

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

Czech Journal of
**GENETICS AND
PLANT BREEDING**

Genetika a šlechtění

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

4

VOLUME 35
PRAGUE 1999
ISSN 1212-1975

CZECH JOURNAL OF GENETICS AND PLANT BREEDING

An international journal published under the authorization by the Ministry of Agriculture and under the direction of the Czech Academy of Agricultural Sciences

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření Ministerstva zemědělství České republiky a pod gescí České akademie zemědělských věd

Abstracts from the journal are comprised in the databases: Agrindex, Biol. Abstr., Bibl. Agri., Chem. Abstr., Field Crop Abstr., Helminthol. Abstr., Herb. Abstr., Landwirt. Zentralbl., Plant Breed. Abstr.

EDITORIAL BOARD – REDAKČNÍ RADA

Chairman – Předseda

Ing. Václav Šíp, CSc.

Members of the Editorial Board – Členové redakční rady

Ing. Bohumír Cagaš, CSc., prof. Ing. Jiří Černý, DrSc., Ing. Antonín Fojtík, CSc., Ing. Alena Hanišová, prof. Ing. Oldřich Chloupek, DrSc., Ing. Josef Konrád, CSc., prof. Ing. Antonín Kováčik, DrSc., Ing. Josef Pešek, DrSc., prof. dr. Ing. Jan Rod, DrSc., RNDr. Erik Schwarzbach, dr. agr. habil., Ing. Josef Špunar, CSc., Ing. Jaroslav Tupý, DrSc.

Foreign Members of the Editorial Board – Zahraniční členové redakční rady

Dr. I. Bos (The Netherlands), Prof. Dr. V. A. Dragavcev (Russia), PD. Dr. A. Jahoor (Denmark), Prof. Dr. A. Mesterházy (Hungary), O. Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. P. Ruckebauer (Austria), Prof. Dr. Z. Staszewski (Poland), RNDr. D. Šubová (Slovak Republic), Ing. M. Užik, DrSc. (Slovak Republic)

Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Marie Černá, CSc.

Aims and scope: The journal publishes original scientific papers, preliminary reports, short communications and reviews. Paper are published in English, Czech, or in Slovak.

Periodicity: The journal is published quarterly, Volume 35 appearing in 1999.

Acceptance of manuscripts: Two copies of manuscript should be addressed to: Ing. Marie Černá, CSc., editor-in-chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic, tel.: 02/24 25 34 89, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz.

Subscription information: Subscription orders can be entered only by calendar year (January-December) and should be sent to: Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Subscription price for 1999 is 62 USD (Europe), 64 USD (overseas).

Cíl a odborná náplň: Časopis publikuje původní vědecké práce, předběžná krátká sdělení a odborná review. Práce jsou publikovány v angličtině, češtině nebo ve slovenštině.

Periodicita: Časopis vychází čtvrtletně. Ročník 35 vychází v roce 1999.

Přijímání rukopisů: Rukopisy ve dvou vyhotoveních je třeba zaslat na adresu redakce: Ing. Marie Černá, CSc., vedoucí redaktorka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, Česká republika, tel.: 02/24 25 34 89, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz.

Informace o předplatném: Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze na celý rok (leden-prosinec) a měly by být zaslány na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1999 je 232 Kč.

GENETICKÁ TRANSFORMACE ROSTLIN

Cílená genetická transformace kulturních rostlin je v současnosti nejen účinným doplňkem konvenčních šlechtitelských metod, ale také otevírá možnosti, jaké klasické šlechtění objektivně neposkytuje. Dnes je možné – alespoň teoreticky – introdukovat gen z libovolného donora (bakteriálního, rostlinného, živočišného) do libovolného recipienta a zajistit jeho expresi v cílovém orgánu rostliny. Praktická realizace tohoto postupu naráží samozřejmě ještě na řadu technických problémů, nicméně velmi razantní postup základního výzkumu spolu s komercializací prvních transgenních odrůd rostlin v průběhu 90. let naznačuje jasně, kterým směrem se bude moderní šlechtění rostlin ubírat. Příznačná je v této souvislosti rychlost, s jakou byly teoretické poznatky realizovány v praxi. První transformační experimenty na klasických rostlinných modelech (tabák, petúnie) proběhly počátkem 80. let a ukázaly obrovské potenciální možnosti nové technologie. Dosažené výsledky prakticky ihned iniciovaly strategický výzkum transgenozy u hospodářsky významných plodin. Tak např. již koncem osmdesátých let (1988) bylo publikováno vytvoření herbicid-tolerantní sóje, začátkem devadesátých let proběhlo její masivní zkoušení na několika desítkách lokalit v USA a v roce 1995 byla Roundup ReadyTM sója povolena pro komerční pěstování. V roce 1999 byla transgenní sója v USA pěstována na 15 milionech hektarů, což představuje plných 50 % veškerých ploch sóje pěstované v USA; v Argentině byla transgenní sója pěstována v roce 1999 dokonce na 90 % ploch. Sója tak jednoznačně dominuje světovému trhu transgenních plodin (54 %) a je v současnosti následována zejména transgenní kukuřicí (28 %), řepkou (9 %) a bavlníkem (9 %). Po roce 2000 se očekává, že na světovém trhu budou k dispozici transgenní odrůdy asi u 25 rostlinných druhů. S plochami pěstování transgenních plodin souvisí i globální trh – během pěti let (1995–1999) se tržby za produkci transgenních plodin zvýšily třicetkrát (ze 75 milionů USD v roce 1995 na odhadovaných 2,3 bi-

lionů USD v roce 1999) a prognóza na rok 2000 je 3 biliony USD a na rok 2005 25 bilionů USD.

Z hlediska vlastností / znaků, které byly do kulturních rostlin genetickou transformací vneseny, byla pozornost nejprve věnována vlastnostem souvisejícím s pěstebními technologiemi (tolerance k herbicidům, rezistence k hmyzím škůdcům a virům) a teprve později nutriční či technologické kvalitě produktů (kvalita a kvantita obsahových látek plodů a semen – proteiny, škrob, tuky a jejich skladba; chuťové vlastnosti; regulace dozrání plodů ve vztahu k transportu a skladování; modifikovaný lignin u dřevin, umožňující jeho snazší extrakci z celulózy, aj.). Specifickou oblastí jsou okrasné rostliny s transformacemi zaměřenými zejména na změny barvy květů. V současnosti nejnovějším (a patrně také nejpřespektivnějším) trendem genetické transformace rostlin je tzv. „molecular farming“, tedy konstrukce rostlin schopných produkovat v ekonomicky uspokojivém měřítku vysoce hodnotné bioprodukty typu vakcín, farmaceutik a řady jiných specifických sloučenin (např. komponent pro biodegradovatelné plasty).

Monotematické číslo časopisu *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* přináší zainteresovanému čtenáři soubor přehledných článků o stavu výzkumu a praktických aplikací genetické transformace u vybraných skupin kulturních rostlin. Tyto přehledy pochopitelně nemohou problematiku postihnout vyčerpávajícím způsobem, neboť v uvedené oblasti bylo ve světě publikováno několik desítek tisíc původních vědeckých prací a rovněž velké množství odborných přehledů či ekonomických statistik a analýz. Důraz je tedy kladen především na ty vědecké poznatky, které již v současnosti našly praktické uplatnění ve šlechtění rostlin či průmyslovém zpracování rostlinných produktů a které slibují praktické přínosy v blízké budoucnosti. Vzhledem k omezenému rozsahu čísla časopisu plánujeme zveřejnit další přehledy o transgenozě u dalších významných plodin (obiloviny, brambory, luskoviny, okrasné rostliny) postupně v roce 2000.

RNDr. Miroslav Gríga, CSc.
AGRITEC, spol. s r. o., Šumperk

GENETIC TRANSFORMATION OF HIGHER PLANTS

Targeted genetic transformation of higher plants represents an efficient supplement of conventional breeding methods, and – at the same time – it offers the possibilities which cannot be objectively achieved via classical plant breeding. Recently, it has been possible – at least theoretically – to introduce a gene from any donor organism (bacterial, plant or animal one) to any recipient and regulate its expression in target plant organ. Practical realization of this general procedure is still connected with a number of technical problems; however, rapid progress in basic research together with the commercialization of the first transgenic plant varieties in the first half of nineties shows clearly the trends of modern plant breeding. The speed at which the theoretical knowledge was applied in practice is very characteristic of this process. First transformation experiments with plant model species (tobacco, *Petunia*) were carried out at the beginning of the eighties and demonstrated an enormous potential of the new technology. The results immediately initiated practically orientated strategic research on genetic transformation in economically important crops. Thus, e.g. in 1988 the construction of herbicide-tolerant soybean was published in the USA, the large-scale field testing of these materials followed during the first half of the nineties, and finally the Roundup ReadyTM soybean was released for commercial growing in 1995. In 1999 transgenic herbicide-tolerant soybean was grown on 15 million hectares in the USA, which represented 50% of the total US soybean area; in Argentina, the transgenic soybean was grown even on 90% of the national growing area of soybean in 1999. Thus, soybean explicitly dominates the global market of transgenic crops (54%) followed by corn (28%), canola / rapeseed (9%) and cotton (9%). Transgenic varieties in ca. 25 plant species are expected on the market after 2000. The global market for transgenic crop products has grown rapidly during the period 1995 to 1999 – the revenues have increased by approximately thirty times (from \$75 million in 1995 to

estimated \$2.3 billion in 1999) and global market is projected to reach \$3 billion in 2000 and \$25 billion in 2005.

From the point of view of traits incorporated to culture crops by genetic transformation, the attention was initially paid to characters related to growing practices (herbicide-tolerance, insect-resistance, virus-resistance) and only later to enhanced nutritional or technological quality of the plant products (quality and quantity of compounds in the fruits and seeds – proteins, starch, oils and their composition; taste characters; regulation of fruit ripening as related to transport and storage; modified lignin in trees facilitating its easy removal from cellulose etc.). A specific area is the transformation of ornamentals directed mainly to flower-colour changes. Recently, the new and probably the most promising trend in plant genetic transformation has been “molecular farming”, i.e. the construction of plants able to produce high-value bioproducts such as vaccines, pharmaceuticals and specialty chemicals (e.g. components for biodegradable plastics).

The monothematic issue of the Czech Journal of Genetics and Plant Breeding brings to interested readers several reviews dealing with recent state and practical applications of genetic transformation in selected culture crops. These reviews, of course, cannot cover the topic exhaustively because up to date several tenths of thousands of original papers as well as many reviews and economic analyses have been published dealing with plant transgenesis and its economic impact. Thus, the stress is laid mainly on these results, which were practically applied in plant breeding or processing of plant products and which promise practical application in the near future. As the issue of the journal is limited by pages we plan to publish further reviews about plant transgenesis in other economically important groups of plants (cereals, grain legumes, potatoes, fodder grasses, ornamentals) successively in 2000.

RNDr. Miroslav Gríga, CSc.
AGRITEC, Ltd., Šumperk

ÚVOD DO PROBLEMATIKY TRANSGENOZE ROSTLIN

INTRODUCTION TO PLANT TRANSGENOSIS

M. Ondřej

Institute of Plant Molecular Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, Czech Republic

ABSTRACT: A possibility of introduction of cloned foreign genes into the plant genome arose in 1978 by demonstration of transfer of a small part of Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* into the plant genome. It opened the door for broad plant transgenesis research. The tools of plant transgenesis are *A. tumefaciens* mediated gene transfer and direct gene transfer, mostly by biolistic method. Currently there are about 50 new transgenic plant varieties, there are plants resistant to herbicides, insect pests, virus diseases, transgenic plants with manipulated spectrum of seed storage oils, tomatoes with increased shelf life and plants with pollen sterility. The main transgenic crop species are maize, cotton, soybean, rape, potato, tomato, tobacco, chicory, squash, carnation. A much broader spectrum of species and transgenes are in preparation. Despite that transgenic plants, which allow to reduce the use of agrochemicals, are more friendly to the environment and human health than classical large-scale industrial agriculture practices, there are worries about the possible hitherto undetected deleterious effects which are reviewed. No adverse effects have actually been found. Only during the last year, there were some small problems connected with the *B. thuringiensis* δ -endotoxin transgene already used in crop varieties and other insect resistance transgenes, which are not yet used in crop varieties. They are analysed in detail and it is shown that they do not present any serious problems.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*; T-DNA; transgene; herbicide tolerance; virus resistance; insect pests resistance

ABSTRAKT: Transgenoz rostlinného genomu z hlediska tvorby nových odrůd kulturních rostlin představuje přirozené rozšíření metod využívaných ve šlechtění rostlin, jak se postupně vyvíjely v tomto století: od výběru a hybridizace k využití polyploidie, indukce mutací, metod tkáňových odrůd a buněčných manipulací až ke genovým manipulacím. První transgenní odrůda byla tržně uvolněna v roce 1994 a v současné době se ve světě pěstuje přes 50 transgenních odrůd na ploše 400 000 km². Současné transgenní odrůdy představují stále ještě první generaci a jsou založeny na transgenech, které byly vyvinuty před asi patnácti lety. Transgeny současných transgenních odrůd podmiňují toleranci k herbicidům, odolnost k hmyzím škůdcům, změny složení zásobních olejů a proteinů semen, prodloužení tržní zralosti plodů rajčat a životnost fezaných květů, pylovou sterilitu pro heterozní šlechtění a další šlechtitelsky významné znaky. Přípravuje se řada dalších transgenů, které podmiňují odolnost k bakteriálním a houbovým chorobám, fyziologické a vývojové změny, produkci významných vzácných proteinů pro farmakologické využití a nové typy transgenních rostlin pro průmyslové využití. Jedná se o nové genotypy, a proto je nutná předběžná opatrnost, aby se zabránilo případným nepříznivým vlivům transgenních rostlin na přírodní prostředí, biodiverzitu a zdraví lidí a zvířat. Tato opatrnost je zajištěna aktivitou biologů i legislativními opatřeními. U nás funguje Česká komise transgenoz rostlin, která je poradním orgánem Ministerstva životního prostředí, a do závěrečné fáze se dostává příprava zákona o geneticky modifikovaných organismech. Zákon by měl platit od 1. září 2000. Je třeba konstatovat, a prozatímní zkušenosti to ukazují, že transgenní odrůdy jsou šetrnější k životnímu prostředí než dosavadní běžné velkovýrobní zemědělské technologie.

Klíčová slova: *Agrobacterium tumefaciens*; T-DNA; transgen; tolerance k herbicidům; rezistence k virům; rezistence ke škůdcům

MECHANISMUS TRANSGENOZE

V roce 1978 bylo prokázáno, že při indukci rostlinných nádorů působením bakterií *Agrobacterium tumefaciens* dochází k přenosu genetické informace z bakterie do rostliny. Toto zjištění nastrovalo výzkum transgenoz rostlin. Prvé transgenní rostliny s geny jinými než původními, vnášenými do rostlinného genomu prostřednictvím *A. tumefaciens*, byly k dispozici

roce 1982 a již v témže roce se podařilo získat také transgenní rostlinné buňky vzniklé přímou transformací prostřednictvím rekombinovaných plazmidů, bez použití *A. tumefaciens*. V roce 1983 se objevily první šlechtitelsky využitelné transgenní rostliny s transgeny pro rezistenci k herbicidům, hmyzím škůdcům, virům a další. V roce 1994 se v USA objevila první transgenní odrůda „FlavrSavr“ se zvýšenou trvanlivostí plodů.

V první etapě se při aplikaci ve šlechtění rostlin vycházelo z klonovaných genů, které byly k dispozici, a šlechtitelský cíl se řídil možnostmi jejich využití. V současné době je již klonováno velké množství genů různých organismů a u mnoha z nich je k dispozici značné kvantum informací o funkci. Díky tomu je možné používat jinou strategii – stanovovat šlechtitelské cíle, kterých má být dosaženo transgenozí, a pak hledat odpovídající klonované geny, kterými bude pravděpodobně možno tohoto cíle dosáhnout.

Bakterie *Agrobacterium tumefaciens* obsahují velký plazmid Ti (o velikosti stovek kilobází), jehož poměrně konstantní část, zvaná T-DNA, se při interakci bakterií a rostlinných buněk přenáší do rostlinného genomu a integruje se do rostlinných chromozomů. T-DNA může přenášet jakékoli geny. Jediné sekvence DNA, které musejí být stále zachovávány, aby T-DNA plnila svou funkci, jsou tzv. hraniční sekvence – úseky 25 párů bází (bp) na obou koncích DNA. Tento přenos T-DNA je vlastně pozměněný proces bakteriální konjugace.

Funkce, potřebné pro vystřížení T-DNA z plazmidu Ti a její konjugativní přenos do rostlinných buněk, jsou uloženy na části plazmidu Ti, která se do rostlinných buněk nevnaší – jeho úseku virulence. Integrace T-DNA do rostlinného genomu je podmíněna spolupůsobením proteinů nesených úsekem T-DNA z bakteriální buňky a enzymů pro reparaci genetického poškození v rostlinné buňce.

K přenosu T-DNA do rostlinného genomu dochází i tehdy, jestliže T-DNA a úsek virulence jsou na různých plazmidech. To je velmi výhodné proto, že z T-DNA se používají jen hraniční sekvence, které tvoří hranice úseku přenášeného do rostlin, který obsahuje zcela jiné geny než původní přírodní geny T-DNA. Přenos takového T-DNA do rostlinných buněk zprostředkovává plazmid Ti, jehož celá T-DNA byla odstraněna, ale úsek virulence zůstal nepoškozen (nazývá se pomocný plazmid). Nová T-DNA je na malém vektorovém plazmidu, který se snadno upravuje metodami genového inženýrství. Upravená T-DNA musí obsahovat gen, který umožňuje selektovat transformované rostlinné buňky v kulturách *in vitro*. Všechny takovéto geny musí mít regulační úseky (promotor na 5'-konci a terminátor na 3'-konci) z rostlinného genomu, genů T-DNA nebo genů rostlinných virů. Velice se osvědčily některé geny pro rezistenci k antibiotikům (kanamycinu, hygromycinu) a některé geny pro rezistenci k herbicidům (fosfinothricinu). Kromě toho T-DNA obsahuje také gen, který chceme do rostlinného genomu přenést. Může to samozřejmě být i několik genů současně. Vektorový plazmid obsahuje počátek replikace, který funguje jak v buňkách *A. tumefaciens*, tak v buňkách *E. coli* (protože tam se provádí vlastní úprava vektorového plazmidu). Musí dále obsahovat nejméně jeden gen pro rezistenci k antibiotiku, ale tentokrát s původními bakteriálními regulačními sekvencemi pro selekci bakterií *E. coli* a *A. tumefaciens*, které vektorový plazmid obsahují. Geny mimo T-DNA se obvykle do rostlinného genomu nepřenesají, ale přenést se mo-

hou. První vektorové plazmidy binárních vektorů byly k dispozici v roce 1982. Takovéto vektory paradoxně již ve stejném roce stály u zrodu přímé transformace, bez bakterií *A. tumefaciens*. Rostlinné protoplasty byly krátkodobě kultivovány v živném roztoku, který obsahoval vektorový plazmid binárního vektoru. U rostlin, regenerovaných z takto ovlivněných protoplastů, se vzácně objevovaly znaky podmíněné geny T-DNA (rezistence k antibiotikům). V dalším vývoji se záhy zjistilo, že při přímé transformaci se neuplatňují hraniční sekvence T-DNA a nemusejí tedy být součástí vektorových plazmidů pro přímou transformaci.

Aby bylo možné selektovat transformované buňky, musí být rezistentní k určité látce v prostředí – živném médiu pro tkáňové kultury. Geny, které podmiňují takovou odolnost, se nazývají selektovatelné geny, protože umožňují selektovat klony pocházející z transgenických buněk. Kódující sekvence genů pro rezistenci k antibiotikům pocházejí z bakteriálního genomu, ale jejich regulační sekvence je z rostlinného genomu, genomu T-DNA nebo genomu rostlinných virů. Takovéto geny, sestavené z částí pocházejících z různých genomů, se nazývají chimické geny. Bylo vyzkoušeno mnoho genů pro rezistenci k antibiotikům, ale zvláště dobře využitelný je gen pro rezistenci ke kanamycinu. Jeho kódující sekvence pochází z bakteriálního transpozonu Tn5 a kóduje enzym neomycinfosfotransferázu II (nptII), která působí inaktivaci kanamycinu jeho fosforylací. Využití kanamycinu má tu výhodu, že toto antibiotikum je pro své závažné vedlejší účinky používáno v medicíně poměrně zřídka. Podobně se využívá gen pro rezistenci k hygromycinu, který kóduje hygromycinfosfotransferázu. Hygromycin je antibiotikum, které je toxické jak pro prokaryontní, tak pro eukaryontní buňky a k léčení lidí se nepoužívá vůbec. V laboratoři je s ním třeba zacházet velmi opatrně, protože je toxické ve stopových množstvích i pro člověka. Často se jako selektovatelný používá gen pro rezistenci k herbicidu fosfinothricinu, čímž případné problémy, vyplývající z rezistence transgenických rostlinných pletiv k antibiotikům, zcela odpadají.

Signální (reportérové) geny jsou takové, jejichž projev lze snadno sledovat, a tím zjistit, zda a jak je daný inzert v daném místě genomu aktivní, jak jsou u daného organismu a v daném pletivu aktivní jeho promotor a další regulační sekvence. Konečně je možné konstruovat chimické geny, které kódují chimické proteiny, jejichž jedna část má aktivitu proteinu, kódovaného reportérovým genem, a druhá část enzymovou aktivitu, kterou jsme chtěli do rostlinných buněk vnést pro zlepšení jejich šlechtitelských znaků.

Existuje několik základních, hojně užívaných typů reportérových genů:

1. Gen GUS pro β -glukuronidázu *E. coli*. Enzym štěpí různé přirozené i syntetické glukuronidy. Některé syntetické glukuronidy dávají po rozštěpení nefluoreskujícího substrátu fluoreskující látku nebo tmavě modře zbarvenou krystalickou, ve vodě nerozpustnou látku, která obvykle zůstává lokalizována v buň-

kách, v nichž byla rozštěpena, a dochází tak k jejich histochemickému barvení. Gen GUS je již více než deset let reportérovým genem čísla jedna.

2. Gen LUC pro luciferázu ze světlušky *Photinus pyralis* nebo bakterie *Vibrio harvei* – enzym, který působí světélkování substrátu luciferinu. To lze sledovat ve tmě vysoce citlivou televizní kamerou, ale také luminimetrem, popř. scintilačním počítačem, nebo je lze zaznamenat na fotografický film. Substráty a zařízení jsou již podstatně dražší, a proto tento systém nedoznal ani zdaleka takového rozšíření jako systém předchozí.
3. Gen pro GFP (green fluorescent protein – zelené fluoreskující protein). Gen pochází z medúzy *Aequorea victoria* a je široce využíván zvláště pro transgenozu živočichů ke sledování vývojových, cytogenetických a virologických otázek. U rostlin byl v první konstrukci genu jen málo účinný, protože tam nebyla z více důvodů dostatečná exprese proteinu, ale to se již podařilo odstranit.

METODY TRANSGENEZE

Klasickou metodou transgeneze rostlinných buněk prostřednictvím bakterií *Agrobacterium tumefaciens* je tzv. disková metoda, kterou vyvinul Horsch se spolupracovníky od firmy Monsanto (Horsch, Klee, 1986). Spočívá v tom, že suspenzi bakterií *Agrobacterium* se působí na disky vysekané korkovrtem z listových čepeří mladých, sterilně kultivovaných rostlin. Vysekávání disků korkovrtem zaručuje stejnou plochu poraněného pletiva, na které bude působit buněčná suspenze (poranění rostliny je základním předpokladem transgeneze bakteriemi *Agrobacterium*). V praktických pokusech s různými materiály se nemusí pracovat právě s listovými disky, ale vyhovují jakékoli čerstvě asepticky nařízané segmenty sterilně kultivovaného rostlinného materiálu, u nichž jsou zkušenosti, že na použitých médiích pro rostlinné explantáty budou mít dobrou schopnost kalogeneze a organogeneze. Používají se také segmenty hypokotylů, lodyh nebo kořenů. Po působení bakterií se disky krátce osuší a umístí na agarové živné médium, které obsahuje růstové látky (analogy auxinů i cytokininů) v hladinách vhodných pro indukci kalogeneze. Na tomto médiu se ponechají jen krátce (1–3 dny), aby byl poskytnut dostatečný čas pro transformaci, ale aby bakterie nepřerostly segment rostliny. Pak se přenesou segmenty na jiné agarové médium, které obsahuje antibiotika pro eliminaci bakterií *Agrobacterium* (Carbenicilin, Claphoram nebo další) a dále antibiotika, na základě kterých je možné selektovat transformovanou rostoucí pletiva (kanamycin, hygromycin) případně herbicidy, které umožňují obdobnou selekci (Basta), podle selektovatelného transgenu v DNA. Dále musí živné médium obsahovat růstové látky v koncentracích podporujících kalogenezi a ještě více organogenezi. Někdy dochází ke kalogenezi a organogenezi transgenních pletiv paralelně, jindy je třeba rostlinné

segmenty postupně přenášet na dvě média (pro kalogenezi a pak pro organogenezi). Za dva až čtyři týdny se obvykle objeví kalusy v místech poranění rostlinných segmentů a současně nebo o něco později také regenerace pupenů. Regenerované pupeny se pasážují na další médium, obvykle bez růstových látek nebo s růstovými látkami, které stimulují tvorbu kořenů, ale stále s antibiotiky pro eliminaci bakterií a pro selekci transformovaných pletiv. V konečném stadiu, kdy je známo, že transgenní rostliny již neobsahují bakterie *Agrobacterium* (bakterie se nedají nakultivovat), je možno transgenní rostliny přenést do země.

V případě velkých problémů s kalogenezí a regenerací rostlin se někdy používá metoda působení na růstové vrcholy, kultivované *in vitro*. Suspenzi agrobakterií se působí na co nejmenší úsek růstového vrcholu (téměř jen vrcholový meristém) a následně se materiál přenesou na agarovou živnou půdu, která obsahuje antibiotika pro eliminaci bakterií *A. tumefaciens*. Pak se aplikuje médium s antibiotikem, které umožňuje selekci transformovaných buněk. Pokud dojde k transformaci, vegetační vrcholy a z nich dále rostoucí pletiva jsou chimérické a vyselektovat pouze transformovaná pletiva z chimérického stavu je obtížné. Proto je účinnost této metody poměrně malá a používá se zřídka.

Pro kokultivaci s bakteriemi *A. tumefaciens* k získání transgenních rostlin je možno využít také rostlinné protoplasty. Tato metoda byla jednou z prvních, které byly pro transformaci rostlin využity. Získalo se jí mnoho zajímavých teoretických výsledků u tabáku, ale dnes se již prakticky nepoužívá.

Pouze u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* se podařila transformace ve stadiu bobtnajících semen nebo otevírajících se květů. Transformované rostliny se pak v nízké frekvenci objevují v následující generaci. Při metodě transformace nově se vytvářejících květů se využívá vakuové infiltrace bakterií do rostlinných pletiv. Tato infiltrace se pak začala používat i pro transformaci segmentů rostlin a obecně jsou s ní dobré zkušenosti – zvyšuje frekvenci transformačních událostí.

V prvních fázích využití bakterií *A. tumefaciens* bylo konstatováno, že této metodě je přístupná většina druhů dvojděložných rostlin, některé rostliny nahosemenné, ale prakticky žádné jednoděložné. Využíváním vysoce virulentních kmenů *A. tumefaciens* (z nichž některé mají zdvojeny některé geny úseku virulence) a současným vylepšováním metod kokultivace rostlinných pletiv s bakteriemi, stejně jako metod regenerace rostlin po kokultivaci se spektrum rostlinných druhů podstatně rozšířilo a zahrnuje i hlavní jednoděložné kulturní rostliny, především obilniny. V současné době lze prakticky veškeré kulturní rostliny transformovat bakteriemi *A. tumefaciens*, ale účinnost je velice různá. Pro některé rostlinné druhy je výhodnější využít přímého vnášení exogenní DNA, bez využití bakterií *A. tumefaciens*.

Existuje celá řada metod přímé transformace, z nichž některé jsou založeny na aplikaci roztoku cizorodé DNA na rostlinné protoplasty, jiné na celá pletiva.

Všechny metody mají společné to, že gen nebo skupina genů, které mají být vneseny, jsou na vektorovém plazmidu, případně směsi dvou plazmidů. Plazmidy jsou namnoženy v buňkách *E. coli*, vyzolovány a použity k transgenozí. Stejně jako při transgenozí prováděné pomocí bakterií *A. tumefaciens*, obsahuje plazmid selektovatelný gen, projevující se v rostlinách, a gen, který má být do rostlin vnesen. Plazmid pro přímou transformaci obsahuje také gen pro rezistenci k antibiotiku, využívaný v bakteriích *E. coli*, s bakteriálními regulačními sekvencemi, který se může, ale nemusí zabudovat do rostlinného genomu (zabudování je v podstatě náhodný proces, který využívá rostlinných enzymů pro opravu genetického poškození).

Bylo zkoušeno také použití celkové, neklonované DNA donorového organismu. Tam však je gen, který má být přenesen, mnohořádkově zředěn ostatní genomovou DNA a pravděpodobnost detekce pozitivního výsledku bez možnosti využití selektivního tlaku je prakticky nulová. Jen tehdy, jestliže se do protoplastů vnášela celková DNA rostliny, transformované předtím T-DNA se selektovatelným genem pro rezistenci ke kanamycinu, se podařilo v suspenzi protoplastů, do nichž byla tato DNA vnesena, s extrémně nízkou frekvencí vyselektovat za silného selektivního tlaku transgenní mikrokalusy, rezistentní ke kanamycinu.

Nejvíce se v současné době využívá nastřelování mikropojektily, tj. aplikace na intaktní pletiva. Vstřelování mikropojektily – mikroskopických kuliček ze zlata nebo jiného inertního kovu, na jejichž povrchu ulpěla vektorová DNA, umožnilo transformovat všechny rostlinné objekty bez rozdílu, i když jen s malou účinností.

Aplikaci na protoplasty je možno provádět při stimulaci příjmu cizorodé DNA polyetylen glykolem, pulzy elektrického náboje (elektroporací) nebo mikroinjekcemi do buněčných jader. Pro mikroinjekce je již možno využít, s menší účinností, i mnohobuněčné útvary (např. embrya).

Existují ještě další metody, jejich účinnost není univerzální – v některých případech jsou účinné jen v laboratořích, v nichž byly vyvinuty. Jednou z nich je metoda makroinjekcí – injekcí pufrů, které obsahují vektorovou plazmidovou DNA v množství řádově desítek mikrolitrů. Takovými mikroinjekcemi do stěbla pod klas v době meiózy bylo dosaženo transformace u žita. Jiným příkladem je metoda působení exogenní DNA na mikrospory a klíčící pylové láčky, která byla vyvinuta pro obiloviny. Inkorporace exogenní DNA do jader buněk (obvykle embryogenních) buněčné suspenze byla stimulována azbestem nebo silikon karbidem.

Oběma metodami, přímého vnášení DNA i vnášení prostřednictvím bakterií *A. tumefaciens*, lze sledovat také dočasnou (tranzientní) expresi reportérových genů. Jedná se o to, že bezprostředně po působení bakterií *A. tumefaciens* nebo aplikaci cizorodé DNA do buněčných jader proniká mnoho vláken cizorodé DNA. K transkripci vnesených genů dochází i na základě DNA, neintegrované do chromozomů. Současně dochází k degradaci vnesené DNA a někdy k inkorporaci je-

jího malého podílu do chromozomů. mRNA, která vznikla na základě transkripce neintegrováných kopií genu, podmiňuje krátkodobou expresi reportérového genu (obvykle GUS) v rostlinných protoplastech nebo pletivech. Tranzientní exprese začíná několik hodin po působení exogenní DNA a končí po několika dnech.

Dalším zajímavým jevem, spojeným s transformací bakteriemi *A. tumefaciens*, je agroinfekce, tj. infekce virem, jehož genom byl vnesen do rostlinných buněk na T-DNA. Předpokladem je, aby byl na T-DNA přítomný v tandemové kopii. Takto byl do genomu rostlin vnesen virus žilkové mozaiky kvěťáku (CaMV), geminivirus kukuřice MDV – máze dwarf virus. Tímto způsobem, ve formě kopií DNA, je možné do genomu senzitivních rostlin vnášet také viroidy. Nepodařilo se to ale u virů, jejichž dědičnou složkou je DNA. Mechanismus agroinfekce není stále zcela jasný.

Obecně lze konstatovat, že metody transgenozí prostřednictvím *A. tumefaciens* mají četné výhody proti metodám bezvektorového přenosu DNA. Prostřednictvím T-DNA lze do akceptorové rostliny vnášet i velký úsek cizorodé DNA (byly přeneseny úseky delší než 100 kb), zatímco při použití bezvektorového přenosu se délka pohybuje jen v kilobázích DNA. Pokud je třeba transgenozí přenést při bezvektorovém přenosu více než dva geny současně, lze to nejsnadněji provést tzv. kotransformací, využitím směsi dvou nebo více různých vektorových plazmidů.

EXPRESSE TRANSGENŮ

Transgeny, zvláště ty, které jsou používány pro obohacení genomu kulturních rostlin, obvykle nejsou jen klonované geny z jiných organismů. Jsou to současně geny upravené. Úpravy často spočívají v tom, že původní promotor je nahrazen jiným, který zajišťuje v daném příjemci vhodnou expresi, ať již konstitutivní, orgánově specifickou nebo specifickou pro určité stadium vývoje či konečně specifickou pro určité vnější podmínky, případně pro kombinaci různých uvedených možností. Promotor musí pocházet z rostlinného genomu, genomu T-DNA nebo genomu rostlinného viru, jehož dědičnou složkou je DNA. Někdy je třeba dodat i další nekódující části genů (koncový nepřekládaný úsek, případně intron). Transgeny se tedy zpravidla skládají z úseků DNA z různých organismů. Transgeny, složené z úseků DNA, pocházejících z různých organismů, se také nazývají chimérické geny. V případě, že kódující sekvence transgeny pochází z taxonomicky odlišného donoru, je třeba k optimalizaci exprese provést úpravy, které zajistí maximální intenzitu transkripce a stabilitu mRNA, případně i zvýší stabilitu proteinu, který je genem kódován. Takovéto úpravy je možno provádět cílenou mutagenézou, ale v řadě případů se provádí dokonce resyntéza kódující sekvence genu na základě znalosti původní sekvence a znalosti složení souboru mRNA akceptora a dalších parametrů jeho genomu, případně i empiricky.

Můžeme rozlišit asi tři hlavní typy transgenů:

1. Transgeny, které pocházejí z nepříbuzných genomů (živočišných, bakteriálních, virových a genomů nepříbuzných rostlin).

2. Transgeny, které pocházejí z genomu identického nebo velmi podobného donorovému, ale jsou pozměněny (mutací, k níž došlo již v donorové rostlině nebo která byla vyvolána cílenou mutagenézou klonovaného genu *in vitro*, nebo jsou změněny resyntézou původního genu). Některé transgeny, podmiňující např. rezistenci rostlin ke specifickému systémovému herbicidu glyfosátu, jsou právě tohoto typu.

3. Transgeny, které kódují antisense RNA. Antisense RNA je komplementární k mRNA nebo virové RNA, v buňkách s ní vytváří dvojvláknové duplexy, které nejsou transkripčně aktivní, jsou rozeznávány rostlinnými RNázami a jsou degradovány. Výsledkem je částečná nebo úplná inhibice funkce původního genu, případně inhibice replikace proteinu.

4. Zatím poměrně málo využívané jsou transgeny, kódující ribozymy, tedy katalytickou RNA, která je schopna způsobit specifické zlomy v úsecích daného typu RNA a tím eliminovat její funkci.

Transgeny mohou mít v akceptorovém genomu dva odlišné typy působení:

1. Jejich exprese vzniká nový protein a nový znak.

2. Jejich exprese dochází ke snížení nebo k eliminaci funkce některého v akceptorovém genomu přítomného genu nebo genové rodiny, případně viru. Tuto funkci nemusí mít jen transgeny, uvedené pod možnostmi 3 a 4, ale za určitých podmínek i ty, které jsou uvedeny pod možnostmi 1 a 2. Zvýšení počtu kopií genu totiž někdy vyvolává inhibici exprese genu již v rostlině přítomného a s ním homologního transgeny, nebo inhibici replikace viru. Zákonitosti, kterými se tato inhibice řídí, jsou známy jen v hrubých rysech a chování celého systému je závislé i na struktuře akceptorového genomu. To vysvětluje, proč má transgen přítomný v jedné kopii často vyšší expresi než transgen přítomný v mnoha kopiích, zatímco v jiných genomech a u jiných transgenů je intenzita exprese úměrná počtu kopií transgenů a v ještě jiných není žádná závislost mezi počtem kopií transgeny a intenzitou exprese.

Je třeba uvést, že intenzita exprese transgeny závisí i na jeho místě integrace v genomu akceptora a intenzita exprese v jednotlivých transgenních liniích se může pohybovat od nulové až do velmi vysoké. Tuto variabilitu lze podstatně omezit použitím tzv. SAR (scaffolding attachment regions) eukaryontní jaderné DNA, pokud jsou lokalizovány ve vektoru v blízkosti obou konců transgeny.

Jednotlivé typy transgenních rostlin, využitelných ve šlechtění, byly opakovaně autorem popsány (Ondřej, 1992, 1997, 1999; Ondřej, Drobník, 1997). Zde bychom se chtěli soustředit výhradně na typy transgenů, které se již používají v současných odrůdách, a na zkušenosti s nimi.

DETEKCE TRANSGENŮ

Prvou indikací transgenozy je růst předpokládaně transgenních pletiv za selektivních podmínek (na médiu s kanamycinem v případě použití selektovatelného transgeny nptII, na médiu s hygromycinem v případě použití selektovatelného transgeny hptII nebo na médiu s fosfinothricinem v případě použití selektovatelného transgeny pat nebo bar). To však není postačující důkaz – nevylučuje to fyziologickou adaptaci nebo genovou mutaci. Objektivní důkaz přináší až molekulární detekce transgeny v rostlinném genomu. Provádí se metodou Southernovy hybridizace, tedy detekce části DNA akceptora, schopné na membráně hybridizovat se sondou insertu. Je možno použít také metody PCR, zvláště takových jejích variant, které vylučují artefakty (zahnížděná PCR – nested PCR), a identitu se sekvencí celého transgeny je možno prokázat sekvenováním DNA amplifikované při PCR. Samotná přítomnost transgeny však ještě nemusí nutně znamenat jeho aktivitu – tu lze zjistit na základě specifických testů na úrovni proteinů nebo jejich enzymatické aktivity, případně jejich dalších produktů.

TYPY TRANSGENŮ JIŽ UŽÍVANÝCH V TRANSGENNÍCH ODRŮDÁCH

Transgeny pro rezistenci k herbicidům

Toto téma jsme již podrobně zpracovali (Ondřej *et al.*, 1998), a proto zde uvádíme jen základní shrnutí.

1. Transgeny pro rezistenci ke glyfosátu. Glyfosát blokuje aktivitu enzymu, který zprostředkovává syntézu aromatických aminokyselin (fenylalanin, tryptofan, tyrosin). Podstatou rezistence dodané transgenem je nadprodukce enzymu nebo tvorba odlišného enzymu.

2. Transgeny pro rezistenci k herbicidům typu fosfinothricinu. Herbicid blokuje enzym glutaminsyntázu, která detoxikuje amoniové ionty vzniklé redukcí dusičnanů, degradací aminokyselin a dalšími cestami. Transgen pochází z genomu aktinomycety *Streptomyces hygroscopicus* a jím kódovaný enzym, fosfinothricin acetyltransferáza, detoxikuje herbicid.

V současné době existují transgenní odrůdy rezistentní k herbicidům obou typů, které se pěstují na plochách jdoucích do set tisíc čtverečních kilometrů.

Transgeny pro rezistenci ke škůdcům

V současných odrůdách je zatím používán pouze transgen pro δ -endotoxin *B. thuringiensis*. Poprvé byl objeven v Japonsku v roce 1902 v podniku, ve kterém se pěstoval bourec morušový. Bakterie tam působily masový úhyn motýlů. Pak byl znovu objeven v Duryňsku biologem jménem Berliner a podle něho byl v roce 1911 pojmenován. *B. thuringiensis* je Gramm-pozitivní bakterie, která při sporulaci syntetizuje insekticidní

krystalický protein. Protein je tvořen uspořádáním jedné nebo několika polypeptidových podjednotek. Aby získal entomocidní aktivitu, musí být rozpuštěn v alkalickém prostředí ve střevě hmyzu a aktivován proteázami, které specificky odštěpí C-terminální vysokomolekulární část krystalického o 130 kDa a několik aminokyselin na aminokonci. Tím teprve vzniká toxický protein 60–70 kDa. Existuje mnoho různých kmenů *B. thuringiensis*, které syntetizují různé typy δ -endotoxinů. První částečná sekvence genu pro δ -endotoxin byla publikována v roce 1983. V současné době je jich známo asi 130 a jejich proteiny mohou být rozděleny do 20 skupin. Každý typ je toxický pouze pro jeden nebo několik druhů hmyzu. Specifita je dána interakcí receptoru a toxinu, určitou úlohu hraje i rozpustnost krystalů a aktivace proteázami. Geny a proteiny byly utříděny do skupin podle jejich specifity působení na hmyzí řády: Již dávno jsou známy typy toxické pro larvy motýlů, jiné jsou toxické pro larvy dipter a teprve nedávno se objevily typy toxické pro brouky. Toxin se specificky váže na proteiny kartáčkovité membrány střevního epitelu hmyzu a působí na sodíkovou pumpu. Dochází k destrukci plazmatické membrány a k narušení střevních epitelálních buněk. Bakterie *B. thuringiensis* se používají jako biopreparáty k ošetřování zemědělských kultur.

První postřiky směsí spor a proteinových krystalů se prováděly již kolem roku 1930, ale většího rozšíření bylo dosaženo až v roce 1950, kdy byl zaveden preparát ThuricideTM, a pak následovaly další preparáty různých firem.

Daleko lepším řešením je proto vnesení genu pro δ -endotoxin přímo do rostlinného genomu. Transgenní rostliny, u nichž dochází k expresi genu pro δ -endotoxin, se také nazývají „rostlinné pesticidy“. Jsou využívány zatím především u kukuřice, bavlníku a bramboru a snižují náklady na ošetřování porostů. Díky poměrně nízkému rozsahu působnosti δ -endotoxinu působí v podstatě jen na cílového škůdce, ale ne na jiný hmyz. Transgenní rostliny nejsou univerzálním řešením likvidace hmyzích škůdců, ale mohou se stát součástí nových, účinnějších systémů integrované ochrany rostlin. První transgenní rostliny s tímto genem byly získány v roce 1983 a první transgenní odrůdy byly uvolněny v roce 1996. Celkem 13 let tedy trval výzkum různých ekologických a dalších hledisek využití těchto transgenních rostlin v zemědělství. Uvedené první transgenní rostliny byly rostliny tabáku odolné k lyšaji *Manduca sexta* a dalším motýlům, jejichž larvy poškozují rostliny tabáku (*Heliotis virescens*, *Spodoptera*). Nyní je transgen *Bt* již v řadě kulturních rostlin, i když ne všechny jsou uznány jako odrůdy.

Využití genu pro δ -endotoxin *Bacillus thuringiensis* jako transgenu pro navození rezistence rostlin k hmyzím škůdcům je známý systém, který byl poprvé využit již asi před deseti lety (Pfeon, 1997). V poslední době byla jeho účinnost podstatně zvýšena a spektrum hmyzích řádů, na které působí, bylo podstatně rozšířeno (*Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera*). Jednotlivé poddru-

hy a kmeny produkují proteiny s různým spektrem citlivých hmyzích taxonů. Geny pro tyto proteiny byly klonovány a prostřednictvím T-DNA včleněny do rostlinného genomu. Pro zvýšení účinnosti se používaly zkrácené varianty proteinu. Jejich účinnost byla i tak obvykle dosti nízká. Příčinou byla především nestabilita mRNA v rostlinných buňkách. Původní geny byly proto modifikovány. Gen pro δ -endotoxin z *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* byl znovu syntetizován tak, aby bylo využito degenerovaných kodonů, vyskytujících se v rostlinném genomu nejčastěji, při zachování struktury výsledného proteinu. Takovýto gen byl vnesen do genomu bramboru a byla zjištěna vysoká rezistence k mandelince bramborové, tj. vysoká účinnost upraveného genu. Transgenní brambory jsou odolné k mandelince bramborové, jejich výnosové a jakostní parametry zůstávají stejné a mikrobiální populace na transgenních rostlinách se jen nepatrně liší od těch, které byly nalezeny na standardních odrůdách. U tabáku bylo publikováno další podstatné zvýšení proporce δ -endotoxinu v proteinech listů, jestliže byl protein směřován do chloroplastů (McBride *et al.*, 1995). Obdobně byl upraven také gen pro rezistenci k motýlím škůdcům, pro δ -endotoxin cryIA (b) *B. thuringiensis*, který se přenášel do genomu rýže se sekvencí bází v kódujícím úseku upraveném tak, aby poskytoval maximální expresi v genomu rýže.

Transgeny pro rezistence k virům

Hostitelská rostlina, u které dochází k expresi určité sekvence nukleových kyselin patogena, se může stát rezistentní k tomuto patogenu (Baulcombe *et al.*, 1996). Takto byla zjištěna rezistence transgenních rostlin tabáku, v jejichž genomu se projevuje gen pro plášťový protein, k viru tabákové mozaiky. V současné době se projev transgenu pro plášťový protein považuje za obecně působící mechanismus rezistence k odpovídajícímu viru.

Nesprávná funkce mutovaných virových genů, použitých jako transgeny, také všeobecně podmiňuje rezistenci k virům, i když se těchto mechanismů pro navození rezistence kulturních rostlin zatím pro šlechtění nevyužívá. Například gen pro virovou replikázu viru Y bramboru, použitý jako transgen, navozuje rezistenci kulturních rostlin k příslušnému viru. Konstitutivní projev genu však vedl ke zpomalení růstu rostlin.

Transgenní rostliny, které mají ve svém genomu konstitutivně přítomny části virové RNA, i takové, jež jsou kratší než gen, jsou rezistentní k infekci tímto virem, pravděpodobně proto, že konstitutivně přítomná část RNA brání normální replikaci viru.

Transgeny pro změny složení zásobních olejů semen

Jedním ze šlechtitelských cílů ve šlechtění řepky je snížení obsahu kyseliny erukové. Bylo toho dosaženo i tradičním šlechtěním řepky olejné. V USA se pěstuje

řepka, která má velmi nízký obsah kyseliny erukové. Existuje již celá řada typů a linií transgenních rostlin řepky se změněným spektrem mastných kyselin v olejích semen nejen pro potravinářské, ale i pro průmyslové využití (Murphy, 1996)

Óleje semen řepky obsahují 1–2 % kyseliny stearové a méně než 0–1 % kyseliny laurové. Existují linie s obsahem 40 % kyseliny stearové a 40 % kyseliny laurové v olejích semen. Odrůda s vysokým obsahem kyseliny laurové byla již v roce 1995 v USA uvolněna pro komerční využití. Jsou i další linie novošlechtění, z nichž každá obsahuje jeden transgen, který mění obsah mastných kyselin v olejích semen. Odrůda s vysokým obsahem kyseliny laurové obsahuje gen pro lauroyl-ACP thioesterázu z genomu jiné rostliny. Tento enzym způsobuje předčasné ukončení řetězce a hromadění mastných kyselin C_{12} (kyseliny laurové) místo C_{18} (kyseliny stearové a olejové). Óleje s převahou kyseliny laurové jsou využitelné hlavně pro výrobu mýdel a detergentů, ale také v cukrovinkářských tucích a náhražkách mléka. Odrůda s vysokým obsahem kyseliny stearové obsahuje antisense kopii genu pro stearát desaturázu z řepky. Tato antisense genová konstrukce inhibuje projev genomového genu pro stearát desaturázu, což vede k hromadění olejů s nadbytkem kyseliny stearové, protože je blokována její desaturace na kyselinu olejovou. Óleje s vysokým podílem kyseliny stearové je zvláště vhodný pro výrobu margarínů.

Transgeny pro změny složení zásobních proteinů semen

Zlepšení výživné hodnoty semen, tj. dosažení optimálního spektra aminokyselin v zásobních proteinech, bylo dlouholetým cílem programů šlechtění rostlin, zvláště u obilovin a luštěnin. V klasickém šlechtění bylo dosaženo úspěchu tím, že u kukuřice byla identifikována mutace s vysokým obsahem lyzinu v semenech. Přirozená variabilita v obsahu síru obsahujících aminokyselin v proteinech semen je v zásobních proteinech ale poměrně malá. Detekce mutací ve tkáňových kulturách, rezistentních k toxickým analogům aminokyselin, zatím nepřinesla pro šlechtění vznik nových typů rostlin se zásobními proteiny pozměněnými tak, aby to zvýšilo podíl nedostatkových aminokyselin v zásobních proteinech. Proto je zcela na místě řešit tento šlechtitelský problém především transgenozí. Dobrý přehled o dosavadních výsledcích podali Tabě a Higgins (1998).

Celý problém je možno rozdělit na dvě související části: První je zvýšení syntézy nedostatkových aminokyselin a druhá zvýšení proporce zásobních proteinů, které obsahují ve větší míře tyto nedostatkové aminokyseliny. Je snaha především o získání dvou typů genetických změn v souvislosti se změnami proporce nedostatkových aminokyselin v semenech. První přístup spočívá v manipulaci regulace biosyntézy aminokyselin, aby se zvýšila syntéza nedostatkového methioninu. Druhý přístup je inserce a exprese genů, které kódují proteiny bohaté na síru.

Pokud jde o manipulaci biosyntézy nedostatkových aminokyselin, je to především problém zvýšení obsahu volného methioninu a lyzinu. Methionin vzniká v aspartátové dráze biosyntézy aminokyselin, při které vznikají i další esenciální aminokyseliny: lyzin, threonin a isoleucin. Klíčovými enzymy přitom jsou aspartát kináza a dihydropikolinát syntetáza (DHPS). U rostlin mají aspartát kinázovou aktivitu dva izoenzymy a jejich aktivita je inhibována zpětnou vazbou threoninem a lyzinem. DHPS je inhibována zpětnou vazbou lyzinem. Byly ale již klonovány bakteriální geny pro aspartát kinázu i DHPS, které zpětnou vazbou inhibovány nejsou. Tyto geny byly přeneseny do rostlinného genomu s konstitutivními orgánově specifickými promotory. Expres takovýchto genů silně zvyšuje obsah volného lyzinu v transgenních rostlinách. Například v semenech sóji a řepky lze transgenozí takovýmito geny zvýšit obsah volného lyzinu až stonásobně a 17krát zvýšit obsah threoninu, čím se současně zvýšil odpovídající měrou i obsah methioninu. Protože však aminokyseliny v semenech jsou stabilní až jako součást proteinů, a biosyntéza proteinů s vyšší frakcí těchto aminokyselin se zvýšila jen mírně, celkové zvýšení obsahu nedostatkových aminokyselin v zásobních proteinech semen představovalo jen několik procent. Dostatečná zásoba volných aminokyselin je předpokladem syntézy odpovídajících zásobních proteinů, avšak konečným řešením problému zvýšení obsahu nedostatkových aminokyselin je teprve transgenozí geny pro zásobní proteiny s vysokým obsahem aminokyselin methioninu a lyzinu.

Pokud jde o transgenozí geny pro zásobní proteiny semen, relativně bohaté na lyzin, bylo použito klonovaných genů pro několik typů proteinů:

1. První z pokusů lze hodnotit jako neúspěšný. Gen pro β -fazeolin *Phaseolus vulgaris* byl modifikován dodáním 45 nukleotidů kódujících úsek bohatý na methionin z genu pro zein 15 kD. Ačkoliv transkripce tohoto genu byla v transgenních rostlinách dostatečně intenzivní, protein byl nestabilní a ke zvýšení obsahu methioninu v semenech transgenních rostlin tedy nedošlo.
2. Další možností je vytvořit na základě existujících genů pro zásobní proteiny syntetický gen s vysokým obsahem methioninu. Syntetický gen, kódující zásobní protein s vysokým obsahem methioninu, byl vnesen do genomu patátů (sladké brambory, *Ipomea batatas*), což vedlo k významnému zvýšení obsahu methioninu v celkovém obsahu proteinů, ale proti očekávání i k celkovému zvýšení obsahu proteinů. Transgenní sladké brambory jsou ve stadiu polního pěstování.
3. Byl klonován gen pro zein 21 kDa, v němž 28 % aminokyselin tvoří methionin. Gen je využíván pro transgenozí.
4. V obilkách rýže byl zjištěn prolamin 10kDa, obsahující 20 % methioninových reziduí a odpovídající gen byl klonován.
5. Dalším genem je gen pro 2S albumin z paraořechu *Bertholletia excelsa*, který obsahuje 18 % albuminu.

6. Albumin 2S ze slunečnice má rovněž vysoký obsah methioninu. Odpovídající klonovaný gen se rovněž používá k transgenozí s cílem zvýšit obsah methioninu v zásobních proteinech semen.

Těchto šest genů již bylo použito v různých typech transgenních rostlin (kukuřice, řepka, fazole, *Lupinus angustifolius*, *Vicia narborescens*) pro zvýšení obsahu lyzinu a methioninu v semenech. Gen ze slunečnice byl využit u *Trifolium subterraneum* ke zvýšení obsahu methioninu v listech. Odrůdy kulturních rostlin se zvýšeným obsahem methioninu zatím nebyly tržně uvolněny, ale jsou ve stadiu odrůdových zkoušek.

Transgen v genomu rajčat se zvýšenou trvanlivostí plodů

Tato rajčata mají transgen pro antisense sekvenci genu polygalakturonázy, který se projevuje ve zrajících plodech rajčat (Smith *et al.*, 1988). Polygalakturonáza je hlavní enzym, který degraduje polygalakturonidy jako komponenty pektinů v buněčné stěně. Tento enzym, který se projevuje v plodech, je u rajčete syntetizován *de novo* na počátku zrání plodů. Enzym je u rajčete kódován jediným genem. Vznikla myšlenka zavést do genomu gen pro antisense RNA k tomuto genu, jehož exprese by měla vést k potlačení aktivity původního genu. Konečným cílem bylo zabránit měknutí dozrávajících plodů. Výsledky pokusů ukázaly podstatnou redukci aktivity polygalakturonázy. Ačkoli měknutí plodů bylo sníženo jen nevýznamně, rajčata získala nečekaně nové dobré tržní vlastnosti: zvýšenou viskozitu šťávy plodů, zvýšenou odolnost proti mechanickému poškození a zvýšenou odolnost k posklizňovému napadení houby.

Vnesení antisense genu pro polygalakturonázu není jediným způsobem manipulace zrání rajčat. Jiným způsobem je využití antisense genu posledního enzymu při biosyntéze etylénu pro enzym, který zprostředkovává přeměnu 1-aminocyklopropan-1-karboxylové kyseliny (ACC) na etylén. Tím se blokuje celý komplex genů, jež jsou spouštěny pod vlivem etylénu u zralých plodů rajčat. Synchronního dozrání je možné dosáhnout po dopravě na místo prodeje – krátkodobým umístěním v uzavřené nádobě, do níž je zaveden etylén. Tohoto principu se využívá nejen u rajčete k prodloužení životnosti plodů, ale také u karafiátu k prodloužení životnosti květů ve váze.

Transgeny pro pylovou sterilitu

Praktický význam pylové sterility v klasických šlechtitelských postupech spočívá především v nuceném cizosprašení pro produkci heterozního osiva. Při tvorbě transgenních odrůd je často požadavek, aby transgen nebyl přenášen pylem, tj. požadavek pylové sterility. Pylová sterilita, využitelná ve šlechtění (jaderně-cytoplazmatický typ s obnovitelí fertility) neexistuje u všech druhů kulturních rostlin a transgenozí poskytl široce využitelný systém, který využívá chimérického genu pro barnázu z *Bacillus amyloliquifaciens* (Chen,

Nagarajan, 1993). Barnáza je extracelulární RN-áza této bakterie. Je syntetizována jako neaktivní pre-proenzym, u kterého při opuštění bakteriální buňky a odstranění signálního peptidu dochází k jedné úpravě a teprve potom vně bakteriálních buněk ke druhé úpravě a vzniku aktivního enzymu. V bakteriálních buňkách současně existuje vnitrobuněčný inhibitor, protein barstar, který má 89 aminokyselin. Příslušný gen byl rovněž klonován. Upravený, zkrácený gen pro barnázu (zbavený sekvencí, jež jsou u vzniklého proteinu upravovány) byl zařazen za promotor, specifický pro tapetovou vrstvu buněk tabáku (označený TA29) a vnesen transgenozí do genomu tabáku a řepky olejné. Tam působil selektivní destrukci tapetových buněk prašníků a následně degeneraci pylových zrn. Stejný vliv měl i chimérický gen pro ribonukleázu T₁ z *Aspergillus oryzae* s promotorem TA29. Pokud se použije obdobným způsobem v jiné transgenní linii gen *barstar* se stejným promotorem, pak tato linie může působit obdobně jako obnovitel fertility při klasické nukleocytoplazmatické pylové sterilizaci.

TYPY DALŠÍCH TRANSGENŮ VYUŽITELNÝCH V TRANSGENNÍCH ODRŮDÁCH

Existuje řada fyziologických změn rostlin, navozených transgenozí. Příkladem takovéto fyziologické změny, výhodné ve šlechtění bramboru, může být inhibice tmavnutí mechanicky poškozených částí hlíz bramboru při skladování a při výrobě bramborových lupínků. Bylo toho dosaženo tím, že do genomu bramboru byl vnesen chimérický gen, který obsahoval jako promotor antisense sekvenci genu pro polyfenol oxidázu. V polních pokusech s následujícím skladováním hlíz bramboru bylo zjištěno podstatné snížení tmavnutí poškozených hlíz. Jiným šlechtitelsky využitelným fyziologickým znakem je odolnost proti vytahování, podmíněná například nedostatkem světla při hustém sponu rostlin. U genomu tabáku toho bylo dosaženo vnesením transgeny pro syntézu fytochromu A. Vytahování rostlin je podmíněno účinky fytochromu B, celková reakce rostliny však závisí na poměru fytochromu A a fytochromu B. Expresí transgeny pro fytochrom A se mění tento poměr ve prospěch fytochromu A a v důsledku toho se snižuje vytahování způsobené zastíněním. Vnášení genů pro nové cesty biosyntézy flavonoidů a antokyanů umožňuje nazvat změny barvy květů, především u petúnie. Vnesením transgeny pro nový enzym biosyntézy antokyanů (dihydroflavonol-4-reduktázu) bylo dosaženo nové, cihlově červené barvy květů petúnie. Jiný typ změn květních barv byl navozen vnesením transgeny pro antisense enzymu pro chalkonsyntázu, který zprostředkovává jeden z prvních kroků biosyntézy antokyanů. Výsledné zbarvení nebo absence zbarvení květů závisí na expresi transgenů v různých částech květů. Pokud je transgen exprimován jen v některých částech květů, pak jsou tyto části bezbarvé a ostatní barevné. Dále bylo zjištěno, že vne-

sení dalšího genu pro chalkonsyntázu jako transgenu do rostlin, které již svůj vlastní gen pro chalkonsyntázu mají, může vést rovněž ke snížení až úplné ztrátě exprese původního genu v genomu. Existují také klonované geny, které mění charakteristickým způsobem časování vývoje rostlin. Jedním z nich je gen *Leafy Arabidopsis thaliana*. Pokud je použit jako transgen, urychluje nástup kvetení rostlin. Je rovněž vyzkoušena řada transgenů, které podmiňují zvýšenou odolnost transgenických rostlin k bakteriálním a houbovým patogenům.

Existuje celá řada dalších klonovaných genů nejružnějších organismů, které mohou svým včleněním do rostlinného genomu podmiňovat syntézu nového typu proteinu, který v rostlinách nikdy syntetizován nebyl. Některé z těchto proteinů pozměňují biochemické, fyziologické a morforegulační procesy v rostlinách šlechtitelsky žádoucím směrem nejen pro lidskou výživu, ale také pro průmyslové zpracování. Jiné vedou k syntéze proteinů, které mají farmakologické využití. Zatím neexistuje žádná povolená odrůda tohoto typu. Lze však předpokládat, že výzkum takovýchto transgenů se provádí jako firemní výzkum za účelem patentování, jehož výsledky nemohou být plně publikovány. Některé zprávy o takovýchto genech jsou velmi stručné.

Jedním z prvních zajímavých systémů jak s farmakologickým využitím, tak s využitím pro šlechtění je produkce protilátek. Geny pro specifické imunoglobuliny určitého typu, které jsou dále stálé, byly klonovány z hybridomových buněk produkujících monoklonální protilátky. Imunoglobuliny obsahují těžký řetězec a lehký řetězec, které jsou kódovány různými geny. Do rostliny je třeba přenést oba geny. Těžký i lehký řetězec obsahuje konstantní a variabilní (i hypervariabilní) oblasti, a právě ty variabilní jsou důležité pro určení antigenních determinant. Kódující sekvence nemusí být celé, stačí syntéza jen specifických úseků pro variabilní úseky, postačujících k imunitní reakci. Předpokládá se, že transgenní rostliny budou zdrojem nejlevnějších protilátek. Bylo prokázáno, že transgenní rostliny budou vhodné také pro pasivní imunizaci, která spočívá v získání imunity sliznic úst a trávicího traktu. Například protilátky proti *Streptomyces mutans*, původci kažení zubů, které byly vneseny do genomu rostlin, působily proti této bakterii, pokud byly rostliny konzumovány v syrovém stavu. Firma Monsanto vyvinula transgenní rostliny s protilátkami proti herpesvirům. Protilátky produkované rostlinami mohou být namířeny také proti rostlinným patogenům (např. virovým proteinům). Mohou být také využity při fytoremediaci, tj. odstraňování toxických složek z prostředí, např. pudy pomocí rostlin. Uvažuje se o využití rekombinovaných protilátek na povrchu rostlinných buněk, aby polutanty byly zachyceny rostlinami.

Obdobným typem je využití rostlinných proteinů jako antigenů. Transgenní rostliny mohou produkovat proteiny, které jsou vlastní lidským patogenům vstupujícím do lidského těla membránami epitelálních buněk. Jsou to především bakterie a viry, které působí nachla-

zení, případně ty, které jsou přenášeny kontaminovanými potravinami. Rostlinné vakcíny, účinné proti těmto infekcím, stimulují mukózní imunitní systém k produkci imunoglobulinů IgA. Tato imunitní odpověď vzniká v buňkách epitelu respiračního a trávicího traktu. K imunizaci dochází pojitáním vhodné transgenní čerstvé zeleniny nebo jiných rostlinných produktů. Některé z takovýchto transgenických rostlin byly již v USA patentovány.

Dalším možným využitím je produkce některých farmakologicky významných, drahých proteinů transgenními rostlinami. Existují například transgenní řepky, které ve svých semenech akumulují protein pijavky koňské – hirudin. Ten tvoří komplexy s trombinem a brání srážení krve. Farmakologicky se používá obdobně jako heparin. Další skupiny proteinů, o jejichž produkci prostřednictvím transgenických rostlin se uvažuje, jsou některé minoritní proteiny lidské krevní plazmy. Jedním z nich je cytokin GM-CSF, který je potřebný po transplantaci kostní dřeně, neboť zvyšuje imunitu a snižuje tak riziko fatálních infekcí. Dalším kandidátem je gen pro faktor srážlivosti krve při léčení hemofilie F VIII a celá řada dalších.

Transgenní rostliny také skýtají nové možnosti průmyslového využití. Jeden z takovýchto typů produkuje poly(3-hydroxyalkanoláty). Tyto látky jsou využitelné jako biodegradovatelný obalový materiál (používaný k výrobě lahví na kokakolu). Transgenozí bylo dosaženo také akumulace fruktanů v rostlinných pletivech. Fruktany jsou polyfruktózové molekuly, které jsou syntetizovány některými bakteriemi a rostlinami a slouží jako zásobní molekuly cukrů. Zatímco rostlinné fruktany se skládají z 5 až 60 zbytků fruktózy, bakteriální se skládají až z 100 000 zbytků fruktózy. Gen *SacB* z *Bacillus subtilis*, který kóduje levansacharázu, zodpovědnou za syntézu fruktanů, byl přenesen do rostlin, které pak akumulovaly nové, využitelnější typy fruktanů.

Existují také transgenní rostliny s modifikací syntézy ligninu. Předpokládá se, že dřevo takovýchto transgenických stromů bude zvláště vhodné pro výrobu papíru. Dále existují transgenní rostliny schopné modifikovat zbarvení ligninu, a dřevo takovýchto transgenických stromů bude pravděpodobně vyhledávané pro nábytkářský průmysl. Transgenozí byl rovněž modifikován genom bavlníku tak, aby produkovaná bavlna měla modré zbarvení a byla přímo využitelná v textilním průmyslu jako stálobarevný materiál bez dalšího dobarvování (např. na džínovinu). V tomto případě se jedná o typický firemní výzkum, jehož detaily nikdy nebyly publikovány.

Transgenozí se podařilo modifikovat také syntézu škrobu. Existují transformanty bramboru, které ze dvou hlavních součástí bramborového škrobu – amylopektinu a amylozy – produkují jen amylopektin. Takovýto bramborový škrob je pak daleko vhodnější pro různé typy průmyslového zpracování.

V experimentálním stadiu je vnesení genů pro některé bakteriální enzymy do rostlinného genomu. Do rostlin byl také vnesen gen pro alfa-amyλάzu z *Bacillus*

licheniformis. Enzym je průmyslově využíván pro úpravu škrobu a další potravinářské biotechnologie. V transgenních buňkách ječmene bylo dosaženo produkce enzymu endo- β -(1,4)-glukanázy z dřevokazné houby *Trichoderma reesei*. Enzym se může příznivě uplatňovat v pivovarnictví a potravinářském průmyslu. Jinými transgeny, vnesenými do rostlin, jsou transgeny pro bakteriální xylanázy. Uplatňují se v papírenském a potravinářském průmyslu, pro úpravu lnu a pro úpravu píce. Do rostlinného genomu byl přenesen také gen z plísně *Aspergillus niger* kódující fytázu. Fytáza je enzym, který podmiňuje degradaci kyseliny fytové, hlavní zásobní formy fosforu v semenech. Fytáza z *Aspergillus niger* přeměňuje kyselinu fytovou na další formy a pak dochází až k přeměně na anorganický fosfor. To je důležité v trávicím traktu drůbeže, protože většina organického fosforu zůstává nespotebována a je výhodné, aby hladina fytázy v trávicím traktu drůbeže byla zvýšena. Uvažuje se o biotechnologické produkci enzymu prostřednictvím rostlinných buněk.

Specifickým typem jsou transgenní rostliny pro fytořemediaci. Byly vyvinuty, ale jejich používání zatím nebylo povoleno. Existují například transgenní rostliny, které jsou schopné akumulovat rtuť nebo kadmium. Takovéto transgenní rostliny musí být spáleny při vysoké teplotě a popeloviny, které mají relativně nepatrný objem, musí být bezpečně uloženy.

Terminátorová technologie

Systém byl patentován v roce 1998. Nebude tedy podrobně publikován, ale z toho, co je známo, je možné se dohadovat, jaké jsou jeho principy. Je považován za největší, ale i nejproblematictější novinku roku 1998. Jde o postup genového inženýrství, který způsobuje, že semena transgenních rostlin jsou v další generaci neklíčivá, protože protein, kódovaný transgenem, působí letálně na embrya. Nová semena musí tedy zemědělské odebrat od biotechnologické firmy, přesévání je vyloučeno. Patent byl podán v červnu 1998 společností Delta and Pine Land Company (DPL). Letální působení na embrya se projevuje jen tehdy, jestliže se na semena před prodejem působí určitou látkou (pravděpodobně tetracyklinem). Proces se tedy skládá z těchto kroků:

1. Do genomu kulturní rostliny se transgenozí přidá terminátorový systém.
2. Biotechnologická společnost před prodejem semen aktivuje terminátorový proces tím, že semena ošetří specifickou látkou – induktorem.
3. Zemědělci vysejí semena, vypěstují rostliny a sklídí vyvinutá, ale neklíčivá semena.

Gen pro toxin, působící letálně na embrya (toxinový gen), je řízen pozdním promotorem (LP). Ten je aktivní pouze v průběhu pozdní embryogeneze. Mezi pozdním promotorem a kódující sekvencí toxinového genu, je úsek DNA (blokáda), který ruší schopnost promotoru zapínat gen.

PŘEDBĚŽNÁ OPATRNOST

Již od samých počátků genového inženýrství (před dvaceti lety) je uznáváno, že rekombinovaná DNA vede ke vzniku nových kombinací genů a je třeba s nimi nejprve pracovat v uzavřeném systému, chráněném od vnějšího prostředí bariérami tak, aby bylo znemožněno jejich neplánované šíření v prostředí. Teprve po provedení pokusů prokazujících, že organismy s rekombinovanou DNA nemají nepříznivé vlivy, je možné je krok za krokem a případ od případu uvádět do prostředí. V průběhu dvaceti let, kdy nebyly žádné negativní vlivy geneticky modifikovaných organismů zjištěny, byla původní opatření zmíněna, ale stále je nutné je dodržovat.

V uzavřeném systému jsou transgenní organismy chráněny od prostředí fyzikálními (stěna laboratoře, stěny kultivačních nádob, případně cirkulace vzduchu v uzavřeném systému), chemickými (dezinfekční a další chemické prostředky) a biologickými (vlastnosti použitých speciálních mutovaných bakteriálních kmenů, jejich auxotrofie a další mutace, podmiňující specifické nároky na prostředí) bariérami. Každý transgenní organismus nového typu musí projít stadiem uzavřeného nakládání. Jeho experimentální výsledky se vyhodnotí a při absenci negativních vlivů je možné postupně uvádění do prostředí. Podrobný souhrnný článek o možných impaktech transgenních rostlin publikovali Ondřej a Rakouský (1997).

Byly vzneseny námitky proti selektovatelným genům pro rezistenci k antibiotikům, které jsou součástí plazmidových vektorů, aby bylo možno na základě nich selektovat bakterie, do nichž byl plazmidový vektor vnesen, nebo selektovat transgenní buňky v populaci rostlinných buněk, převážně netransgenních. Zcela nezdůvodněné jsou obavy, že by geny mohly být přeneseny do genomu bakterií a zvyšovat tak množství bakterií rezistentních k antibiotikům (viz Ondřej, Rakouský 1997). Byly rovněž vzneseny námitky proti velkoplošnému využívání rostlin odolných ke specifickým typům herbicidů. Ty se týkaly toho, že samotná transgenní rostlina by se mohla začít nekontrolovaně šířit jako plevel nebo by se gen pro rezistenci k herbicidu mohl prostřednictvím pylu přenést do genomu plevelů.

U genů pro rezistenci k virovým chorobám, pocházejícím z virového genomu (genu pro plášťový protein), jsou obavy z toho, že bude docházet k tzv. transkapsidaci. Cizí virový genom se s malou účinností bude balit do plášťového proteinu, který vzniká v důsledku aktivity transgenů. Takovýto „převlečený“ virus pak bude mít schopnost infikovat i rostliny, které nejsou jeho původními hostiteli. Tato schopnost je však jen velice dočasná, při následujícím reprodukčním cyklu (pokud bude v cizím hostiteli vůbec dokončen) si virus vytvoří svůj původní obal. Druhé možné riziko je rekombinace virového genomu. Je zvýšená pravděpodobnost, že genom libovolného viru, jenž pronikl do transgenní rostliny a replikuje se v ní, bude rekombinovat s mRNA genu pro plášťový protein, který vzniká v dů-

sledku činnosti transgenů. K oběma jevům však běžně v přírodě dochází při infekci rostliny dvěma viry současně.

Uvažuje se také o možných toxických a alergogenních účincích herbicidů. Transgeny vnášené do rostlinného genomu jsou sekvenčně charakterizovány a je také známa sekvence aminokyselin a struktura proteinu, který byl do rostlin vnesen. Toxické účinky transgenů používaných v odrůdách jsou proto vyloučeny. Z hlediska alergenních účinků existují proteiny v potravě, které působí alergie. Je ale všeobecně používáno takové pravidlo, že pokud některý organismus je potenciálně alergogenní, nelze použít jeho geny pro transgenozu s cílem tvorby nových odrůd, pokud není prokázáno, že protein, který je kódován daným transgenem, alergenní není. Kromě toho lze alergennost nového typu rostliny prokázat nebo vyloučit předběžnými testy.

Žádné z uvedených typů nepříznivých účinků transgenických rostlin nebyly prokázány. Jediné stopy možných problematických aspektů se objevily v souvislosti s transgeny pro odolnost k hmyzím škůdcům. Jejich impakty je však třeba porovnávat s impakty klasické velkoplošné zemědělské výroby, která používá agrochemikálie. Z takového srovnání transgenické rostliny vycházejí daleko lépe. Transgenické rostliny zde tedy nepředstavují nic nového. Námitky proti jejich využívání nejlépe vyvrací současná praxe – výsledky pěstování transgenických rostlin a na milionech hektarů po dobu pěti let.

AKTUÁLNÍ OTÁZKY

Téměř vždy se při transgenozě jedná o obohacování rostlinného genomu novým genem, který vznikl v příbuzných taxonech během fylogeneze, ale jeho potřeba u dané kulturní plodiny je dána novými nároky na zemědělské velkoplošné monokultury, potřebami zpracovatelského průmyslu nebo speciálními potřebami nových typů využití.

Ve všech případech je třeba hodnotit velmi komplexně vlivy nových transgenů na transgenické rostliny, na biocenózy i na zdraví člověka, případně živočichů. To se při výzkumu transgenů a při uznávacím řízení nových transgenických odrůd děje v daleko větší míře než u odrůd netransgenických.

Transgenické rostliny mohou podstatně přispět k řešení problematiky nedostatku potravin i zlepšení kvality rostlinných produktů v mnoha směrech. Podmínkou k tomu je, aby byly otevřeně přijímány veřejností. Biologové k tomu mohou podstatným způsobem přispět podáváním pravdivých, objektivních informací o transgenických rostlinách.

V poslední době se námitky ekologických aktivistů soustředily především na jeden typ transgenů – na transgeny pro rezistenci ke škůdcům. V současných transgenických odrůdách se využívá jen jeden typ transgenů – gen pro δ -endotoxin *Bacillus thuringiensis*. Faktum je, že první linie (ale ne již odrůdy) transgenických

rostlin měly většinou nedostatečný stupeň rezistence ke hmyzu. První transgenické rostliny bavlníku měly být rezistentní k motýlu *Heliothis virescens* a *Pectinophora gossypiella* v USA a ještě k dalším dvěma druhům z r. *Helicoverpa* v Austrálii, ale již v roce 1996 se vyskytly první problémy. V tomto roce se přemnožili škůdci bavlníku *Helicoverpa*. Jejich množství dosáhlo dvaceti- až padesátinásobku množství v jiných letech. Faktum je, že transgenové geny pro δ -endotoxin nepředstavuje sto procentní ochranu před škůdci. Chrání jen z 90 až 95 % a předpokládá se, že zbytek škůdců se zlikviduje občasným postřikem pesticidy (Tabashnik *et al.*, 1998). Zatímco běžně se u bavlníku používá 5 až 12 postřiků na vegetaci, u transgenického materiálu s genem pro δ -endotoxin se používají maximálně tři postřiky za vegetaci.

Byly vypracovány různé typy zvládání rezistence (Roush *et al.*, 1997):

1. Refugia netransgenických hostitelských rostlin, na nichž se mohou vyvíjet citlivé genotypy hmyzu bez expozice Bt-toxinem. Tato strategie je neúčinnější tehdy, jestliže rostliny mají vysokou expresi genu pro δ -endotoxin. Naproti většina mutací na rezistenci k δ -endotoxinu *B. thuringiensis* jsou mutace recesivní. Monofaktoriální recesivní genetické založení nese v sobě princip, na základě kterého lze tyto mutace poměrně účinně eliminovat právě metodou refugií. Takovéto mutace se ovšem neprojeví bezprostředně po svém vzniku. Aby se mutace projevila, tedy aby vznikl recesivní homozygot křížením dvou heterozygotních jedinců, musí tato mutace být již do jisté míry v populaci rozšířena. Na poli s transgenickou plodinou, projevující transgen Bt, jsou schopni přežít pouze rezistentní recesivní homozygoti. Pokud jsou oplozeni opět recesivními homozygoty, v následující generaci již přežívá všechno potomstvo. Pokud však jsou oplozeni senzitivními dominantními homozygoty, pak v následující generaci vzniknou heterozygoti, kteří budou senzitivní a nebudou schopni na poli s transgenickou plodinou přežít. Jako zásobárna dominantních senzitivních homozygotů slouží refugia. Refugia jsou kultury téže, ale netransgenické plodiny, kultivované poblíž plodiny transgenické. Hmyz s rezistentním genotypem pak nalétává na sousední pole s transgenickou plodinou a samečci tam oplozují samičky gametami s dominantními alelami pro senzitivitu. Otázky vzdálenosti refugia, jeho velikosti vzhledem k velikosti pole s transgenem a další okolnosti jsou již záležitostí znalosti intimního života hmyzu. V případě bavlníku a jeho škůdce se předpokládá, že refugia by neměla být od pole s transgenem vzdálena více než 800 m, ale značné neshody panovaly v doporučení optimální velikosti refugia vzhledem k velikosti pole s transgenickým materiálem, který by měl být chráněn. V loňském a letošním roce byly právě v USA a Kanadě velké dohady o dostatečné velikosti refugia. Původní doporučení bylo refugium o velikosti minimálně 5% plochy pole s transgenickým materiálem, pokud se na refugiu

nebudou používat insekticidy. Američtí a kanadští farmáři se však nemohli smířit s tím, že ztratí 5 % úrody, protože refugium bude bez insekticidů značně poničeno hmyzem, a pro jistotu refugium stříkali insekticidy. Pak ovšem 5 % plochy nestačilo a doporučení v tomto případě znělo na 20 % plochy. V letošním roce se vyskytl extrémist, kteří prokazovali, že obě čísla jsou podhodnocena a že optimální by bylo, kdyby velikost refugia bez ošetření insekticidem byla 20 % a s ošetřením insekticidem 50 %. Tak velkou část plochy nechat jako netransgenní, s nižším výnosem, ale farmáři již nechťeli ponechat. Vzniká zásadní otázka, jak je možné, že problém vznikl již tak brzy po zavedení transgenního materiálu. Odpověď je v tom, že již několik desítek let se používaly kultury *B. thuringiensis* jako biologicky insekticid a již tehdy vznikla rezistence.

2. Střední exprese toxinu, takže někteří necitliví jedinci hmyzu přežívají. Vzhledem k tomu, že byly zjištěny rezistentní mutace nejen recesivní, ale i s intermediárním stupněm dominance, ani tato strategie se obecně nedoporučuje, protože při ní dochází k hromadění intermediárních dominantních mutací.
3. Transgenní rostliny s geny pro různé typy δ -endotoxinu *Bacillus thuringiensis* rozseté mozaikovitě na daném území. Tato varianta, stejně jako následující, se již nedoporučuje, protože bylo zjištěno, že jeden gen u škůdce diamantový motýl (*Plutella xylostella*) může přenášet rezistenci ke čtyřem různým Bt-toxinům.
4. Použití odrůd, kde každá rostlina obsahuje směs toxinů. Jak uvádějí Losey *et al.* (1999), pyl transgenní kukuřice odolné proti zavíječi kukuřičnému (*Ostrinia nubilalis*), který obsahuje protein zvaný δ -endotoxin *Bacillus thuringiensis*, škodí larvám motýlů monarchů *Danaus plexippus*. Pyl kukuřice je rozprašován větrem i na okolní porost, a mezi plevy, které se pravidelně vyskytují na okrajích amerických kukuřičných polí, se vyskytuje klejicha (*Asclepias*), a ta je výhradní potravou larev motýlů monarchů. Při laboratorním pokusu, popsaném v citované práci, se zjistilo, že jestliže je však hojně poprášena pyllem uvedeného transgenní kukuřice, je pro larvy motýlů toxická. Motýl monarcha není v přírodě nijak ohrožen, naopak je hojný.

Není pochyb o tom, že během několika let budou k dispozici transgenní odrůdy kukuřice s genem pro δ -endotoxin, který se v pylu neprojeví. Existují transgeny, které se projevují jen v pylu, a pomocí techniky tzv. antisense DNA nebo použitím jiného promotoru v chimérickém genu lze takovéto transgenní rostliny získat. Avšak než budou moci být využívány jako odrůdy, uplyne ještě několik (nejméně pět, spíše deset) let. Co do té doby? Zakázat transgenní kukuřice s genem pro δ -endotoxin? Je třeba uvést, že k tomu, aby se eliminovala většina recesivních mutací zavíječe kukuřičného, biotechnologické firmy, které dávají transgenní kukuřici s genem pro δ -endotoxin na trh, doporučují, aby v sousedství pole s transgenní kukuřicí byla ales-

poň malá políčka s kukuřicí netransgenní (refugia pro hmyz), která nebudou ošetřována insekticidy. Na poli s transgenní kukuřicí se mohou vyselektovat recesivní mutace, rezistentní k δ -endotoxinu *Bacillus thuringiensis*, v homozygotním stavu. V populacích zavíječe kukuřičného se už do určité míry nahromadily, protože bakterie *Bacillus thuringiensis* se používají jako biopesticid, daleko šetrnější k životnímu prostředí než běžné insekticidy, v USA již 40 let. Na refugích se budou larvy citlivých zavíječů kukuřičných nerušeně vyvíjet až do stadia dospělého motýla. Většina těchto motýlů přeletí na pole, na němž dokončí svůj vývoj jen malé množství rezistentních, homozygotně recesivních jedinců. Motýli z refugia předají potomstvu dominantní alelu genu, která podmiňuje citlivost k δ -endotoxinu, a larvy následující generace budou δ -endotoxinem zahubeny. Refugii lze využít i pro ochranu faraonů. Američtí agronomové radí farmářům, aby příští rok refugia situovali jako ochranný pás na kraj pole. Pyl pšenice je poměrně těžký a i při silném větru padá maximálně do vzdálenosti 60 metrů od otcovské rostliny; většina ho spadne do vzdálenosti 8 metrů. Jestliže pás nejméně 8 metrů na kraji pole bude tvořen netransgenní kukuřicí, většina pylu, který se z pole dostane na okolní rostliny klejichy, bude pyl netransgenní kukuřice, o kterém podle autorů Losely *et al.* (1999) bylo prokázáno, že nemá nepříznivý vliv na vývoj faraonů. Ochránit faraony letos již nelze, ale v příštím roce to nebude těžké.

Existují i další transgeny pro rezistenci k hmyzím škůdcům, i když se v transgenních odrůdách ještě neuplatnily. V letošním roce byla publikována podrobnější zpráva o lektinu sněženky (Birch *et al.*, 1999). Je to lektin (GNA – *Gallanthus nivalis* agglutinin), který se váže na manózu a působí *in vitro* proti mnoha druhům mšic. Jeho primární působení nespočívá v přímé toxicitě pro mšice nebo prevenci poškození mšicemi, ale ve zpomalení vývoje mšic a snižování jejich reprodukční schopnosti v následující generaci. Jestliže je gen přenesen do transgenního tabáku a bramboru, snižuje to rozmnožování mšic, tzn. zpomaluje jejich vývoj. Také však dochází k poškození larev motýlů a brouků, což bylo známo již dříve. To znamená, že na jedné straně byla vytvořena určitá ochrana proti škůdcům (*Leptinotarsa decemlineata*), ale na druhé straně tím mohou být postiženi i přirození nepřátelé mšic. Jedním z nich je *Adalia bipunctata* (Hymenoptera). Byla prováděna studie, která prokázala, že mšice, které se živí na transgenních bramborách s genem pro GNA jako potrava *Adalia bipunctata*, působily opravdu sníženou plodnost, životaschopnost vajíček a délku života. Naproti tomu obdobné nutriční pokusy, prováděné s transgenními rostlinami pro δ -endotoxin *B. thuringiensis*, podobně nepříznivé vlivy na necílový hmyz, predátory cílového hmyzu, buď nevykázaly, nebo výsledky jsou zatím sporné. Vliv nebyl zjištěn v publikaci autorů Dogan *et al.* (1996) – gen Bt v transgenních bramborách, kde působil proti mandelince bramborové, neměl negativní vliv na mšicemi se živící *Hippodamia convergens*. V jiné studii však kukuřice s genem pro δ -endotoxin,

podmiňující rezistenci k zavíječi kukuřičnému, ovlivňovala životnost larev predátora larev v potravním řetězci (*Chrysoperla carnea*) (Hilbeck *et al.*, 1998).

SOUČASNÉ ROZŠÍŘENÍ A DALŠÍ PERSPEKTIVY ODRŮD TRANSGENNÍCH ROSTLIN

Transgenní odrůdy se pěstují na polích od roku 1994. V roce 1999 tvořila celková plocha transgenních rostlin ve světě 400 000 km² a podle předpokladu se v roce 2001 zvýší na trojnásobek. V současné době se transgenní rostliny pěstují převážně v USA, Kanadě, Brazílii, Argentině a Číně.

Transgenozie umožňuje vytvářet nové odrůdy kulturních rostlin, vhodnější pro lidskou výživu. Spojeným úsilím sítě vědeckých pracovišť byla vytvořena transgenní rýže s vysokým obsahem vitamínu A a železa a umožňující účinnější využití fosforu. Přírodní rýže neobsahuje žádný vitamin A ani β -karoten, který se v lidském těle mění na vitamin A. Do této rýže byly včleněny čtyři transgeny, které mění přítomný prekurzor na β -karoten. Geny pro dva enzymy byly klonovány z genomu narcisu a dva z bakteriálního genomu. Syntéza a ukládání β -karotenu v obilkách se projevovaly velmi výrazně – zatímco endosperm běžných obilok rýže je bílý, tento byl žlutý. Transgenozí byla vytvořena také nová linie rýže s vyšším obsahem železa a fosforu, která obsahuje tři transgeny. Jeden z nich kóduje enzym fytázu. Rostliny schraňují fosfát v semenech ve formě fytátu, což je molekula, která obsahuje šest fosfátových skupin připojených k pozměněné glukóze. Odbourávání fytátu v trávicím traktu člověka není příliš účinné, ale enzym fytáza mu napomáhá. Druhý transgen kóduje protein, který váže železo, a třetí kóduje protein bohatý na síru, který pomáhá vstřebávání železa v lidském trávicím ústrojí. Linie s vysokým obsahem vitamínu A byla nakřížena s linií, která zvýšeně dodává lidskému organismu železo a fosfor a hybrid kombinuje obě vlastnosti. Zdá se, že tím byla získána nová plodina, která možná pomůže překonat špatnou výživu milionů lidí třetího světa. Deficience vitamínu A postihuje asi 400 milionů lidí na světě a působí oslepnutí milionů dětí. Anémie z nedostatku železa je ve státech, kde je rýže hlavní potravou, ještě rozšířenější. V poslední době byla získána transgenní linie rýže, která má snížený obsah cholesterolu. Dále transgenozie slibuje možnost zvýšení aktivity vitamínu E v rostlinách. Vitamin E působí jako antioxidant, a tedy je schopen mimo jiné snižovat výskyt nádorových onemocnění. V lidské výživě je v suboptimálním množství. Nadějně experimenty s transgenozí v tomto směru byly provedeny zatím na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*. Uznání odpovídajících kulturních odrůd je věcí blízké budoucnosti. Transgenní plodiny tedy nepřinášejí jen zvýšení výnosu, ale jsou schopné podstatným způsobem přispět ke zdravější lidské výživě.

Vzhledem k perspektivám zavádění těchto nových typů transgenních rostlin a vzhledem k tomu, že se hro-

madí zkušenosti s velkoplošným pěstováním transgenních rostlin a s jejich využíváním v lidské výživě, aniž by vznikly jakékoli skutečné problémy, lze předpokládat, že v budoucnosti bude důvěra evropských spotřebitelů v transgenní rostliny postupně vzrůstat a bude se zvětšovat i plocha, na níž se budou transgenní rostliny v Evropě pěstovat.

SITUACE V ČR

V České republice se na transgenozii rostlin experimentálně pracuje již přes dvacet let, od doby úplných začátků této problematiky ve světě. Transgenozie rostlin tvoří podstatnou část pracovní náplně Ústavu molekulární biologie rostlin AV ČR. Na problematice transgenozie se pracuje i v dalších ústavech AV ČR (Biofyzikální ústav, Ústav experimentální botaniky), na univerzitních pracovištích (přírodovědecké fakulty v Praze a Brně) i na pracovištích zemědělského výzkumu (Výzkumný ústav rostlinné výroby a další). V průběhu práce bylo v ČR napsáno cca 200 vědeckých a odborných publikací o problematice transgenozie. Již v roce 1989 vznikla Česká komise transgenozie rostlin, která je v současné době poradním orgánem Ministerstva životního prostředí. Ze zákona č. 92 z roku 1996 o odrůdách, osivu a sadbě pěstovaných rostlin vyplývá, že každá fyzická nebo právnická osoba, která chce na území ČR pěstovat transgenní rostliny za účelem registrace odrůdy, k tomu musí mít povolení Ministerstva životního prostředí. V posledních třech letech požádaly velké mezinárodní biotechnologické společnosti (AgrEvo, Monsanto a další) Ministerstvo životního prostředí ČR o možnost pěstovat na našem území transgenní rostliny za účelem předregistrace nebo registrace odrůd. Jedná se o maloplošné pokusy (s celkovou plochou nepřesahující 1 ha) s transgenními odrůdami, které se zkoušejí nebo jsou již v povolovacím řízení i v jiných evropských státech. Česká komise transgenozie rostlin posuzuje pro Ministerstvo životního prostředí takovéto žádosti, průběžně sleduje pokusná pole s transgenními rostlinami v průběhu kultivace a testuje identitu a přítomnost transgenů v transgenních rostlinách. Současně se podílí na přípravě nového zákona o transgenních organismech, který by měl vstoupit v platnost v září roku 2000.

LITERATURA

- Baulcombe D. C. (1996): Mechanism of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell*, 8: 1833–1844.
- Birch A. N., Geoghegan I. E., Majerus M. E. N., McNicol J., Hackett C. A., Dogan R. B., Berry R. E., Rossignol B. A. (1996): Biological parameters of convergent lady beetle feeding on aphids of transgenic potato. *J. Econ. Entomol.*, 89: 1105–1108.
- Gatehouse A. M. R., Gatehouse J. A. (1999): Tri-trophic interaction involving pest-aphids, predatory 2-spot ladybirds

- and transgenic potatoes expressing snowpowder lectin for aphid resistance. *Mol. Breeding*, 5: 75–83.
- Hilbeck J., Baumgartner M., Fried P. M., Bigler F. (1998): Effect of transgenic *Bacillus thuringiensis* – fed prey on mortality and development of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysoperlidae). *J. Evol. Entom.*, 27: 480–487.
- Horsch R. V., Klee H. J. (1986): Rapid assay of foreign gene expression in leaf discs transformed by *Agrobacterium tumefaciens*: Role of T-DNA borders in the transfer process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 4428–4432.
- Chen M., Nagarajan V. (1993): The roles of signal peptide and mature protein in Rnase (barnase) report from *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, 239: 409–415.
- Losey J. L., Rayor L., Carter M. E. (1999): Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 399: 214.
- McBride K. E., Svab Z., Schaaf D. J., Hogan P. S., Stalker D. M., Maliga P. (1995): Amplification of a chimeric *Bacillus thuringiensis* gene in chloroplasts leads to an extraordinary high level of an insecticidal protein in tobacco. *Biotechnology*, 13: 362–365.
- Murphy D. J. (1996): Engineering oil production in rapeseed and other oil crops. *Tibtech*, 14: 206–213.
- Ondřej M. (1992): Genové inženýrství kulturních rostlin. Praha, Academia.
- Ondřej M. (1997): Transgeny pro šlechtění rostlin. *Genet. a Šlecht.*, 33: 135–160.
- Ondřej M. (1999): Perspektivy transgenních rostlin. *Chmelářství*, (6–7): 89–90.
- Ondřej M., Drobek J. (1997): Bezpečnost a prospěšnost transgenních rostlin pro člověka. *Časopis lékařů českých*, 136: 331–336.
- Ondřej M., Rakouský S. (1997): Rizika, zásady a perspektivy práce s transgenními rostlinami. *Biol. Listy*, 62: 1–20.
- Ondřej M., Rakouský S., Schuetzner K. (1998): Transgeny pro rezistenci k herbicidům. *Genet. a Šlecht.*, 34: 31–42.
- Pfeon M. (1997): Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. *Tibtech*, 15: 173–177.
- Roush R. T. (1997): Bt-transgenic crops: just another pretty insecticide or a chance for a new start in resistance management? *Pestic. Sci.*, 51: 328–334.
- Smith C. J. S., Watson C. F., Ray J., Bird C. R., Morris P. C., Schuch, W., Grierson D. (1988): Antisense RNA inhibition of polygalacturonase in transgenic tomatoes. *Nature*, 334: 724–726.
- Tabashnik B. E., Yang-Biao Liu, Malvar T., Heckel D. G., Masson L., Ferre J. (1998): Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse? *Phil. Trans. Roy. Soc.*, B353: 1751–1756.
- Tabé L., Higgins T. J. V. (1998): Engineering plant protein composition for improved nutrition. *Trends Plant Sci.*, 3: 282–286.

Došlo 2. 11. 1999

Kontaktní adresa:

Doc. RNDr. Miloš Ondřej, DrSc., Ústav molekulární biologie rostlin Akademie věd České republiky, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Česká republika, tel.: + 420 38 777 55 08, fax: + 42 777 55 37, e-mail: ondrej@umbr.cas.cz

TRANSFORMACE ŘEPKY OLEJNÉ (*BRASSICA NAPUS* L.) A JEJÍ PRAKTICKÉ VYUŽITÍ

TRANSFORMATION OF OILSEED RAPE (*BRASSICA NAPUS* L.) AND ITS PRACTICAL USE

J. Ovesná, V. Kučera, M. Vyvadilová, I. Nováková, L. Kučera

Research Institute of Crop Production, Prague-Ruzyně, Czech Republic

ABSTRACT: Oilseed rape (*Brassica napus* L.) belongs to the most important species world-wide. Across centuries rape has been bred to meet changing needs of the mankind. In the last decade new techniques have been developed which offer new possibilities for the breeders and industry. Using molecular techniques and plant transformation, new traits can be introduced rapidly into the rapeseed. Oilseed rape has also become the object of biotech research and development because it is a very valuable crop, meaning that seed companies are willing to invest their money in research and development costs. As a result, oilseed rape now dominates field trials of genetically-modified crops in many countries, Canada being the leading one. Several features make oilseed rape relatively easy to transform using genetic engineering. Rape cells accept the transfer of genes from other species more readily than do many other crops. A second reason why oilseed rape is suited for genetic transformation is that it rejuvenates well from tissue cultures. Tissue culture is a comparable process. Once oilseed rape cells have been genetically modified, it is relatively easy to grow whole plants directly from these modified cells using special growth chambers. Several tissue type can be used ranging from hypocotyl and leaves segments to microspores. Microspores are recommended for their abundance in plant flowers. Efficient protocols are available for their regeneration into haploid embryos and for their transformation using image analysis and green fluorescent protein technology. Both *Agrobacterium* mediated transformation and particle bombardment can be used. Several genes have been transformed in the oilseed rape genome. Sense and antisense constructs for research purposes were used. Many traits have been manipulated for final commercialisation. Work under way includes:

- Genetic transformation to make canola varieties more disease and pest tolerant;
- Research to develop canola with better meal quality;
- Research to make canola resistant to herbicides; and
- Research to modify canola oil to give it a wider variety of uses.

Besides genes generally used in many economically important species coding e.g. for herbicide resistance / tolerance based on resistant or detoxifying enzymes, pest resistance, disease tolerance/resistance specialised constructs influencing seed metabolism have been used. Rapeseed varieties with modified oilseed composition have been developed and some of them were introduced to the market. The oils can be used for manufacturing of detergents, lubricants, margarine, for the pharmaceutical industry, cosmetics. Some of them could overcome problems with nonspecific harmful products in margarine production. Several genes have been cloned to increase laurate biosynthesis or erucic acid content. "Laurate canola" was realised for the market. Other lines are under development. Artificial male sterility is another highly required trait. It simplifies F1 hybrid production and it is another example how to meet breeders requirements for high yielding varieties. The system is based on barnase activity, which destroys pollen development in sterile lines, Barnstar in fertility restorer, which inhibit barnase action and herbicide resistance, which ensures that only hybrid seeds will produce plants. This technology was introduced to American, European and Asian markets. Research is currently underway in many locations to alter the qualities, giving rape many potential uses in industry, animal and human nutrition, and even medicine. Over 1 000 patents have been taken out for new industrial uses of oilseed rape. Although some doubts about biosafety of transgenic oilseed rape are arising, oilseed rape is a powerful crop and it is expected the experiments and trial will successfully continue.

Keywords: *Brassica napus*; transformation; gene; storage oils; resistance; male sterility

ABSTRAKT: Řepka (*Brassica napus* L.) patří mezi nejvýznamnější technické plodiny – v Evropě představuje nejdůležitější zdroj oleje. Šlechtění řepky bylo vždy založeno na strategii křížení a výběru. V posledním desetiletí umožnily techniky molekulární genetiky cílenou manipulaci s genomem řepky. Řepka dobře regeneruje v podmínkách *in vitro*. Byly vypracovány účinné techniky transformace, regenerace a selekce. Kromě genů navozujících odolnost vůči herbicidům, hmyzím škůdcům a dalším patogenům jsou do řepky vnášeny geny ovlivňující složení zásobních olejů. Tyto oleje jsou pak využívány v průmyslu pro výrobu margarínů, mazadel nebo detergentů. Na trhu je zájem o systém umělé samčí sterility, který se využívá pro produkci hybridního osiva. Zájem o nové genotypy řepky je minimálně ze strany průmyslu vysoký a lze předpokládat, že nadále poroste.

Clíčová slova: *Brassica napus*; transformace; gen; zásobní oleje; odolnost; samčí sterilita

ÚVOD

Rod *Brassica* zahrnuje celou řadu hospodářsky důležitých druhů. Nejvýznamnější z nich je řepka olejná (*Brassica napus* L. var. *oleifera*). Používá se pro výrobu olejů k potravinářskému i technickému využití, mazadel, detergentů a bionaft. Řepkové výlisky (pokrutiny) a extrahované šroty se využívají jako bílkovinná krmiva ve výživě hospodářských zvířat. Řepka je třetí nejvýznamnější olejninou ve světě (obr. 1). Po staletí byly vybírány nevhodnější genotypy, které splňovaly měnící se požadavky člověka. V posledním desetiletí umožnily techniky molekulární genetiky přípravu zcela nových genotypů, které se vyznačují lepším využitím potenciálu řepky. Jsou zaváděny modifikované pěstební postupy a zejména je možné řepky využívat jako zdroje cenných surovin.

Tento příspěvek se zabývá vědeckými poznatky, které v poslední době vedly k aplikaci transformace u řepky a k uvedení transgenních odrůd na světový trh.

Příprava geneticky modifikovaných rostlin zahrnuje řadu kroků od správného výběru genu a přípravy konstruktu, který je do buňky vpravován, přes charakterizaci a výběr transformovaných linií až po kontrolu jejich zdravotní nezávadnosti. Úspěšnost přípravy geneticky modifikovaných plodin závisí na mnoha faktorech.

1. Účinnost transformace – souvisí s regenerační schopností daného pletiva *in vitro*, závisí na výběru vhodného způsobu transformace, na dostupnosti totipotentních (regenerace schopných) buněk pro *Agrobacterium* nebo DNA dopravovanou do buněk pomocí částicových střel. Nezbytná je i dostatečně účinná selekce potenciálních transformantů.

2. Výběr znaku, který má být genetickou modifikací pozměněn – vyžaduje znalost požadavků šlechtitelů a potřeb trhu, dostatečně hlubokou znalost biochemických drah, které mají být v buňce pozměněny, a znalost možností, jak toho dosáhnout. Rovněž je třeba zvolit vhodné nástroje molekulární genetiky, které

umožní žádanou změnu navodit (klonování genů, jejich zařazení za vhodné promotory atd.). Samozřejmě jsou rostliny transformovány i pro vědecké účely s cílem detailně studovat metabolické procesy, fyziologii rostliny.

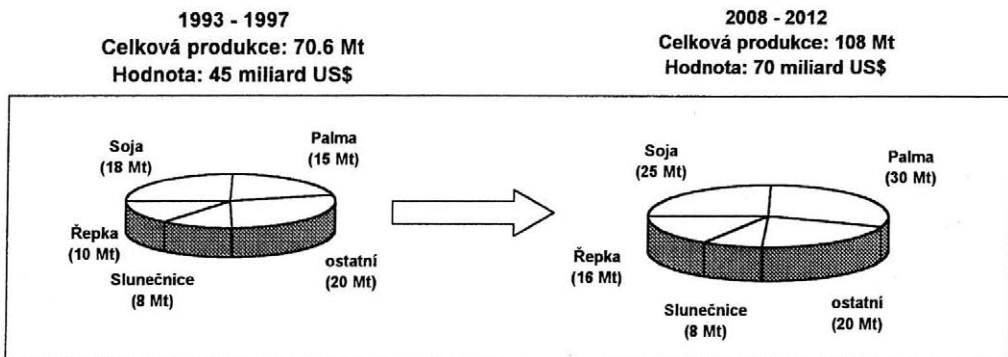
3. Výběr vhodných transformovaných rostlin. Exprese genu a její stabilita však závisí i na okolí místa, kam je gen začleněn. Někdy dochází k utlumení (silencing) činnosti genu, výjimečně i k jeho vystřížení. Proto musí být kontrolována míra exprese a její stabilita v následných generacích. Existuje několik faktorů, které v tomto procesu hrají roli. Selektce se provádí většinou z desítek či stovek transformovaných rostlin.

4. Odhad rizika uvedení geneticky modifikované rostliny do prostředí. Geneticky modifikované rostliny se neprodukují pouze pro vědecké účely, ale výsledkem jsou i komerční odrůdy. Před jejich uvedením na trh je třeba zvážit rizika, které by taková rostlina mohla způsobit životnímu prostředí. Hodnocena je samozřejmě i vhodnost pro výživu lidí a zvířat.

PARAMETRY OVLIVŇUJÍCÍ ÚČINNOST TRANSFORMACE U ŘEPKY

Explantátové kultury a regenerace *in vitro*

Druhy r. *Brassica* obvykle dobře regenerují *in vitro*. Byly popsány metody jak pylové a somatické embryogeneze, tak organogeneze, což je základním předpokladem pro úspěšné zvládnutí transformace. Regenerace bylo dosaženo z různých rostlinných pletiv, jako jsou hypokotyls (Yang *et al.*, 1991), děložní listy (Hachey *et al.*, 1991), listy (Radtko *et al.*, 1988), mikrospory (Lichter, 1982) nebo protoplasty (Glimelius, 1984). Bylo prokázáno, že regenerační schopnost je ovlivňována celou řadou faktorů. Různá pletiva potřebují odlišné složení kultivačního média včetně regulátorů růstu, a rovněž bylo zjištěno, že regenerační schopnost závisí na genotypu rostliny (Khehra, Mathias, 1992; Poulsen, Nielsen, 1989; Ovesná *et al.*, 1993; Pental *et al.*, 1993).



1. Očekávaný nárůst produkce řepkového oleje – Expected increase in rapeseed oil production

Metoda transformace

Základní protokoly pro transformaci řepky byly optimalizovány na přelomu 80. a 90. let. Přehled z tohoto období zpracoval Poulsen (1996). Obecně se pro transformaci řepky používá jak *Agrobacterium*, tak bezvektorový přenos. *Agrobacterium* bylo testováno již na konci 80. let. V rámci rodu *Brassica* bylo možné nejlépe transformovat *B. juncea* (Charest *et al.*, 1989), *B. rapa* (Ohlsson, Ericksson 1988), následované *B. napus*.

Nyní se pro přenos žádaných genů používají binární vektory ve speciálně upravených kmenech, které mají vyšší účinnost transformace díky duplikaci *vir* genů a dalším úpravám v genomu. Pro transformaci se využívají různá pletiva. Nejvíce se však používají mikrospory, protože pylovou embryogenezi vznikají zcela homozygotní dihaploidní regeneranti (Pechan, 1989; Swansson, Ericksson, 1989). Nejvíce se však v první polovině 90. let používaly segmenty hypokotylů, protože práce s nimi je poměrně jednodušší (Moloney *et al.*, 1989). Z přehledu publikací je zřejmé, že nejresponzivnějším genotypem pro transformaci byla kanadská jarní odrůda Westar. Postupem času pak byly transformovány moderní výkonné odrůdy jako Hanna, Arabella nebo Topas (Fry *et al.*, 1987; Pua *et al.*, 1987; Stefanov *et al.*, 1994; Schroder *et al.*, 1994; Jones-Villeneuve *et al.*, 1995).

Kromě transformace pomocí agrobakteria byly testovány další způsoby přenosu DNA do genomu řepky. Jednalo se zejména o metody indukovaného přenosu DNA do protoplastů pomocí PEG (polyethylenglykol) nebo elektroporaci (Chapel, Glimelius, 1990; Bergmann, Glimelius, 1993; Hervé *et al.*, 1993). Velké naděje se vkládaly do mikroinjekcí DNA do embryí odvozených z mikrospor (Neuhauz *et al.*, 1987). Vzhledem k celkové náročnosti postupu a problémům s následnou regenerací celistvých rostlin se tyto metody v současné době příliš nepoužívají. Spíše se využívá transformace pomocí částicových střel (particle bombardment), kterou poprvé publikovali Chen a Beversdorf (1994).

Pro selekci transformovaných rostlin se používá rezistence k antibiotikům nebo herbicidům. Nejčastěji se jedná o gen *nptII* (neomycinofosfotransferázu). Bylo zjištěno, že některé vektory obsahují mutovaný gen, což může vysvětlovat odlišné výsledky s kanamycinem jako selekčním agens (Yenofsky *et al.*, 1990). Jako možná alternativa byla testována odolnost k hygromycinu (Waldron *et al.*, 1985), streptomycinu (Schroder *et al.*, 1994) nebo methotrexátu (Pua *et al.*, 1987). Dalším typem selekčních markerů je odolnost k herbicidům. Nejčastěji se u řepky využívá odolnosti k herbicidu bialaphos (De Block *et al.*, 1989) nebo herbicidům na bázi sulfonylmočoviny (Miki *et al.*, 1990).

V současné době se pro vysoce účinnou transformaci řepky rozšířilo zejména použití mikrosporových kultur. I když embryogeneze bylo v tomto systému dosaženo i u jiných rostlinných druhů, nikde se nyní nepoužívá pro přenos cizorodých genů tak masově jako

právě u této plodiny. Výhodou systému je, že z jediného poupěte je možné získat tisíce mikrospor a z nich přímou pylovou embryogenezi odvodit haploidní regeneranty a po jejich diploidizaci zcela homozygotní rostliny. Vzhledem k její silné buněčné stěně se mikrospora původně zdála nevhodná pro kokultivaci s agrobakteriem. S úspěchem však začaly být využívány částicové střely a později byl optimalizován i protokol pro využití agrobakteria (Fukuoka *et al.*, 1998; Dormann *et al.*, 1998). Základem úspěchu transformace je optimalizovaný regenerační protokol a účinná selekce. Pro výběr embryogenních mikrospor lze s úspěchem používat průtokovou cytometrii a pro selekci transformantů nedestruktivní metodu založenou na detekci zeleného fluoreskujícího proteinu (GFP) a na obrazové analýze (Schulze *et al.*, 1998). Tento postup dnes využívá řada firem, např. AgBiotech (<http://www.Ag.Biotech>).

VÝBĚR ZNAKU

Stejně jako u dalších plodin je úsilí vědeckých týmů a zejména šlechtitelských společností zaměřeno na zlepšení hospodářských znaků řepky. Některé transgenní odrůdy již byly uvolněny pro trh, na dalších se pracuje (tab. I a II). Dostupné techniky molekulární biologie zatím dovolují ovlivňovat tyto monogenně podmíněné znaky:

- odolnost vůči patogenům a hmyzím škůdcům
- odolnost k herbicidům
- kvalita pokrutin a extrahovaných šrotů
- složení zásobních olejů a vosků
- umělá samčí sterilita.

Již na počátku 90. let bylo zřejmé, že v budoucnu by řepka olejka měla sloužit jako zdroj různých mastných kyselin. V současné době je patrné, že se šlechtitelské firmy a producenti osiv budou snažit vyjít vstříc požadavkům chemického a farmaceutického průmyslu (Friedt, Luhs, 1998). Jsou proto studovány biosyntetické dráhy v řepce (Ohlrogge, 1994; Ohlrogge, Browse, 1995; Galili *et al.*, 1998 – obr. 2), zejména pak ve vyvíjejících se semenech. Cílem je nalézt enzymy, které umožňují produkci nejžádanějších typů mastných kyselin. Základní součástí řepkového oleje je triacylglycerol (TAG).

Bylo již klonováno několik genů, které se účastní biosyntetické dráhy mastných kyselin, a řada z nich byla přenesena do genomu řepky (Töpfer *et al.*, 1995). Nyní existuje několik velice zajímavých transgenních linií, které jsou základem nových odrůd.

Laurical™

12:0-ACP thioesteráza ze stromu *Umbellularia californica* (Davies *et al.*, 1993) úspěšně interaguje s biosyntetickou dráhou mastných kyselin v plastidech řepky a může docházet k akumulaci laurátu (Voelker *et al.*, 1992, 1996). Gen řízený napinovým promotorem

I. Přehled povolených odrůd řepky v zemích OECD – A list of registered oilseed rape varieties in OECD countries

Majitel odrůdy	Linie	První stát, ve kterém bylo povoleno
AgrEvo, Canada Inc.	HCN92	Kanada, 1995
Monsanto, Canada Inc.	GT73	Kanada, 1995
Calgene	pCGN3858-212	USA, 1994
Plant Genetic System (PGS)	MS1, RF1	Velká Británie, 1994
Monsanto, Canada Inc.	GT200	Kanada, 1996
AgrEvo, Canada Inc.	HCN28	Kanada, 1996
AgrEvo (PGS)	MS8/RF3	Kanada, 1996
PGS	PHY14, PHY35	Japonsko, 1997
AgrEvo (PGS)	MS1/RF2	Kanada, 1995
PGS	PHY36	Japonsko, 1997
AgrEvo	T45	USA, 1997
AgrEvo	HCN10	Kanada, 1995
Pioneer Hi-Bred	PHI-CAC-IMI-IR	Kanada, 1997
Monsanto, Canada Inc.	ZSR500, ZSR 502, ZSR503	Kanada, 1997
Rhone Poulenc Canada Inc.	Oxy-235	Kanada, 1996
PGS	RF2+PAT	v registraci
Pioneer Hi Bred	kvalita oleje	Kanada, 1997
Calgene	Laurate	Kanada, 1996

GT73 – odolnost k herbicidu Roundup, vnesené geny pro oxidoreduktázu glyfozátu

HCN10 – odolnost k fosfinotricinu, obsahuje gen fosfinotricinacetyltransferasu (PAT)

HCN28 – odolnost k herbicidům na základě fosfinotricinu

kvalita oleje – vysoký obsah kyseliny olejové/nízký obsah linoleové

LAURATE – vysoký podíl laurátu a myristátu

MS1 x RF1 (hybrid) – bar, NPTII, samčí sterilita, obnovitel fertility na základě systému barstar/barnase

MS1 x RF1 – produkce hybridního osiva – samčí sterilita, obnovitel fertility na základě systému barnasa/barstar, odolnost k fosfinotricinu – bar, NPTII

MS8/RF3 produkce hybridního osiva – samčí sterilita, obnovitel fertility na základě systému barnasa/barstar odolnost k fosfinotricinu – bar, NPTII

Oxy-235 – tolerantní k bromoxynilu; gen nitrilasa z bakterie *Klebsiella pneumoniae* ssp. *ozae*

pCGN3828-212/86 – změněné složení olejů, vnesená ACP thioesteráza z *Umbellularia californica* a odolnost ke streptomycinu a NPTII z *E. coli*

PHI-CAN-IMI-IR – odolnost k herbicidům imidazolinového typu, modifikace genů patřících do rodiny acetolaktáz (ALS). V kanadských podkladech lze pro tyto materiály najít označení NS738, NS1481, NS1438

PHY 14, PHY – produkce hybridního osiva – samčí sterilita, obnovitel fertility na základě systému barnasa/barstar odolnost k fosfinotricinu – bar, NPTII

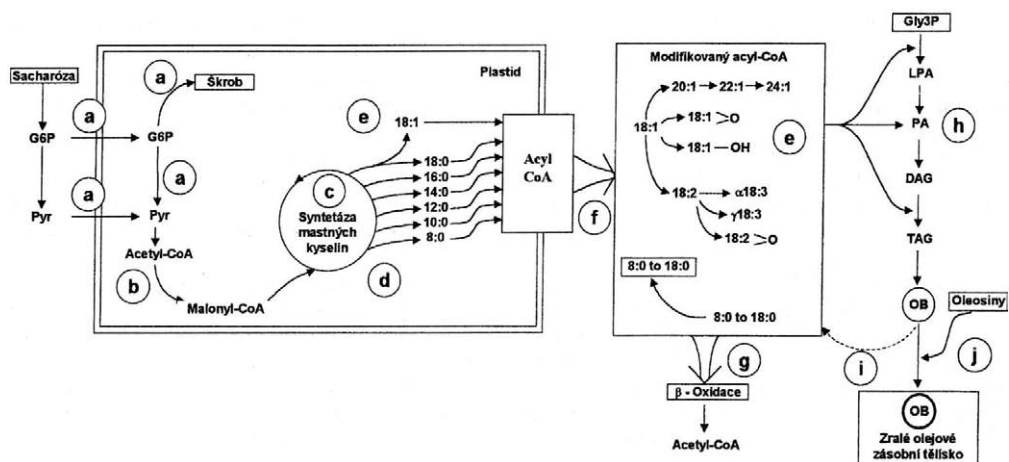
PHY 36 – (hybrid) – produkce hybridního osiva bar, NPTII, samčí sterilita, obnovitel fertility na základě systému barnasa/barstar, odolnost k fosfinotricinu, bar, NPTII

T45 – odolnost k fosfinotricinu, obsahuje gen fosfinotricinacetyltransferasu (PAT)

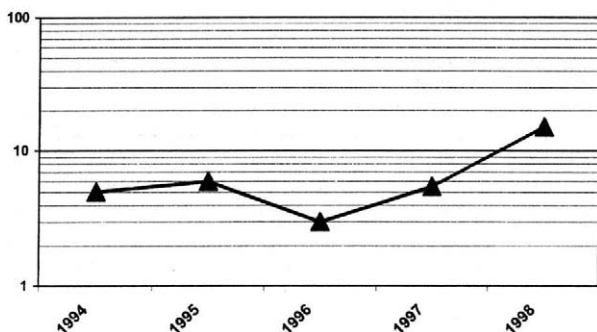
ZSR500, ZSR502, ZSR 503 – kříženec transgenní *Brassica napus* GT73 (Roundup ready) a *Brassica rapa*

II. Transgenní odrůdy/linie ve zkouškách – Transgenic varieties/lines submitted to tests

Produkt v semeni	Zamýšlené průmyslové užití	První polní testy
40 % kyseliny stearové (18:0)	margaríny, kokosové máslo	1994
60 % kyseliny laurové (12:1)	detergenty	1996
80 % kyseliny olejové (18:1)	potraviny, mazadla	1995
Petroselenová kyselina (18:1)	polymery, detergenty	1998–1999
Vosky z jojoby (C20, C22)	kosmetika, mazadla	1997
40 % kyseliny myristové (14:0)	detergenty, mýdla	1996
90 % kyseliny erukové (22:1)	polymery, kosmetika, farmaceutický průmysl	1998
Ricinoleová kyselina (18:1-OH)	lubrikanty, plasty	1997
Polyhydroxybutyráty	biodegradovatelné plasty	1998
Fytázy	krmivo pro zvířata	1994
Enzymy	fermentace, výroba papíru	1998–1999



2. Biosyntetická dráha mastných kyselin v semeni řepky (G6P = glukóza-6-fosfát, Pyr = pyruvát, CoA = koenzym A, DAG = diacylglycerol, TAG = triacylglycerol) – Biosynthetic path of fatty acids in rapeseed (G6P = glucose-6-phosphate, Pyr = pyruvate, CoA = coenzyme A, DAG = diacylglycerol, TAG = triacylglycerol)



3. Procento řepkových linií se změněným obsahem olejů ukazuje na vzrůstající význam této genetické modifikace – Percentage of oilseed rape lines with modified oil content indicates an increasing importance of this genetic modification

byl přenesen do řepky. Původní transformanti vykazovali širokou variabilitu v obsahu laurátu jako následek odlišné exprese transgenů a tedy odlišné thioesterázové aktivity. Tyto linie daly vzniknout odrůdám známé jako „Laurate canola“, která se v USA pěstuje od roku 1995. Olej, který nese označení LauralTM, nachází uplatnění při výrobě mýdel a detergentů.

Obohacení oleje transgenních řepok o laurát koreluje s množstvím 12:0-ACP thioesterázové aktivity exprimované v semenech. I když je možné tuto aktivitu dále zvyšovat, např. vnesením dalších kopií genů, zvýšení již není tak významné (Voelker *et al.*, 1996). Bylo ale zjištěno, že enzym acyltransferáza lysofosfátové kyseliny (LPAAT) vykazuje silnou preferenci pro substrát 18:1 (Oo, Huang, 1989). Byly připraveny linie nesoucí LPAAT z kokosu a byly kříženy s liniemi s vysokou produkcí laurátu.

Ostatní středně dlouhé mastné kyseliny

Touto problematikou se zabývali zejména vědci firmy Calgene. Byla klonována řada acyl-ACP thioesteráz

z odlišných rostlinných druhů. Expres některých z nich vedla ke zvýšení 14:0 mastných kyselin na 40 %. Byla rovněž připravena řepka s vysokým obsahem kyseliny myristové nesoucí thioesterázu z *Cupea lanceolata*. Ke zvýšení podílu kyseliny olejové vedlo i vnesení genu pro acetyl-coenzym A carboxylázu z *Arabidopsis thaliana*. Jeho exprese je řízena napínovým promotorem a gen byl opatřen signálním peptidem specifickým pro chloroplasty (Roesler *et al.*, 1997).

Řepka s vysokým obsahem erukového oleje

Kyselina eruková (22:1) se používá k výrobě mazadel a obvykle se získává z řepok s vysokým obsahem kyseliny erukové (tzv. HEAR = high erucic acid rape). Takový olej slouží nejen jako zdroj pro eruková rezidua, ale je vhodný i pro některé klinické aplikace. Pro zvýšení produkce erukové kyseliny v HEAR odrůdách byly zvoleny dva přístupy. První se zaměřil na elongační systémy a téměř nulovou přítomnost VLCFA (very long chain fatty acid) (Stumpf, Pollard, 1983), druhý

na využití LPAAT z *Limnathes alba* (Lassner *et al.*, 1995).

Alkoholy a estery vosků

Všechny zatím zmíněné projekty se týkaly změny obsahu mastných kyselin. Další jsou pak zaměřeny na nahrazení jednoho typu zásobních lipidů jinými. Např. se jedná o estery vosků, které by se pak uplatnily v průmyslové výrobě. Žádaný je např. ester vosku, který se vyskytuje v jojobě. Metz *et al.* (1994) představili první linii řepky transformovanou pro tyto účely. Weier *et al.* (1998) použili enzym klonovaný z *E. coli* (sn-1-acylglycerol-3 fosfát acylesterázu). V semenech transformované řepky byly nalezeny oleje s dlouhou uhlíkatou kostrou. Výrazně bylo změněno stereochemické složení olejů, které se pak mohou uplatnit ve speciálních výrobách.

Oleje s vysokým obsahem kyseliny stearové

Pro výrobu ztužených tuků, čokolády a cukrářských výrobků se často používají stearáty, jejichž kostra se skládá z 18 uhlíků a neobsahuje žádnou dvojnou vazbu (18:0). Zatím se pro výrobu margarínů běžně využívají hydrogenované rostlinné oleje. Proces zvyšuje náklady na výrobu žádaných produktů. Současně bylo prokázáno, že vznikají i mastné kyseliny s vazbami typu „trans“. Tyto typy mastných kyselin zvyšují riziko koronárního onemocnění srdce. Facciotti *et al.* (1999) získali řepku transformovanou genem z *Garcinia mangostata* (GarmFatA1) upraveným mutagenézí *in vitro*. V semenech byl detekován zvýšený obsah stearátu až o 68 %. Jde o jeden z prvních příkladů úprav enzymů, resp. jejich genů, vedoucí ke zvýšení specifické aktivity, který se využívá pro transformaci rostlin. I při modifikaci obsahu mastných kyselin se bude kromě vnějších funkcí genů zřejmě využívat antisense technologie, jak to naznačují práce na *A. thaliana* (Cartea *et al.*, 1998).

Odolnost vůči patogenům, hmyzím škůdcům a herbicidům

Odolnost vůči patogenům je jedním z cílů šlechtitelů. Kromě integrované ochrany lze s úspěchem aplikovat techniku molekulární genetiky. Kromě genu pro δ -endotoxin a inhibitory proteáz a další testované geny s obecnou platností u dalších plodin se do řepky vnášejí geny, které mohou změnit strukturu povrchu listu – voskovou vrstvu a hladkost. Takové změny mohou rovněž zvýšit odolnost rostlin vůči hmyzu (Palaniswamy *et al.*, 1996).

Pro zvýšení odolnosti k patogenům se u geneticky modifikovaných rostlin používají obecně známé mechanismy, stejné pro různé rostlinné druhy. Jsou popsány v úvodním příspěvku tohoto čísla (Ondřej, 1999). Podobně je tomu s odolností vůči herbicidům. Je třeba zmínit pouze novou technologii, kterou v letošním roce

představila firma NOVARTIS. Technologie je vedena pod ochrannou známkou Acuron TM. Gen zavedený do rostlin je bude chránit proti herbicidům, které jsou známy jako inhibitory oxidáz protoporphirinů (PPOs). Jedná se o herbicidy, které rostliny přijímají jak kořeny, tak listy. Proto se hodí pro ošetření porostů v širokém časovém rozmezí. Herbicidy této třídy a transgenní odrůdy by se měly objevit na trhu po roce 2003 (NOVARTIS NEWS, Feb. 19, 1999). V současné době jsou již na trhu geneticky modifikované odrůdy řepky, které jsou odolné vůči herbicidům. Nejznámější je technologie firmy MONSANTO, USA, zahrnující odrůdy s označením „Roundup ready“, nebo odrůda Inovator firmy AgrEvo odolná vůči herbicidu Liberty.

Do řepky se vnášejí i další geny, které mohou zvýšit její tržní hodnotu. Morisette *et al.* (1998) připravili řepku, v jejíchž semenech se nevyvíjejí chloroplasty. Semena bez stop zeleného barviva jsou pak na trhu cennější.

Hybridní řepka

Hybridní odrůdy řepky dosahují o 15 až 20 % vyššího výnosu semen ve srovnání s tradičními liniiovými odrůdami. Při šlechtění hybridů lze dosud prakticky využít dvou genetických systémů autosterility – sporofytické autoinkompatibility (AI) a cytoplazmatické sterility (CMS), které umožňují kontrolované opylování při produkci hybridního osiva. Na rozdíl od zeleninových druhů rodu *Brassica*, kde většina současných F1 hybridů vznikla na základě AI, je u převážně samosprašné řepky přirozený výskyt AI minimální. Účinné alely S podmiňující AI lze do genotypů řepky vnášet pomocí resyntézy linií vzdálenou hybridizací původních výchozích druhů *B. oleracea* a *B. rapa*. Pokusy o přenos genů AI transformací nebyly zatím úspěšné. Dalším problémem je ekonomické množení AI linií vzhledem k vysoké potřebě osiva.

V praxi je využíváno několik systémů CMS vzniklých mutacemi jaderných a cytoplazmatických faktorů nebo vzdálenou hybridizací. Žádný z nich není plně uspokojivý pro nestabilitu sterility vlivem podmínek prostředí, neúplnou obnovu fertility a nepříznivé vlivy cizí cytoplazmy na hospodářsky významné znaky.

Nová metoda tvorby hybridních odrůd řepky je založena na použití transgenních rodičovských linií s *barnasa* (bakteriální RNAasa) geny, řízenými specifickým promotorem (TA29). Účinek těchto genů v tapetových buňkách řepkových květů vyvolává pylovou sterilitu. Jiný gen nazývaný *barstar* dekoduje inhibitor *barnasy*. Křížením pylově sterilních linií, obsahujících gen TA29-*barnasa* a pylově fertálních linií s genem TA29-*barstar* vznikají pylově fertální hybridy. Gen TA29-*barstar* tak působí jako dominantní obnovitel pylové fertility. Jak *barstar*, tak *barnasa* geny jsou ve vazbě s genem nazývaným *bar* či *pat*, který vyvolává rezistenci vůči některým herbicidům (Basta, Liberty). Enzym *Bar* účinně herbicidně aktivního tripeptidu inaktivuje. Nový hybridizační systém nazývaný

SEEDLINK (tm), vyvinutý firmou Plant Genetic Systems NV, usnadňuje tvorbu hybridních odrůd řepky a množení linií s geny obnovy fertility. Mateřské komponenty hybridů se skládají z 50 % pylově sterilních rostlin s herbicidní rezistencí a 50 % pylově fertálních rostlin, které mohou být odstraněny plošnou aplikací herbicidu ve fázi dvou až čtyř listů. Tento systém uměle indukované sterility se ukazuje jako stabilní. U transgenních linií nebyl zaznamenán nepříznivý vliv na agronomické a hospodářské znaky.

Stabilní exprese vneseného genu

Při výběru vhodné transgenní rostliny se požaduje dědičnost transgenu v souladu s Mendlovými zákony a stabilní exprese vneseného genu. Bylo však zjištěno, že aktivita genu se někdy může u části potomstva ztrácet nebo že dochází zcela ke ztrátě genu. Zeslabování aktivity genu se označuje jako silencing a dochází k němu několika způsoby. Metz *et al.* (1997) popsali silencing u transgenní řepky nesoucí PAT. Konstatovali, že k takové události může dojít i při množení osiva, což může mít dosti neblahé následky. U řepky zatím nebyl nalezen specifický způsob inaktivace transgenů, odlišný od jiných rostlin.

Odhad rizik spojených s uvedením nových odrůd do prostředí

Přenos genů z kulturních rostlin do plevelů hraje důležitou roli ve vývoji jak moderních odrůd, tak plevelů. Stejně jako se mohou křížit v rámci r. *Brassica* běžné odrůdy a plevele, tak se mohou plevele křížit s transgenními odrůdami (Jorgense *et al.*, 1996). Při studiu možnosti spontánního vzniku hybridů mezi kulturní *Brassica napus* a plevelnou *Brassica campestris* bylo zjištěno, že záleží na několika faktorech. Nejdůležitějšími jsou doba kvetení a hustota porostů obou druhů. Hybridní rostliny se však liší dormancí, která je činí poněkud méně konkurenceschopnými, než je samotná *B. campestris*. Překvapivě byla zjištěna závislost schopnosti přežít hybridů na výchozí odrůdě řepky (Hauser *et al.*, 1996). Poměrně snadný přenos transgenů z *B. napus* byl také do hořčice plané. I když většina potomstva byla sterilní, někteří hybridi produkovali semena a jejich potomstvo neslo sledovanou odolnost k herbicidu (Nair *et al.*, 1996).

Scott a Wilkinson (1999) studovali možnost přenosu transgenů do příbuzných druhů řepky a jako zdroj použili řepku, která měla gen pro EPSPS (odolnost ke glyfosátu) integrovaný v genomu chloroplastů (Daniell *et al.*, 1998). Zjistili, že přenos transformovaných plastidů do *B. rapa* se může uskutečnit velice zřídka a jen v určitých směsných populacích. K přenosu dochází s daleko menší pravděpodobností než u transgenů integrovaných v jaderné DNA.

Kromě možnosti přenosu jednotlivých genů do plevelných druhů se v případě genů odolnosti zkoumá jejich vliv na škůdce. Obecně se poukazuje na možnost

vzniku velmi odolných forem hmyzu. Ramachandran *et al.* (1998) zjistili, že směsné kultury transgenních a běžných odrůd nesnižují riziko vzniku rezistentních škůdců. Zkoumá se vliv míry exprese B.t. genu na přímé škůdce rodu *Brassica* i na další lepidoptera (Stewart *et al.*, 1996). Picard-Nizou *et al.* (1997) sledovali vliv inhibitoru trypsinu z bobů, chitinázy a β 1,3 glukonázy v transgenní řepce na včely. Přítomnost inhibitoru trypsinu a glukonázy v pylu ovlivňovala určité schopnosti včel. Popsané testy mohou sloužit i jako bioindikátor při výzkumu vlivu transgenů na užitečný hmyz. Zvláštní pozornost je věnována vedlejšímu efektu transgenních rostlin na predátory škůdců. Je velmi pravděpodobné, že skutečný efekt bude možné zjistit až v době, kdy se transgenní rostliny budou pěstovat na rozsáhlých pozemcích. Schuller *et al.* (1999) konstatují, že studium vlivu vnesených transgenů na tritofický systém musí být sledováno stejně, jako je tomu u chemických pesticidů.

ZÁVĚR

Diskuse o geneticky modifikovaných rostlinách probíhá na úrovni vědecké i politické. Problematika se dotýká každého člověka. Vědecká komunita se většinou staví za rozvoj transgenních technologií. Zejména v Evropě se zvažují více rizika než přínosy. U tak rozšířené plodiny, jakou je řepka, která má mnohé průmyslové využití, bude však výzkum a příprava transgenních materiálů pokračovat. Získané modifikace, které umožní její využití v dalších oblastech, budou při narůstající spotřebě lidstva stále žádanější.

LITERATURA

- Bergmann P., Glimelius K. (1993): Electroporation of rape-seed protoplasts – transient and stable transformation. *Physiol. Plantarum*, 88: 604–611.
- Cartea M. E., Midgal M., Galle A. M., Pelletier G., Guerche P. (1998): Comparison of sense and antisense methodologies for modifying the fatty acid composition of *Arabidopsis thaliana* oilseed. *Plant Sci.*, 136: 181–194.
- Daniell H., Datta R., Varma S., Gray S., Lee S. B. (1998): Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nat. Biotechnol.*, 16: 401.
- Davies H. M., Anderson L., Bleibaum J., Hawkins D. J., Fan C., Worrell A. C., Voelker T. A. (1993): Fatty acid synthesis genes: Engineering the production of medium-chain fatty acids. In: Janick J., Simon J. E. (eds.): *New Crops*. New York, Wiley: 176–181.
- De Block M., Brouwer D., Tenning P. (1989): Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants. *Plant Physiol.*, 91: 694–701.
- Dormann M., Datla N., Hayden A., Puttick D., Quandt J. (1998): Non-destructive screening of haploid embryos for

- glufosinate ammonium resistance four weeks after microspore transformation in *Brassica*. *Acta Hort.*, 459: 191–197.
- Dörman P., Voelker T. A., Ohlrogge J. B. (1995): Cloning and expression in *E. coli* of a novel thioesterase from *Arabidopsis thaliana* specific for long chain acyl-acyl carrier proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 316: 612–618.
- Facciotti M. T., Bertain P. B., Yuan L. (1999): Improved stearate phenotype in transgenic canola expressing a modified acyl-acyl carrier protein thioesterase. *Nat. Biotechnol.*, 17: 593–614.
- Friedt W., Luhs W. (1998): Recent developments and perspectives of industrial rapeseed breeding. *Fett – Lipid*, 100: 219–226.
- Fry J., Barnason A., Horsch R. B. (1987): Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium* based vectors. *Plant Cell Rep.*, 6: 321–325.
- Fukuoka H., Ogawa T., Matsuoka M., Ohkawa Y., Yano H. (1998): Direct gene delivery into isolated microspores of rapeseed (*Brassica napus* L.) and the production of fertile transgenic plants. *Plant Cell Rep.*, 17: 323–328.
- Galili G., Sengupta-Gopalan C., Ceriotti S. A. (1998): The endoplasmic reticulum of plant cells and its role in protein maturation and biogenesis of oil bodies. *Plant Mol. Biol.*, 38: 1–29.
- Glimelius K. (1984): High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some *Brassicaceae*. *Physiol. Plantarum*, 61: 38–44.
- Hachey J. E., Sharma K. K., Moloney M. M. (1991): Efficient shoot regeneration of *Brassica campestris* using cotyledon explants cultured *in vitro*. *Plant Cell Rep.*, 9: 549–554.
- Hauser T. P., Lanbo L., Ostergaard H., Jorgensen R. B. (1996): Spontaneous transfer of traits between crops and weeds: *Brassica napus* and weedy *B. campestris*. In: 13th Danish Plant Protection Conf. Side Effect of Pesticides, Weeds. SP-Rapport Statens plantævelsforsøg, 3: 169–177.
- Hervé C., Rouan D., Guerche P., Montané P. (1993): Molecular analysis of transgenic rapeseed plants obtained by direct gene transfer of two separate plasmids containing, respectively, the cauliflower mosaic virus coat protein gene and a selectable marker gene. *Plant Sci.*, 91: 181–193.
- Chapel M., Glimelius K. (1990): Temporary inhibition of cell wall synthesis improves the transient expression of the GUS gene in *Brassica napus* mesophyll protoplasts. *Plant Cell Rep.*, 9: 105–108.
- Charest P. J., Iyer V. N., Miki B. L. (1989): Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strains with *Brassica napus* and *Brassica juncea*. *Plant Cell Rep.*, 8: 303–306.
- Chen J. L., Beversdorf W. D. (1994): A combined use of microprojectile bombardment and DNA imbibition enhances transformation frequency of canola (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 88: 187–192.
- Jones-Villeneuve E., Huang B., Prudhomme I., Bird S., Kemble R., Hattori J., Miki B. (1995): Assessment of microinjection for introducing DNA into uninuclear microspores of rapeseed. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 40: 97–100.
- Jorgensen R. B., Hauser T. P., Mikkelsen T. R., Ostergaard H. (1996): Transfer of engineered genes from crop to wild plants. *Trends Plant Sci.*, 1: 356–358.
- Khehra G. S., Mathias R. J. (1992): The interaction of genotype, explant and media on the regeneration of shoots from complex explants of *Brassica napus* L. *J. Exp. Bot.*, 43: 1413–1418.
- Lassner M. W., Levering C. K., Davies H. M., Knutson D. S. (1995): Lysophosphatidic acid acyltransferase from *Limnanthes alba* mediates insertion of erucic acid at the sn-2 position of triacylglycerol in transgenic rapeseed oil. *Plant Physiol.*, 109: 1389–1394.
- Lichter R. (1982): Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 105: 427–434.
- Metz J. G., Pollard M. R., Lassner M. W. (1994): Fatty acyl reductases. U.S. Patent 5, 370: 996.
- Metz P. L. J., Jacobsen E., Stiekema W. J. (1997): Occasional loss of expression of phosphinothricin tolerance in sexual offspring of transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Euphytica*, 98: 189–196.
- Miki B. L., Labbé H., Hattori J., Quellet T., Sunohara G., Charest P. J., Iyer V. N. (1990): Transformation of *Brassica napus* canola cultivars with *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase genes and analysis of herbicide resistance. *Theor. Appl. Genet.*, 80: 449–458.
- Moloney M. M., Walkker J. M., Sharma K. K. (1989): High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Rep.*, 8: 238–242.
- Morissette J. C. P., Korschuh M. N., Johnson-Flanagan A. M., Singh J., Robert L. (1998): Reduction of chlorophyll accumulation in seed of transgenic *Brassica napus* using antisense technology. In: Thomas G., Monteiro A. A. (eds.): *Brassica 97*, Belgium: 183–190.
- Nair H. S., Brown J., Brown A. P. (1996): Interspecific and intergeneric hybridization between genetically engineered canola and related weed species. *Cruciferae Newsletter*, 18: 38–39.
- Neuhaus G., Spangenberg G., Scheid O. M., Schweiger H. G. (1987): Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryoids. *Theor. Appl. Genet.*, 75: 30–36.
- Ohlrogge J. B. (1994): Design of new plant products: Engineering of fatty acid metabolism. *Plant Physiol.*, 104: 821–826.
- Ohlrogge J. B., Browse J. (1995): Lipid biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 957–970.
- Ohlsson M., Eriksson T. (1988): Transformation of *Brassica campestris* protoplasts with *Agrobacterium tumefaciens*. *Hereditas*, 108: 173–177.
- Oo K. C., Huang A. H. C. (1989): Lysophosphatidate acyltransferase activities in the microsomes from palm endosperm, maize scutellum, and rapeseed cotyledon of maturing seeds. *Plant Physiol.*, 91: 1288–1295.
- Ovesná J., Ptacek L., Opatrný Z. (1993): Factors influencing the regeneration capacity of oilseed rape and cauliflower in transformation experiments. *Biol. Plantarum*, 35: 107–112.
- Palaniswamy P., Dias J. S., Crute I., Monteiro A. A. (1996): Host plant resistance to insect pests of cruciferous crops with special reference to flea beetles feeding in canola – a review. *Acta Hort.*, 407: 469–481.
- Pechan P. M. (1989): Successful cocultivation of *Brassica napus* microspores and proembryos with *Agrobacterium*. *Plant Cell Rep.*, 8: 387–390.
- Pental D., Pradhan A. K., Sodhi Y. S., Mukhopadhyay A. (1993): Variations among *Brassica juncea* cultivars for re-

- generation from hypocotyl explants and optimization of conditions for *Agrobacterium* mediated genetic transformation. *Plant Cell Rep.*, 12: 462–467.
- Picard-Nizou A. L., Grison R., Olsen L., Pioche C., Arnold G., Pham-Delegue M. H. (1997): Impact of proteins used in plant genetic engineering: Toxicity and behavioral study in the honeybee. *J. Econ. Entomol.*, 90: 1710–1716.
- Poulsen G. B. (1996): Genetic transformation of *Brassica*. *Plant Breeding*, 115: 209–225.
- Poulsen G. B., Nielsen S. V. S. (1989): Regeneration of plants from hypocotyl protoplasts of rapeseed (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) cultivars. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 17: 153–158.
- Pua E. C., Mehra Palta A., Nagy F., Chua N. H. (1987): Transgenic plants of *Brassica napus* L. *Biotechnology*, 5: 815–817.
- Radke S. E., Andrews B. M., Moloney M. M., Crouch M. L., Krid J. C., Knauf V. C. (1988): Transformation of *Brassica napus* L. using *Agrobacterium tumefaciens*: developmentally regulated expression of a reintroduced napin gene. *Theor. Appl. Genet.*, 75: 685–694.
- Ramachandran S., Buntill G. D., All J. N., Raymer P. L., Stewart C. N. (1998): Movement and survival of diamondback moth (*Lepidoptera: Plutellidae*) larvae in mixtures of nontransgenic and transgenic Canola Containing a cryIA (c) gene of *Bacillus thuringiensis*. *Environ. Entomol.*, 27: 649–656.
- Roesler K., Shintani D., Savage L., Boduppali S., Ohlrogge J. (1997): Targeting of the Arabidopsis homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastid of rapeseeds. *Plant Physiol.*, 113: 75–81.
- Scott S. E., Wilkinson M. J. (1999): Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa*. *Nat. Biotechnol.*, 17: 390–392.
- Schroder M., Dixelius C., Rahlen L., Glimelius K. (1994): Transformation of *Brassica napus* by using the *aad A* gene as selectable marker and inheritance studies of the marker genes. *Physiol. Plantarum*, 92: 37–46.
- Schuller T. H., Poppy G. M., Kerry B. R., Denholm I. (1999): Potential side effects of insect-resistant transgenic plants on arthropod natural enemies. *Tibtech*, 17: 210–216.
- Schulze D., Pauls K. P. (1998): Flow cytometric characterization of embryogenic and gametophytic development in *Brassica-Napus* microspore cultures. *Plant Cell Physiol.*, 39: 226–234.
- Srivastava V., Reddy A. S., Mukherjee S. G. (1988): Transformation and regeneration of *Brassica oleracea* mediated by an oncogenic *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.*, 7: 504–507.
- Stewart C. N., Jr., Adang M. J., All J. N., Raymer P. L., Suresh R., Parrott W. A. (1996): Insect control and dosage effect in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAc gene. *Plant Physiol.*, 112: 115–120.
- Stumpf P. K., Pollard M. R. (1983): Pathways of fatty acid biosynthesis in higher plants with particular reference to developing rapeseed. In: Kramer J. K., Sauer F., Pigden W. J. (eds.): *High and Low Erucic Acid Rapeseed Oils*. Academic Press: 131–141.
- Swansson E. B., Erickson L. R. (1989): Haploid transformation in *Brassica napus* using an octopine-producing strain of *Agrobacterium tumefaciens*. *Theor. Appl. Genet.*, 78: 831–835.
- Töpfer R., Martini N., Schell J. (1995): Modification of plant lipid synthesis. *Science*, 268: 681–686.
- Voelker T. A., Hayes T. R., Cranmer A. M., Turner J. C., Davies H. M. (1996): Genetic engineering of a quantitative trait: metabolic and genetic parameters influencing the accumulation of laurate in rapeseed. *Plant J.*, 9: 229–241.
- Voelker T. A., Worrell A. C., Anderson L., Bleibaum J., Fan C., Hawkins D. J., Radke S. E., Davies H. M. (1992): Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants. *Science*, 257: 72–74.
- Waldron C., Murphy E. B., Verver J., Eggen R., van Kamman A., Goldbach R. (1985): Resistance to hygromycin B. *Plant Mol. Biol.*, 5: 103–108.
- Weier D., Luhs W., Dettendorfer J., Frentzen M. (1998): sn-1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase of *Escherichia coli* causes insertion of cis-11 eicosenoic acid into the sn-2 position of transgenic rapeseed oil. *Mol. Breeding*, 4: 39–46.
- Yang M. Z., Jia S. R., Pua E. C. (1991): High frequency of plant regeneration from hypocotyl explants of *Brassica carinata* A. Br. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 24: 79–82.
- Yenofsky R. L., Fine M., Pellow J. W. (1990): A mutant neomycin phosphotransferase ii gene reduces the resistance of transformants to antibiotic selection pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 3435–3439.

Došlo 4. 11. 1999

Kontaktní adresa:

RNDr. Jaroslava Ovesná, Výzkumný ústav rostlinné výroby, Drnovská 507, 161 06 Praha 6-Ruzyně, Česká republika, tel.: +420 2/33 02 24 47, fax: +420 2/33 02 22 86, e-mail: ovesna@hb.vurv.cz

Upozornění pro autory vědeckých časopisů

Z důvodu rychlejšího a kvalitnějšího zpracování grafických příloh (grafů, schémat apod.) příspěvků zasílaných do redakce Vás žádáme o jejich dodání kromě tištěné formy i na disketách.

Pérovky mohou být zpracovány jako předloha pro skenování nebo mohou být dodány též jako bitmapa ve formátu ***.TIF** (600 DPI). Pro skenování by grafy neměly obsahovat šedivé plochy. Místo šedi se mohou použít různé typy černobílého šrafování.

Jestliže jsou **grafy vytvořeny v programu EXCEL**, je potřeba je dodat uložené v tomto programu (nestačí grafy naimportované do programu WORD).

Obrázky **nezasílejte** ve formátu **Harvard Graphics**, nýbrž vyexportované do některého z výše uvedených formátů.

SOUČASNÝ STAV TRANSGENOZE U PÍCNÍCH LEGUMINÓZ

TRANSGENOSIS IN FORAGE LEGUMES

J. Řepková¹, J. Nedělník²

¹Masaryk University, Faculty of Science, Department of Genetics and Molecular Biology, Brno, Czech Republic

²Forage Crop Research Institute, Ltd., Troubsko, Czech Republic

ABSTRACT: Forage legumes are very important components of animal feed and are capable to supply nitrogen demand from symbiotic associations with *Rhizobium*. Genetic variability of alfalfa (*Medicago sativa*), red clover (*Trifolium pratense*) and white clover (*T. repens*) appears to be limited. Therefore incorporation of various genes from other species via genetic transformation offers a definite potential. The use of genetically engineered plasmids carried by *Agrobacterium tumefaciens* is considered an ideal system for forage legumes. The use of *A. rhizogenes* also offers a convenient technique for genetic manipulation of legumes. Limited transformation success with particle bombardment of intact meristems and pollen has been reported. Most of the currently used transformation methods require regeneration of transformed cells into whole plants from cell suspension or callus tissue culture. Advanced cultivars of most forage legumes have not shown a high level of plant regeneration. This low frequency of regeneration may create problems with transformation methods. Molecular engineering is impacting modern agriculture and opens tremendous possibilities. Gene technology has proven to be a powerful tool to help create variability that would not occur with conventional means. The first transgenic alfalfa cultivars will be marketed early into the 21st century. They will possess characteristics such as herbicide resistance, insect resistance, enhanced forage yield, improved digestibility and a variety of stress tolerance traits. Output traits such as better protein utilisation and plant vaccines are also being considered.

Keywords: forage legumes; genetic manipulation; resistance genes; stress tolerance; digestibility

ABSTRAKT: Genetické manipulace se stávají u významných pícních leguminóz (vojtěška setá, jetel plazivý, jetel luční) důležitým nástrojem zlepšení jejich agronomických vlastností. Cílem genového inženýrství je introdukce genů rezistence k nejčastějším původcům chorob, genů tolerance k abiotickým stresovým faktorům (suchovzdornost, zimovzdornost, vysoké koncentrace solí), zlepšení kvality bílkovin, stravitelnosti a schopnosti fixace vzdušného dusíku.

Klíčová slova: pícní leguminózy; transgenóze; geny rezistence; tolerance ke stresům; stravitelnost

Úvod

V roce 1999 byly geneticky modifikované plodiny pěstovány v celosvětovém měřítku na 40 milionech hektarů. Dominantní postavení zaujímá sója, dalšími plodinami jsou kukuřice, řepka a některé druhy zelenin. Pícní leguminózy z tohoto pohledu zatím zaujímají relativně malou plochu. Přesto i na ně je soustředěn intenzivní zájem genetiků a šlechtitelů. Důvodů je několik. Pícní leguminózy (především vojtěška, jetel luční a příbuzné druhy) tvoří důležitou složku výživy zvířat, patří ke druhům schopným fixovat vzdušný dusík, jsou nepochybně plodinami zlepšujícími a stabilizujícími půdní úrodnost. Klasickými šlechtitelskými postupy bylo dosaženo téměř limitu ve zvyšování výnosového potenciálu a také využívání genetické variability, např. u rezistence vůči biotickým činitelům, je omezené. Proto se tyto i další agronomicky výhodné vlastnosti, jako

je tolerance ke stresovým faktorům (vysoké koncentrace solí, suchovzdornost, mrazuvzdornost), kvalita bílkovin, stravitelnost nebo schopnost fixace vzdušného dusíku, stávají cílem genetické manipulace, tedy introdukce některých důležitých genů z jiných nejen rostlinných druhů cestou transgenóze. Obecně se očekává, že geneticky modifikované odrůdy mohou přinést zvýšení a stabilizaci výnosů, omezení množství aplikovaných pesticidů, snížení pěstitelského rizika a v neposlední řadě více možností pro rotaci plodin v osevních postupech.

Základním předpokladem využití různých metod transgenóze u píce je vypracování spolehlivých technik regenerace celistvých rostlin z různých explantátů *in vitro*, především z kalusových nebo suspenzních kultur. Z kořenových kultur bylo dosaženo regenerace rostlin po kultivaci s agrobakteriemi u vojtěšky (Spano *et al.*, 1987) a štiřovníku růžkatého (Petit *et al.*, 1987;

Webb *et al.*, 1990). Většina komerčně využívaných odrůd píce leguminóz nemá dostatečný embryogenní potenciál, což přináší problémy při praktické aplikaci různých metod transgenoz. Embryogenní potenciál vojtěšky a jetele lučního je geneticky determinován (McLean, Nowak, 1998; Wann *et al.*, 1988; Wofford *et al.*, 1992). Opakovaná selekce přinesla významné zvýšení regenerační schopnosti u obou druhů (Bingham, 1989; Quesenberry, Smith, 1993; Řepková, Nedělník, 1998; Smith, Quesenberry, 1995). U jetele plazivého byly vytypovány vhodné explantáty pro přímou regeneraci rostlin (White, Voisey, 1994).

Vhodným systémem pro přenos genů u vyšších rostlin je využití *Agrobacterium tumefaciens*. Platí to i pro píce leguminóz, u nichž bylo *A. tumefaciens* úspěšně využito. Jako vhodný vektor se pro genové manipulace nabízí také *A. rhizogenes*. Přesto, že zatím byl zaznamenán pouze ojedinělý úspěch u alternativní metody transgenoz prostřednictvím bombardování intaktních meristematických pletiv (Songstad *et al.*, 1995) a pylů zrn (Ramaiah, Skinner, 1997), jsou i tyto metody dále přístupy dále rozpracovávány.

Účinnost transgenoz s využitím *A. tumefaciens* se liší mezi jednotlivými druhy i mezi genotypy v rámci jednoho druhu (Webb *et al.*, 1987; Quesenberry *et al.*, 1996). Transgenní linie jetele lučního, jetele plazivého a štirovniku růžkatého se lišily v počtu začleněných inzertů po inokulaci *A. rhizogenes*. Linie jetele plazivého obsahovaly jednu T-DNA kopii, zatímco linie jetele lučního měly jeden až pět inzertů. Rostliny regenerované z několika linií štirovniku růžkatého měly dva až osm inzertů (Webb *et al.*, 1990).

Z píce leguminóz je nejdůležitější pícinou v mnoha částech světa vojtěška setá (*Medicago sativa* L.). Je to alogamní autotetraploidní druh vykazující značnou inbrední depresi. Právě tetraploidie je velkou nevýhodou při transgenoz. Spíše jako modelový druh je využívána *M. truncatula* Gaertner, která je jednoletá, autogamní a diploidní. Je proto vhodnější pro molekulární analýzu, ale také z hlediska úspěšné regenerace *in vitro* a transgenoz (Neves *et al.*, 1999; Trinh *et al.*, 1998). Modelovým genotypem se pro transgenozu i vojtěšky stal vysoce embryogenní genotyp Regen S (D'Halluin *et al.*, 1990; McKersie *et al.*, 1993). Bylo však dosaženo transgenoz i u dalších genotypů vysoce dormantních (Blake *et al.*, 1991; Schroeder *et al.*, 1991) i nedormantních (Pezzoti *et al.*, 1991; Shanin *et al.*, 1986; Sukhapinda *et al.*, 1987). Na spolehlivé a účinné metodě transgenoz komerčních vysoce výnosných a rezistentních odrůd se intenzivně pracuje. Desgagnés *et al.* (1995) optimalizovali metodu transgenoz prostřednictvím *A. tumefaciens* u několika novoslechtění, která jsou rezistentní vůči původci tracheálního vadnutí *Verticillium albo-atrum*.

Hospodářsky nejvýznamnějšími druhy rodu *Trifolium* jsou jetel luční (*T. pratense* L.) a jetel plazivý (*T. repens* L.). Jde o vytrvalé druhy, které jsou často napadány různými patogeny a škůdci. Úspěšná transgenoz prostřednictvím *Agrobacterium* byla dosažena

u jetele plazivého (Voisey *et al.*, 1994; White, Greenwood, 1987) i jetele lučního (Quesenberry *et al.*, 1992, 1996).

Štirovník růžkatý (*Lotus corniculatus* L.) je vhodným druhem pro studium exprese cizích genů prostřednictvím transgenoz s *A. rhizogenes*. Byly vypracovány metody regenerace z kalusů získaných z vegetativních částí rostlin (Vessabur, Grant, 1995; Webb *et al.*, 1987) a z buněčné suspenze (Swanson, Toms, 1980). Jako modelový druh je ke studiu transgenoz využíván také *L. japonicus* (Larsen), který je autogamní a diploidní s poměrně malým genomem (Stiller *et al.*, 1997). Oger *et al.* (1996) vypracovali jednoduchou metodu transgenoz založenou na inokulaci mladých semenáčků *in planta* a schopnosti spontánní regenerace výhonů z děloh.

Tolerance ke stresovým faktorům

Aklimatizace k chladu u vojtěšky je doprovázena specifickou expresí několika genů. Úroveň exprese těchto genů je v pozitivní korelaci se stupněm zimovzdornosti u několika odrůd vojtěšky. Při transgenoz vojtěšky byl využit gen *Mn-Sod* z genomu *Nicotiana glauca* (McKersie *et al.*, 1996) pro enzym superoxiddismutázu. Tyto enzymy katalyzují přeměnu superoxidových radikálů, které vznikají v rostlinných buňkách ve zvýšené míře ve stresových podmínkách mrazu nebo sucha. Transgenní rostliny testované v polních podmínkách vykazovaly vyšší odolnost k nízkým teplotám (McKersie *et al.*, 1999).

U jetele lučního byly využity cDNA sondy genů vojtěšky kódujících rezistenci k chladu, s cílem detekce těchto genů v genomu jetele. Uskutečňuje se introdukce genů chladu z genomu vojtěšky (Samac *et al.*, 1998).

Podářilo se získat rostliny s introdukovaným genem pro metalothionein (Samac *et al.*, 1998). Transgenní rostliny jsou testovány na svoji schopnost vázat některé toxické těžké kovy pro perspektivní využití ve znečištěných oblastech. Zvýšení tolerance vojtěšky k zasažení kombinuje selekci variant získaných kultivací buněk *in vitro*. Po regeneraci tolerantních rostlin jsou identifikovány geny kódující tuto toleranci. Gen *Alfin1* byl izolován z buněčné linie tolerantní k vysokým koncentracím solí. Gen kóduje regulační bílkovinu, která reguluje expresi genů převážně v kořenech (Winicov, Bastola, 1997).

Rezistence k původcům chorob a škůdcům

Ochrana vůči virovým patogenům je založena na metodě, která zabráňuje šíření virové infekce. Introdukce genu pro pláštěvou bílkovinu viru mozaiky vojtěšky byla úspěšná u jetele plazivého. Bylo dosaženo exprese transgenů a získány rostliny rezistentní k tomuto viru (Clive, 1997). V polních pokusech jsou testovány také rostliny s alternativními geny pro pláštěvou bílkovinu (Dudas *et al.*, 1998).

Jsou klonovány geny kódující bílkoviny aktivované patogeny. V polních pokusech je testována transgenní vojtěška se zlepšenou expresí genů kódujících bílkoviny s enzymatickou aktivitou chitináz a glukonáz, jež zvyšují rezistenci k houbovým patogenům (Samac *et al.*, 1998). U vojtěšky je studována biosyntéza izoflavonoidního fytoalexinu medicarpinu a klonují se geny klíčových enzymů (chalkonsyntáza, izoflavon metyltransferáza) (Groose *et al.*, 1996).

S cílem zlepšení rezistence vojtěšky k hmyzím škůdcům byl do jejího genomu (Samac *et al.*, 1998) a do genomu štírovníku růžkatého (Skot *et al.*, 1990) introdukován gen pro Bt toxin z *Bacillus thuringiensis*. Groose *et al.* (1996) se pokusili o introdukci genu kódujícího inhibitory proteináz. Cílem bylo opět vytvoření zárodečné plazmy vojtěšky rezistentní k hmyzím škůdcům.

Rezistence k herbicidům

Transgenoze vojtěšky genotypu Regen S pomocí *A. tumefaciens* a vznik 59 transgenních linií obsahujících gen *bar* kódující rezistenci k herbicidu glufosinát-amoniu byla výsledkem práce kolektivu autorů (D'Halluin *et al.*, 1990). Rogers a Parkes (1995) se pokusili introdukovat do genomu vojtěšky gen kódující rezistenci k herbicidní látce glyfosátu. Transgenní rostliny jsou testovány v polních podmínkách.

Fixace vzdušného dusíku

Transformační systém prostřednictvím *Agrobacterium* je využíván ke studiu regulace genů, které determinují asimilaci vzdušného dusíku u rostlin, a to jak bakteriálních genů (*nod*, *nif* a *fix*), tak genů pro noduliny z genomu rostlin. Noduliny jsou specifické proteiny, které jsou syntetizovány v kořenových hlízkách. K nodulinům, jejichž funkce byla určena, patří leghemoglobin. U štírovníku růžkatého byla studována exprese genu pro leghemoglobin sóje (Stougaard *et al.*, 1986) a genu *GS15* kódujícího glutaminsyntetázu (Vincent *et al.*, 1997) z genomu sóje. Schopnosti regenerace z kořenových vlásků u štírovníku růžkatého se široce využívá při studiu exprese a regulace genů determinujících proces fixace vzdušného dusíku (Stougaard *et al.*, 1986). Při asimilaci CO₂ během symbiotické fixace dusíku v hlízkách leguminóz hraje důležitou úlohu fosfoenolpyruvát karboxyláza (PEPC). U vojtěšky byl izolován a charakterizován gen *PEPC7* (Pathirana *et al.*, 1997).

Vedle výše uvedených postupů se v poslední době objevily i informace o tvorbě genotypů vojtěšky určené k odeírání přebytkového dusíku z půdy. Jsou to rostliny, kterým chybí schopnost vázat vzdušný dusík a naopak by měly upřednostňovat dusík půdní. Využití této vojtěšky se předpokládá při odstraňování dusíku z půdy kontaminované odtoky hnojiv nebo přehnojené umělými hnojivy předtím, než se kontaminanty dostanou do podzemních vod.

Tvorba enzymů

Je snaha vytvořit geneticky pozměněné materiály vojtěšky produkující ve zvýšené míře látky využitelné ve výrobě farmaceutik nebo enzymů. Jedná se především o vyšší produkci fytáz, alfa-amyláz nebo peroxidáz. Fytázy jsou využitelné při lepším využívání živin u nepřežvýkavců, alfa-amylázy se používají při konverzi škrobu na cukr, peroxidázy jsou potenciálně využitelné při výrobě papíru.

Kvalita bílkovin

Bílkoviny píceňích leguminóz jsou relativně chudé na aminokyseliny obsahující síru. Z tohoto důvodu se výzkum v oblasti zlepšení kvality bílkovin zaměřil na zvýšení jejich obsahu prostřednictvím introdukce genu *GIL* pocházejícího z kukuřice, jež kóduje zásobní bílkovinu gama-zein. U transformovaných rostlin vojtěšky však byla hlavním problémem nízká koncentrace gama-zeinu (Bellucci *et al.*, 1997). Také do genomu jetele plazivého se podařilo introdukovat gen kukuřice kódující zásobní bílkovinu semen delta-zein. U všech získaných transgenních rostlin docházelo k expresi transgenu, a to v řapících, internodiích, kořenech a semenech (Sharma *et al.*, 1998).

Syntéza taninů

Štírovník růžkatý se využívá při studiu genů kódujících taniny. Prvním příkladem genetické modifikace biosyntézy taninů u štírovníku byla introdukce genu *DFR* z genomu hledíku kódujícího enzym dihydroflavonol reduktázu (Bavage *et al.*, 1996). Gen pro enzym chalkonsyntázu z fazolu obecného byl introdukován do genomu štírovníku (Colliver *et al.*, 1994). Studium a izolace genů kódujících taniny umožní jejich přenos do genomů rostlinných druhů, které tyto geny nemají, např. do genomu vojtěšky.

Výsledky polních pokusů s transgenními píceňími leguminózami

Polní pokusy ukázaly dobrou stabilitu testovaného transgenního materiálu, což je základním předpokladem pro jeho následné praktické využití. Vojtěška byla mezi prvními 25 geneticky modifikovanými druhy rostlin, které byly roku 1988 uvolněny pro polní pokusy. Od té doby se nejvíce polních pokusů uskutečnilo kromě vojtěšky také s jetelem plazivým. V Kanadě tvořily roku 1990 plochy s transgenní vojtěškou 3 % z celkové výměry transgenních plodin. Roku 1995 to bylo 5 % a roku 1997 2 % (Clive, 1997). V Austrálii převažují polní pokusy s transgenním jetelem plazivým především s rezistencí vůči viru mozaiky vojtěšky (Clive, 1997). Komerční využití prvních transgenních odrůd vojtěšky se plánuje na začátek 21. století (Loiselle, McCaslin, 1999). Budou to odrůdy rezistentní k herbicidům a hmyzu, se zlepšeným výnosem, stravitelností a lepší odolností ke stresovým faktorům.

LITERATURA

- Bavage A. D., Davies I. G., Robbins M. P., Morris P. (1996): Modified condensed tannins in transgenic *Lotus corniculatus* plants expressing heterologous dihydroflavonol reductase genes. Polyphenols Communications 96. In: Vercauteren *et al.* (eds.): Proc. 18th Int. Conf. on Polyphenols, Bordeaux, France: 211–212.
- Bellucci M., Lazzari B., Viotti A., Arcioni S. (1997): Differential expression of a gamma-zein gene in *Medicago sativa*, *Lotus corniculatus* and *Nicotiana tabacum*. Plant Sci. Limerick, 127: 161–169.
- Bingham E. T. (1989): Registration of Regen-S alfalfa germplasm useful in tissue culture and transformation research. Crop Sci., 29: 1095–1096.
- Blake N. K., Ditterline R. L., Stout R. G. (1991): Polymerase chain reaction used for monitoring multiple gene interaction in *Agrobacterium*-mediated transformation. Crop Sci., 31: 1686–1688.
- Clive J. (1997): Global status of transgenic crops in 1997. ISAAA Briefs, 5: 1–30.
- Colliver S. P., Robbins M. P., Morris P. (1994): An antisense strategy for the genetic manipulation of condensed tannins and isoflavonoid accumulation in transgenic *Lotus corniculatus*. Acta Hort., 381: 148–151.
- Desgagnés R., Laberge S., Allard G., Khoudi H., Castonguay Y., Lapointe J., Michaud R., Vézina L. P. (1995): Genetic transformation of commercial breeding lines of alfalfa (*Medicago sativa*). Plant Cell Tis. Org. Cult., 42: 129–140.
- D'Halluin K., Botterman J., Greef W. (1990): Engineering of herbicide-resistant alfalfa and evaluation under field conditions. Crop Sci., 30: 866–871.
- Dudas B., Woodfield D., Tong P. M., Nicholls M. F., Cousins G. R., Burgess R., White D. W. R., Beck D. L., Lough T. J., Forster R. L. S. (1998): Estimating the agronomic impact of white clover mosaic virus on white clover performance in the North Island of New Zealand. New Zeal. J. Agr. Res., 41: 171–178.
- Groose R. W., McKersie B. D., Samac D. A. (1996): 1996 report of the committee on the use of biotechnology research in alfalfa improvement. Rep. of the 35th North American Alfalfa Improvement Conf., July 16–20, Oklahoma City, USA.
- Loiselle F., McCaslin M. (1999): Opportunities and challenges of generating transgenic lucerne cultivars. Proc. 13th Eucarpia Medicago Group Meeting, September 13–16, Perugia, Italy: 8.
- McKersie B. D., Chen Y., de Beus M., Bowley S. R., Bowler C., Inzé D., D'Halluin K., Botterman J. (1993): Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). Plant Physiol., 103: 1155–1163.
- McKersie B. D., Bowley S. R., Jones K. S. (1999): Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. Plant Physiol., 119: 839–848.
- McKersie B. D., Bowley S. R., Harjento E., Leprince O. (1996): Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. Plant Physiol., 111: 1177–1181.
- McLean N. L., Nowak J. (1998): Inheritance of somatic embryogenesis in red clover (*Trifolium pratense* L.) Theor. Appl. Genet., 97: 557–562.
- Neves L. O., Duque S. R. L., Almeida J. S., Fevèreiro P. S. (1999): Repetitive somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* ssp. *narbonensis* and *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong. Plant Cell Rep., 18: 398–405.
- Oger P., Petit A., Dessaux Y. (1996): A simple technique for direct transformation and regeneration of the diploid legume species *Lotus japonicus*. Plant Sci., 116: 159–168.
- Pathirana M. S., Samac D. A., Roeven R., Yoshioka H., Vance C. P., Gantt J. S. (1997): Analyses of phosphoenolpyruvate carboxylase gene structure and expression in alfalfa nodules. Plant J., 12: 293–304.
- Petit A., Stougaard J., Kühle A., Marcker K. J., Tempé J. (1987): Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus*: a system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. Mol. Gen. Genet., 207: 245–250.
- Pezzotti M., Pupilli F., Damiani F., Arcioni S. (1991): Transformation of *Medicago sativa* L. using a Ti plasmid derived vector. Plant Breeding, 106: 39–46.
- Quesenberry K. H., Smith R. R. (1993): Recurrent selection for plant regeneration from red clover tissue culture. Crop Sci., 33: 585–589.
- Quesenberry K. H., Wofford D. S., Krottje P. A., Smith R. L. (1992): Production of transgenic red clover. In: Wofford D. S., Quesenberry K. H. (eds.): Proc. 12th Trifolium Conf., Agronomy Dep., Univ. Florida, Gainesville: 5–10.
- Quesenberry K. H., Wofford D. S., Smith R. L., Krottje P. A., Tcacenco F. (1996): Production of red clover transgenic for neomycin phosphotransferase II using *Agrobacterium*. Crop Sci., 36: 1045–1048.
- Ramaiah S. M., Skinner D. Z. (1997): Particle bombardment: a simple and efficient method of alfalfa (*Medicago sativa* L.) pollen transformation. Current Sci., 73: 674–682.
- Rogers H. J., Parkes H. C. (1995): Transgenic plants and the environment. J. Exp. Bot., 46 (286): 467–488.
- Řepková J., Nedělník J. (1998): Selection of embryogenic genotypes of alfalfa (*Medicago sativa* L.) and their utilisation in the selection of plants resistant to fusaric acid. Czech J. Genet. Plant Breed., 34: 45–48.
- Samac D. A., Brummer E. CH., McKersie B., Skinner D. Z. (1998): 1998 report of the committee of the use of biotechnology research in alfalfa improvement. In: Rep. 36th North American Alfalfa Improvement Conf., Bozeman, USA, August 2–6.
- Shanin E. A., Spielman A., Sukhapinda K., Simpson R. B., Yashar M. (1986): Transformation of cultivated alfalfa using disarmed *Agrobacterium tumefaciens*. Crop Sci., 26: 1235–1239.
- Sharma S. B., Hancock K. R., Ealing P. M., White D. W. R. (1998): Expression of a sulphur-rich maize seed storage protein, delta-zein, in white clover (*Trifolium repens*) to improve forage quality. Mol. Breed., 4: 435–448.
- Schroeder H. E., Khan M. R. I., Knib W. R., Spencer D., Higgins T. J. V. (1991): Expression of a chicken ovalbumin gene in three lucerne cultivars. Aust. J. Plant. Physiol., 18: 495–505.
- Skot L., Harrison S. P., Nath A., Mytton L. R., Clifford B. C. (1990): Expression of insecticidal activity in *Rhizobium* containing the endotoxin gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. Plant Soil, 127: 285–295.

- Smith R. R., Quesenberry K. H. (1995): Release of NEWRC red clover germplasm. *Crop Sci.*, 35: 295.
- Songstad D. D., Sommers D. A., Griesbach R. J. (1995): Advances in alternative DNA delivery techniques. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 40: 1–15.
- Spano L., Mariotti D., Pezzotti F., Damiani F., Arcioni S. (1987): Hairy root transformation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 73: 523–530.
- Stiller J., Martirani L., Tuppal S., Chian R. J., Chiurazzi M., Gresshoff P. M. (1997): High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicus*. *J. Exp. Bot.*, 48 (312): 1357–1365.
- Stougaard J. J., Marker K. A., Otten L., Schell J. (1986): Nodule-specific expression of a chimaeric soybean leghaemoglobin gene in transgenic *Lotus corniculatus*. *Nature*, 321: 669–674.
- Sukhapinda K., Spivey R., Shanin E. A. (1987): Ri-plasmid as a helper for introducing vector DNA into alfalfa plants. *Plant Mol. Biol.*, 8: 209–216.
- Swanson E. B., Tones D. T. (1980): Plant regeneration from cell cultures of *Lotus corniculatus* and the selection and characterisation of 2,4-D tolerant cell lines. *Can. J. Bot.*, 58: 1205–1209.
- Trinh T. H., Ratet P., Kondorosi E., Durand P., Kamate K., Bauer P., Kondorosi A. (1998): Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* ssp. *falcata* lines improved in somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.*, 17: 345–355.
- Vessabur S., Grant W. F. (1995): Isolation, culture and regeneration of protoplasts from birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 41: 9–15.
- Vincent R., Fraiser V., Chaillou S., Limami M. A., Deleens E., Phillipson B., Douat C., Boutin J. P., Hirel B. (1997): Overexpression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in shoots of transgenic *Lotus corniculatus* L. plants triggers changes in ammonium assimilation and plant development. *Planta*, 201: 424–433.
- Voisey C. R., White D. W. R., Dudas B., Appleby R. D., Ealing P. M., Scott A. G. (1994): *Agrobacterium*-mediated transformation of white clover using direct shoot organogenesis. *Plant Cell Rep.*, 13: 309–314.
- Wann Y., Sorensen E. L., Liang G. H. (1988): Genetic control of in vitro regeneration in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Euphytica*, 39: 3–9.
- Webb K. J., Woodcock S., Chamberlain D. A. (1987): Plant regeneration from protoplasts of *Trifolium repens* and *Lotus corniculatus*. *Plant Breeding*, 98: 111–118.
- Webb K. J., Jones S., Robbins M. P., Minchin F. R. (1990): Characterization of transgenic root cultures of *Trifolium repens*, *Trifolium pratense* and *Lotus corniculatus* and transgenic plants of *Lotus corniculatus*. *Plant Sci.*, 70: 243–254.
- White D. W. R., Greenwood D. (1987): Transformation of the forage legume *Trifolium repens* L. using binary *Agrobacterium* vectors. *Plant Mol. Biol.*, 8: 461–469.
- White D. W. R., Voisey C. H. (1994): Proliferic direct plant regeneration from cotyledons of white clover. *Plant Cell Rep.*, 13: 303–308.
- Winicov I., Bastola D. R. (1997): Molecular biology of plants under environmental stress. In: *Proc. Int. Conf.*, Poznan, Poland, 1997. *Acta Physiol. Plant.*, 19: 435–449.
- Wofford D. S., Baltensperger D. D., Quesenberry K. H. (1992): *In vitro* culture response of alyceclover genotypes on four media systems. *Crop Sci.*, 32: 261–265.

Došlo 2. 11. 1999

Kontaktní adresa:

RNDr. Jana Řepková, CSc., Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, katedra genetiky a molekulární biologie, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika, tel.: 00 420 5/41 12 96 16, fax: 00 420 5/41 21 12 14, e-mail: repkova@sci.muni.cz

TRÁVY NAŠE KAŽDODENNÉ – NETRADIČNÉ ROZPRÁVANIE O TRÁVACH

Š. Gáborčík, N. Gáborčík

Banská Bystrica, Horizont s. r. o., 1998. 118 s.

Nevidět jenom výnos zelené či suché hmoty, kvalitu a vůbec hospodářské vlastnosti, ale také krásu, vůni, ladnost a poezii u rostlinného materiálu, který přetváříme, není dáno každému. Proto je tato neobyčejně zajímavá a poutavá kniha „o travách z druhé stránky“ známého slovenského šlechtitele, nyní již emeritního, Ing. Štefana Gáborčíka, který zasvětil travám podstatnou část svého života, a jeho syna, doc. Ing. Norberta Gáborčíka, DrSc., vedoucího vědeckého pracovníka Výzkumného ústavu travních porostů a horského zemědělství v Banské Bystrici, dílkem ojedinělým. Poskytuje jak šlechtitelům, tak množitelům travních semen, i těm, kteří se zabývají trávníky, a široké pýcninářské veřejnosti vůbec spoustu užitečných informací o tra-

vách a jejich cenných vlastnostech, názvech našich i cizích odrůd, o tom, že trávy už dávno nejsou pouze potravou přežvýkavců, ale mohou se stát v budoucnu cennou energetickou, stavební či farmaceutickou surovinou, nebo tím, co pomůže zlidštit společnost 21. století a zacelit rány na Zemi, které člověk svou neuváženou činností způsobil. Druhou a neméně cennou hodnotou knihy je to, že autoři nasbírali, shromáždili a čtenáři předložili spoustu příkladů z historie, folkloru a poezie, kde tráva, jako subjekt, se kterým se člověk středověký i dnešní setkává na každém kroku, slouží jako „motiv“. Jde o publikaci na rozhraní literatury odborné a beletrie. Je napsána čtivou, přístupnou formou a svým krásným slovenským jazykem potěší jistě i českého čtenáře.

Ing. Bohumír Čagaš, CSc.

OSEVA PRO s. r. o., Výzkumná stanice travinářská, Rožnov-Zubří

METODY A VÝSLEDKY TRANSGENOZE LNU^{*}

METHODS AND PROSPECTS OF FLAX TRANSGENOSIS

S. Rakouský¹, E. Tejkllová²

¹*Institute of Plant Molecular Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, Czech Republic*

²*AGRITEC, Research, Breeding and Services, Ltd., Šumperk, Czech Republic*

ABSTRACT: Flax, which is known as a traditional source of fibre, is now cultivated also for good quality oil (linseed) and compounds favourable for human health. Although being thought to be a marginal crop it offers new possibilities for non-traditional use, e.g. in automotive-, paper and pulp industry, remediations, cosmetics, pharmaceuticals etc. Comparing to other crops the potential of the environment friendly no-waste processing of whole plants should be mentioned, too. Flax breeding was originally based on classical hybridization and mutation techniques. Various mutants were induced both by γ -rays and chemicals, the most important among them the lines accumulating low levels of γ -linolenic acid in their seeds were recognized. Low content of γ -linolenic acid in oil of mutant analogs of cvs. Glenelg and McGregor enables its easier industrial processing. But mutation techniques have their own limits due to the absence of gene resources for resistance to some pathogens and qualitative traits. The necessity to accelerate flax and linseed breeding has stimulated the development of alternative techniques based on tissue cultures and gene manipulations. The aim of the article presented here is to describe some recent advances and potential of flax biotechnologies. Flax belongs to a still limited group of temperate crops where positive results in gene transfer have already been achieved. First attempts aimed at transfer of whole unmodified T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes* were later changed for integration of model prokaryotic genes and specific genes coding for resistance to herbicides into flax genome. *Agrobacterium*-derived vectors were also used to induce mutations and for transfer of mobile Ac/Ds elements which could be useful in mutagenesis, genome mapping and gene isolation. Although efficient procedures of plant regeneration from various parts of plant body and different kinds of tissue cultures were developed, most of flax transformation techniques rely on co-cultivation of hypocotyl slices with vector bacteria and selection of transformants on media containing kanamycin. Common disadvantage of such techniques is a great number of non-transformed plants (escapes) among the regenerants. Many attempts were done to enhance the efficiency of flax transformation procedures including removal of epidermis, prolonged co-cultivation and callus induction phase. Alternative procedures based on the use of other selectable genes coding for either herbicide tolerance or resistance to other antibiotics (spectinomycin, hygromycin) were developed and successfully applied, too. Another possibility is offered by particle gun (biolistic) method adopted to flax in the Crop Development Centre (Univ. Saskatchewan, Saskatoon, Canada). Several laboratories around the world are now applying their transgenic technologies to improve flax quality and characteristics. Based on transformation various flax lines tolerant to either sulfonylurea or glyphosate and phosphinotricine herbicides were obtained and field tested for many seasons. Up to now the only transgenic cultivar "CDC Triffid" was described and introduced into agricultural practice. It bears in its genome a gene conferring resistance to sulfonylurea herbicides residues in soil. Attempts were also done to establish genetic variability in flax using the transformation. In T2 generation some lines with altered plant morphology and shortened growing period were found. Selected genotypes will be characterized in greater deal in the next seasons. Although genes for various agronomically useful traits are isolated in many laboratories around the world, they will not probably be as much of importance for flax due to its specific breeding programs and results already achieved during their careful application. Instead, flax breeding will benefit more from the isolation and modification of other, more specific genes, e.g. those that modify fatty acid composition, straw and fiber characteristics and retting or breakdown processes. Some programs are also focused on the introduction of greater tolerance to abiotic or environmental stress and use of antisense DNA. In future, various flax species could be used for the production of high value products like pharmaceuticals.

Keywords: *Linum usitatissimum*; flax; linseed; flax biotechnology; overview

* V této práci jsou uvedeny i některé výsledky, kterých bylo dosaženo při řešení projektu Grantové agentury České republiky č. 521/97/1135 „Inzerční mutagenese u lnu“.

Len setý (*Linum usitatissimum* L.) je v našich podmínkách pěstován především jako významná textilní rostlina, která je zdrojem nejen přírodního vlákna, ale i dalších surovin. V posledních letech nabývá na významu také pěstování olejných typů (Štaud, Vašák a kol., 1997). Lněný olej je nepostradatelnou komponentou při výrobě přírodních fermeží, laků a barev, imitací kůže apod. Z farmakologického hlediska vyniká len nad ostatními plodinami mimořádně příznivým obsahem kyseliny γ -linolenové a lignanů (Ulbricht, Southgate, 1991; Chan *et al.*, 1991; Cunnane *et al.*, 1993; Hřebíček *et al.*, 1993). Nezanedbatelná je také skutečnost, že bezesbýtkové zpracování této plodiny nezatěžuje životní prostředí odpadními produkty. Stále častěji se proto objevují projekty zaměřené na netradiční využití lnu např. v automobilovém průmyslu, při výrobě celulózy, léčiv, kosmetiky apod. (Kessler, Kohler, 1996; Kozłowski, 1998; Smolny *et al.*, 1998).

Ve šlechtění lnu se uplatnily klasické hybridizační i mutační techniky. Byly popsány mutanty získané γ -zářením (Green, Marshall, 1984) a chemomutageny (Pospíšil, 1972; Green, 1986; Nichterlein *et al.*, 1988; Rowland, 1991; Rowland, Bhatti, 1990; Tejklová, 1990a). Bezespornu nejvýznamnějšími materiály, jež byly získány pomocí chemomutagenu etylmetansulfonátu (EMS), jsou mutantní linie odvozené od cv. Glenelg (Green, 1986) a cv. McGregor (Ntiamoah a Rowland, 1997) s velmi nízkým obsahem kyseliny linolenové v semenech. Hlavním omezením mutačních technik je však absence genových zdrojů pro odolnost k některým chorobám a pro kvalitativní ukazatele. Také potřeba urychlit šlechtitelský proces a přizpůsobit jej novým požadavkům vedla k rozvoji alternativních postupů explantátových kultur a genových manipulací (Tejklová, 1990b; Rowland, Wilen, 1998). V této oblasti patří v současnosti len k několika málo plodinám, u nichž bylo dosaženo výrazného pokroku.

GENOVÉ MANIPULACE U LNU

Transgenní rostliny lnu se podařilo získat po infekci pletiv bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* již v roce 1983 autorům Hepburn *et al.* (1983), poté i celé řadě dalších autorů. Zatímco zpočátku, obdobně jako u jiných objektů (viz např. Ondřej, 1999), byly přenášeny celé úseky T-DNA, případně modelové prokaryontní geny (Basiran *et al.*, 1987; Dong, McHughen, 1993a; Mlynářová *et al.*, 1994; Bretagne-Sagnard, Chupeau, 1996), později autoři usilovali o přenos hospodářsky významných genů (Jordan, McHughen, 1988a; McHughen, 1989; McHughen, Holm, 1995) či navození mutací prostřednictvím cizích genů (Rakouský *et al.*, 1999). Pokusy o využití bakteriálních vektorů na bázi *Agrobacterium rhizogenes* byly méně úspěšné vzhledem k tomu, že bylo použito tzv. neodbrojených vektorů obsahujících v T-DNA onkogeny, tj. původní geny plazmidu zodpovědné za tvorbu novotvarů. Regenero-

vaní jedinci měli plagiotropní kořeny, abnormální morfologii nadzemní části rostliny a často i nižší životaschopnost (Zhan *et al.*, 1987). Proto se v tomto směru s transformacemi dále nepokračovalo. V současné době, kdy jsou běžné „odbrojené“ vektory prosté onkogenů, nic nebrání tomu danou oblast dále rozvíjet. U lnu byla také úspěšně ověřena technika vnášení mobilních elementů Ac/Ds, známých z kukuřice, které lze využít k indukci mutací, mapování genomu, označení genů za účelem jejich izolace, ale i jako možný vektor přenosu cizích genů (Finnegan *et al.*, 1993).

Techniky buněčných a genových manipulací

U lnu jsou k dispozici efektivní postupy regenerace rostlin organogenezi z kultur orgánů, zejména hypokotylů (Gamborg, Shyluk, 1976; Mathews, Narayanaswamy, 1976; Lane, 1979; Chlyah *et al.*, 1980), apikálních meristémů (Lane, 1979) a stonkových řízků (Murray *et al.*, 1977; Chlyah *et al.*, 1980; Zhang *et al.*, 1987). Z explantátů nezralých zygotických embryí byly regenerovány některé genotypy i cestou somatické embryogeneze (Preřová, Williams, 1986). O deset let později se podařilo tímto způsobem regenerovat rostliny z kultur buněčných suspenzí (Gomes da Cunha, Ferreira, 1996). Úspěšné byly také techniky regenerace rostlin z protoplastových kultur několika genotypů kulturního lnu *L. usitatissimum* a řady planých druhů lnu (Binding *et al.*, 1982; Barakat, Cocking, 1985; Ling, Binding, 1987).

Nevýhodou stávajících transformačních postupů u lnu, založených na společné kultivaci částí rostliny s vektorovými bakteriemi, je poměrně nízká výtěžnost transformantů, tj. „účinnost transformace“, která je do značné míry také závislá na účinnosti postupů použitých k vlastní regeneraci výhonů z takto ošetřených pletiv. Z tohoto důvodu většina metod používá takové části rostliny, které za normálních podmínek poskytují nejlepší odezvu, tj. vysoký počet regenerovaných jedinců na explantát. Jedním z nejlépe regenerujících systémů jsou hypokotylové řízků, zejména jejich epidermis (Link, Eggers, 1946). K regeneraci dochází organogenní cestou, tj. nejdříve se z většího počtu meristematických buněk formuje základ pupenu nadzemní části rostliny, který prorůstá ve výhon. Ten později může samovolně zakoeňovat. Z hlediska transgeneze je důležité, že za uvedených podmínek, „*in vitro*“, tato regenerační schopnost lnu zůstává uchována nebo se dokonce zvyšuje (Gamborg, Shyluk, 1976; Lane, 1979; Tejklová, 1992). Například v našich kontrolních pokusech se třemi rozdílnými liniemi lnu (na bázi cv. Areco, cv. Jitka a novošlechtění NLN) regenerovalo výhonů v závislosti na genotypu 82,6 % až 98 % hypokotylových řízků (Rakouský *et al.*, 1999). Avšak účinnost transformace i v dobře zavedených laboratořích nepřesahuje úroveň několika málo procent. Z tohoto důvodu rozpracovává špičkové pracoviště Univerzity v Saskatchewanu v Kanadě metodu využívající bombardování rostlinných pletiv částicemi nosiče pokrytými DNA,

„particle gun“, kde zastoupení transformovaných rostlin lnu v populaci regenerantů přesahuje 10 % (McHughen, 1998 – osobní sdělení). Alternativní metoda transformace protoplastů kulturního lnu, kterou rozpracovali Ling a Binding (1997), zatím nedoznala většího uplatnění zejména vzhledem k nízké účinnosti regeneračních postupů.

Metody selekce transformantů

Od samého počátku je dalším ústředním problémem transformace lnu nalezení vhodného postupu pro selekci transformantů. Až na malé výjimky jsou běžné postupy založeny na tom, že transformovaná rostlinná pletiva získají současně zvýšenou odolnost k antibiotiku kanamycinu (Mlynářová *et al.*, 1994; Polyakov *et al.*, 1998 a další). Poměrně ojedinělé jsou práce využívající selektivních genů rezistence k herbicidům. McSheffrey *et al.* (1992) ve svých pokusech využili genu pro acetolaktátsyntázu (ALS), jež podmiňuje toleranci k herbicidům na bázi sulfonfylmočoviny, Jordan a McHughen (1988a) kombinace genu pro neomycin-fosfotransferázu II (*npt*) a genu pro 5-enolpyruvylsukcinát-3-fosfát syntázu (EPSP), který umožňuje toleranci ke glyfosátu. Řada prací je věnována problematice výskytu chimérismu u transformovaných jedinců, tkáňově specifické expresi genů (Dong, McHughen, 1993a) a zdokonalování postupů transformace (Dong, McHughen, 1991). S využitím modelového genu pro bakteriální β -glukuronidázu (GUS) bylo totiž prokázáno, že převážná většina netransformovaných rostlin lnu regeneruje z buněk epidermis (Dong, McHughen, 1991), a proto jsou v některých postupech hypokotylové řízků zbavování pokožkové vrstvy, což je však značně pracné. Současně se ukázalo, že prodloužením doby kokultivace na 5 až 7 dní se výrazně zvyšuje frekvence transformovaných buněk explantátu. Na druhé straně je pak velmi obtížné zbavit infikovanou pletiva vektorových bakterií. Vyšší účinnosti transformace je také dosahováno předpěstováním řízků na neselektivním médiu před kokultivací (Dong, McHughen, 1993b). Jinou možností je vhodným způsobem zvýšit selekční tlak ve prospěch transformovaných buněk. Tuto variantu zvolili Basiran *et al.* (1987) a Mlynářová *et al.* (1994). Z infikovaných pletiv autoři neregenerují hned rostliny, ale naopak pomocí růstových látek typu auxinů podpoří tvorbu nediferencovaně rostoucích pletiv, kalusů, které pak přenesou na půdy s vyšší koncentrací selektivně působící látky (v daném případě 100–200 mg.l⁻¹ kanamycinu), a to vzhledem k tomu, že kalusové buňky tyto vysoké koncentrace tolerují snáze než diferencované buňky hypokotylu a regenerujících výhonů. Opakované ale bylo prokázáno, že i přesto se vytváří mnoho netransformovaných výhonů, jež pocházejí z netransformovaných buněk, které byly obklopeny transformovanými buňkami, a tudíž chráněny před účinkem selekčního agens (Jordan, McHughen, 1988b; McHughen, Jordan, 1989). Protože použitím kanamycinu nebylo dosahováno uspokojivých výsledků, vypra-

covali Bretagne-Sagnard a Chupeau (1996) metodiku založenou na toleranci transformantů k jinému antibiotiku – spektinomycinu. Přestože podle těchto autorů bylo snáze docíleno vyšší selektivity, uvedený postup zatím nedoznal širšího uplatnění. Prakticky paralelně (v roce 1997) byly v našich laboratořích zahájeny experimenty v rámci projektu GA ČR (521/97/1135) „Inzerční mutagenese u lnu“, kde jedním z dílčích cílů bylo vypracování alternativní metody selekce transformantů. Na základě předchozích zkušeností s jinými objekty bylo v pokusech využito přenosu selektovatelného genu pro hygromycin. Tímto způsobem byly získány transformované rostliny u několika linií lnu, přičemž přítomnost transgenu v jejich pletivech byla jednoznačně prokázána molekulárními metodami (Rakouský *et al.*, 1998). Vzhledem k tomu, že mezi regeneranty nadále převažovali netransformovaní jedinci, byla daná metodika dále zdokonalována. V současné době zahrnuje rovněž kalusové stadium. Obdobnou metodiku vyvinuli i na pracovišti CPRO-DLO ve Wageningenu, kde podíl transformantů, detekovaných v populaci regenerantů polymerázovou řetězovou reakcí, činí až 95 % (Toonen, 1999 – ústní sdělení).

Praktické využití transgenních rostlin lnu

Využitím transgenozie byly získány linie lnu rezistentní k herbicidům glyfosátu (Jordan, McHughen, 1988a), sulfonfylmočovině (Jordan, McHughen, 1988a; McHughen, 1989) a fosfinotricinu (McHughen, Holm, 1995a). Některé z nich byly po několika sezonách zkoušeny v polních podmínkách (McHughen, Holm, 1991, 1995b; McHughen, Rowland, 1991; McSheffrey *et al.*, 1992). Zatím jedinou registrovanou transgenní odrůdou lnu je cv. CDC Triffid, vykazující zvýšenou toleranci k reziduům herbicidů typu sulfonfylmočoviny v půdě (McHughen *et al.*, 1997). Rakouský *et al.* (1999) využili transformace k indukci mutací v několika liniích prádlního i olejného lnu. V polních pokusech realizovaných společně se spoluřešiteli z AGRITEC, s. r. o., Šumperk byly v roce 1999 na úrovni rostlin T2 genotypy nalezeny genotypy lišící se oproti kontrolám výškou stébla, některými morfologickými charakteristikami a raností. Charakterizace vybraných genotypů bude pokračovat i v dalším období s cílem zjistit dědičné založení znaků a jejich případnou využitelnost ve šlechtitelském procesu.

ZÁVĚR

Příklady některých recentních buněčných a molekulárněgenetických přístupů ve šlechtění lnu jsou uvedeny např. v přehledných pracích autorů Rowland *et al.* (1995) a Rowland, Wilen (1998). Přestože jsou v mnoha laboratořích na celém světě izolovány nejrůznější geny pro hospodářsky využitelné znaky, nepředpokládá se, vzhledem ke specifitě plodiny i výsledkům dosaženým konvenčním šlechtěním, jejich výraznější uplatně-

ní v transgenozí lnu. Při šlechtění lnu se bezesporu uplatní jiné izolované a modifikované geny specifického účinku, jež se podílejí na vytváření takových kvalitativních znaků, jakými jsou např. složení oleje a charakteristiky stonku a vlákna. Záměrem některých autorů je u olejného typu lnu docílit pomocí transgenických technik nadprodukce mastných kyselin a změny jejich spektra. Jiné projekty jsou zaměřeny na dosažení změn ve složení komponent buněčné stěny a tím i charakteristik a vlastností vlákna, zvýšení odolnosti vůči abiotickým faktorům (např. zasolení půdy), jakož i využití přístupů založených na protismyslových DNA a RNA. Takové projekty byly již zahájeny ve Francii, Velké Británii, Kanadě a Austrálii (Van Soest, 1999 – ústní sdělení).

LITERATURA

- Barakat M. N., Cocking E. C. (1985): Plant regeneration from protoplast-derived tissues of *Linum usitatissimum* L. (flax). *Plant Cell Rep.*, 4: 146–147.
- Basiran N., Armitage P., Scott R. J., Draper J. (1987): Genetic transformation of flax (*Linum usitatissimum*) by *Agrobacterium tumefaciens*: Regeneration of transformed shoots via a callus phase. *Plant Cell Rep.*, 6: 396–399.
- Binding H., Nehls R., Jörgensen J. (1982): Protoplast regeneration in higher plants. In: Fujiwara A. (ed.): *Proc. 5th Int. Congr. Plant Tissue Culture*, Tokyo: 576–578.
- Bretagne-Sagnard B., Chudeau Y. (1996): Selection of transgenic flax plants is facilitated by spectinomycin. *Transgenic Res.*, 5: 131–137.
- Cunnane S. C., Ganguli S., Menard C., Liede A. C., Hamadeh M. J., Chen Z. Y., Wolever T. M. S., Jenkins D. J. A. (1993): High alpha-linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): Some nutritional properties in humans. *Brit. J. Nutr.*, 69: 443–453.
- Dong J. Z., McHughen A. (1991): Patterns of transformation intensity on flax hypocotyls inoculated with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.*, 10: 555–560.
- Dong J. Z., McHughen A. (1993a): Transgenic flax plants from *Agrobacterium* mediated transformation: incidence of chimeric regenerants and inheritance of transgenic plants. *Plant Sci.*, 91: 139–148.
- Dong J. Z., McHughen A. (1993b): An improved procedure for production of transgenic flax plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.*, 88: 61–71.
- Finnegan E. J., Lawrence G. J., Dennis E. S., Ellis J. G. (1993): Behaviour of modified *Ac* elements in flax callus and regenerated plants. *Plant Mol. Biol.*, 22: 625–633.
- Gamborg O. L., Shyluk J. P. (1976): Tissue culture, protoplasts and morphogenesis in flax. *Bot. Gaz.*, 137: 301–306.
- Gomes da Cunha A. C., Ferreira M. F. (1996): Somatic embryogenesis, organogenesis and callus growth kinetics of flax. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 47: 1–8.
- Green A. G. (1986): Genetic modification of seed fatty acid composition in *Linum usitatissimum* L. *J. Austral. Inst. Agric. Sci.*, 52 (3): 175–176.
- Green A. G., Marshall D. R. (1984): Isolation of induced mutants in linseed (*Linum usitatissimum*) having reduced linolenic acid content. *Euphytica*, 33: 321–328.
- Hepburn A. G., Clarke L. E., Blumdy K. S., White J. (1983): Nopaline Ti-plasmid, pTiT37, T-DNA insertions into flax genome. *Mol. Appl. Genet.*, 2: 211–224.
- Hřebíček J., Chmela Z., Rypka M. (1993): Sborník přednášek Sjezdu chemických společností, Olomouc: 211–216.
- Chan J. K., Bruce V. M., McDonald B. E. (1991): Dietary alpha-linolenic acid is as effective as oleic acid and linoleic acid in lowering blood cholesterol in normolipidemic men. *M. J. Clin. Nutr. Baltimore, Md. American Soc. Clin. Nutr.*, 53: 1230–1234.
- Chlyah H., Squalli-Khalil M., Chlyah A. (1980): Dimorphism in bud regeneration in flax (*Linum usitatissimum*). *Can. J. Bot.*, 58: 637–641.
- Jordan M. C., McHughen A. (1988a): Glyphosate tolerant flax plants from *Agrobacterium* mediated gene transfer. *Plant Cell Rep.*, 7: 281–284.
- Jordan M. C., McHughen A. (1988b): Transformed callus does not necessarily regenerate transformed shoots. *Plant Cell Rep.*, 7: 285–287.
- Kessler R. W., Kohler R. (1996): New strategies for exploiting flax and hemp. *ChemTech* (Dec.): 34–42.
- Kolodziejczyk P., Kozłowska J. (1993): Linseed in health food and nutrition. In: *Proc. III Eur. Regional Workshop on Flax*, Bonn, Germany: 61–67.
- Kozłowski R. (1998): Present situation and future prospects in the field of flax and hemp production/processing. In: *Proc. Symp. Bast Fibrous Plants Today and Tomorrow, Breeding, Molecular Biology and Biotechnology Beyond 21st Century*, St. Petersburg, Russia, September 28–30: 22–31.
- Lane D. W. (1979): Influence of growth regulators on root and shoot initiation from flax meristem-tips and hypocotyls *in vitro*. *Physiol. Plantarum*, 45: 260–264.
- Ling H. Q., Binding H. (1997): Transformation in protoplast cultures of *Linum usitatissimum* and *L. suffruticosum* mediated with PEG and with *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Plant Physiol.*, 151: 479–488.
- Link G. K. K., Eggers V. (1946): Mode, site, and time of initiation of hypocotyledonary bud primordia in *Linum usitatissimum* L. *Bot. Gaz.*, 107: 441–454.
- Mathews V. H., Narayanaswamy S. (1976): Phytohormone control of regeneration in cultured tissues of flax. *Z. Pflanzenphysiol.*, 80: 436–442.
- McHughen A. (1989): *Agrobacterium* mediated transfer of chlorsulfuron resistance to commercial flax cultivars. *Plant Cell Rep.*, 8: 445–449.
- McHughen A., Holm F. A. (1991): Herbicide resistant transgenic flax field test: Agronomic performance in normal and sulfonyl-urea containing soil. *Euphytica*, 55: 49–56.
- McHughen A., Holm F. A. (1995a): Development and preliminary field testing of a glufosinate-ammonium tolerant transgenic flax. *Can. J. Plant Sci.*, 75: 117.
- McHughen A., Holm F. A. (1995b): Transgenic flax with environmentally and agronomically sustainable attributes. *Transgenic Res.*, 4: 3–11.
- McHughen A., Jordan M. (1989): Recovery of transgenic plants from „escape” shoots. *Plant Cell Rep.*, 7: 611–614.

- McHughen A., Rowland G. G. (1991): The effect of T-DNA on the agronomic performance of transgenic flax plants. *Euphytica*, 55: 269–275.
- McHughen A., Jordan M., Feist G. (1989): A preculture period prior to *Agrobacterium* inoculation increases production of transgenic plants. *J. Plant Physiol.*, 135: 245–248.
- McHughen A., Rowland G. G., Holm F. A., Bhaty R. S., Kenaschuk E. O. (1997): CDC Triffid transgenic flax. *Can. J. Plant Sci.*, 77: 641–643.
- McSheffrey S. A., McHughen A., Devine M. D. (1992): Characterization of transgenic sulfonylurea-resistant flax (*Linum usitatissimum*). *Theor. Appl. Genet.*, 84: 480–486.
- Mlynárová L., Bauer M., Nap J. P., Preťová A. (1994): High efficiency *Agrobacterium*-mediated gene transfer to flax. *Plant Cell Rep.*, 13: 282–285.
- Murray B. E., Handyside R. J., Keller W. A. (1997): *In vitro* regeneration of shoots on stem explants of haploid and diploid flax (*Linum usitatissimum*). *Can. J. Genet. Cytol.*, 19: 177–186.
- Nichterlein K., Marquard R., Friedt W. (1988): Breeding for modified fatty acid composition by induced mutations in linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Breeding*, 101: 190–199.
- Ntiemoah C., Rowland G. G. (1997): Inheritance and characterization of two low linolenic acid EMS-induced McGregor mutant flax (*Linum usitatissimum*). *Can. J. Plant Sci.*, 77: 353–358.
- Ondřej M. (1999): Úvod do problematiky transgenoz rostlin. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, 39: 95–108.
- Polyakov A. V., Chikrizova O. F., Kalyaeva M. A., Zakharchenko N. S., Balokhina N. V., Buryanov Y. I. (1998): The transformation of fiber flax plants. *Russ. J. Plant Physiol.*, 45: 764–769.
- Pospíšil B. (1972): Výzkum využití chemomutagenů ve šlechtění lnu. [Závěrečná zpráva úkolu RV-3-2/2.] VÚTPL Šumperk.
- Preťová A., Williams E. G. (1986): Direct somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of flax (*Linum usitatissimum* L.). *J. Plant Physiol.*, 126: 155–162.
- Rakouský S., Tejklová E., Wiesner I., Wiesnerová D., Kocábek T., Ondřej M. (1998): T-DNA induced mutations and somaclonal variants of flax. In: *Proc. Symp. Bast Fibrous Plants Today and Tomorrow, Breeding, Molecular Biology and Biotechnology Beyond 21st Century*, St. Petersburg, Russia, September 28–30: 244–246.
- Rakouský S., Tejklová E., Wiesner I., Wiesnerová D., Kocábek T., Ondřej M. (1999): Hygromycin B – an alternative in flax transformant selection. *Biol. Plantarum*, 42: 361–369.
- Rowland G. G. (1991): An EMS-induced low-linolenic acid mutant in McGregor flax (*Linum usitatissimum* L.). *Canad. J. Plant Sci.*, 71: 393–396.
- Rowland G. G., Bhaty R. S. (1990): Ethyl methane-sulfonate induced fatty acid mutations in flax. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 67: 213–214.
- Rowland G. G., Wilen R. (1998): New trends in linseed breeding. In: *Proc. Symp. Bast Fibrous Plants Today and Tomorrow Breeding, Molecular Biology and Biotechnology Beyond 21st Century*, St. Petersburg, Russia, September 28–30: 22–31.
- Rowland G. G., McHughen A., Bhaty R. S., Mackenzie S. L., Taylor D. C. (1995): The application of chemical mutagenesis and biotechnology to the modification of linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Euphytica*, 85: 317–321.
- Smolny T., Wichers H., Kalenberg S., Shahsavari A., Petersen M., Alfermann A. W. (1998): Accumulation of podophyllotoxin and related lignans in cell suspension cultures of *Linum album*. *Phytochemistry*, 48: 975–979.
- Štaud J., Vašák J. a kol. (1997): Základy pěstování přádného a olejného lnu. Praha, Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR.
- Tejklová E. (1990a): Výzkum metod explantátových kultur u lnu. [Závěrečná zpráva úkolu P 11-329-808-05.] VÚTPL Šumperk.
- Tejklová E. (1990b): Lan. In: *Seman I. a kol.: Biotechnologické metody v šlechtění poľných plodín*. Bratislava, Priroda: 156–166.
- Tejklová E. (1992): Dlouhodobá kultivace shluků pupenů a regenerace rostlin lnu (*Linum usitatissimum* L.) *in vitro*. *Rostl. Vyr.*, 28: 1009–1022.
- Ulbricht T. V. L., Southgate D. (1991): Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet*, 338: 985–992.
- Zhan X. C., Jones D. A., Kerr A. (1988): Regeneration of flax plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Mol. Biol.*, 11: 551–559.
- Zhang J. (1987): Studies on the plantlet regeneration of flax and induction factors. *Acta Bot. Boreali-Occidentalia Sinica (China)*, 7: 29–36.

Došlo 2. 11. 1999

Kontakní adresa:

RNDr. Slavomír Rakouský, CSc., Ústav molekulární biologie rostlin Akademie věd České republiky, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Česká republika, tel.: + 420 38 777 55 37, fax: + 42 414 75, e-mail: ray@umbr.cas.cz

Životní jubileum šlechtitele Ing. Antonína Fojtíka, CSc.

Ve významný den, 17. listopadu 1999, se uprostřed svých trav a jetelů dožil 65 let jeden z našich nejznámějších šlechtitelů pícnin, Antonín Fojtík. Jeho osoba je živoucím dokladem toho, kolik lze stihnout práce za relativně krátký časový úsek i na tak komplikovaném poli lidské činnosti, jako jsou sice zajímavé, ale tolik různorodé a navíc cizosprašné trávy.

Jubilant se narodil ve Starojické Lhotě na Novojičínsku a prvé poznatky o kráse, ale i těžkostech práce v zemědělství získal na rodinném hospodářství. Po maturitě v Opavě a absolutoriu Vysoké školy zemědělské v Brně spojil svůj životní osud v roce 1960 se šlechtitelskou stanicí v Hladkých Životicích. Poněkud pionýrské podmínky na tehdejšího pracovišti, osobnost jeho blízkého spolupracovníka a vedoucího stanice Ing. V. Světlíka, CSc., láska k rostlinné genetice a jeho vlastní intuice, to byly snad okolnosti a zároveň mantinely, které formovaly jeho práci. Inspirací mu možná byl i jeho velký krajan, Gregor Mendel, který fídlil z obrázku v jeho pracovně jeho kroky při tvorbě nových odrůd trav dosud netradičními metodami. To ostatně naznačil i svou disertační prací z roku 1975, jejímž ústředním tématem byly indukce genomových mutací u jílku jednoletého.

Praktickým využitím složité problematiky genomových mutací byla i změněná apomixie u lipnice luční, která našla uplatnění při vzniku nových kvalitních odrůd tohoto druhu pro pícní i trávnickářské využití (Slezanka, Krasa, Moravanka a Bohemia).

Od mutací není daleko k polyploidii a tvorbě tetraploidních odrůd trav a jetelů; rok 1974 znamenal zavedení prvních odrůd tohoto typu do zemědělské praxe u nás (Jitral, Kvarta). Poté vyšly z jeho šlechtitelské dílny odrůdy Lolita, Tarpan, Radegast, Jivet, Jiskra, Luha, Lubina, Mustang, Vesna a Beskyd. Podílel se rovněž na vyšlechtění tetraploidního žita Beskyd a jetele zvrhlého Trend.

Čas mu dal za pravdu při tvorbě mezirodových hybridů; v době, kdy západoevropské travinářství dispono-

valo několika málo nevýznamnými mezirodovými kříženci, vyšlechl se svým kolektivem výkonné hybridy Odra, Felina, Bečva, Hykor, Korina, Perun a Lofa, z nichž poslední byla oceněna v roce 1997 Zlatým kladem.

Při pochůzkách zasněnou pooderskou přírodou se nevrací většinou s prázdnou. Odrůda kostřavy rákosovitě Kora a řada nadějných novošlechtění zařazených ve státních odrůdových zkouškách mají svůj původ právě v ekotypy z blízkého okolí.

Do šlechtitelského procesu u trav a jetelů zavedl metodu tkáňových kultur, bez které by vznik nových odrůd nebyl možný. Významná byla i cesta zvýšení semenářské výkonnosti tetraploidních odrůd jetele lučního jako kombinace přirozeného výběru rostlin s určitým typem květků a jejich ošetření růstovými regulátory.

Pro své hluboké teoretické znalosti, které dovedl skloubit s praxí, je Ing. Antonín Fojtík, CSc., vyhledávaným oponentem diplomových, disertačních a výzkumných prací nejrůznějšího typu. Mimo práce na dalších výkonných odrůdách pícnin se v současné době podílí na řešení výzkumných projektů směřovaných do oblasti využití androgeneze ve šlechtění a alelopatických vztahů jetelovin a trav. Je členem vědeckých rad několika výzkumných ústavů, členem redakční rady našeho časopisu, členem odboru rostlinné výroby ČAZV, pracuje v Československé biologické společnosti a v Genetické společnosti G. Mendla. Od roku 1990 pracuje jako předseda sekce pícnin v Českomoravském svazu šlechtitelů a Českomoravské šlechtitelské a semenářské asociace.

Ing. A. Fojtík, CSc., je výraznou osobností v našem šlechtění, nejen váženou pro své odborné znalosti, ale také oblíbenou pro své charakterové rysy. Přejeme jubilantovi především hodně zdraví a ještě mnoho inovačních a inspiračních podnětů, kterými on a jeho spolupracovníci obohatí naše odrůdy trav a jetelů pro příští tisíciletí tak, aby čestně obstály v tvrdé zahraniční konkurenci.

*Za všechny jeho spolupracovníky
Ing. Bohumír Cagař, CSc.*

Flamme W., Andrée S., Jansen G., Jacobi A., Huth M., Dongowski G.: New winter barley breeding lines with changed content of amylopectin, amylose, and β -glucan Nové šlechtitelské linie ozimého ječmene se změněným obsahem amylopektinu, amylozy a β -glukanu.	1
Griga M.: Genetická transformace rostlin Genetic transformation of higher plants	93
Holý J., Chloupek O.: Vliv inzuchtů a heterozygotnosti na některé ukazatele symbiotické fixace N_2 u vojtěšky (<i>Medicago sativa</i> L.) Influence of inbreeding and heterosis on some indices of dinitrogen fixation in lucerne (<i>Medicago sativa</i> L.)	79
Chalýk S., Chebotar O.: Utilizing maternal haploids to identify major genes controlling plant height in maize Využití materských haploidů pro identifikaci major genů kontrolujících výšku rostliny u kukuřice	73
Kolovrat O., Judlová M., Havel J.: Studium variability indolylglukosinolatů v semeni ozimé řepky (<i>Brassica napus</i> L.) Study of variability of indolylglucosinolates in winter rape (<i>Brassica napus</i> L.) seeds	49
Košner J., Pánková K.: Impact of homeologous group 5 chromosomes with different <i>vrn</i> loci on leaf size and tillering Vliv chromozomů páté homeologické skupiny s rozdílnými lokusy <i>vrn</i> na velikost listů a odnožování	65
Kubánek J., Hanišová A., Horčíčka P.: Použití směsných vzorků pro analýzy HMW gluteninových podjednotek ve šlechtění pšenice The use of mixed samples for analyses of HMW glutenin subunits in wheat breeding	11
Ondřej M.: Úvod do problematiky transgenoz rostlin Introduction to plant transgenesis	95
Ovesná J., Šíp V., Vacke J., Kučera L.: Evaluation of resistance to BYDV with the use of PCR marker linked to Yd2 gene in comparison with the results of field infection tests in spring barley Hodnocení odolnosti k BYDV pomocí PCR markeru spojeného s genem Yd2 ve srovnání s výsledky polních testů u jarního ječmene	37
Ovesná J., Kučera V., Vyvadilová M., Nováková I., Kučera L.: Transformace řepky olejné (<i>Brassica napus</i> L.) a její praktické využití Transformation of oilseed rape (<i>Brassica napus</i> L.) and its practical use	109
Prášilová P., Prášil I., Jurečka D.: Zimovzdornost a mrazuvzdornost odrůd ozimé pšenice a ozimého ječmene registrovaných v České republice Winter and frost resistance of winter wheat and barley varieties registered in the Czech Republic	17
Rakouský S., Tejkl E.: Metody a výsledky transgenoz lnu Methods and prospects of flax transgenesis	125
Řepková J., Nedělník J.: Současný stav transgenoz u píceňných leguminóz Transgenesis in forage legumes	119
Špunar J., Oborný J., Špunarová M., Vaculová K.: Odolnost registrovaných odrůd a nově šlechtěných ozimého ječmene z České republiky ke komplexu žluté mozaiky ječmene Resistance of registered varieties and advanced breeding lines of winter barley from the Czech Republic to the barley yellow mosaic virus complex	83
Věchet L.: Response of winter wheat varieties to the leaf rust infection Reakce odrůd pšenice ozimé na infekci rzí pšeničnou	43
Vyvadilová M., Tomášková D., Bechyně M., Kučera V.: The use of doubled haploids to stabilize yellow-seedness in oilseed rape (<i>Brassica napus</i>) Využití dihaploidů pro stabilizaci žlutosemennosti u řepky (<i>Brassica napus</i>)	7
INFORMACE – STUDIE – SDĚLENÍ – INFORMATION – STUDIES – REPORTS	
Horáčková V., Konrád J., Krpálková A.: Postupy tvorby viruprostého materiálu v udržovacím šlechtění odrůdy bramboru Keřkovské rohlíčky Methods of production of virus-free material in maintenance breeding of potato variety Keřkovské rohlíčky	25
Šíp V., Chrpová J., Vacke J., Ovesná J.: Present state and future tasks of the research on barley resistance to barley yellow dwarf virus in the Czech Republic Současný stav a zaměření výzkumu rezistence ječmene k viru žluté zakrslosti v České republice	55

NOVÉ ODRŮDY – NEW VARIETIES

Červenka J., Chour V.:	
Oves setý Neklan	
Spring oat Neklan	90
Červenka J., Chour V.:	
Oves nahý Izak	
Naked oat Izak	91
Konrád J.:	
Brambor Kordoba	
Kordoba Potato	89
Kreuzman J.:	
Hrách setý Zekon	
Pea variety Zekon	61
Kreuzman J.:	
Hrách setý Gotik	
Pea variety Gotik	62
Mařík P.:	
Ječmen ozimý Luran	
Winter barley Luran	62
Mohl J.:	
Brambor Samanta	
Potato Samanta	64
Ohnoutka Z.:	
Pšenice ozimá Nela	
* Winter wheat Nela	35
Šíp V., Škorpík M., Kučera L., Bobková L., Amler P.:	
Pšenice ozimá Vlasta	
Winter wheat Vlasta	91
RECENZE	
Cagaš B.:	
Jacqueline Rowarth (ed.) – Practical Herbage Seedcrop Management	42
Cagaš B.:	
Š. Gáborčík, N. Gáborčík – Trávy naše každodenné – netradičné rozprávanie o trávach	124
Ehrenbergerová J.:	
O. Chloupek – Zemědělský výzkum	36
Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA – FROM THE SPHERE OF SCIENCE	
Cagaš B.:	
4. mezinárodní konference o semenářství trav a jetelovin	48
Cagaš B.:	
Životní jubileum šlechtitele Ing. Antonína Fojtíka, CSc.	130
Černý J.:	
Osivo a sadba – IV. odborný a vědecký seminář	78
Jůzl M.:	
VIII. seminář šlechtitelů	
VIIIth Breeders Seminar	34
Martinek P.:	
9. mezinárodní genetické sympozium o pšenici	
9th International Wheat Genetics Symposium	29

POKYNY PRO AUTORY

Časopis uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení a výběrově i přehledné referáty, tzn. práce, jejichž podkladem je studium literatury a které shrnují nejnovější poznatky v dané oblasti. Práce jsou uveřejňovány v češtině, slovenštině nebo angličtině. Rukopisy musí být doplněny krátkým a rozšířeným souhrnem (včetně klíčových slov).

Autor je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být přiloženo prohlášení autora o tom, že práce nebyla publikována jinde.

O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce.

Rozsah vědeckých prací nesmí přesáhnout 15 strojopisných stran včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné použít jednotky odpovídající soustavě měřových jednotek SI (ČSN 01 1300).

Vlastní úprava rukopisu: formát A4, 30 řádek na stránku, 60 úhůz na řádku, mezi řádky dvojité mezery. K rukopisu je třeba přiložit disketu s prací pořízenou na PC a s grafickou dokumentací. Tabulky, grafy a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu.

Pokud autor používá v práci zkratky jakéhokoliv druhu, je nutné, aby byly alespoň jednou vysvětleny (vypsány), aby se předešlo omylům. V názvu práce a v souhrnu je vhodné zkratky nepoužívat.

Název práce (titul) nemá přesáhnout 85 úhůz. Jsou vyloučeny podtitulky článků.

Krátký souhrn (Abstrakt) je informačním výběrem obsahu a závěru článku, nikoliv však jeho pouhým popisem. Musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo ve vědecké práci, a má obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot. Musí obsahovat klíčová slova. Nemá překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl napsán celými větami, nikoliv heslovitě. Je uveřejňován a měl by být dodán ve stejném jazyce jako vědecká práce.

Rozšířený souhrn (Abstract) je uveřejňován v angličtině, měly by v něm být v rozsahu cca 1–2 strojopisných stran komentovány výsledky práce a uvedeny odkazy na tabulky a obrázky, popř. na nejdůležitější literární citace. Je vhodné jej (včetně názvu práce a klíčových slov) dodat v angličtině, popř. v češtině či slovenštině jako podklad pro překlad do angličtiny.

Úvod má obsahovat hlavní důvody, proč byla práce realizována, a velmi stručnou formou má být popsán stav studované otázky.

Literární přehled má být krátký, je třeba uvádět pouze citace mající úzký vztah k problému.

Metoda se popisuje pouze tehdy, je-li původní, jinak postačuje citovat autora metody a uvádět jen případné odchylky. Ve stejné kapitole se popisuje také pokusný materiál.

Výsledky – při jejich popisu se k vyjádření kvantitativních hodnot dává přednost grafům před tabulkami. V tabulkách je třeba shrnout statistické hodnocení naměřených hodnot. Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy.

Diskuse obsahuje zhodnocení práce, diskutuje se o možných nedostacích a práce se konfrontuje s výsledky dříve publikovanými (požaduje se citovat jen ty autory, jejichž práce mají k publikované práci bližší vztah). Je přípustné spojení v jednu kapitolu spolu s výsledky.

Literatura by měla sestávat hlavně z lektorovaných periodik. Citace se řadí abecedně podle jména prvních autorů. Odkazy na literaturu v textu uvádějí jméno autora a rok vydání. Do seznamu se zařadí jen práce citované v textu. Na práce v seznamu literatury musí být odkaz v textu.

Na zvláštním listě uvádí autor plné jméno (i spoluautorů), akademické, vědecké a pedagogické tituly a podrobnou adresu pracoviště s PSČ, číslo telefonu a faxu, popř. e-mail.

Rukopis nebude redakcí přijat k evidenci, nebude-li po formální stránce odpovídat pokynům pro autory.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Original scientific papers, short communications, and selectively reviews, that means papers based on the study of technical literature and reviewing recent knowledge in the given field, are published in this journal. Published papers are in Czech, Slovak or English. Each manuscript must contain a short and a longer summary (including key words).

The author is fully responsible for the originality of his paper, for its subject and formal correctness. The author shall make a written declaration that his paper has not been published in any other information source.

The board of editors of this journal will decide on paper publication, with respect to expert opinions, scientific importance, contribution and quality of the paper.

The paper extent shall not exceed 15 typescript pages, including tables, figures and graphs.

Manuscript layout: quarto, 30 lines per page, 60 strokes per line, double-spaced typescript. A PC diskette should be provided with the paper and graphical documentation. Tables, figures and photos shall be enclosed separately. The text must contain references to all these annexes.

If any abbreviation is used in the paper, it is necessary to mention its full form at least once to avoid misunderstanding. The abbreviations should not be used in the title of the paper nor in the summary.

The title of the paper shall not exceed 85 strokes. Subtitles of the papers are not allowed either.

Abstract is an information selection of the subject and conclusions of the paper, it is not a mere description of the paper. It must present all substantial information contained in the paper. It shall not exceed 170 words. It shall be written in full sentences, not in form of keynotes, and comprise basic numerical data including statistical data. It must contain key words. It should be submitted in English and if possible also in Czech or Slovak.

Introduction has to present the main reasons why the study was conducted, and the circumstances of the studied problems should be described in a very brief form.

Review of literature should be a short section, containing only literary citations with close relation to the treated problem.

Only original method shall be described, in other cases it is sufficient enough to cite the author of the used method and to mention modifications of this method. This section shall also contain a description of experimental material.

In the section **Results** figures and graphs should be used rather than tables for presentation of quantitative values. A statistical analysis of recorded values should be summarized in tables. This section should not contain either theoretical conclusions or deductions, but only factual data should be presented here.

Discussion contains an evaluation of the study, potential shortcomings are discussed, and the results of the study are confronted with previously published results (only those authors whose studies are in closer relation with the published paper should be cited). The sections Results and Discussion may be presented as one section only.

The section **References** should preferably contain reviewed periodicals. The citations are arranged alphabetically according to the surname of the first author. References in the text to these citations comprise the author's name and year of publication. Only the papers cited in the text of the study shall be included in the list of references. All citations shall be referred to in the text of the paper.

The author shall give his full name (and the names of other collaborators), academic, scientific and pedagogic titles, full address of his workplace and postal code, telephone and fax number or e-mail.

The manuscript will not be accepted to be filed by the editorial office if its formal layout does not comply with the instructions for authors.

CONTENTS

Griga M.: Genetic transformation of higher plants.....	94
Ondřej M.: Introduction to plant transgenesis (in Czech).....	95
Ovesná J., Kučera V., Vyvadilová M., Nováková I., Kučera L.: Transformation of oilseed rape (<i>Brassica napus</i> L.) and its practical use (in Czech)	109
Řepková J., Nedělník J.: Transgenesis in forage legumes (in Czech)	119
Rakouský S., Tejklová E.: Methods and prospects of flax transgenesis (in Czech).....	125
NAME INDEX	I

OBSAH

Griga M.: Genetická transformace rostlin	93
Ondřej M.: Úvod do problematiky transgenoz rostlin	95
Ovesná J., Kučera V., Vyvadilová M., Nováková I., Kučera L.: Transformace řepky olejné (<i>Brassica napus</i> L.) a její praktické využití.....	109
Řepková J., Nedělník J.: Současný stav transgenoz u píceňích leguminóz.....	119
Rakouský S., Tejklová E.: Metody a výsledky transgenoz lnu.....	125

RECENZE

Cagaš B.: Š. Gáborčík, N. Gáborčík – Trávy naše každodenné – netradičné rozprávanie o trávach	124
---	-----

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

Cagaš B.: Životní jubileum šlechtitele Ing. Antonína Fojtíka, CSc.	130
---	-----

REJSTŘÍK JMENNÝ.....	I
----------------------	---