

ŽÁDOST O UDĚLENÍ POVOLENÍ PRO UVÁDĚNÍ DO ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ PRO JINÉ ÚČELY NEŽ KLINICKÉ HODNOCENÍ LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ

Díl 2

ŽÁDOST PRO GENETICKY MODIFIKOVANÝ ORGANISMUS, KTERÝ JE VYŠŠÍ ROSTLINOU

[K § 17 odst. 3 písm. a) zákona]

1. Název projektu:

Sada GMO linií jarního ječmene exprimujících antigeny rybích virů určené pro vývoj orálních vakcín v akvakultuře.

2. Žadatel

ÚSOVSKO a. s.

se sídlem č.p. 33, 789 73 Klopina

IČO: 60793015

5. Charakteristika nakládání s geneticky modifikovaným organismem

5.1. Účel uvádění do životního prostředí, jako jsou zejména agronomické účely, zkoušky hybridizace, změna schopností přežití nebo šíření nebo zjišťování účinků na cílové nebo necílové organismy

Akvakultura, představující největší udržitelný zdroj celosvětové produkce ryb (Adams, 2019), čelí závažné výzvě v podobě šíření infekčních onemocnění. Nejefektivnějším preventivním opatřením proti jejich výskytu je očkování, přičemž orální aplikace vakcín je považována za nejpraktičtější způsob podání (Chinabut a Puttinaowarat, 2005). Její širší využití je však dosud omezené nedostatečnou stimulací lymfoidní tkáně asociované se střevem (Lee et al, 2021). Nadějně řešení nabízí produkce rekombinantních vakcín prostřednictvím rostlin, jejichž buňky umožňují cílené ukládání antigenů do specifických organel, čímž je zajištěna jejich bioenkapsulace (Rovalino-Cordova et al., 2019). Rostlinné buňky navíc obsahují přirozené sloučeniny s adjuvantním účinkem, které mohou zesilovat aktivaci imunitního systému (Ching et al., 2021).

Výzkumná skupina rostlinného inženýrství a biotechnologie (CATRIN, Univerzita Palackého v Olomouci) se zaměřuje na potenciál ječmene setého (*Hordeum vulgare*) jako produkčního systému pro orální podjednotkové vakcíny proti virovým infekcím postihujícím hospodářsky významné druhy ryb z čeledí *Salmonidae* a *Cyprinidae*. Za tímto účelem byly vytvořeny transgenní homozygotní linie ječmene nesoucí geny kódující rekombinantní antigeny viru jarní virémie kaprů a viru infekční anémie lososů. Cílem projektu je analyzovat účinek těchto antigenů na aktivaci imunitního systému ryb a ověřit zvýšení odolnosti imunizovaných ryb vůči virovým onemocněním po orálním podání zrn transgenního ječmene. Plánovaný polní pokus bude zaměřen na množení tří homozygotních linií: AsGLOp::GP_GFP_S2-1-6, AsGLOp::GP_LTB-S2-1-1 a AsGLOp::HE_GFP-OM-4A-3.

Rostliny budou pěstovány do plné zralosti, přičemž část zrn bude sklizena již ve stádiu mléčné zralosti a dále zpracována na jemný lyofilizovaný prášek určený k orální imunizaci kaprů a pstruhů.

Imunostimulační účinky rekombinantních antigenů z transgenního ječmene budou testovány ve spolupráci s Parazitologickým ústavem Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích, dále s Fakultou rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a s Jihočeským výzkumným centrem akvakultury a biodiverzity hydrocenóz ve Vodňanech. Veškeré experimenty na rybách budou provedeny v souladu s českou legislativou (§ 29 zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, zejména novelizovaného zákonem č. 77/2004 Sb.) i na základě Oprávnění k používání pokusných zvířat MZE-39723/2025-13143, na základě schválení Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (číslo schválení: MSMT-24635/2022–4). Zahájení polních pokusů je plánováno na jaro 2026.

6. Doba uvádění do životního prostředí

6.1. Celková doba uvádění geneticky modifikovaného organismu do životního prostředí a datum jeho předpokládaného zahájení

Celková doba uvádění GMO do životního prostředí – 10 let (tj. od roku 2026 do roku 2035).

Datum zahájení dle schválení žádosti. Linie AsGLOp::GP_GFP_S2-1-6, AsGLOp::GP_LTB-S2-1-1 a AsGLOp::HE_GFP-OM-4A-3 budou vysety na jaře 2026.

7. Plánuje žadatel uvádění stejného geneticky modifikovaného organismu do životního prostředí v některém členském státě Evropské unie nebo mimo její území?

Ne, nevztahuje se.

8. Podal žadatel žádost pro uvádění stejného geneticky modifikovaného organismu do životního prostředí v jiném členském státě Evropské unie?

Ne, nevztahuje se.

9. Podal žadatel žádost pro uvádění stejného geneticky modifikovaného organismu do životního prostředí nebo na trh mimo území Evropské unie?

Ne, nevztahuje se.

10. Hodnocení rizika uvádění geneticky modifikovaného organismu do životního prostředí

10.1. Shrnutí hodnocení rizika

Ječmen je samosprašná, v přírodě neinvazivní rostlina. Sexuální kompatibilita s plevelným druhem ječmenem myším (*Hordeum murinum* L.), který se na našem území volně vyskytuje, je obtížná, ke křížení nedochází, nevytváří se hybridy. V Evropské unii se nenacházejí žádné jiné sexuálně kompatibilní planě rostoucí příbuzné druhy ječmene. Horizontální přenos genů u vyšších organismů se považuje za vzácný, ale k jeho zabránění podnikneme následující kroky - ošetření pole herbicidem před vysetím ječmene, minimálně 2,5 m izolační pás a minimálně 20 m izolační vzdálenost pro zamezení přenosu pylu na další rostliny a tím zabránit přenosu genů. S ječmenem rostoucím v izolačním pásu bude nakládáno jako s GMO. Přístup lidí, zvířet, ptáků a hlodavců k transgennímu ječmeni bude zamezen oplocením, značením, omezeným vstupem do areálu a skladu, plotem, a plašičkami. Všichni pracovníci, kteří přijdou do kontaktu s GM materiálem, budou řádně proškoleni.

Transgenní linie jarního ječmene AsGLOp::GP_GFP_S2-1-6, AsGLOp::GP_LTB-S2-1-1 a AsGLOp::HE_GFP-OM-4A-3 byly pěstovány ve fytotronech a skleníku výzkumné skupiny rostlinného inženýrství a biotechnologie, CATRIN (Univerzita Palackého v Olomouci) určených pro

uzavřené nakládání s GM rostlinami (na základě rozhodnutí z 19. října 2010 čj. 91997/ENV/10 a rozhodnutí 18. ledna 2013 čj. 4498/ENV/13). Během manipulace s těmito transgenními liniemi na pracovišti CATRIN nebyly u těchto rostlin pozorovány žádné selekční výhody ani nevýhody. Nebyla pozorována žádná interakce s kontrolními rostlinami ani s ostatními rostlinami ani jinými cílovými organismy.

Nepředpokládáme, že by GM linie jarního ječmene AsGLOp::GP_GFP_S2-1-6, AsGLOp::GP_LTB-S2-1-1 a AsGLOp::HE_GFP-OM-4A-3 představovaly rizika pro životní prostředí nebo rizika pro zdraví zvířat, lidí a necílových organismů (podrobně v příloze „Hodnocení rizika“).

Odůvodnění:

Specifický rozdíl transgenních linií ječmene oproti rodičovskému organismu je v produkci virových antigenů (fragment glykoproteinu z jarní virové kapří a fragment hemagglutinin esterase z infekční anemie lososů), jejichž účelem je vyvolat imunitní odpověď u ryb při použití v rámci orální vakcinace.

- Antigeny nemají toxický charakter
- Nejsou známy žádné nežádoucí účinky na zdraví člověka, necílových živočichů ani na životní prostředí a nejedná se o látky cizorodé životnímu prostředí
- Transgenní linie ječmene se liší pouze schopností exprimovat a akumulovat rekombinantní virové antigeny, jinak je její chemické složení a fyziologie srovnatelná s původním organismem.
- Náhodná konzumace zrna s obsahem antigenu volně žijícími živočichy a ptáky nepředstavuje specifické riziko (dietární protein; očekává se trávení na peptidy).
- Pravděpodobnost horizontálního přenosu z rostliny na mikroorganismy je zanedbatelná; integrační/expresní elementy neudělují selekční výhodu mikrobiálním populacím bez souvisejících promotorů kompatibilních s prokaryoty (exprese dvou základních částí transgenu je řízena výhradně promotory funkčními jenom v rostlinných buňkách).
- antigeny fGP a fHE jsou v transgenních liniích ječmene uloženy v endoplazmatickém retikulu a v membránou obalených proteinových tělískách rostlinných buněk, nejsou vylučovány do dalších částí buňky či rostliny, či ven z rostliny. U všech transgenních linií se antigeny fGP a fHE vyskytují pouze v zrnech.

Nepředpokládáme, že by krmný substrát, připravený z lyofilizovaných zrn modifikovaného ječmene, představoval toxikologické nebo patogenní riziko pro ryby ani pro životní prostředí. Očekávané biologické účinky vyplývají výhradně ze záměrné imunostimulační aktivity exprimovaných antigenů, což je cílem experimentu. V případě, že by se objevily jakékoli nežádoucí účinky na zdraví ryb, budou tyto skutečnosti pečlivě zaznamenány a další využití transgenního ječmene pro tento účel bude přehodnoceno.

Při realizaci polního pokusu budou dodržena všechna zákonná opatření o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, které jsou stanoveny Zákonem č. 78/2004 Sb. v aktuálním znění.

Díky opatřením, která budou aplikována při pokusném uvádění modifikovaných rostlin ječmene do prostředí (ochranné obsevy, vzdálenost od pěstovaných konvenčních odrůd ječmene, kontrola pozemku dva roky po ukončení pokusu), bude prakticky vyloučen jakýkoliv potenciální přenos genu pylem nebo semenem. Rovněž bude zajištěno bezpečné nakládání s osivem a rostlinným

materiálem (sklizeň, uskladnění, přeprava a odstranění odpadu) tak, aby žádné environmentální riziko nevzniklo.

11. Údaje o příjemci, případně, kde je to aplikovatelné, rodičovském organismu

11.1. České a latinské rodové a druhové jméno organismu, s přesným určením kultivaru (odrůdy, linie, hybridu)

NÁZEV ČELEDI: *POACEAE (GRAMINEAE)*

ROD: *HORDEUM*

DRUH: *H. VULGARE L.*

PODDRUH: *H. VULGARE L.*, JARNÍ FORMA

KULTIVAR: GOLDEN PROMISE (F) OBECNÝ NÁZEV: JARNÍ JEČMEN

12. Údaje o genetické modifikaci a geneticky modifikované vyšší rostlině

12.1. České a latinské rodové a druhové jméno geneticky modifikované vyšší rostliny, s přesným určením kultivaru (odrůdy, linie, hybridu)

Obiloviny, ječmen setý, (*Hordeum vulgare L.*), jarní forma, kultivar Golden Promise.

12.2. Popis a charakteristika dědičných vlastností, které byly vloženy nebo změněny, včetně signálních a selekčních genů a předchozích modifikací, a popis jejich fenotypových projevů

Do genomu ječmene byl vložen gen kódující cílový antigen: glykoprotein (fGP) nebo hemaglutinin esterasu (fHE), mimo jiné fúzovaný se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) nebo s adjuvantním proteinem (LTB). Exprese transgenu je řízena globulínovým promotorem, což zajišťuje tkáňově specifickou expresi v endospermu semen během zrání. Jedná se o tyto transgeny a úseky nukleových kyselin:

- AsGLOp::fGP_GFP
- AsGLOp::fGP_LTB
- AsGLOp::fHE_GFP

Dále byl do ječmene vnesen selekční marker *hpt* („hygromycin phosphotransferase“), který umožňuje rezistenci k antibiotiku hygromycinu B (gen HygR), což vede k identifikaci úspěšně transformovaných rostlin během regenerace *in vitro*. Všechny modifikované rostliny ječmene tedy také obsahují kazetu CaMV35S::hpt:NOST.

12.3. Typ genetické modifikace

12.3.1. Vnesení cizorodého dědičného materiálu

Vnesení cizorodého dědičného materiálu do genomu ječmene setého (*Hordeum vulgare*) jarního kultivaru Golden Promise bylo provedeno pomocí bakteriální kultury *Agrobacterium tumefaciens* kmen AGL1.

12.3.2. Vynětí části dědičného materiálu

Není relevantní

12.3.3. Kombinace vynětí a vnesení dědičného materiálu

Není relevantní

12.3.4. Buněčná fúze

Není relevantní

12.3.5. Jiné (jednoznačně identifikujte)

Není relevantní

12.5. Údaje o každé části úseku DNA, který byl vnesen do organismu příjemce (pokud genetická modifikace zahrnuje vnesení dědičného materiálu)

12.5.1. Původ (české a latinské rodové a druhové jméno dárcovského organismu přesným určením kultivaru – odrůdy, rasy, plemene, linie, formy, hybridu, kmene, patovaru)

Do jaderného genomu ječmene (*Hordeum vulgare* L., kultivar Golden Promise) byla integrována T-DNA binárního vektoru pBRACT209.

12.5.2. Funkční charakteristika

Binární vektor pBRACT209 Transgen AsGLOp::fGP_LTB	Velikost genu (v bp)	Funkce
RB T-DNA	25	Oblast pravé hraniční sekvence T-DNA v Ti plasmidu
AsGLO promotor	959	Endospermově specifický promotor původem z ovsa setého (<i>Avena sativa</i> L.)
KOZAK sekvence	12	Iniciační sekvence pro nasedání ribosomů
Signální peptid	51	N-terminální signální peptid kukuričné cytokinin oxidasy/dehydrogenasy 1 zodpovídající za translokaci proteinu skrz endoplasmatické retikulum
Dvojitý 6xHist	36	Dvojitá sekvence šesti histidinů umožňující interakci proteinu s kovem při afinitní purifikaci nebo také slouží na imunodetekci proteinu
2xGGGGGS	30	flexibilní peptidový linker pro spojování dvou proteinových domén nebo epitopů
fragment GP	285	GP je obalový glykoprotein viru, který zprostředkovává vazbu na hostitelské buňky a vstup viru a je hlavní imunogenní antigen (vyvolává tvorbu neutralizačních protilátek a chrání ryby před infekcí).
LTB	309	Netoxická vazebná podjednotka enterotoxinu <i>E. coli</i> , využívaná v imunologii pro cílení antigenů na slizniční imunitní systém i jako mukózní adjuvant.
Myct	30	Peptidový epitopový tag pro detekci a purifikaci rekombinantních proteinů

KDEL	12	C-terminální signální sekvence fungující jako retenční signál pro proteiny endoplasmatického retikula
NOS terminator	253	Transkripční terminátor genu pro nopalinsyntázu (NOS) bakterie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
hpt gen	1264	Gen kódující hygromycin fosfotransferasu, která zabezpečuje rezistenci transgenických rostlin proti hygromycinu B
LB T-DNA	23	Oblast levé hraniční sekvence T-DNA v Ti plasmidu

Binární vektor pBRACT209	Velikost genu (v bp)	Funkce
Transgen AsGLOp::fGP_GFP		
RB T-DNA	25	Oblast pravé hraniční sekvence T-DNA v Ti plasmidu
AsGLO promotor	959	Endospermově specifický promotor původem z ovsu setého (<i>Avena sativa</i> L.)
KOZAK sekvence	12	Iniciační sekvence pro nasedání ribosomů
Signální peptid	51	N-terminální signální peptid kukuričné cytokinin oxidasy/dehydrogenasy 1 zodpovídající za translokaci proteinu skrz endoplasmatické retikulum
Dvojitý 6xHist	36	Dvojitá sekvence šesti histidinů umožňující interakci proteinu s kovem při afinitní purifikaci nebo také slouží na imunodetekci proteinu
2xGGGGGS	30	flexibilní peptidový linker pro spojování dvou proteinových domén nebo epitopů
fragment GP	285	GP je obalový glykoprotein viru, který zprostředkovává vazbu na hostitelské buňky a vstup viru a je hlavní imunogenní antigen (vyvolává tvorbu neutralizačních protilátek a chrání ryby před infekcí).
EK	15	Proteáza, která specificky štěpí po sekvenci DDDDK a používá se k odstraňování purifikačních tagů a fúzních proteinů z rekombinantních proteinů.
GFP	714	Fluorescenční markerový protein, který slouží k vizualizaci a sledování genové exprese a proteinů v živých buňkách
Myct	30	Peptidový epitopový tag pro detekci a purifikaci rekombinantních proteinů
KDEL	12	C-terminální signální sekvence fungující jako retenční signál pro proteiny endoplasmatického retikula

NOS terminator	253	Transkripční terminátor genu pro nopalinsyntázu (NOS) bakterie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
hpt gen	1264	Gen kódující hygromycin fosfotransferasu, která zabezpečuje rezistenci transgenních rostlin proti hygromycinu B
LB T-DNA	23	Oblast levé hraniční sekvence T-DNA v Ti plasmidu

12.6. Pokud se jedná o vynětí části dědičného materiálu (deleci), velikost a funkce vyřatého úseku

Nevztahuje se

12.7. Popis metody použité pro genetickou modifikaci

Nezralá zrna jarního ječmene (*Hordeum vulgare* L., odrůda Golden Promise) byla odebrána dva týdny po opylení a sterilizována. Z nich byla následně sterilně izolována nezralá zygotická embrya o velikosti přibližně 1,5 mm. Po odstranění embryonální osy byla embrya transformována pomocí kultury *Agrobacterium tumefaciens*, kmene AGL1. Pro zvýšení účinnosti transformace byl do bakteriální kultury přidán acetosyringon a během inkubace embryí s bakteriální kulturou bylo po dobu jedné minuty aplikováno vakuum.

Po třídní kokultivaci byla embrya přenesena na médium indukující tvorbu kalusu. Z embryogenních kalusů, selektovaných na médiu s antibiotikem Hygromycin B, byly následně regenerovány transgenní rostliny. Při přesazování z in vitro kultury do zeminy byla jejich transgenní povaha ověřena pomocí PCR. Analýzy potvrdily přítomnost genů kódujících antigeny (fGP a fHE) fúzané s proteiny GFP nebo LTB, stejně jako přítomnost selekčního markeru *hpt*.

U vybraných transgenních linií generace T0, identifikovaných jako pozitivní na základě PCR analýzy, byl dále stanoven počet kopií transgenu metodou Southern blot. Tyto rostliny byly následně dopěstovány ve skleníku za kontrolovaných podmínek.

12.15. Jednoznačné údaje o tom, v čem se geneticky modifikovaná vyšší rostlina liší od příjemce nebo rodičovského organismu:

12.15.1. způsob a rychlost rozmnožování

Není ovlivněno způsob a rychlost rozmnožování.

12.15.2. šíření v prostředí

Není ovlivněno šíření v prostředí.

12.15.3. schopnost přežití

Není negativně ovlivněna schopnost přežití.

12.15.4. účinky na zdraví lidí, zvířat a životní prostředí

Specifický rozdíl transgenních linií ječmene oproti rodičovskému organismu je v produkci virových antigenů (fragment glykoproteinu z jarní viremie kaprů a fragment hemagglutinin esterase z infekční anemie lososů), jejichž účelem je vyvolat imunitní odpověď u ryb při použití v rámci orální vakcinace.

- Antigeny nemají toxický charakter.

- Nejsou známy žádné nežádoucí účinky na zdraví člověka, necílových živočichů ani na životní prostředí.
- Transgenní linie ječmene se liší pouze schopností exprimovat a akumulovat rekombinantní virové antigeny, jinak je její chemické složení a fyziologie srovnatelná s původním organismem.

12.16. Fenotypová stabilita geneticky modifikované vyšší rostliny

Na základě pěstování transgenního ječmene s antigeny fGP a fHE v uzavřeném prostředí ve fytotronu a ve skleníku určeného pro pěstování GM rostlin nebyly zjištěny změny ve fenotypu transgenních rostlin.

12.17. Jakákoliv změna schopnosti geneticky modifikované vyšší rostliny přenášet genetický materiál na jiné organismy v důsledku genetické modifikace

Nedošlo ke změně schopnosti modifikované rostliny přenášet genetický materiál na jiné organismy v důsledku genetické modifikace. Přenos vloženého dědičného materiálu jarního ječmene s antigeny fGP a fHE na jiné organismy není v přírodě možný. Přesto však budou uplatněna opatření, která vyloučí jakýkoli přenos genetické informace při pokusném uvádění do životního prostředí. Aby bylo zabráněno transferu vnášených genů do životního prostředí, bude transgenní jarní ječmen od veškerého nepokusného jarního ječmene potencionálně pěstovaného v blízkosti pokusného „GMO pole“ oddělovat izolační vzdálenost minimálně 20 m. Místo vysetí transgenních rostlin bude navíc chráněno izolačním obsevem konvenčního jarního ječmene obdobné ranosti širokým minimálně 2,5 m. Porost bude ohraničen přenosným oplocením bránícím vstupu zvěře a označen viditelnými cedulemi s nápisem "POZOR - GMO - NEVSTUPOVAT - NEZKRMOVAT, Není určeno ke konzumaci, krmení! Zákaz předávání neoprávněným osobám!". Na konci pokusu bude všechna zbývající rostlinná hmota, včetně obsevu konvenčního jarního ječmene, zničena rozdrčením a zapravením do půdy orbou. Výskyt rostlin vzešlých z výdrolu bude kontrolován každý měsíc během následujících dvou let po ukončení pokusu.

12.18. Informace o každém možném škodlivém účinku geneticky modifikované vyšší rostliny na zdraví lidí způsobeném genetickou modifikací

Takový účinek není předpokládán. Navíc rostliny z polních pokusů nebudou použity k produkci potravin ani nebudou běžnou součástí krmiv.

12.19. Údaje o bezpečnosti geneticky modifikované vyšší rostliny pro zdraví zvířat, zejména s ohledem na jakékoliv škodlivé účinky způsobené genetickou modifikací, pokud má být geneticky modifikované vyšší rostliny použito jako krmivo

Ječmen patří mezi obilniny, které se v rybníkářství a akvakultuře příležitostně používají jako doplňková složka krmných směsí pro kapra obecného (*Cyprinus carpio*), obvykle společně s pšenicí a kukuřicí. Není podáván jako hlavní zdroj živin, ale jako součást směsí. Oproti jiným obilninám obsahuje vyšší podíl vlákniny, zejména β -glukanů a polysacharidů, na druhou stranu je však ječmen pro kapra hůře stravitelný (Burton a Fincher, 2012; Degani et al., 2008). Přesto je považován za bezpečnou krmnou surovinu, pokud netvoří příliš velký podíl krmné dávky. Dosud nebyly popsány žádné toxické účinky ječmene na zdraví ryb; limitujícím faktorem je pouze nižší využitelnost živin a energie (Degani et al., 2008), která se v praxi může projevit nižší růstovou účinností, nikoli však ohrožením zdraví.

Cílem studie je využití nezralých zrn transgenního ječmene ve formě lyofilizovaného prášku, který bude podáván rybám buď ve formě kaše, nebo zapracovaný do pelet jako součást krmiva. Toto

krmivo bude sloužit pro experimentální účely se zaměřením na sledování aktivace imunitního systému ryb (veškeré experimenty na rybách budou vykonány na Parazitologickém ústavu Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích, na Fakultě rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a dále na Jihočeském výzkumném centru akvakultury a biodiverzity hydrocenóz ve Vodňanech).

Transgenní ječmen exprimuje proteiny, u nichž se nepředpokládají škodlivé účinky vyplývající z genetické modifikace.

- fragment GP je imunogenní glykoprotein virového původu. Jeho biologickým účinkem je stimulace tvorby neutralizačních protilátek; není známo, že by vykazoval toxické či jinak škodlivé účinky u ryb.
- fragment HE – virový glykoprotein (např. z virů koronavirů/influenzavirů), jehož biologická funkce souvisí s vazbou na receptory a štěpením esterových vazeb kyseliny sialové. V transgenní rostlině se uplatní pouze jako antigen, nemá toxické účinky na ryby, při orálním podání se rychle degraduje proteázami.
- GFP – fluorescenční protein z medúzy *Aequorea victoria*, běžně využívaný jako marker v biologii. Je netoxický, nepatogenní a bezpečnost jeho využití v GMO je dlouhodobě doložena.
- LTB podjednotka – netoxická a slouží jako mukózní adjuvans, její bezpečnost byla opakovaně doložena v imunologických studiích.
- hpt gen – kóduje enzym hygromycinofosfotransferázu, který je netoxický a slouží výhradně jako selekční marker. Protein se u ryb neakumuluje ani nevyvolává patologické účinky.
- Signální peptid, linkery, epitopové značky (6xHis, Myc, KDEL) jsou technické sekvence běžně využívané v molekulární biologii a nevykazují negativní vliv na zdraví zvířat.

Na základě uvedeného lze konstatovat, že krmný substrát nepředstavuje toxikologické ani patogenní riziko pro ryby ani pro životní prostředí. Očekávané biologické účinky vyplývají výhradně ze záměrné imunostimulační aktivity exprimovaných antigenů, což je cílem experimentu. V případě, že by se objevily jakékoli nežádoucí účinky na zdraví ryb, budou tyto skutečnosti pečlivě zaznamenány a další využití transgenního ječmene pro tento účel bude přehodnoceno.

12.20. Mechanismus interakce mezi geneticky modifikovanou vyšší rostlinou a cílovým organismem, pokud cílový organismus existuje

Mechanismus interakce mezi geneticky modifikovanou rostlinou a cílovým organismem spočívá v orálním podání mletých zrn ječmene obsahujících standardizovaný podíl antigenu chovaným rybám – kapru obecnému (*Cyprinus carpio*). Po požití je antigen, tvořený fragmentem virového glykoproteinu nebo hemagglutinin esterasy, prezentován mukóznímu imunitnímu systému ve střevě, kde dochází k jeho rozpoznání antigen-prezentujícími buňkami a následné aktivaci specifické humorální (IgM/IgT) i buněčné imunitní odpovědi. Nicméně, způsob interakce antigenů s buňkami imunitního systému ryb a aktivace jejich imunitního systému a popsání všech průvodních mechanismů je předmětem naší studie a hlavním důvodem pěstování transgenního ječmene na poli ve větším měřítku.

12.21. Možné změny v interakcích geneticky modifikované vyšší rostliny s necílovými organismy plynoucí z genetické modifikace

Nepředpokládá se žádný vliv na necílové organismy. Uvádění třech linií transgenního ječmene s antigeny fGP a fHE do životního prostředí je z tohoto hlediska bezpečné a nevyvolá žádné změny v interakcích s necílovými druhy. Bude pozorován vliv transformovaných rostlin na faunu a flóru s cílem identifikace případných změn interakcí oproti běžnému stavu.

Odůvodnění tvrzení

- Nepředpokládáme vliv na prostředí, jelikož:
 - nejedná se o látky cizorodé životnímu prostředí
 - antigeny fGP a fHE jsou v transgenních liniích ječmene uloženy v endoplazmatickém retikulu a v membránou obalených proteinových tělískách rostlinných buněk, nejsou vylučovány do dalších částí buňky či rostliny, či ven z rostliny. U všech transgenních linií se antigeny fGP a fHE vyskytují pouze v zrnech.
- Případné křížení s divokým typem ječmene je zamezeno izolačním pásem širokým minimálně 2,5 m a izolační vzdáleností minimálně 20 m od pokusu. Navíc, ječmen je samosprašný a pro opylovače minimálně atraktivní; vložený antigen nemění tvorbu pylu/ nektaru ani jeho nutriční hodnotu. Zvýšené riziko pro opylovače se nepředpokládá, ani se nepředpokládá přenos pylu na jiné rostliny mimo vymezenou oblast pěstování.
- Přístup lidí, zvěře, ptáků a hlodavců k transgennímu ječmeni bude zamezen oplocením, značením, omezeným vstupem do areálu a skladu, plotem, a plašičkami. Všichni pracovníci, kteří přijdou do kontaktu s GM materiálem budou řádně proškoleni.
- Náhodná konzumace zrna s obsahem antigenu volně žijícími živočichy a ptáky nepředstavuje specifické riziko (dietární protein; očekává se trávení na peptidy).
- Pravděpodobnost horizontálního přenosu z rostliny na mikroorganismy je zanedbatelná; integrační/expresní elementy neudělují selekční výhodu mikrobiálním populacím bez souvisejících promotorů kompatibilních s prokaryoty (exprese dvou základních částí transgenu je řízena výhradně promotory funkčními jenom v rostlinných buňkách).

12.22. Možné interakce geneticky modifikované vyšší rostliny s neživými složkami životního prostředí

Nejsou předpokládány žádné interakce s neživými složkami životního prostředí. Interakce s neživým prostředím jsou podle současných znalostí na úrovni nemodifikovaného jarního ječmene.

13. Pracoviště a pozemky, na kterých bude uvádění do životního prostředí probíhat

13.1. Umístění pozemku

13.1.1. Kraj Olomoucký

13.1.2. Obec Mohelnice

13.1.3. Název katastrálního území a parcelní číslo 698032 – Mohelnice, p.č. 2502/4 (pole), p.č. 2477 (sklad)

13.3. Velikost a využití pozemku

13.3.1. Celková rozloha pozemku 14 919 m²

13.3.2. Velikost a poloha plochy, na které mají být geneticky modifikované vyšší rostliny pěstovány (m²) 10300 m²

13.3.3. Velikost (m²) a způsob využití izolačního pásma kolem plochy pěstování geneticky modifikované vyšší rostliny (vyznačit v plánu)

Okolo celého pokusu bude vyset ochranný izolační pás jarního ječmene široký minimálně 2,5 m. Vyseta bude odrůda jarního ječmene Francin. Celková plocha všech pěstovaných jarních ječmenů, včetně ochranného pásu, bude maximálně 10300 m². Obsev bude zničen před, nebo těsně po sklizni pokusu a to tímto způsobem: rozdrčení rostlin, podmítka, po vzejití postřik totálním herbicidem a následně orba. Izolační pásmo zamezí transferu modifikovaných genů do jiných nepokusných rostlin jarního ječmene. Transgenní ječmen bude od veškerého nepokusného jarního ječmene pěstovaného mimo experimentální pole oddělovat izolační vzdálenost minimálně 20 m. Využití pozemků v okolí a plán pokusu viz příloha „Plán polních pokusů“.

13.4. Využití okolních pozemků

Využití okolních pozemků je uvedeno v příloze “Plán polních pokusů”.

13.5. Vzdálenost pozemku od specifických území (v metrech nebo kilometrech)

Posuzovaná lokalita v Mohelnici se nenachází na žádném chráněném území ve smyslu zákona č. 114/92 Sb. o ochraně přírody a krajiny.

Nejbližším takto chráněným územím je chráněná krajinná oblast Litovelské Pomoraví, která byla zřízena vyhláškou MŽP ČR č. 464 ze dne 29. října 1990. Její západní hranice probíhá východně od areálu ve vzdálenosti přibližně 800 metrů. CHKO má rozlohu 96 km² a na tomto území je vyhlášeno celkem 26 maloplošných zvláště chráněných území.

13.5.1. Zvláště chráněná území⁽¹²⁾

Nejbližším takto chráněným územím je chráněná krajinná oblast Litovelské Pomoraví. Západní hranice CHKO Litovelské Pomoraví probíhá východně od areálu ve vzdálenosti přibližně 800 metrů.

13.5.2. Ochranná pásma vodních zdrojů

Nevyskytují se v blízkém okolí.

13.5.3. Vodní toky, vodní nádrže

V blízkosti pokusného pole se nachází vodní tok Újezdka – potok o průměrné šířce břehové linie 4 m a hloubce cca 1.5 až 2 m (viz příloha „Plán pokusů“) a bezejmenný vodní útvar (odvodňovací strouha, většinu roku zcela suchá). Pokusné pole se nevyskytuje v záplavové oblasti.

13.5.4. Území obhospodařovaná v ekologickém zemědělství⁽¹³⁾

Pozemky v ekologickém zemědělství v blízkém okolí nejsou

13.6. Způsob zabezpečení pozemku

13.6.1. Zabezpečení pozemku proti neoprávněným osobám

Proti vstupu neoprávněných osob bude pozemek opatřen čtyřmi výstražnými cedulemi, umístěnými v rozích pozemků "POZOR - GMO - NEVSTUPOVAT - NEZKRMOVAT- CHEMICKY OŠETŘENO“. V případě, že to bude z pohledu organizace pokusu nutné, bude použito více cedulí tak, aby bylo vidět z jedné na druhou. Pokusná lokalita s GM jarním ječmenem bude obseta minimálně 2,5 pásem porostu jarního ječmene okolo celého pokusu, a tím bude přímý přístup k pokusným plochám omezen.

Pozemek s GMO ječmenem bude bezpečně oplocen pletivem.

Celý areál, za kterým se pozemky nachází, je zabezpečen proti vniknutí neoprávněných osob (vstup na kartu). Na pokusný pozemek je možný přístup jen z tohoto zabezpečeného areálu. V tomto zabezpečeném areálu se nachází GM sklad na parcelním čísle 2477 (zastavěná plocha a nádvoří).

13.6.2. Zabezpečení pozemku proti zvěři

Pokusná plocha s výsevem jarního ječmene bude bezpečně oplocena ohradovým pletivem do výšky 120 cm. Bezpečnost zajistí i obsev porostu jarního ječmene v šířce 2,5 m okolo celého pokusu. Pozemek s ječmenem bude bezpečně oplocen pletivem. Celý areál, na kterém se pozemky nachází, je zabezpečen proti vniknutí.

13.6.3. Zabezpečení pozemku proti splachu

Na rovinatém terénu pokusného pozemku nepředpokládáme riziko splachu. Pokusné pole se nevyskytuje v záplavové oblasti.

13.7. Popis ekosystému v místě pozemku

13.7.1. Typ půdy

Hnědozem (hnědozem modální slabě oglejená)

13.7.2. Vodní režim včetně zavlažování

Vodní režim je přirozený a v místě pokusu se nezavlažuje

13.7.3. Klimatické podmínky

Město Mohelnice leží v nadmořské výšce 280 m v klimatické oblasti T 2 teplá, mírně suchá s mírnou zimou. Průměrná roční teplota je 8,5 0 C. Ve vegetačním období je prům. teplota 14,0 0 C. Průměrný roční úhrn srážek v této oblasti je 650 mm, z toho ve vegetačním období (IV. - IX.) 380-390 mm, a mimo něj 280 - 290.

13.7.4. Flóra včetně zemědělských plodin

Běžné polní plevely - merlíky, lebedy, pcháče, svízel, laskavec, rdesna, svlačce, pýr plazivý, ježatka kuří noha a další. Pozemek se nyní nevyužívá k produkčnímu pěstování plodin.

13.7.5. Fauna včetně hospodářských a migrujících zvířat

Na lokalitě předpokládat z entomologického hlediska výskyt běžných druhů, vázaných na pěstované plodiny a zemědělsky využívanou půdu (jedná se především o mšice, třásněnky, ploštice).

13.9. Relevantní údaje týkající se předchozích případů uvádění do životního prostředí stejné geneticky modifikované vyšší rostliny, pokud existují, zejména ve vztahu k možným vlivům na zdraví lidí a zvířat, životní prostředí a biologickou rozmanitost

Nevztahuje se.

15. Opatření na ochranu zdraví lidí, zvířat, životního prostředí a biologické rozmanitosti a nakládání s odpadem

15.4. Monitoring

Během vegetačního období a dva měsíce po sklizni bude sledován 1x měsíčně případný růst ječmene v areálu žadatele mimo pokusné pole pro případný výskyt GM ječmene. V případě výskytu rostlin ječmene mimo pokusné pole bude odebrán list z rostliny (zbytek rostliny bude odstraněn; viz výše) pro izolaci DNA a stanovení modifikace pomocí postupů uvedených v metodách.

Monitoring případného růstu ječmene v areálu žadatele mimo pokusné pole bude probíhat v přímém okolí pole (do vzdálenosti cca 5 m od pokusného pole). V případě havárie bude cca 5 m od místa případné havárie po dobu dvou let sledován taktéž výskyt rostlin vzešlých z výdrolu zrna.

15.4.1. Metody zjišťování přítomnosti geneticky modifikované vyšší rostliny a monitorování jejich účinků na ekosystém

Ověření modifikace bude prováděno pomocí postupů uvedených v 12.13.2. Během pokusu budou plochy z agronomických a pokusných důvodů pravidelně navštěvovány, a to alespoň jednou za čtrnáct dní. Tyto kontroly umožní, aby byl monitorován vývoj rostlin a bylo zabráněno rozšiřování modifikovaného rostlinného materiálu. Pozorování budou probíhat tak, jak je popsáno v Plánu monitoringu v bodu 5.4.

Po skončení pokusu bude pokusná plocha navštěvována každý měsíc během následujících dvou let za účelem monitoringu výdrolu. Pokud by nějaký výdrol byl nalezen, byl by ještě před metáním odstraněn ručně nebo aplikací totálního herbicidu. V zájmu usnadnění kontroly případného výdrolu nebude následující dva roky na daném poli pěstována komerčně žádná obilovina.

15.4.2. Specificita metod identifikace geneticky modifikované vyšší rostliny a odlišení geneticky modifikované rostliny od dárcovského organismu, příjemce, případně rodičovského organismu, citlivost a spolehlivost těchto metod

Pro polní pokusy byly vybrány tři homozygotní linie AsGLOp::GP_GFP_S2-1-6, AsGLOp::GP_LTB-S2-1-1 a AsGLOp::HE_GFP-OM-4A-3. Potomstvo těchto rostlin obsahuje transgeny (popsáno v kapitolách 12.2 až 12.5), jejichž přítomnost v genomu ječmene lze prokázat metodou PCR a sekvenováním (viz kapitola 12.13.). Tyto rychlé, jednoduché a spolehlivé metody tudíž jednoznačně odliší geneticky modifikované linie AsGLOp::GP_GFP_S2-1-6, AsGLOp::GP_LTB-S2-1-1 a AsGLOp::HE_GFP-OM-4A-3 od všech netransgenických rostlin.

15.4.3. Techniky (metody) detekce přenosu vloženého dědičného materiálu na další organismy

Ověření modifikace bude prováděno pomocí postupů uvedených v 12.13.2., včasná detekce pomocí pravidelného monitoringu (15.4.)

15.4.4. Plocha, na které bude monitoring prováděn

Monitoring bude probíhat dle plánu monitoringu, viz bod 15.4, na místě pokusu a v jeho nejbližším okolí.

Monitoring bude také prováděn na místě případné havárie a v jeho nejbližším okolí.

15.4.5. Doba trvání monitoringu

Monitoring bude probíhat dle plánu monitoringu, viz bod 15.4 každý rok během pokusů (od setí do ukončení pokusů) a poté během dvou let od ukončení pokusu.

15.4.6. Četnost monitoringu

dle Plánu monitoringu, viz bod 15.4

15.5. Nakládání s odpady včetně odstraňování geneticky modifikovaných, vyšších rostlin

Odpad z geneticky modifikovaných rostlin vyrobených z pokusu (všechny vegetativní části rostlin) bude na konci pokusu zničen rozdrcením a zapravením do půdy střední orbou. Izolační obsev konvenčního jarního ječmene bude tímto způsobem rovněž zničen. Sklizený transgenní ječmen se nedostane do potravinového ani do běžného krmivového řetězce. Odstraňování vzorků určených pro analýzy bude probíhat v laboratoři akreditované pro nakládání s GMO na pracovišti výzkumné skupiny rostlinného inženýrství a biotechnologie, CATRIN, UP Olomouc, Šlechtitelů 27, budova H, 2. podlaží (laboratoř 2.39), a to autoklávováním GMO, jak je uvedeno v provozním řádu daného pracoviště.

Shrnutí ochranných opatření

Všechna ochranná opatření jsou v souladu se zákonem č.78/2004 Sb. (aktuálním znění). Transgenní zrna a vzorky budou přemísťovány mezi CATRIN (výzkumná skupina rostlinného inženýrství a biotechnologie), UP Olomouc, budova H, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc a místem realizace polních pokusů a skladem – firmou Úsovsko a.s., ÚSOVSKO AGRO s.r.o. a MOHELNICE AGRO s.r.o.

Přeprava vzorků bude zajišťována tak, aby během přepravy nevznikla žádná rizika. GM materiál bude řádně označen, umístěn ve dvojitéch plastových boxech/ obalech. Převážející bude mít dále s sebou havarijný plán v a lopatku, smetáček a autoklávovatelný pytel pro případ havárie. Odebrané vzorky a zrno GM rostlinného materiálu budou řádně označeny tak, aby nemohlo dojít k jejich záměně a při převozu zabezpečeny proti úniku do prostředí. Aby bylo zabráněno transferu vnášených genů do životního prostředí, bude modifikovaný jarní ječmen od veškerého nepokusného jarního ječmene (tj. vyskytujícího se mimo pokusné „GMO pole“) oddělovat izolační vzdálenost minimálně 20 m. Pozemek s GMO ječmenem bude bezpečně oplocen pletivem. Celý areál, za kterým se pozemky nachází, je zabezpečen proti vniknutí neoprávněných osob (vstup na kartu). Na pokusný pozemek je možný přístup jen z tohoto zabezpečeného areálu. V tomto zabezpečeném areálu se nachází GM sklad na parcelním čísle 2477 (zastavěná plocha a nádvoří). Sklad zrna bude určen výhradně pro skladování GM semen ječmene, přístup do skladu bude evidován a omezen (uzamčen, vstup bude umožněn pouze třem osobám), sklad bude řádně označen a okna ve skladu budou opatřena sítí. Místo pokusu bude navíc chráněno izolačním obsevem konvenčního jarního ječmene obdobné ranosti širokým minimálně 2.5 m. Porost bude ohraničen oplocením bránícím vstupu zvířete a označen viditelnými cedulemi s nápisem "POZOR - GMO - NEVSTUPOVAT - NEZKRMOVAT- CHEMICKY OŠETŘENO. Není určeno ke konzumaci, krmení! Zákaz předávání neoprávněným osobám!". Plán monitoringu bude realizován během pokusů a po jejich skončení, jak je uvedeno viz plán monitoringu (bod 15.4). Monitoring bude probíhat na pokusném pozemku a v jeho nejbližším okolí. Monitoring bude také prováděn na místě případné havárie a v jeho nejbližším okolí. Na konci pokusu bude všechna zbývající rostlinná hmota, včetně obsevu konvenčního jarního ječmene, zničena rozdrcením a zapravením do půdy orbou. Následující dva roky nebude na pokusné ploše pěstován žádný komerční jarní ječmen.

16. Shrnutí informací o plánovaných polních pokusech prováděných za účelem získání nových údajů o vlivu uvádění geneticky modifikované vyšší rostliny do životního prostředí na zdraví lidí, zvířat a životní prostředí

Účelem uvádění homozygotních linií ječmene AsGLOp::GP_GFP_S2-1-6, AsGLOp::GP_LTB-S2-1-1 a AsGLOp::HE_GFP-OM-4A-3 na pracovišti Úsovsko a.s., ÚSOVSKO AGRO s.r.o., katastrální

území Mohelnice, obec Klopina do životního prostředí je namnožení osiva, přičemž větší část zrn bude sklízena již ve stádiu mléčné zralosti a dále zpracována na jemný lyofilizovaný prášek určený k orální imunizaci kaprů a pstruhů.

Účelem plánovaného nakládání s geneticky modifikovanými rostlinami je analyzovat účinek rekombinantních antigenů viru jarní virémie kaprů a viru infekční anémie lososů, produkovaných transgenními homozygotními liniemi ječmene, na aktivaci imunitního systému ryb. Cílem je rovněž ověřit, zda orální podání zpracovaných zrn transgenního ječmene vede ke zvýšení odolnosti imunizovaných ryb vůči uvedeným virovým onemocněním, a to v rámci projektu „Rostoucí obor : Posun poznání slizniční imunity ryb prostřednictvím molekulárního zemědělství“ (GAČR, číslo projektu: 24-13026S).

V průběhu pěstování modifikovaného ječmene bude prováděno také ověření bezpečnosti vůči životnímu prostředí a sledování případné změny schopnosti přežití, nebo šíření v rámci prostředí se zaměřením na cílové i necílové organismy.