

**VYUŽITÍ GMO PRO SNÍŽENÍ ZÁTĚŽE POTRAVINOVÝCH SUROVIN  
PESTICIDY  
USE OF GMO FOR LOWERING THE PESTICIDE CONTAMINATION OF RAW  
MATERIALS AND FOODSTUFFS**

*Pavel Hanáček<sup>1</sup>, Michal Rohrer<sup>1</sup>, Vilém Reinöhl<sup>1</sup>, Stanislav Procházka<sup>1</sup>, Dana Šafářová<sup>2</sup>,  
Milan Navrátil<sup>2</sup>, Jiří Horáček<sup>3</sup>, Lenka Švábová<sup>3</sup>, Petr Smýkal<sup>3</sup>, Miroslav Griga<sup>3</sup>*

**ABSTRACT**

Pests and diseases of crop plants can be a serious economical problem. There are several approaches to control them, the most common of them being the application of pesticides which in turn causes potential contamination of food products. To avoid this risk breeding for resistance could be used, but the process is lengthy and sometimes the resistance sources are not available.

This study presents the results of testing of an alternative approach – the use of genetic modification to achieve the induction of resistance to viral diseases and insect pests. Gene constructs were prepared and pea plants were transformed by cloning fragments of the coat protein (*cp*) gene sequences to induce posttranscriptional gene silencing (PTGS), those appeared to be resistant to Pea Enation Mosaic Virus and Pea Seed-born Mosaic Virus. Furthermore, studies are in progress for developing transgenic plants expressing the *GmSPI2* (*Galleria mellonella* silk protease inhibitor) to induce resistance against insect pests and perhaps also fungal diseases.

**Keywords:** transformation, pea, PEMV, PSbMV, proteinase inhibitor, viral diseases, insect pests

---

**ÚVOD**

Moderní konvenční zemědělství vyžaduje náročné vstupy chemických přípravků, z nichž významnou skupinu tvoří pesticidy. Jejich masivní používání však zvyšuje náklady a rezidua pesticidů mohou kontaminovat finální zemědělské (potravinářské) suroviny. Alternativním způsobem hospodaření může být biologická ochrana rostlin, která je však při invazivním napadení chorobami či škůdci méně účinná, nebo šlechtění zemědělských plodin s tolerancí či rezistencí vůči patogenům. Tato cesta je však časově náročná a ne vždy technicky schůdná, například díky neexistenci vhodných genetických zdrojů rezistence.

Jednou z dalších možností je využití transgenních odrůd. V současnosti je v Evropské unii povolena pro uvolnění do životního prostředí a tedy pro pěstování pouze Bt-kukuřice (produkující Cry protein z bakterie *Bacillus thuringiensis*) rezistentní vůči hmyzím škůdcům (zavíječ kukuřičný). Ve světě je Bt-toxin využit také na ochranu bavlníku a experimentálně se zkouší jeho využití u dalších plodin. U luskovin jsou v zásadě popsány tři možné typy rezistence k hmyzu: (1) strukturální obranné mechanismy (trichomy, morfologie lusku a semene), (2) sekundární metabolity (taniny, saponiny, alkaloidy), (3) antinutriční látky (lektiny, nebílkovinné aminokyseliny). Do skupiny antinutričních látek patří také inhibitory proteáz inhibující proteázové enzymy v trávicím traktu hmyzu, přičemž specializovaní škůdci je překonávají vlastními proteázami, necitlivými vůči těmto inhibitorům. Proteázové inhibitory taxonomicky vzdálených druhů jsou považovány za potenciální transgeny pro navození rezistence vůči hmyzu (**Edwards a Singh 2006**), mohou však působit inhibičně i na růst houbových patogenů (**Hraška et al. 2006**). Takovýmto potenciálním transgenem pro práci s hrachem a jeho hmyzími škůdci je *GmSPI2* (*Galleria mellonella* silk protease inhibitor) zavíječe voskového produkující inhibitor proteáz hypoteticky funkční u širšího spektra hmyzích druhů, ale také bakterií a hub (**Nirmala et al. 2001**).

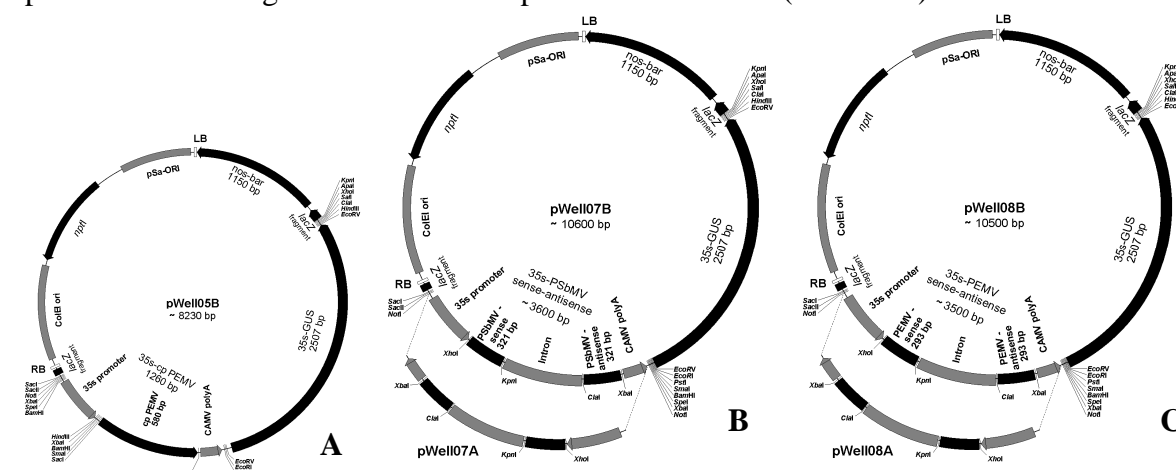
Intenzívně se pracuje také na tvorbě geneticky modifikovaných plodin rezistentních vůči virózám, které snižují zátěž především absencí použití inekticidních přípravků vůči hmyzím přenašečům viróz. Pro indukci rezistence vůči virům jsou využívány především transgeny nesoucí gen pro plášťový protein příslušného viru (u hrachu **Chowrira et al. 1998; Timmerman-Vaughan et al. 2001**) nebo pro virovou replikázu (**Jones et al. 1998**). Ve světě jsou tyto GM plodiny rezistentní vůči virózám značně rozšířené. Komerčně využívány jsou plodiny úspěšně indukovanou rezistencí například u papáje – virus kroužkovitosti papáje (PRSV), švestky – virus šarky švestky (PPV), bramboru - Y virus bramboru (PVY) a virus svinutky bramboru (PLRV), dýně – virus mozaiky okurek (CMV), virus mozaiky vodního melounu (WMV) a virus žluté mozaiky cukety (ZYMV), přičemž existuje linie dýně CZW3 rezistentní vůči všem třem virovým chorobám.

V této práci jsou prezentovány výsledky experimentálního testování indukce rezistence vůči nejzávažnějším virovým onemocněním hrachu v ČR - výrůstkové mozaice hrachu (PEMV) a semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV), vnesením sekvencí plášťového proteinu virů (PEMVcp resp. PSbMVcp) a dále pro indukci rezistence vůči pozerovému hmyzu pomocí inhibitoru hmyzích proteáz GmSpi2, s případnou možností vyvolat tak i odolnost vůči houbovým chorobám.

## MATERIÁL A METODY

### Příprava a testování konstruktů

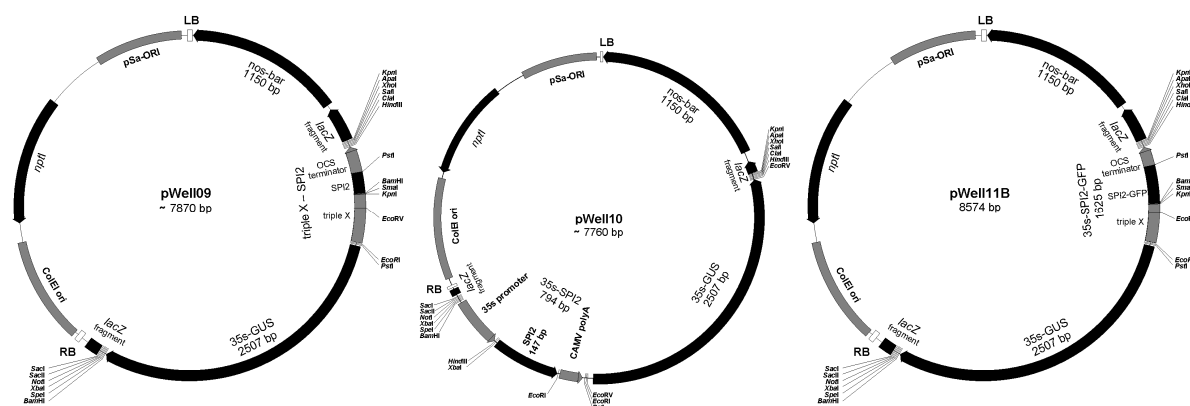
Pro indukci rezistence vůči virózám hrachu byly použity sekvence genů pro plášťové proteiny hospodářsky nejvíce škodlivých virů (PEMV a PSbMV). První z vektorových konstruktů vyvinutých na našem pracovišti pWELL05 nese celý strukturní gen pro plášťový protein, ke kterému byl připojen 35S promotor a terminátor a tato kazeta byla vnesena do vektoru pro transformaci rostlin pGREEN (**Hellens et al. 2000**) spolu se selekčním genem *nos::bar* a reportérem *35S::uidA*. Další konstrukty pWELL07 a pWELL08 nesou pouze fragmenty genů pro plášťové proteiny PEMV a PSbMV které byly klonovány v poloze sense/antisense za použití systému pHannibal (**Wesley et al. 2001**) a poté opět vneseny do konstruktů pGREEN spolu se selekčním genem *nos::bar* a reportérem *35S::uidA* (obrázek 1).



**Obrázek 1** Konstrukty pro navození virové rezistence u rostlin: **A** - pWell05B nesoucí celý cpPEMV; **B** – pWell07A-B nesoucí fragment cpPSbMV v poloze sense/antisense; **C** - pWell08A-B nesoucí fragment cpPEMV v poloze sense/antisense

Konstrukty pro indukci rezistence vůči hmyzím škůdcům a houbovým patogenům byly připravovány s využitím genu pro inhibitor hmyzí proteázy SPI2, který byl izolován z hedvábí zavíječe *Galleria melonella* (**Nirmala et al. 2001**). Celkem byly vytvořeny tři varianty

vektorů pro transformaci rostlin: pWell09 obsahující 35S::SPI2, pWell10 obsahující 35S::SPI2-histag a pWell11 obsahující 35S::SPI-GFP. Všechny konstrukty použité pro tuto práci byly vytvořeny na základě vektoru pGREENII 0229 (John Innes Center, UK), který obsahuje selekční gen *nos::bar* pro rezistenci k fosfotricinu a také reporétový gen 35S::uidA pro produkci β-glukuronidázy (obrázek 2).



**Obrázek 2** Konstrukty pro navození rezistence vůči hmyzím škůdcům u rostlin: **A** - pWell09 obsahující 35S::SPI2; **B** - pWell10 obsahující 35S::SPI2histag; **C** - pWell11 obsahující 35S::SPI-GFP

Vytvořené vektorové konstrukty byly testovány restriční analýzou a sekvenací a jejich účinnost byla testována transformací listových disků tabáku.

#### Rostlinný materiál

Listové disky tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana line SR-1) použité pro transformaci byly izolovány z rostlin kultivovaných v aseptických podmínkách *in vitro*.

Kultivary hrachu setého (*Pisum sativum* L.) byly vybrány z kolekce genových zdrojů luskovin firmy Agritec: Adept, Komet, Menhir, Merkur, Raman, Zekon. Semena byla povrchově sterilizována promýváním v 96 % etanolu 30 s a následně namočena v 10 % w/v Chloraminu<sup>®</sup> B (sodium N-chlorbenzensulfonamide, Bochemie Ltd., Bohumín, CZ) na 20 min. Poté byla důkladně promyta ve sterilní neionizované vodě a následně byla předklíčena v aseptických podmínkách *in vitro* 4-5 dní bez přístupu světla při pokojové teplotě ve 250 ml Erlenmeyerových baňkách na vrstvě buničité vaty přikryté navlhčeným filtračním papírem. Explantáty hrachu byly pro transformační experimenty izolovány z embryonálních segmentů nezralých embryí (E), nodálních segmentů zralých embryí (NS) a zralých nabobtnaných řezů semen (TS).

#### Transformace, uchovávání a množení kultury *Agrobacterium tumefaciens*

Všemi vytvořenými vektorovými konstrukty byly spolu s pomocným vektorem pSoup (John Innes Center, UK) transformovány elektroporací kompetentní buňky *Agrobacterium tumefaciens* kmen EHA 105. Kultura *Agrobacterium* byla uchovávána v 1.5 ml mikrozkuřavkách při -80°C v LK mediu (Langley a Kado 1972). Obsah jedné mikrozkuřavky (1 ml) byl revitalizován před použitím v čerstvém LK mediu (100 ml) přes noc na horizontální třepačce při 120 rpm a 28°C. Suspenze *Agrobacterium* byla centrifugována (15 min, 3000 g) a resuspendována ve stejném objemu (100 ml) čerstvého LK media. Optická denzita tekuté kultury byla pro kokultivaci upravena ředěním na hodnotu OD<sub>600</sub>=1,0.

#### *Transformace tabáku*

Pro otestování funkčnosti nově vytvořených vektorových konstruktů pro byla provedena transformace tabáku jako modelové rostliny pro transformaci rostlin. Tato metoda byla prováděna transformací listových disků tabáku (**Dombrowski et al. 1994**). Listové výseče o průměru 10 mm rostlin kultivovaných *in vitro* byly ponořeny do suspenzní kultury *Agrobacterium* na jednu minutu a poté převedeny na kokultivační medium v Petriho misce. Po třech dnech byly explantáty převedeny na medium s augmentinem a po dalších 14-30 dnech byly převedeny na medium s augmentinem a fosfinothricinem. Histochemické GUS testy byly prováděny na části listových disků po třech dnech kokultivace a dále pak na regenerovaných rostlinách na selekčním mediu.

#### *Transformace hrachu*

Základní transformační protokol byl prováděn podle **Švábová et al. (2005)**, **Švábová 2008**, **Švábová and Griga (2008)** a **Krejčí et al. (2007)**. Po 48 hodinové kokultivaci byly explantáty proprány ve směsi MS media doplněného antibiotiky. Dále byly explantáty po transformaci regenerovány do konce organogeneze na různých mediích na každém z nich 3-4 týdny: pro ES – 3 byly aplikovány 3 typy medií - MS macro + micro, B5 s vitamíny + 5mg.l<sup>-1</sup> TDZ; MS macro+micro, B5 s vitamíny bez fytohormonů; MS macro+micro, B5 s vitamíny + 0.1 μM NAA + 20μM BAP. Pro NS - MS macro+micro, B5 s vitamíny + 0.1 μM NAA + 20μM BAP a pro - TS ½ MS macro+micro, B5 s vitamíny bez fytohormonů. Seznam použitých medií pro každý z regeneračních postupů je shrnut v tabulce 1. Ve stadiu zakořeňování byly regeneranty selektovány na mediu s fosfinothricinem. Přežívající rostliny byly převedeny do nesterilních podmínek a kultivovány pro získání semenného potomstva T1. Kultivace *in vitro* stejně jako pěstování v substrátu probíhalo při 20 ± 2°C a 16/8h (den/noc) fotoperiodě.

**Tabulka 1** Kultivační media použitá pro individuální regenerační systémy – ES, NS a TS.

Culture	ES	NS	TS
Počáteční explantát	Embryonální segment nezralého embrya	Nodální segment zralého embrya	Zralé nabobtnané řezy semen
Indukční medium	MS macro+micro, B5 s vitamíny + 5 mg TDZ (2 týdny)	MS macro+micro, B5 s vitamíny + 0.1 µM NAA + 20 µM BAP (4 týdny)	MS macro+micro, B5 s vitamíny bez fytohormonů (4 týdny)
Regenerační medium	MS macro+micro, B5 s vitamíny bez fytohormonů (2 weeks); MS macro+micro, B5 s vitamíny + 0.1 µM NAA + 20 µM BAP (4 týdny)	MS macro+micro, B5 s vitamíny + 0.1 µM NAA + 20 µM BAP (4 týdny)	MS macro+micro, B5 s vitamíny bez fytohormonů (4 týdny)
Zakořeňovací medium	½ MS macro+micro, B5 s vitamíny, 1 µM NAA (4 týdny)	½ MS macro+micro, B5 s vitamíny, 1 µM NAA (4 týdny)	½ MS macro+micro, B5 s vitamíny, 1 µM NAA (4 týdny)

*Histochemický GUS test pro detekci předpokládaných transformantů*

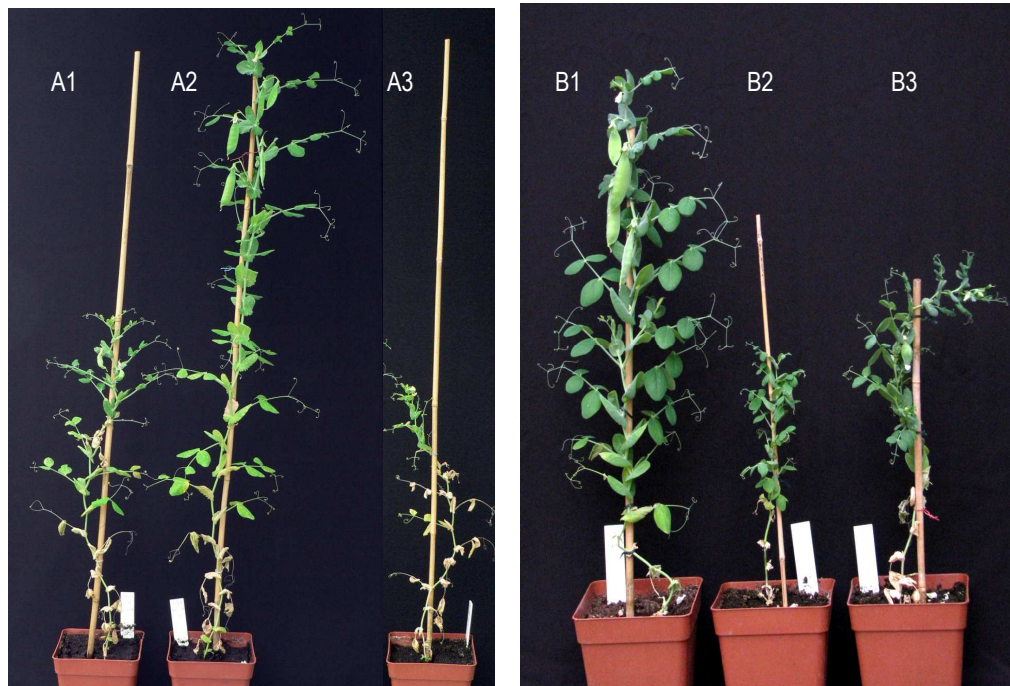
Histochemický roztok pro barvení transgenních pletiv byla připravena podle Springer lab manuálu (Fütterer et al. 1995). Vzorky inkubované v barvicím roztoku byly vystaveny působení vakua na 1 hodinu a inkubovány při 37°C přes noc. Hodnota pH byla upravena na 7,0 a do barvicí směsi byl přidán 20 % v/v metanol jako prevence proti endogenní GUS expresi.

**VÝSLEDKY A DISKUSE**

Práce probíhala po dvou samostatných liniích. První část se věnovala navození rezistence vůči hlavním virózám hrachu v ČR – viru výrůstkové mozaiky hrachu (*Pea enation mosaic virus*, PEMV) a viru mozaiky hrachu přenosné semenem (*Pea seed-borne mosaic virus*, PSbMV). Další část práce se věnovala navození rezistence proti hmyzím škůdcům a houbovým patogenům využitím genu pro inhibitor hmyzí proteázy (*Galleria mellonella* silk protease inhibitor – *gmSPI2*). Na základě vektorového systému pGREENII byly vytvořeny konstrukty pro transformaci rostlin nesoucí fragmenty genů pro obalové proteiny sledovaných virů a gen pro inhibitor hmyzí proteázy SPI2. Všechny nově vytvořené vektorové konstrukty byly pozitivně testovány restriční analýzou, sekvenováním a jejich funkčnost byla ověřena transformací listových disků tabáku, které byly úspěšně testovány pomocí histochemického GUS testu.

Série transgenních linií hrachu selektovaných po transformaci konstrukty obsahujícími fragmenty genů pro obalový protein PEMV (*cpPEMV*) a PSbMV (*cpPSbMV*) byla testována metodou PCR a Southernblot. Pozitivně testované linie byly v dalších potomstvech (T3 a více) podrobeny skleníkovým biologickým testům mechanickou inokulací příslušným virem. V potomstvu se vyskytovaly rostliny s normálním vzrůstem i s projevy růstové deprese, s normální dobou kvetení i s opožděným nástupem květu, a s různou intenzitou symptomů

infekce PEMV a PSbMV (Obrázek 3). Úroveň replikace viru byla po inokulaci sledována za pomoci time-sequenced DAS-ELISA a real-time PCR dvěma páry primerů. V obou variantách konstruktů byly nalezeny transgenní linie vykazující toleranci k mechanické inokulaci příslušným virem.



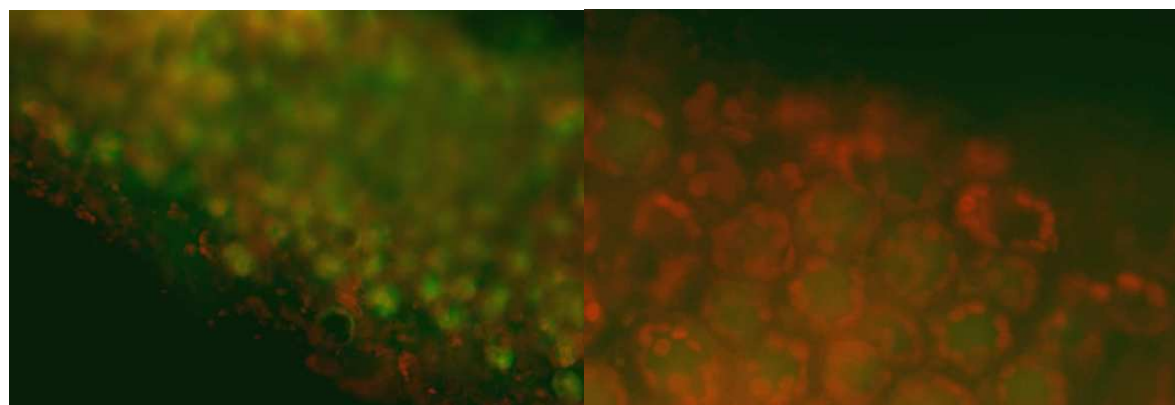
**Obrázek 3** Rostliny hrachu po mechanické inokulaci virovým izolátem. A – PEMV (A1 netransgenní kontrola, A2 – linie 9781/1 bez příznaků napadení virem, A3 – linie 9688/2 s příznaky napadení), B – PSbMV (B1 – linie 1025/2 bez příznaků napadení virem, B2 – linie 1028/1 s příznaky napadení, B3 – netransgenní kontrola). (Foto Dana Šafářová)

Relativní koncentrace viru po mechanické inokulaci se pohybovala v průměru na úrovni 30% ve srovnání s netransgenní kontrolou (100%). Některé linie měly prakticky nulový obsah virové RNA (tabulka 2).

**Tabulka 2** Relativní koncentrace viru – odrůda Raman

Vzorek (GM linie)	Relativní koncentrace viru (%)	Symptomy
10025/1	0,1	-
10025/2	0,1	-
10026	55,7	+ zakrslost
10028/1	19,6	+ zakrslost
10028/2	43,0	+ zakrslost
10028/3	24,5	+ zakrslost, svinutost
10028/4	46,4	+ zakrslost
10029/2	16,6	++ zakrslost
10029/3	27,1	++ zakrslost
10029/4	28,9	++ zakrslost
10030	6,6	+ zakrslost
10031	32,8	+ zakrslost
10062	48,1	++ zakrslost
10063	25,4	++ zakrslost, svinutost
10065	61,4	++ zakrslost
10066	18,8	++ zakrslost, svinutost
10073	74,5	++ zakrslost
C2	100	++ zakrslost

U linií odvozených po transgenozí konstruktem s genem *gmSPI2* pro navození odolnosti k hmyzím škůdcům a houbovým patogenům byly prozatím selektovány linie pozitivní na histochemický test GUS a fluorescenci GFP (Obrázek 4). Linie jsou množeny a budou testovány ve skleníkových a laboratorních testech na odolnost k listopasu hrachovému (*Bruchus pisorum*), mšici (*Acyrtosiphon pisum*) a k houbovým patogenům (např. *Fusarium solani*, *Ascochyta pisi*).



**Obrázek 4:** Fluorescence GFP v cytoplazmě mezofylových buněk listu transgenní linie hrachu po transformaci konstruktem pWell11b. (Foto Vladan Ondřej)

## ZÁVĚR

Podarilo se připravit funkční konstrukty s fragmenty sekvencí pro plášťové proteiny virů PEMV a PSbMV a úspěšně provést transformaci rostlin hrachu. Molekulárně biologickými testy byla prokázána přítomnost vnášeného transgenu a některé linie vykazovaly očekávanou toleranci vůči inokulaci příslušným virovým izolátem. Tyto linie jsou dále množeny a testovány a mohly by sloužit jako významný šlechtitelský materiál. Dále byly připraveny

konstrukty pro indukci odolnosti vůči hmyzím škůdcům a u získaných transgenních linií byly provedeny molekulární analýzy přítomnosti transgenů. Úspěšnost použití sekvence inhibitoru hmyzí proteázy *GmSPI2* bude ale potvrzena teprve biologickými testy.

## LITERATURA

- CHOWRIRA, G. M., CAVILEER, T. D., GUPTA, S. K., LURQUIN, P. F., BERGER, P. H., 1998. Coat protein-mediated resistance to pea enation mosaic virus in transgenic *Pisum sativum* L. In *Transgenic Res.*, roč. 7, 1998, s. 265-271.
- DOMBROWSKI, J. E., GOMEZ, L., CHRISPEELS, M. J., RAIKHEL, N. V., 1994. Targeting of proteins to the vacuole. *Plant Molecular Biology Manual, Ed 2*, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1994, s. 1-29.
- EDWARDS, O., SINGH, K. B., 2006. Resistance to insect pests: What do legumes have to offer? In *Euphytica*, roč. 147, 2006, s. 273-285.
- FÜTTERER, J., GISEL, A., IGLESIAS, V., KLÖTI, A., KOST, B., MITTELSTEN, SCHEID, O., NEUHAUS, G., NEUHAUS-URL, G., SCHROTT, M., SHILLITO, R., SPANGENBERG, G., WANG Z. Y., 1995. Standard molecular techniques for the analysis of transgenic plants. *Gene Transfer to Plants*, Springer Lab Manual, Berlin: Springer-Verlag, 1995, s. 215-263.
- HRASKA, M., RAKOUSKY, S., CURN, V., 2006. Protease inhibitors, mode of action and perspectives for plant transgenesis. In *Chem. listy*, roč. 100, 2006, s. 501-507.
- JONES, A. L., JOHANSEN, I. E., BEAN, S. J., BACH, I., MAULE, A. J., 1998. Specificity of resistance to pea seed-borne mosaic potyvirus in transgenic peas expressing the viral replicase (NIb) gene. In *J. General Virol.*, roč. 79, 1998, s. 3129-3137.
- LANGLEY, R. A., KADO, C. I., 1972. Studies on *Agrobacterium tumefaciens*: conditions for mutagenesis by N-methyl-N-nitrosoquandine and relationship of *A. tumefaciens* mutants to crown gall induction. In *Mutat. Res.*, roč. 14, 1972, s. 277-286.
- NIRMALA, X., KODRÍK, D., ŽUROVEC, M., SEHNAL, F., 2001. Insect silk contains a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor. In *Eur. J. Biochem.*, roč. 268, 2001, s. 2064-2073.
- HELLENS R. P., EDWARDS, E. A., LEYLAND, N. R., BEAN, S., MULLINEAUX, P. M., 2000. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. In *Plant Mol. Bio.*, roč. 42, 2000, s. 819-832.
- KREJČÍ, P., MATUŠKOVÁ, P., HANÁČEK, P., REINÖHL, V., PROCHÁZKA, S., 2007. The transformation of pea (*Pisum sativum* L.): applicable methods of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. In *Acta Physiol. Plant.*, roč. 29, 2007, s. 157-163.
- ŠVÁBOVÁ, L., SMÝKAL, P., GRIGA, M., ONDŘEJ, V., 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pisum sativum* *in vitro* and *in vivo*. In *Biol. Plant.*, roč. 49, 2005, s. 361-370.
- ŠVÁBOVÁ, L., 2008. Metodika agrobakteriální genetické transformace hrachu (*Pisum sativum* L.). Vydal Agritec Plant research s.r.o. v nakladatelství AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o. Šumperk. ISBN 978-80-903868-7-7.
- ŠVÁBOVÁ, L., GRIGA, M., 2008. The effect of cocultivation treatments on transformation efficiency in pea (*Pisum sativum* L.). In *Plant Cell Tiss. and Org. Culture*, roč. 95, 2008, s. 293-304.
- TIMMERMAN-VAUGHAN, G. M., PITHER-JOYCE, M. D., COOPER, P. A., RUSSELL, A. C., GOULDEN, D. S., BUTLER, R., GRANT, J. E., 2001. Partial resistance of transgenic peas to alfalfa mosaic virus under greenhouse and field conditions. In *Crop sci.*, roč. 41. 2001, s. 846-853.
- WESLEY, S. V., HELLIWELL, CH. A., SMITH, N. A., WANG, M. B., ROUSE, D. T., LIU, Q., GOODING, P. S., SINGH, S. P., ABBOTT, D., STOUTJESDIJK, P. A., ROBINSON, S. P., GLEAVE, A. P., GREEN, A. G., WATERHOUSE, P. M., 2001. Construct design for



efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. In *Plant J.*, roč. 27, 2001, č. 6, s. 581-590.

**Poděkování**

Tato práce vznikla za podpory výzkumného centra MŠMT 1M06030 a grantového projektu NAZV QI91A229.

**Korespondenční adresy:**

Ing. Pavel Hanáček, PhD. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Ústav biologie rostlin, Zemědělská 1, Brno. Tel.: 420 545133343, E-mail: [hanacek@mendelu.cz](mailto:hanacek@mendelu.cz)

Ing. Lenka Šváblová, PhD. AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby s.r.o., Zemědělská 2520/16, Šumperk, Tel.: 420 583382135 , E-mail: [svabova@agritec.cz](mailto:svabova@agritec.cz)

Mgr. Dana Šafářová, Ph.D. Palackého Univerzita v Olomouci, Ústav buněčné biologie a genetiky, Křížkovského 8, 771 47 Olomouc, E-mail: [dana.safarova@upol.cz](mailto:dana.safarova@upol.cz)