

UNIVERZITA SV. CYRILA A METODA V TRNAVE

Fakulta prírodných vied



RASTLINNÉ, ŽIVOČÍŠNE A POTRAVINÁRSKE
BIOTECHNOLÓGIE, ICH REGULÁCIA A
BIOLOGICKÁ BEZPEČNOSŤ

Ján Kraic, Ján Rafay, Michaela Havrlentová,
Jana Moravčíková

Trnava 2024

Rastlinné, živočíšne a potravinárske biotechnológie, ich regulácia a biologická bezpečnosť

Autorský kolektív:

prof. RNDr. Ján Kraic, PhD.

doc. RNDr. Ján Rafay, CSc.

doc. RNDr. Michaela Havrlentová, PhD.

doc. Ing. Jana Moravčíková, PhD.

Recenzenti:

prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc.

prof. Ing. Katarína Ražná, PhD.

doc. RNDr. Ján Salaj, DrSc.

Učebnica bola vypracovaná v rámci projektu KEGA 001 UCM-4/2022.

Vysokoškolská učebnica bola schválená Edičnou radou Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave a vedením Fakulty prírodných vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave pre študentov vysokých škôl.

© Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave

© prof. RNDr. Ján Kraic, PhD., doc. RNDr. Ján Rafay, CSc., doc. RNDr. Michaela Havrlentová, PhD., doc. Ing. Jana Moravčíková, PhD.

Všetky práva vyhradené. Bez súhlasu majiteľa práv toto dielo a ani jeho časti nemožno reprodukovať.

Rukopis neprešiel jazykovou úpravou.

Vydavateľ: Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Fakulta prírodných vied, 2024

Vydanie: prvé, online: www.ucm.sk/files/sk/ine-pracoviska/centrum-informacnych-zdrojov-ucm-trnave/referat-informacnych-sluzieb/e-zdroje/ucebne-texty-k-stiahnutiu/rastlinne.pdf

ISBN 978-80-572-0480-0

Obsah

Predslov	11
Časť 1. Úvod do biotechnológie	12
1 Úvod do biotechnológie	13
1.1 Chlieb, pivo, víno – prvé biotechnológie v rukách človeka	13
1.2 Fermentácie	14
1.3 Biotechnológie – podstata a ich vývoj.....	16
1.4 Staroveké biotechnológie (do roku 1800)	17
1.5 Klasické biotechnológie (1800 – polovica 20. storočia)	17
1.6 Moderné biotechnológie (od polovice 20. storočia).....	18
1.7 Definície biotechnológií	20
1.8 Odvetvové členenie biotechnológií	21
1.9 Biotechnológie a hospodárstvo.....	23
1.10 Zoznam použitej literatúry	25
Časť 2. Rastlinné biotechnológie	26
2 Rastlinné biotechnológie	28
2.1 Zlepšovanie vlastností rastlín	28
2.2 Šľachtenie rastlín a jeho vývoj	29
2.2.1 Selektívne šľachtenie rastlín	31
2.2.2 Konvenčné mutačné šľachtenie rastlín	36
2.3 Biotechnológie v šľachtení rastlín	37
2.3.1 Mutačné šľachtenie rastlín <i>in vitro</i>	37
2.3.2 Cílené mutačné šľachtenie rastlín – editovanie genómov	40
2.3.3 Bunkové šľachtenie rastlín.....	42
2.3.3.1 Mikropropagácia rastlín.....	45
2.3.3.2 Produkcia bezvírusových rastlín.....	49
2.3.3.3 Embryo kultúry rastlín.....	52
2.3.3.4 Záchrana hybridných embryí („ <i>Embryo rescue</i> “).....	53
2.3.3.5 Produkcia dihaploidov	55
2.3.3.6 Tvorba haploidov a dihaploidov	57
2.3.4 Somaklonálna variabilita.....	60
2.3.4.1 Somatická hybridizácia.....	62
2.3.4.2 Dlhodobé uchovávanie rastlín	65

2.3.4.3	Uchovávanie rastlín v kultúrach <i>in vitro</i>	67
2.3.4.3.1	Uchovávanie rastlín kryokonzerváciou	68
2.3.4.4	DNA banky	71
2.3.4.5	Produkcia rastlinných sekundárnych metabolitov	73
2.3.4.5.1	Produkcia sekundárnych metabolitov kalusovými kultúrami	74
2.3.4.5.2	Produkcia sekundárnych metabolitov bunkovými suspenznými kultúrami.....	76
2.3.4.5.3	Produkcia sekundárnych metabolitov orgánovými kultúrami.....	77
2.3.4.5.4	Elicitácia produkcie sekundárnych metabolitov v <i>in vitro</i> kultúrach.....	80
2.3.5	Genetické modifikácie rastlín	82
2.3.5.1	Systém <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	84
2.3.5.2	Biolistická technika.....	85
2.3.5.3	Prenos cudzích génov do protoplastov	87
2.3.5.3.1	<i>In planta</i> techniky.....	88
2.3.6	Geneticky modifikované rastliny v praxi	91
2.3.6.1	Geneticky modifikované rastliny rezistentné proti hmyzím škodcom	95
2.3.6.2	Geneticky modifikované rastliny tolerantné voči herbicídum.....	96
2.3.6.3	Geneticky modifikované rastliny rezistentné voči fytopatogénom	98
2.3.6.4	Geneticky modifikované rastliny rezistentné voči abiotickým stresom	100
2.3.6.5	Geneticky modifikované rastliny so zlepšenými nutričnými a funkčnými parametrami	103
2.3.6.6	Geneticky modifikované rastliny pre farmáciu a medicínu.....	111
2.3.6.6.1	Vakcíny produkované v geneticky modifikovaných rastlinách.....	112
2.3.6.6.2	Monoklonálne protilátky produkované v geneticky modifikovaných rastlinách.....	114
2.3.6.6.3	Terapeutické bielkoviny produkované v geneticky modifikovaných rastlinách.....	116
2.3.6.7	Molekulárne poľnohospodárstvo	117
2.3.7	Molekulárne šľachtenie rastlín.....	119
2.4	Zoznam použitej literatúry	125
	Časť 3. Živočíšne biotechnológie.....	134
	3 Živočíšne biotechnológie.....	135
3.1	Vznik a história využívania biotechnologických postupov v chove zvierat	135
3.1.1	Domestikácia zvierat.....	136

3.2 Biotechnologické postupy v reprodukci hospodárskych zvierat.....	140
3.2.1 Umelý prenos spermií (umelá inseminácia).....	141
3.2.2 Získavanie a skladovanie gamét.....	141
3.2.3 Oplodnenie – fertilizácia.....	143
3.2.4 <i>In vitro</i> oplodnenie.....	144
3.2.5 Rané embryá.....	145
3.2.5.1 Získavanie raných embryí.....	146
3.2.6 Kultivácia embryí.....	147
3.2.7 Prenos embryí.....	148
3.2.8 Výhody oplodnenia <i>in vitro</i> a prenosu embryí.....	148
3.2.9 Vyplavovanie embryí.....	148
3.2.10 Uchovávanie gamét a raných embryí.....	149
3.2.11 Klonovanie.....	150
3.2.12 Transgenéza.....	152
3.2.13 Editácia genómu.....	153
3.3 Využitie genomických techník v chove hospodárskych zvierat.....	155
3.4 Využitie poznatkov zo živočíšnych biotechnológií v medicínskom výskume.....	162
3.5 Využitie biotechnológií pri tvorbe a ochrane aktívneho zdravia hospodárskych zvierat.....	164
3.6 „Welfare“ – dobré životné podmienky zvierat a ich ochrana v biotechnologických aplikáciách.....	169
3.7 Biotechnológie vo výžive zvierat.....	174
3.7.1 Zlepšenie kvality objemového krmiva.....	175
3.7.2 Biotechnologické produkty ako krmné doplnkové látky.....	176
3.7.2.1 Ionofóry.....	176
3.7.2.2 Enzýmy.....	176
3.7.2.3 Probiotiká a prebiotiká.....	176
3.7.2.4 Ochrana bielkovín, aminokyselín a tukov.....	177
3.7.2.5 Odstránenie antinutričných faktorov z dostupných krmív.....	177
3.7.2.6 Zlepšenie nutričnej hodnoty konzervovaného krmiva.....	177
3.7.2.7 Antimikrobiálne peptidy.....	178
3.7.2.8 Elektronický nos.....	178
3.7.2.9 Nutrigenomika.....	178
3.8 Zoznam použitej literatúry.....	180

Časť 4. Potravinárske biotechnológie.....181

4 Potravinárske biotechnológie.....	183
4.1 Úvod do problematiky	183
4.1.1 Pojem potravin a funkcie potravín	183
4.1.2 Makro- a mikroelementy vo výžive	184
4.1.3 Definovanie pojmu potravinové biotechnológie	187
4.2 Nutrične významné sacharidy	189
4.2.1 Potravinová vláknina.....	189
4.2.1.1 Rozpusťná a nerozpusťná potravinová vláknina – definícia, vlastnosti, zdroje.....	189
4.2.1.2 Funkčné vlastnosti zložiek potravinovej vlákniny, aplikácie v potravinách....	192
4.2.2 Arabinoxylány.....	195
4.2.2.1 Základná charakteristika	195
4.2.2.2 Biosyntetická dráha.....	197
4.2.2.3 Význam arabinoxylánov v inovatívnych potravinách	200
4.2.3 β -D-glukány	202
4.2.3.1 Základná charakteristika β -D-glukánov.....	202
4.2.3.2 Biosyntetická dráha β -D-glukánov	204
4.2.3.3 Zdraviu prospešné vlastnosti β -D-glukánov	207
4.2.3.4 Funkčné vlastnosti a modifikácie	207
4.2.3.5 Kapacita viazania žlčových kyselín.....	208
4.2.3.6 Rozpusťnosť β -D-glukánov.....	208
4.2.3.7 Gélové vlastnosti β -D-glukánov	209
4.2.3.8 Viskozita	210
4.2.3.9 Texturálne vlastnosti	210
4.2.3.10 Aplikácie v potravinách.....	211
4.2.4 Škrob.....	212
4.2.4.1 Základná charakteristika škrobu	212
4.2.4.2 Biosyntetická dráha škrobu.....	215
4.2.4.3 Biotechnologické prístupy k produkcii modifikovaného škrobu.....	218
4.2.5 Rezistentný škrob.....	225
4.2.5.1 Základná charakteristika rezistentného škrobu - definícia, vlastnosti, zdroje..	225
4.2.5.2 Fyzikálno-chemické vlastnosti, technologický vývoj a nové výhody rezistentného škrobu	228
4.3 Oleje a tuky.....	231

4.3.1	Nutrične významné mastné kyseliny a ich deriváty.....	233
4.3.1.1	Biosyntéza lipidov	236
4.3.1.2	Genetická modifikácia rastlinných olejov pre potravinárske aplikácie	240
4.4	Aminokyseliny a oligopeptidy	243
4.4.1	Funkcia bioaktívnych peptidov v potravinovej matrici a fyziológia	246
4.4.1.1	Antimikrobiálne a protirakovinové aktivity peptidov.....	247
4.4.1.2	Antioxidačná aktivita	249
4.4.1.3	Antihypertenzívna a antidiabetická aktivita peptidov	249
4.4.1.4	Imunomodulačná aktivita.....	250
4.4.1.5	Bioaktívne peptidy účinné proti starnutiu.....	250
4.4.1.6	Biologická dostupnosť a fyziologická stabilita bioaktívnych peptidov.....	251
4.4.1.7	Produkcia bioaktívnych peptidov	252
4.4.1.8	Funkčné potraviny	253
4.5	Sekundárne metabolity	256
4.5.1	Polyfenolické látky rastlín.....	256
4.5.1.1	Biosyntéza.....	259
4.5.1.2	Poľnohospodárske rastliny ako zdroje polyfenolických látok.....	264
4.6	Nutraceutiká	265
4.6.1	Základná charakteristika nutraceutík	265
4.6.2	Nutraceutiká a choroby	267
4.6.3	Výzvy	270
4.6.3.1	Biotechnologické metódy ako nástroj na zvýšenie produkcie nutraceutík	271
4.7	Zoznam použitej literatúry	274
	Časť 5 Regulácia a biologická bezpečnosť biotechnológií.....	281
	5 Regulácia a biologická bezpečnosť biotechnológií.....	282
5.1	Biologická diverzita.....	282
5.1.1	Genetická diverzita.....	283
5.1.2	Druhovú diverzita.....	285
5.1.3	Ekosystémová biodiverzita	287
5.1.4	Kultúrna diverzita.....	290
5.2	Význam biodiverzity pre človeka.....	291
5.3	Príčiny ohrozenia biodiverzity	293
5.3.1	Deštrukcia a fragmentácia biotopov.....	293

5.3.2 Klimatické zmeny	295
5.3.3 Introdukcia inváznych druhov.....	297
5.3.4 Nadmerné využívanie.....	298
5.3.5 Znečistenie pôdy, vody a ovzdušia.....	299
5.3.6 Šírenie infekčných chorôb.....	301
5.3.7 Genetické znečistenie.....	303
5.3.8 Okysľovanie oceánov.....	303
5.3.9 Zjednodušenie ekosystému	303
5.4 Biodiverzita a potreby človeka	304
5.4.1 Trvalo udržateľný rozvoj.....	305
5.4.2 Ekologická stopa	306
5.4.3 Deň prekročenia Zeme	307
5.4.3.1 Deň prekročenia krajiny.....	308
5.4.4 Uhlíková stopa	309
5.4.5 Uhlíková neutralita.....	311
5.4.6 Parížska dohoda 2015	313
5.4.7 Konferencia o zmene klímy COP26 a COP27.....	313
5.5 Ochrana biodiverzity	314
5.5.1 AGENDA 21	316
5.5.1.1 AGENDA 2030	316
5.5.1.2 Envirostratégia 2030	317
5.5.2 Dohovor o biologickej diverzite.....	318
5.5.2.1 Natura 2000.....	320
5.5.3 Nagojský protokol.....	321
5.5.4 Kartagénsky protokol.....	322
5.5.5 Klíringové stredisko biologickej bezpečnosti	325
5.6 Biologické riziko a biologické faktory	327
5.7 Mikroorganizmy ako biologické faktory	329
5.7.1 Rizikové skupiny.....	329
5.7.2 Úrovnne biologickej bezpečnosti.....	332
5.8 Mikroorganizmy ako biologické zbrane.....	338
5.8.1 História použitia biologických bojových zbraní	339
5.8.1.1 Antrax.....	340
5.8.2 Bioterorizmus.....	342

5.8.3 Biozločin	343
5.8.4 Forezná mikrobiológia	345
5.8.5 Dohovor o zákaze vývoja, výroby a hromadenia zásob bakteriologických (biologických) a toxínových zbraní a o ich ničení.	346
5.9 Geneticky modifikované rastliny a biologické riziko	347
5.9.1 Analýza rizika v kontexte geneticky modifikovaných organizmov	350
5.9.2 Hodnotenie rizika	354
5.9.3 Riadenie rizika	358
5.9.4 Komunikovanie o riziku.....	359
5.9.5 Posudzovanie rizika	359
5.10 Regulačný systém týkajúci sa geneticky modifikovaných organizmov v Európskej únii.....	361
5.10.1 Používanie geneticky modifikovaných organizmov v uzavretých priestoroch.....	362
5.10.2 Regulačný systém týkajúci sa zámerného uvoľnenia geneticky modifikovaných organizmov v Európskej únii	365
5.10.3 Proces autorizácie	366
5.10.3.1 Európsky úrad pre bezpečnosť potravín EFSA	368
5.10.3.2 Referenčné laboratórium Európskej únie pre geneticky modifikované potraviny a krmivá	368
5.10.3.3 Register geneticky modifikovaných organizmov autorizovaných ako potraviná alebo krmovina a produktov z nich v Európskej únii.....	369
5.10.4 Pestovanie geneticky modifikovaných plodín v Európskej únii	370
5.10.5 Označovanie geneticky modifikovaných organizmov a ich produktov z nich.....	372
5.10.5.1 Povinné označovanie	372
5.10.5.2 Dobrovoľné označovanie.....	374
5.10.6 Geneticky modifikované zvieratá a ich uvedenie na trh v Európskej únii	375
5.10.6.1 Geneticky modifikované zvieratá a ich uvedenie na trh mimo Európskej únii.....	376
5.10.7 Regulačný systém týkajúci sa nových techník šľachtenia v Európskej únii	378
5.10.8 Regulačný systém týkajúci sa nových techník šľachtenia mimo Európskej únii.....	379
5.11 Etické dôsledky využívania moderných biotechnológií.....	380
5.12 Zoznam použitej literatúry	384
6 Terminologický slovník.....	389

Predslov

Predkladaná vysokoškolská učebnica „Rastlinné, živočíšne a potravinárske biotechnológie, ich regulácia a biologická bezpečnosť“ je určená pre študentov bakalárskeho, magisterského a doktorandského štúdia v študijnom odbore Biotechnológie, nielen na Fakulte prírodných vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave, ale môže poslúžiť ako učebná pomôcka aj študentom iných univerzít, ktoré majú vo svojich študijných programoch biotechnológie a príbuzné odbory.

Učebnica je rozdelená do piatich samostatných častí. Prvá časť je venovaná úvodu do biotechnológie, pričom jej cieľom je uviesť študenta do problematiky a oboznámiť ho s jej históriou, členením a základnou terminológiou. Ďalšie časti sú zamerané na problematiku rastlinných (Časť 2), živočíšnych (Časť 3) a potravinárskych (Časť 4) biotechnológií. Posledná, piata časť sa venuje problematike biotechnológií z hľadiska ich regulácie a biologickej bezpečnosti. Súčasťou učebnice je aj terminologický slovník, ktorý napomôže študentovi lepšie sa zorientovať v danej problematike.

Autori

Časť 1. Úvod do biotechnológie

prof. RNDr. Ján Kraic, PhD.

Obsahom úvodnej časti sú informácie o prvých kontaktoch človeka s biotechnológiami v podobe využívania fermentačných procesov. Opísaný je, v hrubých rámcoch, vývoj biotechnológií v rukách človeka od doby, kedy ešte nechápal ich podstatu a neuvedomoval si ich potenciál, až do doby súčasnej. Uvedené sú rôzne, ale v princípe obsahovo podobné definície biotechnológií a ich členenie, po historickom členení, aj odvetvové, podľa ich zamerania a aplikačných výstupov a populárne – farebné. V závere sú uvedené väzby biotechnológií na život človeka, na úrovniach produkcie (výrobkov), energetiky a ekonomiky.

1 Úvod do biotechnológie

1.1 Chlieb, pivo, víno – prvé biotechnológie v rukách človeka

Biotechnológie a produkty biotechnológií sa v rukách, resp. ústach človeka, objavili najskôr vo forme požívateľných produktov. Tými produktmi bolo jedlo a nápoje. Aj keď sa biotechnologické postupy podieľali na ich výrobe, neboli ešte použité premyslene a zámerne. Skôr to bolo o náhode a o existencii v prírode sa vyskytujúcich, prirodzených procesoch vykonávaných živými mikroorganizmami. Pomohli tomu všade sa vyskytujúce, zvlášť však užitočné a pre človeka aj bezpečné baktérie, huby a kvasinky.

Z archeologických nálezov kamenných nástrojov na blízkej južnej Morave, ale aj v Taliansku a Rusku a v iných oblastiach sveta, a následnou chemickou analýzou ich povrchov, sa zistilo, že spracovanie rôznych rastlinných semien pomletím na múku je datované do paleolitu, teda do doby pred asi 30 000 rokmi. Múka takto pripravená, zo suchých škrobnatých semien, bola skladovateľná ľahšie a počas dlhšej doby. Po zmiešaní s vodou a tepelnom spracovaní bola aj lepším zdrojom energie, ako dovtedy konzumované semená v surovom stave. Aj keď bez cieleného zámeru človeka, do procesu prípravy potravy sa zapojilo aj spektrum mikroorganizmov z prostredia. Tie zahájili proces rozkladu škrobu na sacharidy a následne ich fermentáciu, čoho výsledkom bol produkt podobajúci sa na kysnutý **chlieb**, placky, posúchy, či iné produkty. Tu sú asi začiatky prvého, aj keď nezámerného využitia biotechnológií v rukách človeka. Príprava prvého kysnutého chleba, mala podľa archeologických nálezov na Blízkom východe, konkrétne na území dnešného Jordánska, dokonca asi o 4 000 rokov predbehnúť začiatky poľnohospodárstva. Potvrdzujú to nálezy štruktúr pecí, ale aj zuhoľnatených zvyškov chleba. Bol vyrobený zo zmesi obilných (pšenica, raž, proso, ovos, jačmeň) semien a iných zložiek (hl'úz šachoru). Aj keď nemal tvar bochníka, charakteristiky jeho textúry (veľkosť a množstvo pórov vzniknutých kysnutím) už boli podobné dnešnému kysnutému chlebu. So začiatkom neolitu (10 000 rokom pred našim letopočtom) nastal rozvoj a rozšírenie poľnohospodárstva. Semená rastlín, hlavne obilnín, sa stali základnou surovinou na prípravu chlebových výrobkov.

Keďže nielen chlebom je človek živý, mikroorganizmy pomohli človeku vyrobiť aj fermentované nápoje, vrátane tých s určitým obsahom alkoholu. Aj ich výroba bola ešte bez

znalostí o fermentácii a úlohe kvasiniek a mikroorganizmov v nej. Za prvých výrobcov nápoja podobného dnešnému pivu sú, podľa archeologických nálezov, označení Sumerovia v Mezopotámii. **Pivo** vyrábali už pred 8 000 – 10 000 rokmi. Oveľa neskôr (asi pred 5 000 rokmi) Egypťania vyrábali už rôzne druhy piva, niektoré s obsahom alkoholu až 15%. Dnes je pivo globálne vyrábaný aj konzumovaný nápoj.

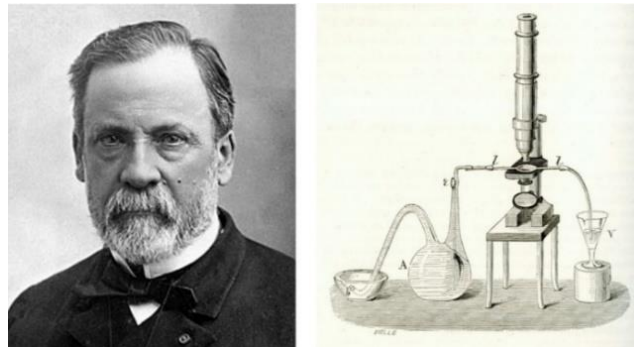
Rovnako, alebo možno ešte starším, je proces výroby iného alkoholického nápoja, ktorým je **víno**. Podľa archeologických objavov v Mezopotámii a Číne sa jeho začiatky datujú do obdobia pred 8 000 – 11 000 rokmi.

Dôkazy o výrobe **fermentovaných nápojov** sú aj z území dnešného Iránu a Egypta. Sú mladšie, datované do obdobia 6 000 – 3 000 rokov pred našim letopočtom. Aj proces výroby fermentovaných nápojov z obilnín a hrozna bol už globalizovaný, o čom zase svedčia dôkazy zo starého Grécka, rímskej ríše, amerického kontinentu, ale aj severnej Európy.

1.2 Fermentácie

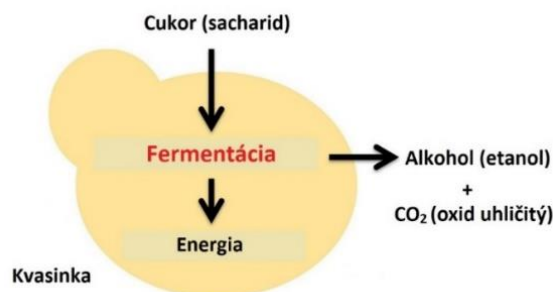
Proces **fermentácie** a vývoj fermentačných techník má svoj kultúrny a ekonomický rozmer, pretože fermentované potraviny a nápoje majú zvláštne a mimoriadne miesto prakticky v každej spoločnosti. Pod fermentáciami sú už myslené zámerné a cielene využívané biotechnologické procesy. Preto sú korene fermentácií hlboko v minulosti, o čom znova svedčia archeologické nálezy. Kľúčovú úlohu zohrali mikroorganizmy, najmä všade prítomné kvasinky, ktorých spóry boli a sú aj na povrchoch rastlinných semien. Preto, každé cesto vyrobené z múky pomletých semien, ponechané odležať aspoň na krátky čas, začne prirodzene kysnúť. Vtedy kysnutie podporia ešte aj spóry kvasiniek prítomných vo vzduchu. Niektoré staré národy (Egypťania, Galovia, Iberijci) podporovali proces kysnutia v ceste pridávaním peny a zvyškov z nápoja podobného pivu, alebo hroznovej šťavy. Pridávanie časti cesta, z predchádzajúcej prípravy chleba do nového cesta, sa datuje do doby 6 000 rokov pred našim letopočtom a pripisuje sa Sumerom v Mezopotámii. K biotechnologickému procesu kysnutia, tak už vtedy pribudlo aj využívanie štartérovej kultúry mikroorganizmov, čo urýchlilo a podporilo kysnutie cesta. Dávnovekí pekári na to prišli empiricky, bez poznania kvasinky, či pochopenia chemickej podstaty procesu kysnutia a fermentácie. V samotnom ceste prebieha fermentácia bez prítomnosti kyslíka, vykonávaná živými kvasinkami, ktoré premieňajú organické molekuly glukózy na konečné produkty.

V podstate iba celkom nedávno, v roku 1860, objasnil proces fermentácie (kvasenia) Louis Pasteur. Fermentáciu nazval ako „život bez vzduchu“ (t. j. bez kyslíka). Na obrázku 1.1 je Louis Pasteur a ilustrácia jeho jednoduchej aparatury, na ktorej sledoval proces fermentácie v pive, vyvolaný prítomnými kvasinkami.



Obrázok 1.1: Louis Pasteur (zdroj: https://sk.wikipedia.org/wiki/Louis_Pasteur) a ilustrácia aparatury na dôkaz fermentácie z jeho práce „Štúdie o pive“ publikovanej v roku 1876 (Zdroj: <https://www.nlm.nih.gov/exhibition/fromdnatobeer/exhibition-interactive/louis-pasteur/louis-pasteur-alt.html>).

Typická fermentácia je procesom premeny organických látok pôsobením enzýmov z kvasiniek. Kvasinky dokážu premeniť (fermentovať) cukor, obsiahnutý v substráte na žiadané produkty – etanol a oxid uhličitý (Obrázok 1.2). Surovina sa tak zmení na produkt, ktorými sú chlieb, pivo, víno a ďalšie výrobky. Po chemickej stránke sa jedna molekula glukózy premieňa na dve molekuly etanolu a dve molekuly oxidu uhličitého:



Obrázok 1.2: Produkcia alkoholu a CO₂ kvasinkou procesom fermentácie (Zdroj: <https://socratic.org/questions/how-do-the-products-of-fermentation-in-animals-differ-from-yeast>, upravené).

Chlieb, pivo a víno majú teda spoločného, kľúčového, živého, jednobunkového producenta, ktorým je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Kmene tejto kvasinky sú si síce navzájom geneticky podobné, ale kmene používané na prípravu chleba sú odlišné od kmeňov používaných na výrobu piva, vína, alebo iných výrobkov. Oveľa väčší vplyv na ich genetickú rozdielnosť (až 28 %) má ich geografický pôvod, čo je dôsledok ich domestikovania na úrovni teritoriálnej a lokálnej. Kvasinky totiž majú úzky vzťah a spoločný vývoj s človekom, pretože tak ako fermentačné technológie, aj kvasinky putovali po migračných cestách človeka. Príkladom je migrácia vínnych kvasiniek pochádzajúcich z Mezopotámie, spojená s cestami človeka a viniča.

1.3 Biotechnológie – podstata a ich vývoj

Prvýkrát bol termín biotechnológia použitý až v roku 1919. Objavil sa v knihe *Biotechnologie der Fleisch-, Fett-, und Milcherzeugung im landwirtschaftlichen Grossbetriebe: für naturwissenschaftlich gebildete Landwirte verfasst*, ktorej autorom bol maďarský inžinier Karl (Károly) Ereky. Ereky predvídal, že pod týmto názvom sa budú rozvíjať technológie, ktorými sa budú dať suroviny premieňať na užitočné produkty, s použitím živých organizmov. Nasledujúce časy mu dali za pravdu. Vznikol nový odbor a termín „biotechnológie“ sa ujal. Je racionálne odvodený z dvoch jednoduchých pojmov vedy, termínov „biológia“ a „technológia“. Od tej doby boli a sú biotechnológie definované rôznymi formuláciami. V každej však majú kľúčové miesto slová „surovina“, „živý organizmus“ a „produkt“.

Biotechnológie získali počas posledných desaťročí obrovský význam. Môžu slúžiť ľuďstvu s takmer neobmedzeným potenciálom a dotýkajú sa jeho existencie vo všetkých aspektoch, ako sú potraviny, zdravie, zlepšenie životného prostredia, dopyt po surovinách a energiách a ďalšie. Každý deň a celý život človeka začína aj končí produktom biotechnológií.

Biotechnológie sa v čase vyvíjali v závislosti od potrieb človeka, v súlade s lepším poznaním a pochopením princípov rôznych vedných odborov o živote, a pokrokom vo vývoji nových technológií. Na základe štúdia vývoja biotechnológií, od najstarších nálezov až po súčasnosť, evolúcia biotechnológií sa klasifikuje do troch časových etáp:

- staroveké biotechnológie
- klasické biotechnológie
- moderné biotechnológie

1.4 Staroveké biotechnológie (do roku 1800)

Pokrok a vývoj v dobách do roku 1800 bol založený na pozorovaní javov v prírode a snahe o ich využitie pre zlepšenie života človeka. Koncentroval sa hlavne na kľúčovú potrebu človeka – potravu. Tisícročia predtým sa začali, a stále prebiehali, procesy **domestikovanie rastlín a zvierat**, rozvoj poľnohospodárstva a remesiel, zmena spôsobu života a sociálneho správania sa človeka. To poskytlo človeku **viac potravín** na priame skonzumovanie, ale aj zásoby na uskladnenie. Objavili sa nové potreby a potom aj možnosti ako tieto **nadbytky produkcie uchovať** na **dlhšiu dobu** a tiež ako z nich vyrobiť **nové druhy výrobkov**. Takáto požiadavka sa objavila hlavne po domestikovaní zvierat, ktorých mäso a mlieko sa nedali dlhodobo uskladňovať v požívateľnom stave. Mlieko sa stalo surovinou na výrobu tvarohu, syrov, jogurtov a iných výrobkov. Na jeho zrážanie, aj keď podstata procesu sa ešte nepoznala, sa používala šťava zo žalúdkov teliat, fungujúca ako syridlo. Výroba syra a produktov z mlieka je teda tiež starovekou biotechnológiou, ale nie tak starou ako výroba chleba, piva a vína. Začala až s dobou domestikovania zvierat – oviec a kôz na Blízkom východe a v Anatólii, pred najmenej 9 000 rokmi. Začala pravdepodobne náhodným skysnutím mlieka a následným zberom a nasolením tvarohu. Tej náhode určite pomohlo skladovanie mlieka vo vakoch vyrobených zo žalúdkov cicavcov.

Staroveké biotechnológie, bez poznania ich podstaty, boli človekom používané v spracovaní surovín rastlinného aj živočíšneho pôvodu, na výrobu potravín. Zámerne používali kvasinky na prípravu chleba, piva a vína, ale už v staroveku vedeli, že niektoré potraviny sa aj po splesnivení (prerastení hubami) dali konzumovať, že po tepelnom spracovaní sa spomalil proces ich kazenia, že rovnaký účinok malo aj kyslé prostredie, a vedeli už aj vyrábať ocot.

Dôležitými objavmi tej doby bolo napríklad, odhalenie, že rastliny aj živočíchy sa reprodukovujú pohlavným (sexuálnym) spôsobom (William Harvey, 1630), objav jednobunkových organizmov (Anton van Leeuwenhoek, 1673).

1.5 Klasické biotechnológie (1800 – polovica 20. storočia)

V tomto období boli vykonané zásadné objavy v biológii a genetike, za ktorými boli veľikáni vedy ako Robert Brown (1773 – 1858) s objavom bunkového jadra, Fredrich Miescher (1844 – 1895) s objavom deoxyribonukleovej kyseliny (DNA), Johann Gregor Mendel (1822 – 1884) so zákonmi dedičnosti, Charles Darwin (1809-1882) s evolučnou teóriou, Louis Pasteur (1822

– 1895) s procesom fermentácie, Robert Koch (1843 – 1910) s objavom bakteriálnych pôvodcov ochorení (tuberkulózy, cholery, antraxu), Walter Flemming (1843 – 1905) s objavom chromatínu v bunkovom jadre, Heinrich Wilhelm Gottfried von Waldeyer-Hartz (1836 – 1921) s pojmom chromozóm, Oswald Theodore Avery (1877 – 1955) s objavom, že dedičným materiálom je DNA a nie bielkoviny, Thomas Hunt Morgan (1891 – 1945) so základmi genetického mapovania, Edward Jenner (1749 – 1823) s prvou vakcináciou človeka, Alexander Fleming (1881 – 1955) s objavom penicilínu a mnohí ďalší. V tejto etape vývoja biotechnológií boli nielen objavené a objasnené základné teoretické poznatky a princípy fungovania živých organizmov, ale boli už aj aplikované, najmä vo výrobe liečiv, v medicíne a v odvetviach súvisiacich s výrobou potravín a nápojov.

1.6 Moderné biotechnológie (od polovice 20. storočia)

Za míľnik zrodu moderných biotechnológií, ale aj ďalších vedných odborov, je považovaný konkrétny rok – 1953. Vtedy James Watson (1928 –) a Francis Crick (1916 – 2004) predstavili model a štruktúru dvojitej skrútkovice DNA. V ďalších rokoch a desaťročiach prišli nové objavy. Bol predstavený model operónu (Francois Jacob a Jacques L. Monod, 1960), v *in vitro* podmienkach boli syntetizované prvé úseky DNA (oligonukleotidy) a aj celý gén (Har Gobind Khorana, 1972), bolo vykonané prvé štiepenie a spojenie v molekule DNA (Stanley Cohen, Herbet Boyer, 1973), pripravené boli prvé monoklonálne protilátky (George Köhler a Cesar Milstein, 1975), vynájdená polymerázová reťazová reakcia (PCR) (Kary Mullis, 1983). Medzi najvýznamnejšie míľniky v aplikáciách moderných biotechnológií tohto obdobia patrí aj produkcia funkčného rekombinovaného ľudského inzulínu v geneticky modifikovanej baktérii *Escherichia coli* (Obrázok 1.3).

Táto etapa priniesla prvého transgénneho živočícha (myš) a jeho živé transgénne potomstvo (laboratóriá na univerzitách v Yale, Oxforde a Seattle, 1981), prvú geneticky modifikovanú rastlinu – tabak (Mary-Dell Chilton, Jeff Schell, Robert Horsch, z troch rôznych inštitúcií, 1983), prvé testovanie geneticky modifikovanej rastliny v poľných podmienkach, teda v životnom prostredí (USA, Francúzsko, 1986), prvé schválenie a vykonanie génovej terapie s použitím retrovirusového vektora (kolektív Williama Frencha Andersona, 1990), prvé použitie syridla vyrobeného v geneticky modifikovaných mikroorganizmoch (CHY-MAX®) v syrárskom priemysle (1990), začiatok komerčného pestovania geneticky modifikovaných rastlín – rajčiaka (USA, 1996). Prvým klonovaným cicavcom bola ovca Dolly (Roslin Institute,

1996). Následne boli klonované ďalšie druhy, vrátane ohrozených. V roku 2000 bola naklonovaná transgénna sviňa domáca, ktorej orgány by mali byť vhodné na transplantovanie do človeka. V roku 2012 bola publikovaná revolučná metóda editovania (úpravy) génov (CRISP-Cas9), ktorej objaviteľmi sú Jennifer Doudna, Emmanuelle Charpentier, Feng Zhang, ale aj Francis Mojica, z pracovísk v USA, Francúzsku a Španielsku.



Obrázok 1.3: Časť kolektívu spoločnosti Genentech (biotechnologická spoločnosť založená v San Franciscu, v roku 1976) zapojená do tzv. „inzulínového projektu“ v roku 1978. Zľava: K. Itakura, A. D. Riggs, D. V. Goeddel a R. Crea. (Zdroj: Riggs, 2021, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8152450/>).

V 21. storočí sa už nové objavy a ich aplikácie objavovali s vysokou frekvenciou. Na rozdiel od doby do polovice 20. storočia, však už za nimi častejšie nie sú jednotlivci, ale inštitúcie, najmä súkromné, ktoré do výskumu a vývoja boli a sú schopné investovať obrovské objemy peňazí.

Do moderných biotechnológií dnes zaraďujeme genetické inžinierstvo, produkciu rekombinovaných bielkovín a nukleových kyselín, aplikácie z poznania DNA sekvencií genómov rôznych organizmov, klonovacie postupy živočíchov, produkciu kmeňových buniek a regeneratívnu medicínu, nanobiotechnológie, postupy syntetickej biológie a ďalšie. Medzi biotechnológie a biotechnologické aplikácie zaraďujeme aj rôzne metódy DNA fingerprintingu („odtlačkov DNA“), ktoré sa využívajú pri personálnej identifikácii, testoch otcovstva a materstva, forenzných analýzach, diagnostike a liečbe dedičných ochorení, identifikovaní geneticky modifikovaných organizmov a produktov z nich.

1.7 Definície biotechnológií

Biotechnológie, najskôr nepoznané a nezámerne využívané, potom s poznaním ich podstaty a cieľenými aplikáciami, sú spojené v vývojom ľudstva najmenej 30 000 rokov. Od prvého použitia termínu „biotechnológie“ (1919) sa vyvíjali aj definície biotechnológií a rozširoval sa ich obsah. Na prvý pohľad sú rôzne definície odlišné, ale vždy ide o varianty spájajúce biologické procesy s technológiami, ktorými sa na niečo využívajú. Medzi mnohými, kratšími či dlhšími, jednoduchšími, či zložitejšími, definíciami sú biotechnológie definované ako:

- Vývoj nových produktov pomocou biologických procesov.
- Kontrolované a rozvážne využitie najjednoduchších biologických jednotiek – živých alebo mŕtvych buniek a ich zložiek v technologicky užitočných procesoch.
- Priemyselné využitie biologických systémov a procesov.
- Komerčné využitie mikroorganizmov a živých rastlinných a živočíšnych buniek na vytváranie látok, alebo účinkov prospešných pre ľudí.
- Odbor, v ktorom sa integrujú aplikácie iných vedných odborov – biológie, mikrobiológie, genetiky, fyziológie, biochémie, chémie, fyziky, strojárstva a ďalších.
- Každé technologické využitie biologických systémov, živých organizmov, alebo ich častí, pre výrobu alebo modifikovanie výrobkov alebo procesov, pre špecifické využitie – definícia Konvencie o biologickej diverzite Organizácie spojených národov (OSN).
- Integrované využitie biochémie, mikrobiológie a technických vied pre technologické (priemyselné) aplikácie schopností mikroorganizmov, buniek pletivových kultúr a ich častí – definícia Európskej federácie biotechnológií (EFB).
- Kontrolované využitie biologických zložiek, napr. mikroorganizmov alebo častí buniek, pre získanie benefitov – definícia Národnej vedeckej nadácie USA (NSF).
- Aplikácie vied a technológií na živé organizmy a ich časti, produkty a ich modely, na zmeny živých a neživých materiálov za účelom produkcie vedomostí, tovarov a služieb – definícia OECD a Európskej komisie.
- Technológie využívajúce biologické fenomény na kopírovanie a výrobu rôznych využiteľných substancií – definícia používaná v Japonsku.
- Aplikácia živých organizmov, systémov alebo procesov na zabezpečenie výroby a služieb – definícia používaná vo Veľkej Británii.
- Aplikácia technológií do biologických procesov pre priemyselné, poľnohospodárske a medicínske účely – definícia podľa *Universities Press Dictionary of Biology*.

- Vývoj techník na aplikáciu biologických procesov na výrobu materiálov používaných v medicíne a priemysle – definícia podľa *Oxford Dictionary of Biology*.
- Využívanie buniek a biologických molekúl na vysvetlenie problémov alebo výrobu cenných produktov. Tieto biologické molekuly zahŕňajú DNA, RNA a proteíny.

Na Slovensku je obsah biotechnológií definovaný iba v sústave študijných odborov pre vysoké školy (<https://www.portalvs.sk/sk/studijne-odbory/zobrazit/biotechnologie>) ako odbor, ktorý „... zahŕňa aplikovanie vedeckým poznáním získaných znalostí a technológií na živých organizmoch, ich častiach a produktoch, na zmenu živých a neživých materiálov pre produkciu tovarov a služieb“. *Biotechnológiami sa dosahujú využiteľné aplikácie mikroorganizmov, rastlín a živočíchov v priemysle, pôdohospodárstve, medicíne, životnom prostredí a energetike a sú založené na integrovanom použití prírodných, technických, pôdohospodárskych a lekárskeho vied. Biotechnológie využívajú najmä poznatky biochémie, molekulovej biológie, mikrobiológie a inžinierskych disciplín*“.

1.8 Odvetvové členenie biotechnológií

Biotechnológie sa z hľadiska odvetví, v ktorých sa využívajú, môžu členiť na:

- **Priemyselné biotechnológie** – hlavne potravinárske biotechnológie (výroba potravín a nápojov) a chemicko-technologické biotechnológie (fermentácie, výroba organických kyselín, aminokyselín, steroidov, polyfenolov, biopolymérov, biokompozitov, biodegradovateľných plastov a ďalších látok), ale aj ďalšie odvetvia priemyslu.
- **Polnohospodárske biotechnológie** – geneticky modifikované rastliny, príp. živočíchy, biotechnológie v pôde (využitie mikroorganizmov podporujúcich produkciu rastlín, využitie živín), bunkové, pletivové a orgánové kultúry *in vitro*, molekulárne šľachtenie rastlín a živočíchov, vrátane tzv. nových techník šľachtenia (editovanie genómov rastlín a živočíchov), biopesticídy, bioindikátory a ďalšie.
- **Medicínske a farmaceutické biotechnológie** – rekombinantné terapeutické bielkoviny (vakcíny, protilátky) a iné biologicky aktívne látky, pletivové kultúry *in vitro*, génová terapia, regeneratívna medicína, metódy DNA fingerprintingu a ďalšie.
- **Environmentálne biotechnológie** – konzervovanie biodiverzity, bioremediácie, dekontaminácie, bioindikátory, bezodpadové technológie a ďalšie).

- **Energetické biotechnológie** – konverzia obnoviteľnej, hlavne nepotravinárskej biomasy na energiu.

Podľa inej klasifikácie, ktorá vznikla evokovaním spojenia odvetvia biotechnológií s nejakou farbou, sa biotechnológie členia na:

- **Biele biotechnológie** – priemyselné biotechnológie, napríklad produkcia chemikálií (enzýmov, katalyzátorov, monomérov, energetických nosičov, polymérov a podobne).
- **Zelené biotechnológie** (agrobiotechnológie) – biotechnológie aplikované v poľnohospodárstve a lesníctve (hlavne produkcia a využívanie geneticky modifikovaných rastlín, hospodárskych zvierat a lesných drevín s novými vlastnosťami).
- **Červené biotechnológie** – aplikované v medicíne a farmácii (produkcia antibiotík, terapeutických molekúl, génová terapia, regenerácia orgánov a pletív a ďalšie).
- **Modré biotechnológie** – biotechnológie v prostredí vody a procesov prebiehajúcich v riekach, jazerách, moriach a oceánoch.

Okrem týchto základných „farebných“ odvetví biotechnológií sa časom priradili farby aj ďalším odvetviám:

- **Žlté biotechnológie** – biotechnológie aplikované vo výrobe potravín a vo výžive.
- **Sivé biotechnológie** – environmentálne biotechnológie, aplikované v životnom prostredí.
- **Hnedé biotechnológie** – biotechnológie, ktoré sa dajú aplikovať v púštnych a suchých oblastiach.
- **Čierne biotechnológie** – biotechnológie spojené s bioterorizmom, biologickými zbraňami a ochranou proti nim.
- **Fialové biotechnológie** – odvetvie, ktoré rieši otázky práva, etiky, filozofie a náboženstva, vyplývajúce z biotechnologických postupov a aplikovania biotechnológií (napríklad, vzťah náboženstva ku geneticky upravovaným organizmom, vrátane človeka, sociálne a ekonomické súvislosti a podobne).
- **Zlaté biotechnológie** – témy spájajúce biotechnológie s bioinformatikou, spracovaním biologických tzv. „veľkých dát“ („big data“), počítačovými technológiami, technológiami mikročipov, umelej inteligencie a podobne.

Pokrok v poznaní a využívanie biotechnológií vo viacerých „farebných“ odvetviach majú v súčasnosti spoločný základ, ktorým je univerzálna podstata biologickej a genetickej

existencie a aktivít organizmov, ktoré sú využívané v biotechnológiách. Touto podstatou sú molekuly nukleových kyselín. Preto sa viaceré odvetvové biotechnológie stretávajú na platforme DNA a RNA a označujú sa pod spoločným termínom „**Molekulárne biotechnológie**“.

1.9 Biotechnológie a hospodárstvo

Biotechnológie majú potenciál svojho aplikovania a využitia asi vo všetkých odvetviach hospodárstva a života človeka. Využívanie biotechnológií pomáha rásť národnej ekonomike, poskytuje nové pracovné príležitosti, podporuje vzdelanosť, trvalo udržateľný rozvoj, verejné zdravie aj ochranu životného prostredia. S biotechnológiami sa objavili aj nové termíny, medzi nimi:

- bioprodukty,
- bioenergetika,
- bioekonomika.

Bioprodukty sú výrobky úplne alebo čiastočne odvodené z materiálov biologického pôvodu, s výnimkou materiálov uložených v geologických a fosílnych formáciách. Ich podstata z predpony „bio“ spočíva v tom, že sa získavajú z obnoviteľných surovín, hlavne z rastlín. Často používanými bioproduktmi sú enzýmy, ktoré sa v priemyselných procesoch používajú pri výrobe chemikálií, detergentov, buničiny a papiera, textílií, energie a ďalších produktov. Enzýmy vo fermentáciách a biokatalýzach sa používajú na dosiahnutie vyššej efektivity procesov, čo sa premietne do zníženia spotreby vynaloženej energie a vody, zníženia emisií CO₂ a zostatku problémových odpadov. Bioproduktmi sú aj produkty s úplne novými vlastnosťami, napríklad biochemikálie, biologicky odbúrateľné plastové materiály, výrobky nahradzujúce rovnaké výrobky z kovu a iných materiálov, biokompozitné materiály, hnojivá, mazivá, biofarmaceutiká, biokozmetika, ale aj nové, rekombinované bielkoviny so širokým spektrom využitia a mnohé ďalšie.

Bioenergetika má za cieľ produkovať a transformovať obnoviteľné suroviny (zdroje) biologického pôvodu, t. j. biomasu, na energiu a výrobu energetických nosičov. Koncovými bioproduktmi pre bionergetiku sú energetické nosiče (bioplyn, bioetanol, bionafta, bioolej) vyrobené z obnoviteľných zdrojov rastlinného pôvodu (škrobu, oleja, zvyškov rastlín) z rastlinnej výroby a tiež organické odpady z chovu hospodárskych zvierat v živočíšnej výrobe.

Bioekonomika je, podľa Organizácie Spojených národov pre výživu a poľnohospodárstvo (FAO), výroba, využívanie a uchovávanie biologických zdrojov, vrátane súvisiacich znalostí, vedy, technológií a inovácií, s cieľom poskytovať informácie, produkty, procesy a služby všetkým sektorom hospodárstva, s cieľom smerovať k udržateľnému hospodárstvu. Európska komisia definuje bioekonomiku ako tie časti hospodárstva, ktoré využívajú obnoviteľné biologické zdroje z pevniny a mora (plodiny, lesy, ryby, zvieratá a mikroorganizmy) na výrobu potravín, materiálov a energie.

Bioekonomika využíva biologické zdroje, procesy a metódy na poskytovanie tovarov a služieb trvalo udržateľným spôsobom, vo všetkých hospodárskych sektoroch. Rieši aj globálny environmentálny problém, ktorým je cirkulácia CO₂ v prostredí, emisie metánu a udržanie rovnováhy medzi ich produkciou a spotrebou v prostredí.

Pod bioekonomikou je možné, z investorského pohľadu, chápať aj investície, ktoré generujú ekonomické výstupy na základe aplikovania (t. j. investovania do) biotechnologických prístupov, techník, metód, postupov.

Zavedením princípov bioekonomiky sa naplňajú aj zásady a ciele cirkulárnej (bio)ekonomiky, v ktorej fungujú princípy opätovného používania, recyklovania zložiek, čím sa zvyšuje udržateľná výroba aj spotreba, znižuje sa množstvo odpadov, šetrí sa energia a predchádza sa nezvratným škodám klímy, biodiverzity, ovzdušia, pôdy a vody.

Biotechnológie a biovýroba by mali byť aj podľa Európskej komisie „...*klúčom k modernizácii európskeho priemyslu*“. Využitím biotechnológií by sa mohol podporiť rast hospodárstva Európskej únie, zabezpečiť nové pracovné miesta, podporiť udržateľný rozvoj, verejné zdravie a ochrana životného prostredia. Vo februári 2024 boli Nariadením Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) 2024/795 biotechnológie zaradené medzi strategické technológie pre Európu.

1.10 Zoznam použitej literatúry

ARRANZ-OTAEGUI, A. – GONZALEZ CARRETERO, L. – RAMSEY, M.N. – RICHTER, T. 2018. Archaeobotanical evidence reveals the origin of bread 14,400 years ago in northeastern Jordan. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. ISSN 0027-8424, 2018, roč. 115, s. 7925-7930.

GHOSEPEER, G.D. – SINGH, P. – PANDEY, R.P. 2024. History, scope and development of biotechnology. In Al-Harrasi, A. – Hameed, S. – Fatima, Z - Bhatia, S. (Eds.) In *Introduction to Pharmaceutibal Biotechnology*, Vol. 1. Basic techniques and concepts. ISBN: 978-0-7503-5382-3, 2024, IOP Publishing Ltd., Bristol, UK, s. 1-80.

BUD, R. 2001. History of biotechnology. In *Encyclopedia of Life Sciences*. ISBN: 978-0333726211, 2001, Nature Publishing Group, s. 1-6.

LEGRAS, J.-L. – MERDINOGLU, D. – CORNUET, J.-M. – KARST, F. 2007. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. In *Molecular Ecology*. ISSN:1365-294X, 2007, roč. 16, s. 2091-2102.

PURUGGANAN, M.D. 2022. What is domestication? In *Trends in Ecology and Evolution*. ISSN: 1872-8383, 2022, roč. 37, 663-671.

REVELIN, A. – ARANGUREN, B. – BECATTINI, R. – LONGO, L. – LIPPI, M.M. – SKAKUN, N. – SINITSYN, A. – SPIRIDONOVA, E. – SVOBODA, J. 2010. Thirty thousand-year-old evidence of plant food processing. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. ISSN 0027-8424, 2010, roč. 107, s. 18815-18819.

RIGGS, A.D. 2021. Making, cloning, and the expression of human insulin genes in bacteria: The path to Humulin. In *Endocrinology Reviews*. ISSN 0163-769X, 2021, roč. 42, s. 374-380.

VERMA, A.S. – AGRAHARI, S. – RASTOGI, S. – SINGH, A. 2011. Biotechnology in the realm of history. In *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. ISSN 0976-4879, 2011, roč. 3, s. 321-323.

Časť 2. Rastlinné biotechnológie

prof. RNDr. Ján Kraic, PhD

Podstatou ktorejkoľvek z definícií, sú biotechnológie nástrojom na vývoj nových produktov s využívaním živých organizmov (alebo ich častí) a biologických procesov, ktoré sú schopné vykonávať. Výstupmi biotechnológií sú výrobky (produkty), služby, alebo vedomosti, ktoré poskytujú užívateľovi (človeku, ľuďstvu) nejaký prospech. V prípade rastlinných biotechnológií, nazývaných aj „**zelené biotechnológie**“, je živým organizmom samotná rastlina, celá, jej časti, alebo iba bunky. Hmotným výstupom (produktom) je nová, zmenená rastlina (myslené s novými vlastnosťami) alebo zlepšená (t. j. so zmenenými, modifikovanými vlastnosťami) pôvodná rastlina. Jej pestovaním sa získava nový produkt (jedlé časti, vlákno, fytomasa, chemické zložky a ďalšie). Produktmi zelených biotechnológií sú aj chemické zložky produkované rastlinami, napríklad sekundárne metabolity a rekombinované bielkoviny. Okrem, respektíve namiesto produktu, môže rastlina poskytovať aj novú službu, napríklad schopnosť dekontaminovať pôdu a vzduch, ťažiť z pôdy určité prvky, znížiť zaťaženie životného prostredia tým, že jej pestovanie si vyžaduje menej hnojenia a aplikovania pesticídov. So zelenými biotechnológiami je spojené aj získavanie nových vedomostí.

Hlavným cieľom rastlinných biotechnológií je zlepšovať vlastnosti rastlín, vytvárať nové typy (genotypy, línie, hybridy, populácie, odrody) rastlín s vlastnosťami požadovanými človekom, a s využitím nielen pre produkciu potravín a krmív, ale s produktmi pre priemysel, medicínu, farmáciu, energetiku, životné prostredie. Intenzívne spojenie rastlín s biotechnológiami, najmä modernými biotechnológiami, nastalo kvôli tomu, aby mohli byť rastliny neustále zlepšované (šľachtené) rýchlejšie, účinnejšie a spôsobmi, ktoré nie sú vykonateľné tradičnými postupmi šľachtenia rastlín.

Vzhľadom na vyššie uvedené, časť „Rastlinné biotechnológie“, sa venuje zlepšovaniu vlastností rastlín procesom nazývaným šľachtenie. Začína stručným historickým opisom od procesu domestikácie, cez kľúčové míľniky, až do súčasnej doby. Nasleduje podrobnejšia charakterizácia procesu selektívneho šľachtenia a mutačného šľachtenia. Ďalšie časti už opisujú prístupy, ktorými boli a sú do šľachtenia integrované postupy, metódy a techniky s jasne identifikovateľnými charakteristikami biotechnológií tak, ako ich priniesol vedecký pokrok približne od polovice 19. storočia až po dnešnú dobu. Z týchto častí by malo byť zrejmé nielen to, ako sa do šľachtenia rastlín integrovali nové metódy, postupy a poznatky, ale aj to, ako v priebehu času rastlinám pribúdajú nové úlohy, dôležitosť a spôsoby využitia. Rastlina, ktorej

hlavnou úlohou bolo iba produkovať potraviny a krmivá, sa dokáže meniť a zlepšovať vo všetkých svojich parametroch a dajú sa vytvárať rastliny „šité na mieru“ spracovateľa a konzumenta. Rastliny dokážu riešiť environmentálne problémy, energetické požiadavky a môžu byť „bunkovými továrňami“ produkujúcimi vlastné fytochemikálie, ale aj chemické látky pre farmáciu a medicínu. Cieľom časti „Rastlinné biotechnológie“ je poskytnúť čitateľovi stručný prehľad o úžasných možnostiach a až neuveriteľnom význame spojenia rastlín s biotechnológiami.

2 Rastlinné biotechnológie

2.1 Zlepšovanie vlastností rastlín

Prečo musíme stále zlepšovať vlastnosti rastlín? A prečo tento proces nenechať len na evolúciu? Odpoveď je celkom jednoduchá. Rastliny a rastlinná výroba sú zdrojmi potravín, krmív, surovín, materiálov, energie a tvoria tiež životné prostredie. Jedna a tá istá rastlina (rastlinný druh) môže zabezpečovať udržateľnú produkciu potravín pre ľudí a krmív pre chované zvieratá, pre zdravú výživu, ochranu životného prostredia a príležitosti na prácu a príjem. V poľnohospodárstve a rastlinnej výrobe sa pre rastliny, resp. rastlinné druhy, používa termín plodina. Plodinou je rastlina, ktorú ľudia využívajú pre nejaký úžitok. Je opakom divorastúcej rastliny, pretože už prešla procesom domestikovania, počas ktorého ju človek geneticky menil tak, aby mala lepšie a pre človeka užitočnejšie vlastnosti.

Motorom neustálej nutnosti zlepšovať vlastnosti rastlín je požiadavka na stále vyššiu produkciu potravín, krmív, surovín, materiálov a energie. Za tým je dramaticky sa zväčšujúca populácia človeka na planéte Zem. Odhadovaný počet ľudí v roku 2050 je okolo 10 miliárd. To si bude vyžadovať, aby sa vo veľmi krátkom čase zvýšila produkcia potravín o 30 – 60 % (podľa rôznych výpočtov a zdrojov).

Zlepšovanie vlastností rastlín je veľmi komplexná výzva. V priebehu času sa menili metódy používané na zlepšovanie vlastností rastlín. S požiadavkami človeka sa menil a rozširoval aj rozsah užitočných a cenných vlastností, vrátane komplexných vlastností rastlín. Prvotnou požiadavkou človeka na rastlinu bolo, aby mu poskytla potravu, ktorou sú jej generatívne (semená, plody) a vegetatívne (listy, korene, stonky) orgány. Potom pribudla aj požiadavka na krmivá pre domestikované zvieratá. Tieto dve základné požiadavky sa dosahovali pomalým zlepšovaním parametrov rastlín, ktoré začalo hneď v začiatkoch ich domestikovania. Výsledkom boli rastliny poskytujúce väčšie množstvo i kvalitu semien, plodov a vegetatívnych častí, rastliny so zmenenou architektúrou a morfológickými parametrami a tiež so zmenenými fyziologickými a biochemickými vlastnosťami. Príklad vplyvu procesu domestikovania ukazuje Obrázok 2.1 na papáji. Vývoj veľkosti plodu ukazuje rozdiel medzi divorastúcou a domestikovanou papájou.

Čiastočne domestikovaných bolo človekom asi 2 500 druhov rastlín z asi 300 000 známych druhov krytosemenných rastlín. Plne domestikovaných však bolo iba 250 rastlinných

druhov, a z nich iba menej ako 20 druhov poskytuje celosvetovo až okolo 95 % kalorického príjmu ľudí potravou.

Progres zlepšovania vlastností rastlín v procese domestikovania, však ešte nebol zo strany človeka vedecký, nebol založený na poznaní genetickej podstaty zlepšovania rastlín. Princípom bolo vyhľadanie a výber lepších jedincov rastlín, ktoré vytvorila príroda, a ktoré človek v prírode našiel. Takýto proces zlepšovania rastlín prebiehal veľmi pomaly, niekoľko tisíc rokov. Uspokojenie zväčšujúcej sa populácie človeka a vyšších požiadaviek na množstvo potravy a krmív si vyžiadalo efektívnejší spôsob zlepšovania vlastností rastlín, ktorého princípy však boli objavené až začiatkom 18. storočia.



Obrázok 2.1: Vplyv domestikovania na veľkosť a štruktúru plodov papáje (vľavo – divorastúca, vpravo – plne domestikovaná, v strede – hybrid divorastúcej a domestikovanej) (Zdroj: Chávez-Pesqueira, Núñez-Farfán, 2017, upravené).

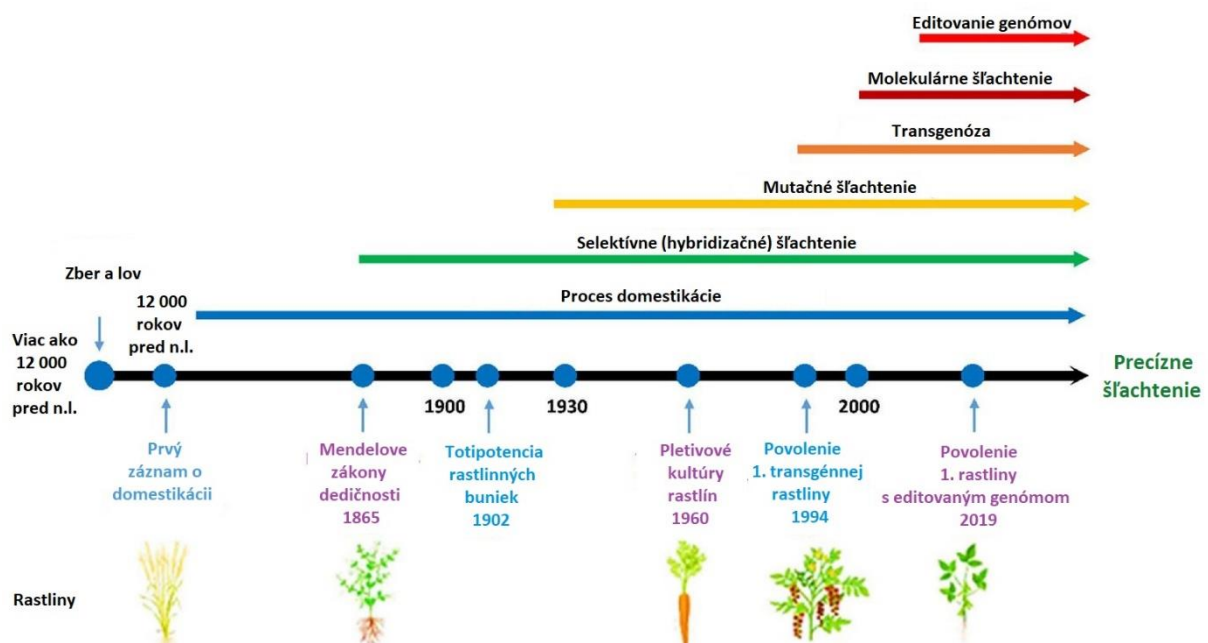
2.2 Šľachtenie rastlín a jeho vývoj

V roku 1717 anglický záhradník Thomas Fairchild (1667 – 1729) dokázal, že rastliny sa dajú rozmnožovať sexuálne, prenosom peľu z jedného rodiča na bliznu druhého rodiča. Šľachtenie rastlín sa odvtedy stalo cieľavedomou činnosťou človeka. Jeho cieľom je vytvárať nové odrody poľnohospodárskych plodín, ale aj okrasných rastlín a lesných drevín, ktoré svojimi vlastnosťami spĺňajú požiadavky užívateľov. **Šľachtenie** rastlín sa dá definovať ako vedecky riadený tvorivý proces vývoja nových odrôd rastlín, využívajúci princípy z rôznych vied na zlepšenie genetického potenciálu rastlín. Šľachtenie zahŕňa kombináciu rodičovských rastlín, ktorým sa vytvárajú geneticky rôznorodé populácie potomstva, z ktorých sa vykonáva výber jedincov s novými kombináciami špecifických, požadovaných vlastností. Existujú aj ďalšie definície šľachtenia rastlín. Vo všetkých sa definuje ako umenie a veda o genetickom zlepšovaní

rastlín, aby sa dosiahli požadované vlastnosti v prospech človeka. V našej legislatíve (Zákon NR SR č. 291/1996 Z.z. o odrodách a osivách) sa šľachtenie rastlín definuje všeobecne ako proces, ktorým sa objavujú, vytvárajú a vyvíjajú nové odrody rastlín a ktorým sa udržiavajú ich znaky a vlastnosti počas rozmnožovania. Pod šľachtením nových odrôd rastlín je definované zlepšovanie úžitkových a iných znakov a vlastností rastlín tvorivou vedecko-výskumnou činnosťou šľachtiteľa na účely objavenia, vytvorenia alebo vyvinutia novej odrody. Finálny produkt šľachtenia rastlín – **odroda**, je definovaná tiež tým istým zákonom (č. 291/1996 Z.z. o odrodách a osivách) ako skupina rastlín v rámci najnižšieho známeho botanického triedenia, ktorú možno:

- Definovať podľa prejavu znakov vyplývajúcich z daného genotypu alebo kombinácie genotypov.
- Odlíšiť od akejkoľvek inej skupiny rastlín podľa prejavu najmenej jedného znaku.
- Považovať za jednotnú s ohľadom na jej schopnosť nemeniť sa pri rozmnožovaní.

Šľachtenie rastlín, tak ako aj iné činnosti človeka, má svoj vývoj a kľúčové míľniky. V určitom, dlhšom či kratšom časovom období, sa objavili nové poznatky, ktoré viedli k výrazným pokrokom v šľachtení rastlín (Obrázok 2.2).



Obrázok 2.2: Míľniky v šľachtení rastlín (Zdroj: Vu a kol., 2022, upravené).

Po dlhodobom procese domestikácie sa objavilo v 18. storočí **selektívne šľachtenie**, ktoré sa rýchlejšie rozvíjalo po objavení Mendelových zákonov dedičnosti v 19. storočí. Objav totipotencie rastlinných buniek na začiatku 20. storočia a pletivové kultúry *in vitro* sú míľnikom už moderného **bunkového šľachtenia** rastlín. Od 30. rokov 20. storočia sa zaviedlo aj **mutačné šľachtenie** pomocou chemických alebo fyzikálnych mutagénov. Od 80. rokov 20. storočia sa uplatňujú aj postupy šľachtenia prenosom cudzích génov do rastlín – genetické modifikácie a tiež **molekulárne šľachtenie**. K postupom z 20. storočia pribudli v prvých dekádach 21. storočia techniky **editovania genómov** rastlín, respektíve génov a ostatných sekvencií DNA.

2.2.1 Selektívne šľachtenie rastlín

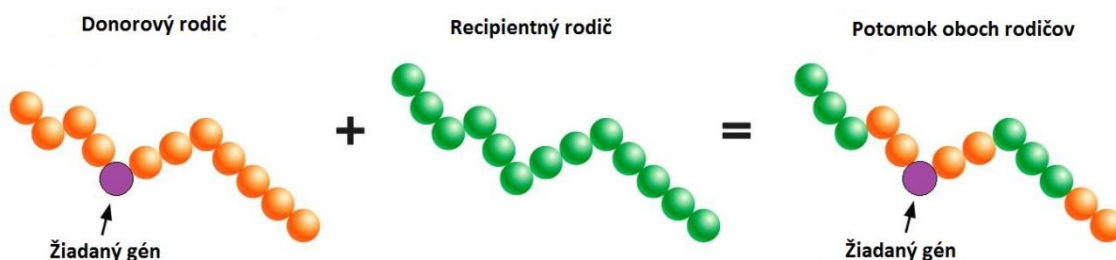
V roku 1727 francúz Louis Leveque de Vilmorin založil prvú inštitúciu, ktorá sa začala venovať selektívnemu šľachteniu rastlín. Neskôr, v roku 1743, založil firmu Vilmorin, ktorá ako prvá na svete obchodovala so semenami nových odrôd rastlín, a ktorá je dnes súčasťou najväčšej spoločnosti v oblasti šľachtenia rastlín v Európskej únii. Základnou metódou šľachtenia vtedy, a ešte aj v súčasnosti, je tzv. **selektívne šľachtenie**. Jeho podstatou je vykonanie umelého kríženia (hybridizácie) rodičovských rastlín, tvorba potomstva a selekcia žiadaných jedincov z množiny vytvoreného potomstva. Proces selekcie je postavený na morfológickom, biologickom a agronomickom hodnotení rastlín vo vonkajšom prostredí, a na chemickom a molekulárnom hodnotení laboratórnymi metódami. Úspech v šľachtení sa hodnotí ziskom pri selekcii, ktorý je funkciou genetickej variácie, intenzity výberu a času.

Až od prvej polovice 18. storočia sa vlastnosti rastlín vylepšujú aktívnym, uvedomelým a vedeckým prístupom človeka. Šľachtenie rastlín je dlhodobá a cieľavedomá činnosť človeka, ktorou sa vytvárajú nové, respektíve zlepšené genetické varianty (označené termínom odrody) poľnohospodárskych plodín určených na pestovanie. Na základe homologickej rekombinácie vznikajú v potomstve, procesom kríženia (hybridizácie), nové kombinácie génov z oboch rodičov (Obrázok 2.3).

Okrem žiadaného génu, zodpovedného za požadovanú vlastnosť, sa však týmto spôsobom do potomstva prenášajú a introdukujú aj nežiadané gény, ktoré naopak, prinášajú nechcené vlastnosti.

Od polovice 18. storočia sa postupy klasického selektívneho šľachtenia používajú na zlepšovanie základných vlastností rastlín. Okrem prvotných požiadaviek na produkty z rastlín sa pridávali nové ciele, hlavne:

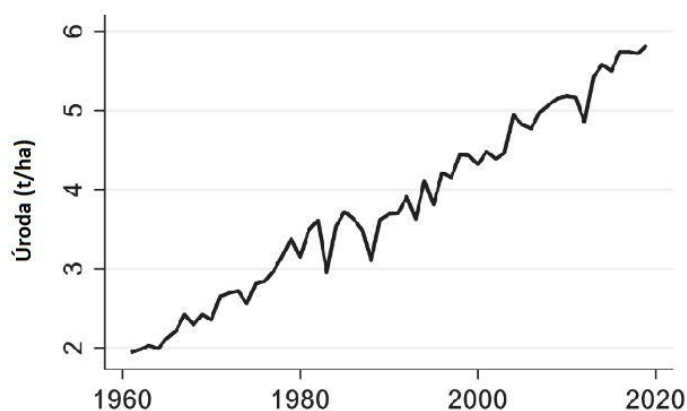
- Zvýšenie odolnosti proti chorobám spôsobených fytopatogénmi a proti škodcom.
- Zmena vybraných vlastností, napríklad zmena chemického zloženia jedlých alebo nejedlých častí rastliny.
- Zvýšenie odolnosti voči negatívnym, abiotickým vplyvom prostredia (suchu, chladu, mrazu, vysokým teplotám).
- Zlepšenie pestovateľských vlastností (nepoliehavosť, skrátenie dĺžky vegetačnej doby, rovnomerné dozrievanie, nevypadávanie semien, lepšie využívanie vody a živín, získavanie dusíka jeho fixáciou zo vzduchu, vyššia odolnosť voči herbicídum, tolerancia voči nižšej kvalite pôdy, možnosť pestovania aj v klimaticky menej vhodných oblastiach a ďalšie).



Obrázok 2.3: Kombinácia génov oboch rodičov v potomstve pripravenom ich vzájomnou hybridizáciou (Zdroj: <https://medium.com/genomino/classical-plant-breeding-vs-molecular-plant-breeding-f3f24bee5521>, upravené).

Mnohé z týchto cieľov sa veľmi úspešne podarilo riešiť ~~celkom nedávno~~, navyše v priebehu iba niekoľkých desaťročí (približne v období 1940 – 1970). Toto obdobie sa nazýva „**Zelená revolúcia**“. Jej „otcom“ bol americký vedec a agronóm Norman Borlaug a jej „rodiskom“ vedecká inštitúcia CIMMYT („Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo“) v Mexiku. Odtiaľ sa jej výsledky rozšírili do celého sveta a aj v súčasnosti ešte žijeme z jej úspechov. Zelená revolúcia priniesla zásadné zvýšenie produkcie najvýznamnejších plodín, najmä obilnín a strukovín a pred hladom zachránila asi miliardu ľudí. Podstatou jej úspechu bol technologický a genetický pokrok v šľachtení rastlín a v poľnohospodárskej produkcii. Kľúčovými technológiami, ktoré zaviedla do poľnohospodárstva, boli používanie chemických pesticídov a syntetických hnojív, nové metódy pestovania rastlín, intenzívna mechanizácia, a kontrolované systémy zavlažovania. Genetický pokrok prinieslo šľachtenie a výsledkom boli nové, vysoko úrodné odrody. Vysoká úrodnosť bola dôsledkom zásadne zmenenej architektúry rastlín (hlavne zásadne skrátenej výšky rastliny a spevnenia stonky),

adaptovania sa na aplikovanie syntetických hnojív a pesticídov, zavlažovanie a rezistencie proti významným fytopatogénom. Úspešnosť selektívneho šľachtenia v rukách človeka, a výsledkov Zelenej revolúcie, sa dá dokumentovať na kľúčových poľnohospodárskych plodinách. Príkladom je globálny nárast priemerných výnosov zrna (v t/ha) kukurice, aj v dôsledku pestovania vyšľachtených, nových odrôd a hybridov vytvorených Zelenou revolúciou (Obrázok 2.4). Z priemernej hodnoty približne 2,0 t/ha v roku 1961, sa zvýšili priemerné výnosy na 5,8 t/ha v roku 2019. Vo veľmi krátkom časovom rámci, necelých 60 rokov, sa teda vo svete zvýšila priemerná úroda kukurice 2,9 krát a celková svetová produkcia päťnásobne. Bol to samozrejme nezvyčajný úspech, ale na druhej strane, medziročný priemerný nárast úrodnosti bol „iba“ 64,4 kg/ha. Pri kľúčových poľnohospodárskych plodinách platí všeobecne, že progres, ktorý prinášajú nové odrody vytvorené selektívnym šľachtením, na priemernom ročnom zvýšení úrodnosti je do 1 %.



Obrázok 2.4: Dynamika nárastu priemernej úrodnosti kukurice (t/ha) vo svetovom poľnohospodárstve, v období 1961–2019 (Zdroj: FAOStat, 2021, <http://www.fao.org/faostat>, upravené).

Dnes a v budúcnosti ľudia požadujú nielen dostatok potravín a krmív, ale prioritu kladú na to, aby boli zdravé a bezpečné. Pre súčasnosť a budúcnosť je však požiadaviek na rastliny oveľa viac. Kľúčové z nich boli definované v strategickom dokumente, ktorý vypracovala Európska technologická platforma s názvom „*Plants for the Future*“, ešte v roku 2007 (<https://www.plantetp.eu/>). Medzi výzvami, ktoré sa podľa nich majú naplniť už do roku 2025, bola aj výzva, aby boli rastliny využívané aj na produkciu surovín a energie, aby ich pestovanie bolo priateľské k životnému prostrediu a aby boli objavené aj ďalšie, úplne nové smery využívania rastlín. V rámci množstva konkrétnych cieľov platforma stanovila aj nasledovné:

- Vyvíjať a produkovať dostatočné množstvo pestrej, kvalitnej a cenovo dostupnej suroviny na výrobu potravín.
- Zlepšiť zloženie zásobných látok obsiahnutých v rastlinách a zvýšiť ich nutričnú a senzorickú hodnotu a spracovateľské vlastnosti.
- Produkovať zdravé suroviny na výrobu potravín s redukovaným obsahom toxínov biotického pôvodu, antinutričných a iných nežiadúcich látok.
- Vyvinúť rastliny pre výrobu potravín s vyšším obsahom antioxidantov, karotenoidov, vitamínov, polynenasýtených mastných kyselín, esenciálnych aminokyselín a ďalších zložiek s preventívnymi účinkami proti chronickým ochoreniam (obezita, cukrovka, alergie, srdcovo-cievne a onkologické ochorenia a ďalším).
- Produkovať dostatočné množstvo kvalitných krmív pre hospodárske zvieratá.
- Využiť rastliny na produkciu biochemikálií (farmaceutiká, enzýmy, oleje, vlákna, polyméry, bioplasty a ďalšie).
- Využiť rastliny na produkciu bioenergie (produkciou fytomasy, olejov, škrobových a neškrobových polysacharidov).
- Zvýšiť produktivitu rastlín (zlepšením účinnosti fotosyntézy a viazania CO₂, lepším využívaním vody a živín, zmenou architektúry rastliny a ďalšími zásahmi), a to aj v meniacich sa podmienkach (biotických, abiotických, klimatických).
- Redukovať dopad rastlinnej výroby na životné prostredie (monitoringom škodcov a patogénov spojeným so šetrnou a biologickou ochranou rastlín, využívaním interakcií s mikroorganizmami a podobne).
- Spoznať a zachovať biodiverzitu všetkých zložiek prírody.
- Sekvenovať genómy plodín a ich hlavných patogénov.

Dosiahnutie týchto cieľov, ktoré ľudstvu majú zabezpečiť potraviny, krmivá, suroviny, materiál a energiu si bude vyžadovať, už v najbližších rokoch, dôsledne sa venovať nasledovným témam:

- Študovanie existujúcej biodiverzity, identifikovanie nových génov a vlastností použiteľných pre ďalšie zlepšovanie vlastností rastlín, zabudovávanie týchto génov do rastlín aj inými ako tradičnými spôsobmi.
- Zmeny vo vnútornom zložení rastlín metódami molekulárneho šľachtenia a genetického inžinierstva.

- Identifikovanie a využívanie nových génov rezistencie proti fytopatogénom, najmä tých, ktoré produkujú toxíny prenášané do potravinového reťazca.
- Študovanie a modifikovanie biosyntetických dráh v rastlinách.
- Využívanie všetkých nástrojov genomiky, transkriptomiky, proteomiky, metabolomiky a cellomiky.

Z uvedených výziev je zrejmé, že tradičné postupy selektívneho šľachtenia, založené iba na hybridizácii a selekcii, nemajú potenciál vyriešiť uvedené problémy súvisiace s existenciou ľudstva. Dôvodov je niekoľko. Hybridizácie (kríženia) sa dajú vykonávať v rámci rovnakého druhu rastlín, niekedy aj v rámci rodu. Ostatné prenosy a kombinácie génov zo vzájomne nekrížiteľných rodičov sa vykonávať nedajú. Tým je znemožnené využitie génov z rastlinných druhov zaradených do iných rodov, čeľadí a vyšších taxónov. Nie je možný ani prenos génov z mikroorganizmov alebo živočíchov (vrátane človeka) do rastlín.

Ďalšími obmedzeniami selektívneho šľachtenia, ktoré limitujú jeho možnosti sú napríklad:

- Tendencia znižovania genetickej diverzity v dôsledku vzájomných krížení geneticky stále viac si podobnejších rodičov.
- Spolu so žiadaným génom sa hybridizáciou (krížením) prenáša a kombinuje v potomstve aj obrovský počet génov nežiadúcich (nevyhovujúcich).
- Nemožnosť fenotypovo pozorovať prejav prítomnosti väčšiny zaujímavých génov.
- Prakticky nemožné vytváranie kombinácií viacerých génov, napríklad viacerých alel génov rezistencie proti fytopatogénom.
- Nemožnosť využívať haploidné a dihaploidné formy rastlín.
- Nemožnosť tvorby vzdialených, najmä medzirodových hybridov.
- Dlhý čas potrebný na vyšľachtenie novej odrody (zvyčajne 10 – 12 rokov, niekedy však aj viac ako 25 rokov).

Na prekonanie obmedzení klasického, selektívneho šľachtenia sa časom k nemu pridávali iné postupy a metódy. Veľmi významné bolo zaradenie mutagenézy a vznik mutačného šľachtenia rastlín. Z dvoch základných etáp klasického selektívneho šľachtenia nie je v tomto prípade potrebný prvý krok – hybridizácia (kríženie). Namiesto nej pribudol proces indukovanej mutagenézy. Následná selekcia jedincov so žiadanými vlastnosťami (fenotypom) podmienenými génmi (v tomto prípade mutovanými) sa stala kľúčovou etapou.

2.2.2 Konvenčné mutačné šľachtenie rastlín

Mutačné šľachtenie rastlín sa používa od roku 1927, kedy Hermann Joseph Muller a Lewis John Stadler demonštrovali, že ionizujúce žiarenie, v ich prípade to bolo röntgenové žiarenie, pôsobí ako mutagén a môže spôsobiť genetické mutácie. Používanie chemických a fyzikálnych mutagénov v mutačnom šľachtení rastlín zaznamenalo najväčší rozmach v 80. rokoch 20. storočia. Odvtedy je na ústupe, pretože má mnohé limity, ale významný pokrok prinieslo a ešte stále aj prináša. Ak sa medzi mutantmi vytvorenými indukovanou mutagenézou vyskytujú aj užitočné fenotypové formy, a dokážu sa identifikovať a selektovať, môže mutačné šľachtenie viesť k novej odrode. V procese selekcie bývajú najzaujímavejšie mutanty s recesívnymi mutáciami, tie však nie je jednoduché, niekedy až nemožné identifikovať. Asi najväčším limitom tradičného mutačného šľachtenia je nízka efektivita, rýchlosť a spoľahlivosť selekcie žiadaných mutovaných jedincov vykonávaná po mutagenéze medzi získanými mutantmi.

Indukcia mutácií sa vykonáva vystavením živých častí rastlín (plodov, semien) chemickým alebo fyzikálnym mutagénom. Tie spôsobia chromozomálne prestavby, zmenia niektoré gény na ich iné alelické formy, alebo gén stratí svoju funkciu. Výsledné mutanty majú z genetického hľadiska chimérickú štruktúru. Z populácie mutantov sa selektujú tie, ktoré môžu viesť k vytvoreniu novej, mutantnej odrody. Príkladom konvenčného mutačného šľachtenia môže byť nová, mutantná odroda hybridného mandarínkovníka (*Citrus nobilis* Lour × *Citrus deliciosa* Tenora). Po vykonaní mutagenézy na púčikoch prostredníctvom γ -žiarenia, niektoré mutanty stratili schopnosť tvoriť v plodoch generatívne orgány (semená), čím sa táto nová bezsemenná odroda stala atraktívnejšou na trhu (Obrázok 2.5).



Obrázok 2.5: Nová mutantná odroda „PAU Kinnow-1“ bez semien (vľavo) vytvorená z rodičovskej odrody „Kinnow“ (vpravo) (Zdroj: Rattanpal a kol., 2019, upravené).

Konvenčné mutačné šľachtenie vykonávané na rastlinách *in vivo*, kedy sú mutagénom vystavené generatívne orgány (semená, peľové zrná) alebo vegetatívne časti rastliny, nemá však všetky parametre, na základe ktorých by konvenčné mutačné šľachtenie bolo možné zaradiť medzi biotechnologické metódy.

2.3 Biotechnológie v šľachtení rastlín

Nevyhnutnosť spojenia biotechnológií so šľachtením rastlín vyplýva z požiadaviek kladených na rastliny (potraviny, krmivá, suroviny, energie) uvedených v prechádzajúcej kapitole. Zvyšujúci sa počet obyvateľov potrebuje a bude potrebovať všetkého viac a rýchlo. Požadované zvýšenie produkcie potravín o 30 – 60% vo veľmi krátkom čase, do roku 2050, nebude možné dosiahnuť doterajšími prístupmi selektívneho ani konvenčného mutačného šľachtenia. Nástrojom už nebudú môcť byť ani nové syntetické hnojivá a pesticídy, ako tomu bolo od 60. rokov 20. storočia. Musia nastúpiť nové koncepcie a technológie a medzi nimi budú kľúčovými biotechnológie.

Aj keď sa často uvádza, že už aj selektívne šľachtenie je najskoršou formou biotechnológií, predsa len jeho obsah nie je v úplnom súlade s dnešným chápaním a definovaním biotechnológií. Definíciu biotechnológií zodpovedajú iné, novšie, alternatívne formy šľachtenia rastlín, medzi ktoré patria:

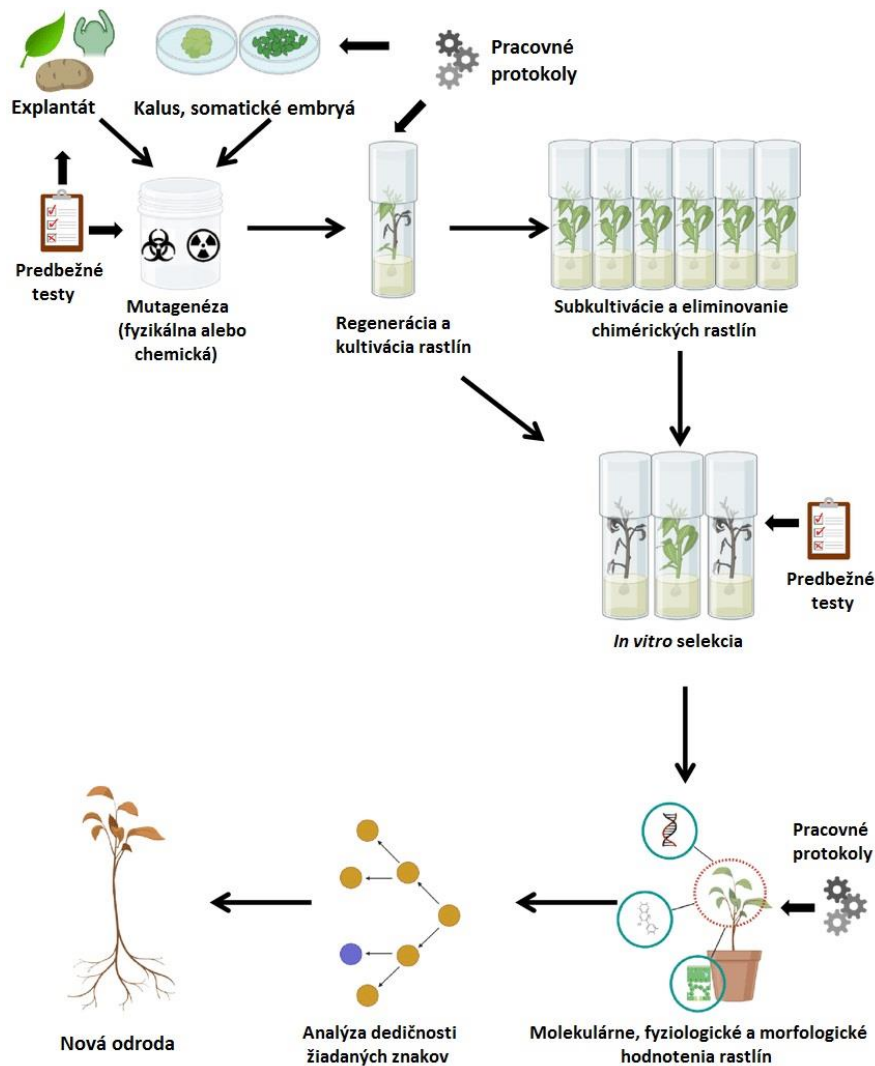
- Mutačné šľachtenie s využitím *in vitro* kultúr a cieleňá mutagéza editovaním génomov a génov.
- Bunkové šľachtenie.
- Transfer génov – genetické modifikácie.
- Molekulárne šľachtenie.

2.3.1 Mutačné šľachtenie rastlín *in vitro*

Opätovne zvýšené využívanie a záujem o mutagenézu nastalo potom, keď sa proces mutagenézy spojil s výhodami metód *in vitro* kultúr rastlín. V takýchto prípadoch je už použitie termínu „biotechnologický postup“ úplne namieste. Navyše, proces **mutagenézy *in vitro*** aj proces selekcie sa stali oveľa efektívnejšími.

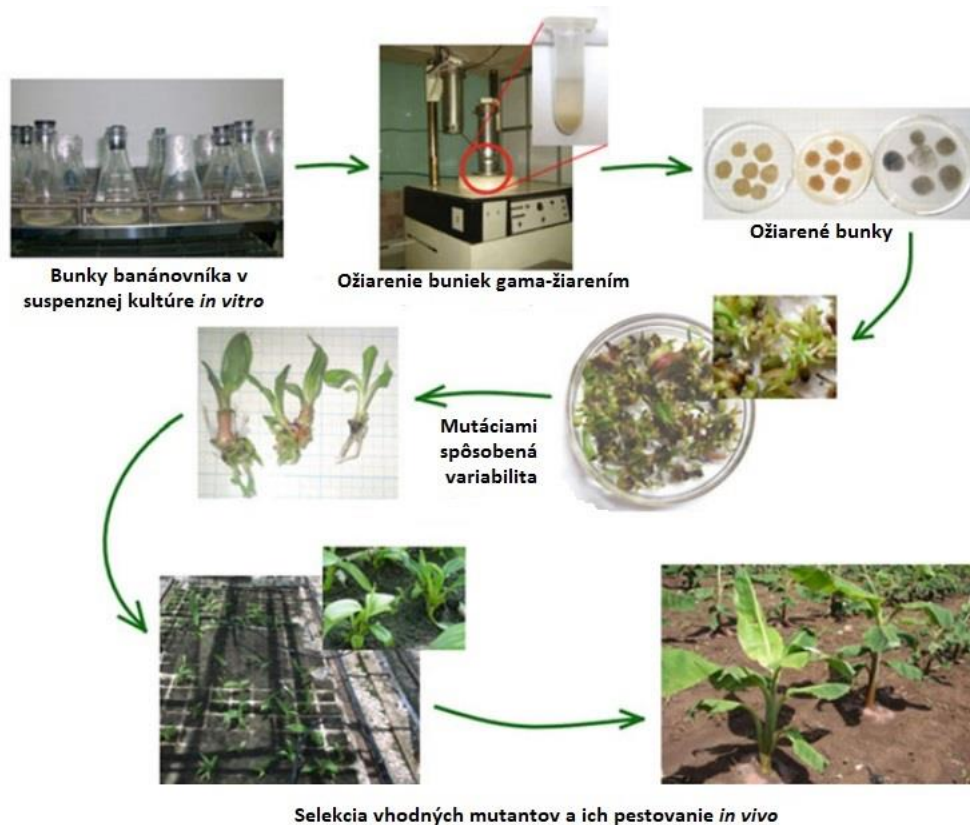
Najskôr treba uviesť, že už samotné prostredie *in vitro* (t. j. umelo vytvorené kultivačné podmienky), aj bez použitia mutagénu, zvyšuje mieru výskytu spontánnych mutácií a dokáže

generovať novú genetickú variabilitu. Tento fenomén nazvali Larkin a Scowcroft v roku 1981 ako „**somaklonálna variabilita**“. Už aj tento samotný fenomén sa využíva v šľachtiteľských programoch rastlín. Rastliny, ktoré prešli iba *in vitro* kultiváciou a boli regenerované z *in vitro* kultúry, poskytujú zdroj na selekciu jedincov so zlepšenými vlastnosťami. Takýto, skôr pasívny postup, bez použitia exogénneho mutagénu, však nie je zvyčajne vysoko efektívny. Fenomén somaklonálnej variability však môže byť spojený s **indukovanou mutagénzou**. Mutagény sa aplikujú už v *in vitro* kultúre, čím sa zvýši frekvencia indukovaných mutácií. Expozícii mutagénu sa vystavujú buď rastlinné bunky, pletivá, orgány, alebo celé rastliny pred ich zavedením do *in vitro* kultúry. Druhou možnosťou je vykonať mutácie až na bunkách, pletivách, či orgánoch počas ich kultivácie v *in vitro* kultúre, alebo až na kalusoch a *de novo* vznikajúcich somatických embryách (Obrázok 2.6).



Obrázok 2.6: *In vitro* mutagénza rastlín s využitím kultivácie rastlinných buniek, pletív a orgánov v *in vitro* kultúrach. (Zdroj: Kashtwari a kol., 2022, upravené).

Po expozícii buniek, pletív (vrátane kalusového pletiva), orgánov, či somatických embryí, mutagénom sa z nich iniciujú procesy regenerovania orgánov a kompletných rastlín. Po eliminovaní chimérických jedincov (tie obsahujú vo svojich bunkách rôzne molekuly DNA – pôvodné aj rôzne zmutované) sa vykonáva selekcia žiadaných mutovaných jedincov (podobne ako v klasickom selektívnom šľachtení), ktoré majú mutáciami získané žiadané vlastnosti. Tie sú potom prenesené do *in vivo* podmienok a hodnotené rôznymi metódami, vrátane stanovenia dedičnosti novo získaných znakov a vlastností. Selekcia teda môže prebiehať dvakrát, prvý raz ešte v *in vitro* kultúre, pomocou selekčného činidla, a druhý raz už v *in vivo* podmienkach. Ak je mutagenéza a selekcia úspešná, výsledkom môže byť nová odroda (Obrázok 2.7). Pri mnohých významných rastlinných druhoch, najmä tých, ktoré sa nerozmnožujú generatívne, ale vegetatívne, sa *in vitro* mutagenéza využíva intenzívne. Príkladom takéhoto postupu môže byť banánovník, ktorý sa rozmnožuje vegetatívne. Na tomto rastlinnom druhu sa mutagenéza efektívne a úspešne vykonáva na bunkovej úrovni, v bunkách kultivovaných v bunkovej suspenznej kultúre *in vitro* (Obrázok 2.7).



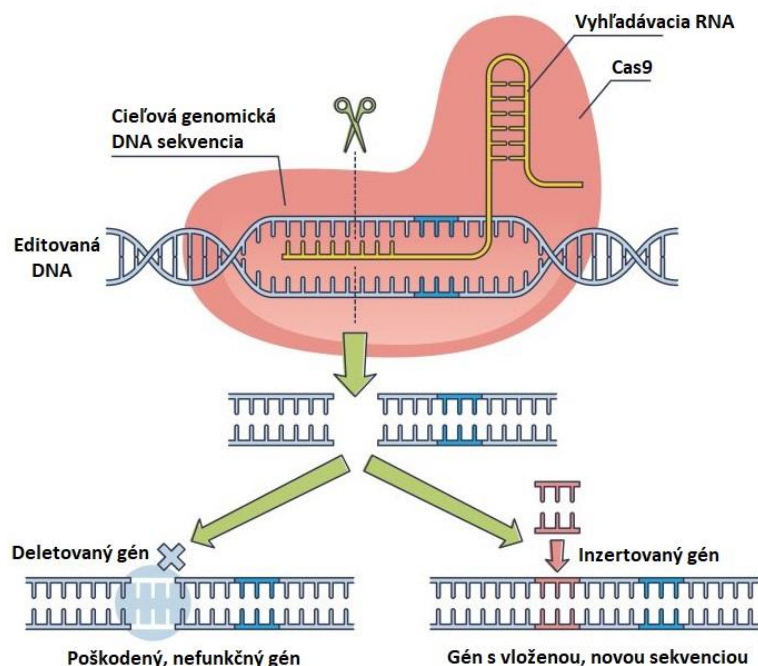
Obrázok 2.7: *In vitro* mutagenéza γ -žiarením na bunkách banánovníkov (*Musa* spp.) kultivovaných v bunkovej suspenznej kultúre *in vitro*, následný proces regenerácie a selekcie mutantov (Zdroj: López a kol., 2017, upravené).

Bunková suspenzná kultúra sa iniciuje z kalusového pletiva, ktoré je zase odvodené z vybraného vegetatívneho pletiva rastlín banánovníka. Predpokladom úspechu je zvládnutý proces regenerovania orgánov a celých rastlín *in vitro*, z individuálnych buniek mutovaných predtým v bunkovej suspenznej kultúre. Výsledkom následnej selekcie mutantov s požadovanými vlastnosťami, ale už v podmienkach *in vivo*, na regenerovaných rastlinách, môžu byť mutované jedince, ktoré sa po ďalšom procese šľachtenia môžu stať novou odrodou.

Mutagénom sa môže, v *in vitro* kultúrach, súčasne pôsobiť na obrovský počet biologických jednotiek, t. j. individuálnych buniek, najmä v bunkovej suspenznej kultúre alebo peľovej kultúre, a následne aj selektovať z veľkého počtu biologických jednotiek na najnižšej organizačnej úrovni organizmu, t. j. individuálnych buniek. *In vitro* mutagenéza má aj viaceré nevýhody. Proces indukovanej mutagenézy nie je riadený, ale je náhodný, mnohé z mutácií nie sú dedičné, žiadané sú recesívne mutácie, ale vznikajú najmä dominantné mutácie, a tiež vzniká mnoho mutácií v znakoch, ktoré nebolo žiadané mutovať. Tieto nedostatky môžu byť eliminované cieľným mutačným šľachtením, tzv. editovaním génov, respektíve genómov.

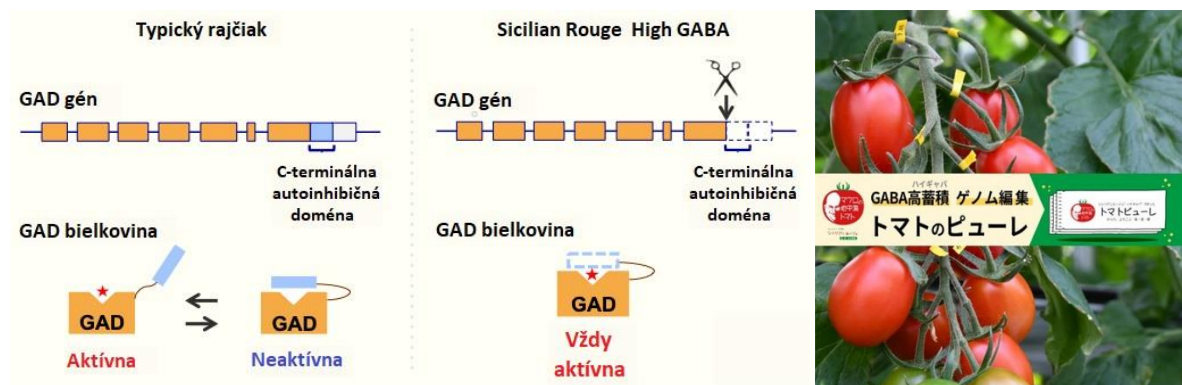
2.3.2 Cieľné mutačné šľachtenie rastlín – editovanie genómov

Ešte väčší význam a využitie mutačného šľachtenia rastlín sa objavil s použitím genetických foriem mutagenézy, najmä technológiou **CRISPR/Cas** („Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/CRISPR Associated Protein“). CRISPR je najnovšou genomickou technológiou, predstavenou len nedávno. V roku 2020 dostali za jej objav a vývoj Nobelovu cenu za chémiu Emmanuelle Charpentier a Jennifer Doudna. Táto technológia zavádza požadované genetické mutácie do DNA rastliny a tak upravuje jej genóm. Pomocou nej sa presne upravuje genetická informácia (gén) v DNA. Krátka, syntetická vyhľadávacia RNA (označovaná ako guide RNA – gRNA) je komplementárna k cieľovej, t. j. sekvencii (génu) v genomickej DNA, ktorý sa má upravovať. Vyhľadávacia RNA (gRNA) je pripojená k bielkovine Cas9 (útvár hnedej obličky na Obrázku 2.8) a spolu vyhľadajú cieľovú sekvenciu DNA v jadre bunky. Bielkovina Cas9 otvorí (rozpletie) cieľovú DNA a gRNA sa viaže s komplementárnou sekvenciou cieľovej DNA. Bielkovina Cas9 potom funguje ako nožnice a rozdelí („rozstrihne“) obe vlákna DNA. Potom je možné, buď odstrániť problematickú časť genetickej informácie, alebo vložiť novú genetickú informáciu. Prirodzený opravný mechanizmus potom reparuje DNA opäť do jej pôvodnej dvojitých vláknovej formy.



Obrázok 2.8: Mechanizmus CRISPR/Cas9 na riadené editovanie (mutagenézu) DNA v genómoch organizmov, vrátane rastlín. Deletovaný gén = gén s cieľovou deléciou sekvencie, Inzertovaný gén = gén s cieľovou inzerciou sekvencie (Zdroj: Lab Associates, Oudenbosch, The Netherlands, 2017, <https://labassociates.com/crispr-a-gene-editing-tool>, upravené).

Na rozdiel od konvenčného alebo *in vitro* mutačného prístupu, je úprava genómu rastliny cestou CRISPR/Cas veľmi presná a kontrolovaná (riadená), čo umožňuje rýchle kumulovanie (pyramídovanie) viacerých prospešných vlastností do jedného genómu rastliny, už v rámci jednej generácie. Cieľené zmeny (cieľená mutagenéza) vykonané editovaním genómov, génov a genetickej štruktúry rastlín, sú označované ako najnovšie metódy šľachtenia rastlín („*new plant breeding techniques*“), alebo ako nové genomické techniky („*new genomic techniques*“). V budúcnosti sa očakáva, že tieto techniky budú generovať výstupy, teda nové odrody rastlín, ktoré sa rýchlo dostanú na trh. Táto perspektíva je reálna, už v súčasnosti sa potvrdzuje. Jedným z príkladov môže byť v Japonsku vytvorená odroda rajčiaka jedlého s komerčným názvom „*Sicilian Rouge High GABA*“ (Obrázok 2.9). Editovaním jeho genómu, konkrétne deletovaním (t. j. cieľným vybratím) krátkych úsekov v dvoch génoch zúčastňujúcich sa syntézy kyseliny γ -aminomaslovej (GABA), bola dosiahnutá 4 – 5 násobne vyššia produkcia kyseliny γ -aminomaslovej, oproti obyčajnému rajčiaku. Konzumácia týchto rajčiakov znižuje krvný tlak a stres, zlepšuje spánok a zvyšuje elasticitu pokožky. Od roku 2021 je táto odroda rajčiaka neregulovaná, t. j. odrodou povolenou na voľné pestovanie, konzum a spracovávanie.



Obrázok 2.9: Editovanie génov *GAD* technikou CRISPR/Cas9 (vľavo) a vytvorená nová odroda rajčiaka jedlého *Sicilian Rouge High GABA* na trhu (vpravo) (Zdroj: Sanatech Seed Co., Ltd., Tokyo, Minato City, Japan, <https://sanatech-seed.com/>, upravené).

Práve technológia editovania genómov, ktorá sa neustále zlepšuje, by mala priniesť mnoho ďalších a nových aplikácií a výstupov do šľachtenia všetkých pestovaných rastlinných druhov. Technológia úpravy genómom CRISPR sa už stáva kľúčovým nástrojom na dosiahnutie revolučného pokroku v genetickom zlepšovaní rastlín. Hlavnou výhodou editovania génov a genómov je rýchlosť a presnosť vykonávaných úprav a zmien v DNA. Globálne akceptovanie geneticky upravených rastlín, v tomto prípade cielenou mutagenézou, a potravín z nich vyrobených, môže vyriešiť problémy hladu a chudoby v každej krajine sveta. S ňou bude určite spojená aj diskusia o rizikách a biologickej bezpečnosti, potenciálnych necieľových účinkoch a pripravené medzinárodné usmernenia o biologickej bezpečnosti takto geneticky upravených plodín.

2.3.3 Bunkové šľachtenie rastlín

Táto alternatíva pre šľachtenie rastlín, všeobecne nazývaná pletivové kultúry rastlín (v súčasnosti už skôr bunkové a pletivové kultúry rastlín), má svoje začiatky v objave bunky a bunkovej teórii, z prvej polovice 19. storočia. V roku 1838 nemeckí prírodovedci Mathias Jacob Schleiden a Theodor Schwann uviedli, že bunka je základnou štruktúrnou jednotkou všetkých živých organizmov, je schopná autonómie, a malo by byť možné, aby sa z každej bunky v priaznivom prostredí zregerovala celá rastlina. Rastlina a jej bunky majú jedinečnú schopnosť – bunkovú **totipotenciu**, ktorá dovoľuje kultivovať bunky a pletivá z takmer akejkoľvek časti rastliny, a z nich vytvoriť nového jedinca, čo je podstatou možnosti kultivovať rastlinné bunky a pletivá v *in vitro* podmienkach. Možnosť regenerácie celej rastliny z jednej

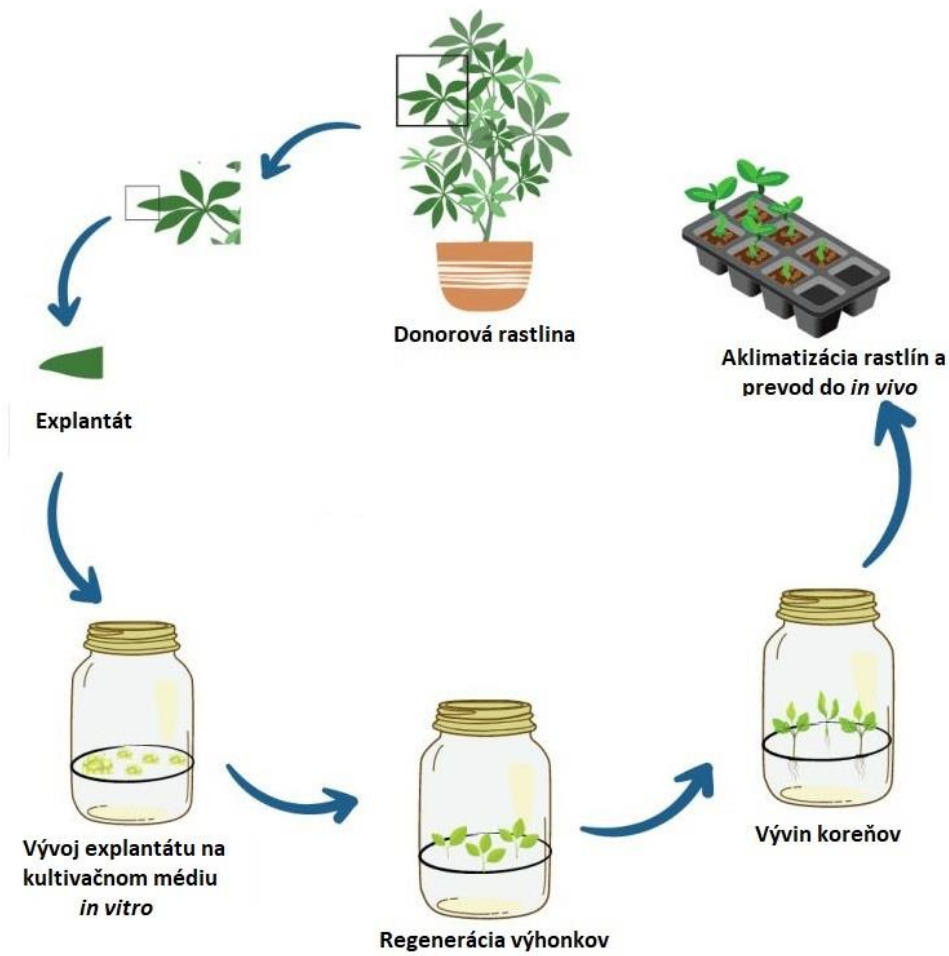
alebo niekoľkých nezygotických buniek navrhol nemecký fyziológ Gottlieb Haberlandt už v roku 1902. Položil tak základy technológií pletivových kultúr rastlín *in vitro* a preto je považovaný za otca rastlinných pletivových kultúr. Týmito technológiami sa kultivujú a ovplyvňujú rastlinné bunky, pletivá a orgány v *in vitro* podmienkach.

Rastlinné bunkové, pletivové a orgánové kultúry *in vitro* patria do skupiny biotechnologických metód, medzi tzv. zelené biotechnológie, ktoré využívajú stratégie a techniky *in vitro* na kultiváciu živých rastlinných buniek a pletív v kontrolovaných, *in vitro* podmienkach. Za posledných 100 rokov, zvlášť v druhej polovici 20. storočia, nesmierne prispeli, do oblasti poznania a praktických aplikácií inovatívnych vedeckých techník samotných pletivových kultúr, spojenia s molekulárnymi, genomickými, proteomickými, metabolomickými a ďalšími prístupmi. Mnohé techniky bunkových a pletivových kultúr rastlín veľmi významne zasiahli aj do šľachtenia rastlín a poľnohospodárstva.

Kultúry *in vitro* začínajú odberom častí rastlín – explantátov, ktorými môžu byť bunky (gametické, prípadne somatické), pletivá alebo orgány, respektíve iba ich časti. Takmer vždy je **explantát** mnohobunkový a môže byť odobraný z rôznych častí rastliny. Procesom kultivácie v aseptických podmienkach *in vitro* sa z nich môže iniciovať aj vznik ďalšieho typu pletiva – **kalusového pletiva**, čo je heterogénna masa buniek.

Hlavnou požiadavkou na všetky bunkové a pletivové kultúry *in vitro*, je neustále udržiavanie aseptických podmienok a stavu. Príprava sterilných kultivačných nádob, nástrojov, kultivačných médií, pracovných priestorov a tiež nutnosť asepticky pracovať, nie je problémom. Sterilita sa zabezpečí vysokou teplotou, vysokým tlakom, chemikáliami, ultrafiltráciou alebo UV žiarením. Problém kontaminovania *in vitro* kultúr mikroorganizmami (baktériami a hubami) spočíva zvyčajne v kontaminantoch, ktoré do *in vitro* kultúry vnesú samotné explantáty odobrané z rastlín, pestovaných *in vivo*. Dekontaminácia explantátov od mikroorganizmov, pred ich vstupom do *in vitro* kultúry, sa vykonáva ich povrchovou sterilizáciou pomocou viacerých chemických látok obsahujúcich chlór – chlórnanom sodným alebo vápenatým, alebo v extrémnych prípadoch aj chloridom ortuťnatým. Vždy sa používa aj etanol zriedený na 70 % a viacnásobné premývanie v sterilnej vode. Výhodné býva aj použitie špeciálnych širokospektrálnych biocídnych látok (napríklad, „Plant Preservative Mixture“, https://plantcelltechnology.com/products/plant-preservative-mixture-ppm?srsId=AfmBOoqPHSzjT6jOhDWMVHTuJLSaxXifZwmQyzUdjq_bCfPL1561qHoY), ktoré sa používajú na kontrolu kontaminácie počas povrchovej sterilizácie a sú aj zložkou kultivačného média.

Aby boli postupy a metódy *in vitro* kultúr aplikovateľné na rastlinách pre poľnohospodárstvo a lesníctvo, vyžaduje sa, aby z izolovaných buniek, pletív a orgánov, kultivovaných v *in vitro* podmienkach, bolo možné regenerovať kompletne, fertillné rastliny. Na začiatku je odber explantátov z donorovej rastliny, ktorá je kultivovaná na syntetickom médiu *in vitro*. Po regenerácii nadzemnej a podzemnej časti v *in vitro* kultúre sú regenerované rastliny prenesené do *in vivo* podmienok (Obrázok 2.10).



Obrázok 2.10: Základná schéma (uzavretý cyklus) pletivových kultúr rastlín *in vitro* od odberu explantátu po prenos regenerantov do *in vivo* podmienok (Zdroj: Plant Cell Technology, Inc., Washington, DC, USA, 2024, <https://www.linkedin.com/feed/hashtag/?keywords=tissueculture>, upravené).

Pri každom konkrétnom rastlinnom druhu, zdroji odobraného explantátu, a danom type *in vitro* kultúry, je proces regenerácie rastlín potrebné zvládnuť individuálne. Potom môžu tieto techniky doplniť šľachtiteľské postupy pri konkrétnych plodinách. Okrem rastlinného druhu, zdroja explantátu a fyzikálnych podmienok kultivácie je asi najdôležitejším článkom *in vitro*

kultúry kultivačné médium. Tie môžu byť pevné alebo tekuté a obsahujú anorganické aj organické zložky. Organickými zložkami sú hlavne zdroje uhlíka a dusíka, vitamíny, ale aj kľúčové látky, ktorými sa navodzujú, kontrolujú a podporujú určité procesy v rastlinných bunkách (dediferenciáciu, rediferenciáciu, morfogénu a ďalšie) – regulátory rastu. Chemickými látkami s takýmito vlastnosťami sú natívne rastové hormóny (fytormóny) a syntetické rastové regulátory, hlavne zo skupín auxínov a cytokinínov. Optimálna formulácia kultivačného média sa môže líšiť v závislosti od rastlinného druhu, genotypu, pôvodu a veku buniek a pletív použitých do *in vitro* kultúry.

V programoch šľachtenia rastlín sa pre mnohé druhy poľnohospodárskych plodín rutinne využíva viacero postupov bunkových a pletivových kultúr *in vitro*:

- **Mikropropagácia** – klonálne rozmnožovanie, s možnosťou prípravy rastlín zbavených fytopatogénov (hlavne rastlinných vírusov).
- **Embryokultúry** – revitalizáciu semien, ale hlavne na záchranu a rast nezrelých embryí pri príprave vzdialených hybridov.
- **Mikrospórové, peľnicové a vajíčkové kultúry** – produkcia homozygotných rastlín.
- **Somaklonálna variabilita** – indukcia variability spojenej s kultiváciou *in vitro*, využiteľná na prípravu genetických variantov rastlín z ich somatických buniek.
- **Somatická hybridizácia** – produkcia hybridov fúziou protoplastov z geneticky rôznych zárodočných plaziem (druhov, rodov, čeľadí).
- **Genetické modifikácie** – zmeny v genómoch rastlín vykonané prenosom génov s využitím technológií rekombinantnej DNA a genetických transformácií.

Ďalšie princípy *in vitro* kultúr, napríklad také, ktoré nevyžadujú regeneráciu rastlín z explantátov, sa využívajú pre iné účely a ciele, napríklad produkciu metabolitov v rastlinných bunkách alebo orgánoch.

2.3.3.1 Mikropropagácia rastlín

Mikropropagácia rastlín *in vitro* je technika masovej produkcie, najskôr propagúl a potom kompletných rastlín. Podstatou mikropropagácie je produkcia žiadaného množstva potomstva, ktoré je geneticky identické s konkrétnou, hoci aj jedinou materskou rastlinou, z ktorej boli odobrané explantáty. Ide teda o klonovanie rastlín, preto sa nazýva sa aj **klonálna propagácia**. V tejto technike sa na klonovanie využívajú najčastejšie **apikálne meristémy**, odoberané

z rastových vrcholov a **axilárne meristémy**, nachádzajúce sa v stonkových uzloch, v axilárnych púčikoch, teda na stonke, tam kde sa na stonku pripájajú listy (Obrázok 2.11). Meristémy sú pletivá špecializované na tvorbu nových buniek, ktoré sa následne diferencujú a menia na bunky všetkých pletív rastliny. Apikálny meristém zabezpečuje predlžovanie stonky, tvorbu stonkových uzlov (nódií) a internódií. Úlohou axilárnych púčikov s meristémami je tvorba bočných stoniek a kvetov. Internódiá sú časti stonky medzi stonkovými uzlami.

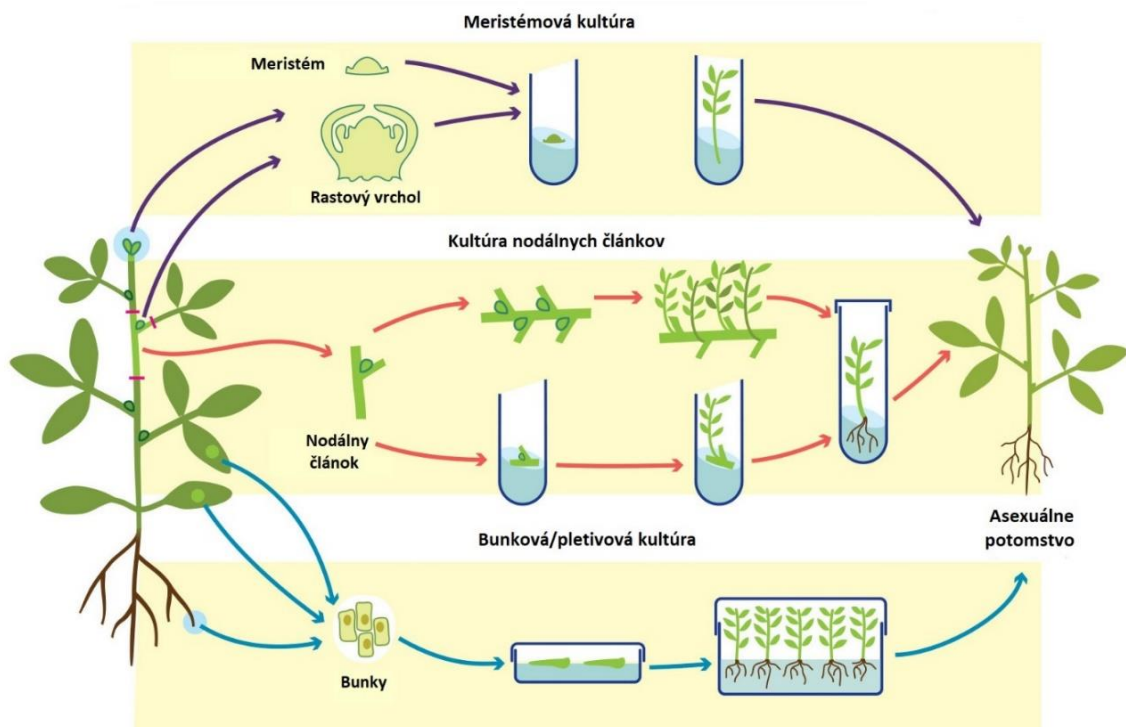


Obrázok 2.11: Lokalizácia apikálnych a axilárnych meristémov na rastline (Zdroj: Atlas of Plant and Animal Histology, 2013, https://mmevias.webs.uvigo.es/02-english/2-organos-v/guiada_o_v_tallo.php , upravené).

Meristémy sú geneticky veľmi stabilné pletivá a sú najlepšou voľbou na klonálnu propagáciu, pretože frekvencia vzniku genetických variantov v potomstve odvodenom z nich, oproti rastline poskytujúcej meristém, je najmenšia. Súčasťou odobratých explantátov obsahujúcich meristémy sú, okrem samotnej oblasti meristemických buniek, aj jedno alebo dve listové primordiá. V *in vitro* kultúre sa z týchto explantátov indukuje tvorba axilárnych výhonkov, tie je možné multiplikovať a vzájomne oddeľovať dovedy, kým sa nevyprodukuje vznik požadovaného počtu výhonkov. V ďalšej etape mikropropagácie sa na výhonkoch iniciuje tvorba koreňov. Kompletne, regenerované rastliny sa prevedú z *in vitro* kultúry do pôdy (substrátu) a postupne aklimatizujú na *ex vitro* podmienky.

Technika, v ktorej sa na mikropropagáciu použijú meristémy, sa nazýva **meristémová kultúra** (Obrázok 2.12). Ak sa na mikropropagáciu rastlín *in vitro* použije axilárny meristém,

explantátom je **nodálny segment**, čo je časť stonky so stonkovým uzlom. Táto technika sa podľa toho nazýva **kultúra nodálnych článkov** (segmentov) (Obrázok 2.12).

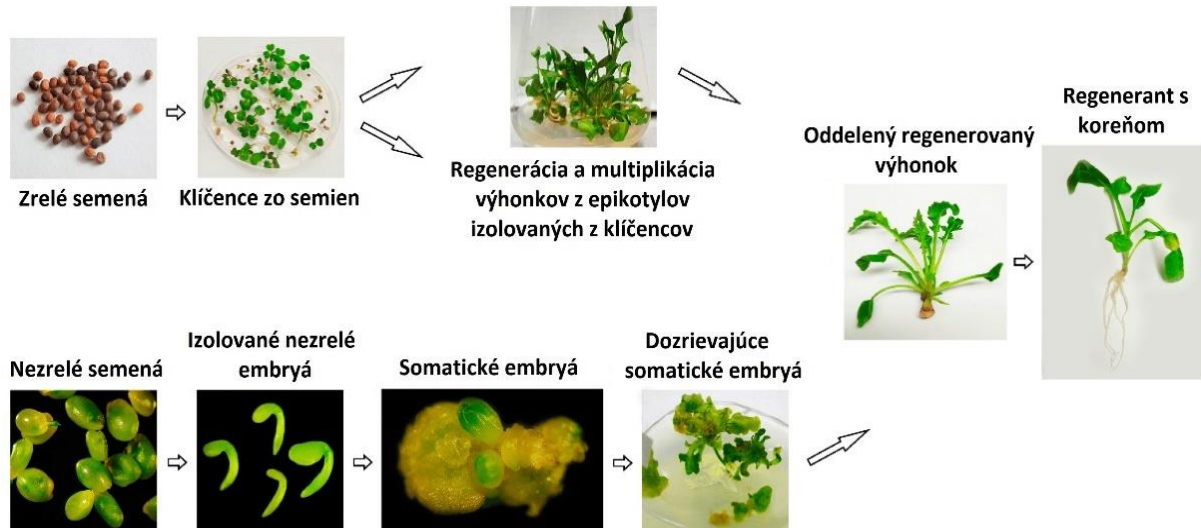


Obrázok 2.12: Schéma postupov na mikropropagáciu rastlín *in vitro* apikálnymi meristémami (hore), axilárnymi meristémami v nodálnych článkoch (v strede) a zo somatických buniek a pletív (dole) (Zdroj: Center for Plant Conservation, Escondido, CA, USA, 2024, <https://saveplants.org/best-practices/collecting-and-maintaining-exceptional-species-tissue-culture-and-cryopreservation/#>, upravené).

In vitro mikropropagáciu je možné, okrem techniky meristémových kultúr, vykonávať aj zo somatických buniek, resp. pletív (Obrázok 2.12). Východiskovými explantátmi sú pletivá z odobraných častí rastlinných orgánov (listov, stoniek, koreňov), na ktorých sa indukuje buď proces tvorby **somatických embryí** (procesom somatickej embryogenézy) alebo kalusových kultúr. V prvom prípade sa regeneranty získajú po dozretí a vyklíčení somatických embryí (cestou **somatickej embryogenézy**), v druhom prípade po regenerovaní výhonkov a ich zakorenení (cestou **organogenézy**).

Pri endemických a ohrozených druhoch, alebo pri rastlinných druhoch nereagujúcich na *in vitro* podmienky (rekalitrantných), medzi ktorými sú mnohé obilniny a dreviny (najmä ihličnany), sa na ich (mikro)propagáciu používajú zrelé **zygotické embryá**, resp. len ich časti (**epikotyly**), alebo celé nezrelé zygotické embryá (Obrázok 2.13). Sú izolované zo zrelých,

respektíve nezrelých semien alebo plodov. V týchto prípadoch zvyčajne nie je cieľom produkcia obrovského počtu regenerantov, ale skôr záchrana, získaním aspoň niekoľkých regenerujúcich potomkov.



Obrázok 2.13: *In vitro* propagácia zo zrelých a nezrelých semien (Zdroj: Banjac a kol., 2023, upravené).

Proces *in vitro* mikropropagácie obsahuje prípravné a ďalšie štyri štádiá (Obrázok 2.14):

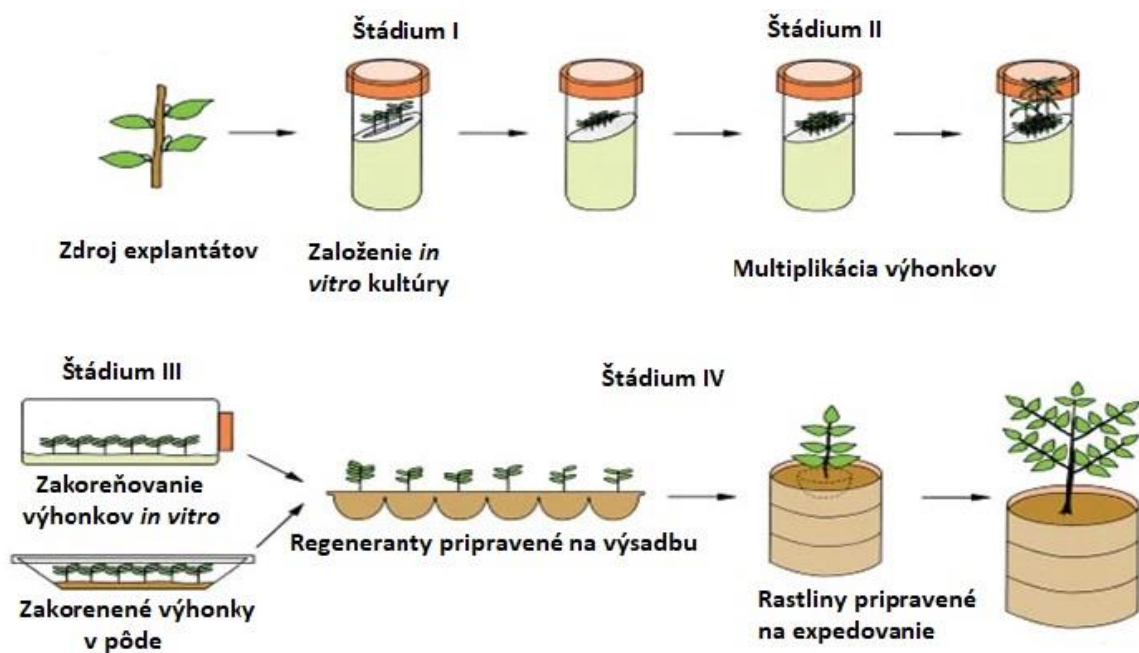
- Štádium 0 – príprava materských rastlín na poskytnutie čo najkvalitnejších explantátov obsahujúcich meristémy pre založenie aseptickkej *in vitro* kultúry.
- Štádium 1 – povrchová sterilizácia explantátov a založenie aseptickkej *in vitro* kultúry.
- Štádium 2 – multiplikácia, t. j. násobenie počtu výhonkov z pôvodného explantátu.
- Štádium 3 – indukcia tvorby koreňov na výhonkoch vytvorených *in vitro*.
- Štádium 4 – prenos regenerantov do *ex vitro* podmienok.

Každé štádium má svoje špecifické podmienky a podmieňuje úspešnosť mikropropagácie *in vitro*. Výhodami, pre ktoré sa techniky mikropropagácie rastlín *in vitro* využívajú v šľachtení a poľnohospodárstve sú:

- Rýchle množenie rastlín v krátkom čase a na malom priestore.
- Rastliny sa získavajú za kontrolovaných podmienok, nezávisle od ročného obdobia.
- Možnosť rozmnožovať aj sterilné rastliny alebo rastliny, ktoré si nedokážu zachovať svoje znaky pohlavným rozmnožovaním.
- Rozmnožovanie a záchrana vzácnych a ohrozených druhov rastlín.

- Produkcia rastlín zbavených vírusov (bezvírusových sadeníc).

Mikropropagovaním (mikrorozmnožovaním, klonovaním) sa dajú rozmnožovať aj genotypy s ďalšími zvláštnymi vlastnosťami, napríklad hybridné jedince, vzácne genetické zdroje, geneticky modifikované rastliny a ďalšie zaujímavé genotypy.



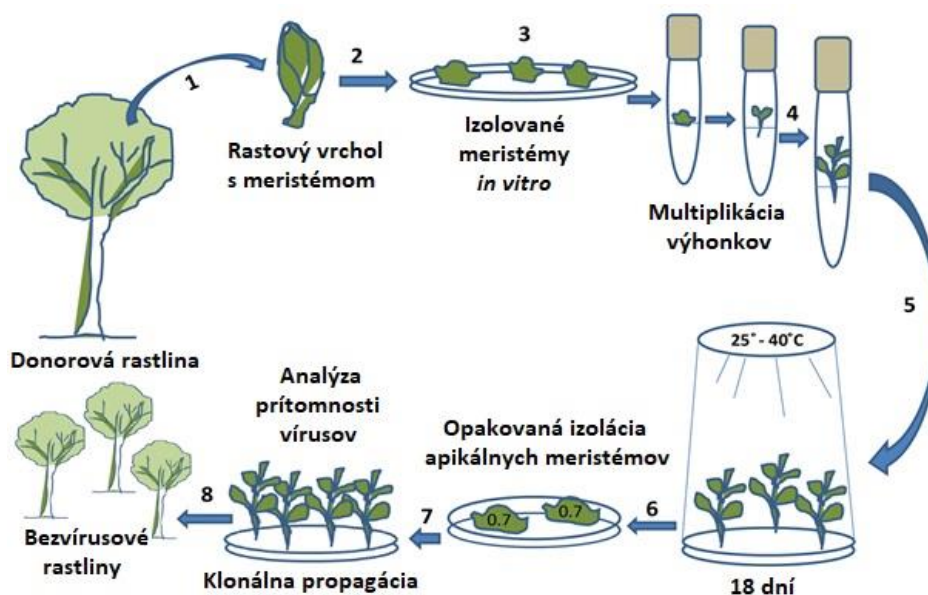
Obrázok 2.14: Štádia mikropropagácie rastlín *in vitro* (Zdroj: University of Florida, Gainesville, FL, USA, 2023, <https://propg.ifas.ufl.edu/09-tissue-culture/01-types/04-tctypes-micropropagation.html>, upravené).

2.3.3.2 Produkcia bezvírusových rastlín

Rastlinné patogény sú najvýznamnejšími biotickými faktormi negatívne ovplyvňujúcimi nielen kvantitu, ale aj kvalitu produkcie rastlín. Kontrola alebo eliminácia baktérií a húb sú riešiteľné s použitím bakteriocídov a fungicídov. Zvláštne postavenie medzi fytopatogénmi majú rastlinné vírusy infikujúce poľnohospodárske plodiny, pretože ochrana rastlín pred nimi, ako aj možnosti ich eradikácie z už infikovaných rastlín, v podstate neexistuje. Predsa len, techniky bunkových a pletivových kultúr majú riešenie na eliminovanie vírusov z rastlín, ktorým je príprava a masová produkcia tzv. bezvírusových rastlín. Tieto postupy využívajú vegetatívne rozmnožovanie *in vitro*, t. j. mikropropagáciu, kedy sa z infikovanej donorovej rastliny odoberú rastové vrcholy obsahujúce apikálne meristémy. Využíva sa to, že apikálny meristém v

rastovom vrchole v donorovej rastline, spravidla nie je spojený vodivými pletivami so zvyškom rastliny, preto v meristémie nie sú prítomné fytopatogény. Meristém je pravdepodobne chránený ešte aj určitým mechanizmom inaktivujúcim vírus. Tento fakt sa dá využiť na (mikro)propagáciu potomstva zbaveného fytopatogénov, zvlášť vírusov, pomocou *in vitro* kultúry. Veľkosť odobraného explantátu obsahujúceho meristém je kritickým faktorom. Čím je odobraný explantát (rastový vrchol), obsahujúci meristém menší, tým je vyššia pravdepodobnosť získania rastlín bez vírusov. Je však esenciálne, aby s apikálnym meristémom zostali 1 – 2 listové primordiá, ktoré produkciou rastových hormónov podpora prežitie a normálny vývin meristému v *in vitro* kultúre.

Táto technika je vhodná na produkciu potomstva regenerantov zbavených najmä rastlinných vírusov, prípadne aj iných fytopatogénov. Tento proces sa ešte spája s **termoterapiou**, čo je použitie vyššej teploty na eliminovanie vírusov, všeobecne používané proti vírusom (Obrázok 2.15). Prevodu explantátu obsahujúceho meristém do *in vitro* kultúry, a následnej mikropropagácii, môže ešte pred odberom vrcholového meristému, predchádzať vystavenie donorovej rastliny vyššej teplote (do 40°C), ktorá inaktivuje vírusy, ale nepoškodí meristémové bunky v explantáte. Regenerujúce výhonky z meristémov sú vystavované, aj opakovane počas niekoľkých subkultivácií *in vitro*, teplote až do 40°C, počas 2 – 3 týždňov. Ak je v regenerujúcich výhonkoch, alebo v už zakorenených rastlinách po termoterapii, príslušnými diagnostickými testami potvrdená neprítomnosť vírusu, sú produkované bezvírusové sadenice (Obrázok 2.15).

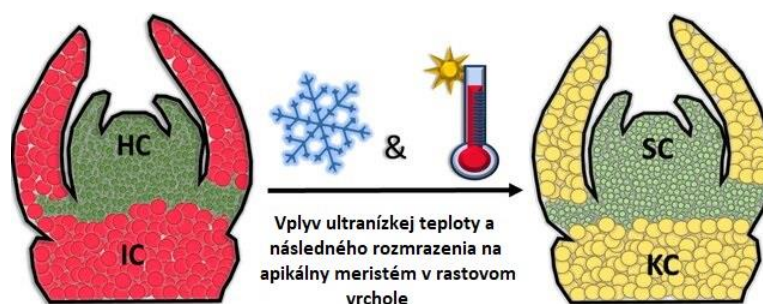


Obrázok 2.15: Schéma procesu termoterapie spojenej s kultiváciou apikálnych meristémov a mikropropagáciou (Zdroj: Lizárraga a kol., 2017, upravené).

Ďalšími technikami na eliminovanie vírusov z rastlín sú chemoterapia a kryoterapia. Obe sú tiež spojené využitím *in vitro* kultúr, zvlášť meristémových mikropropagačných techník.

Chemoterapia využíva antivirotiká (napr. ribavirín, aktinomycín D, cykloheximid) alebo rôzne chemické látky (napr. antibiotiká, rastové regulátory, aminokyseliny, analógy purínov a pyrimidínov), ktoré sa pridávajú do kultivačného média a majú zabezpečiť inaktivovanie vírusu a inhibovať jeho množenie v pletivách rastliny. Používané antivirotiká sú určené proti humánnym vírusom, preto ich antivírusový účinok proti rastlinným vírusom je obmedzený.

Kryoterapia je založená na expozícii rastových vrcholov, obsahujúcich apikálne meristémy, ultranízej teplote (-196 °C), podľa príslušného kryokonzervačného protokolu. Používa sa aj v prípadoch, kedy je vírus rezistentný a rastlina senzitívna voči vyššej teplote použitej v termoterapii. Rastové vrcholy musia byť pripravené na ultraníjku teplotu dehydratovaním alebo vitrifikáciou, aby malé, kompaktné a vírusom nekontaminované meristematické bunky prežili tento extrémny stav a boli schopné množiť sa, rásť a regenerovať rastlinu. Proces kryoterapie nie sú schopné prežiť bunky meristému, respektíve rastového vrcholu, ktoré sú infikované vírusom, teda ich kondícia a životaschopnosť je slabšia oproti vírusom neinfikovaných buniek (Obrázok 2.16).



Obrázok 2.16: Princíp účinku kryoterapie na bunky apikálneho meristému. HC – zdravé bunky, IC – infikované bunky, SC – preživšie bunky, KC – usmrtené bunky (Zdroj: Jiroutová, Sedlák, 2020, upravené).

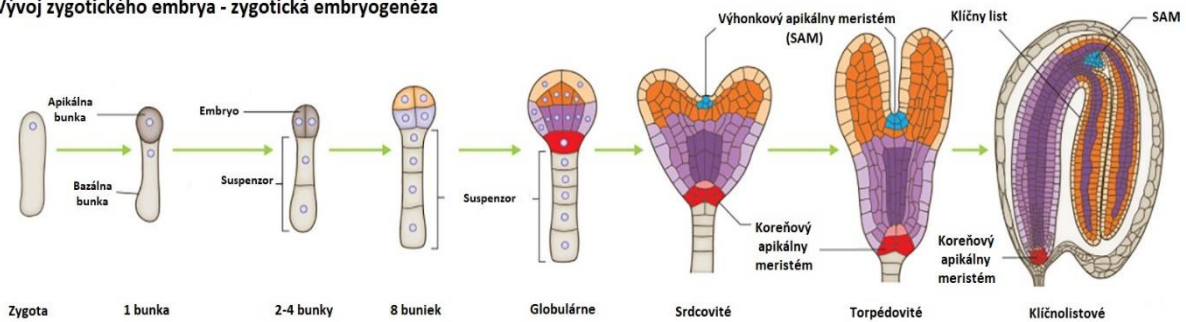
V prípadoch, ak vírus dokáže migrovať a infikovať meristematické bunky, ani tento postup nestačí. Vtedy sa kombinuje termoterapia s kryoterapiou a následne s meristémovou kultúrou. Kontrola úspešnosti procesu eliminovania fytopatogénneho vírusu sa vykonáva imunologickými metódami, napríklad ELISA. Aj keď žiadna z rastlín zbavených vírusov sa nestáva po terapii imúnnou voči reinfekcii vírusmi, je táto technológia veľmi významná pre pestovateľov mnohých rastlinných druhov, najmä viacročných (napríklad chmeľu). Preto treba periodicky nahrádzať rastliny pestované na poli bezvírusovými rastlinami vyprodukovanými

mikropropagáciou a terapiou v *in vitro* podmienkach, alebo množení z udržiavanej, už bezvírusovej rezervy rastlín.

2.3.3.3 Embryo kultúry rastlín

Techniky *in vitro* kultúr, v ktorých je objektom kultivácie **zygotické embryo** sa nazývajú **embryokultúry**. Sú jednou z najstarších techník využívaných v *in vitro* kultúrach rastlín. Po oplodnení vajíčka sa izolujú vyvíjajúce sa embryá, v rôznych vývinových štádiách, od štádia proembrya (2-bunkový stav) až po zrelé embryo (Obrázok 2.17) a kultivujú sa na kultivačnom médiu v aseptickvej *in vitro* kultúre. O úspechu techniky embryokultúr, izolovaných v ktoromkoľvek vývinovom štádiu, rozhodujú dva kľúčové aspekty – proces excízie embrya a zloženie kultivačného média.

Vývoj zygotického embrya - zygotická embryogenéza



Obrázok 2.17: Vývinové štádiá zygotických embryí dvojkličnolistových rastlín (Zdroj: Yuan a kol., 2024, upravené).

Zrelé zygotické embryo krytosemenných druhov rastlín má jasne rozpoznateľné výhonkové aj koreňové primordium (plumulu, respektíve radikulu) a kľúčne listy. Má teda základnú organizačnú štruktúru už ako dospelá rastlina. Môže byť použité ako explantát, kultivovaný *in vitro* a regenerovaný na kompletnú rastlinu. Izolácia zrelých embryí zo semien donorových rastlín napučaných vodou, je celkom jednoduchý proces. Pretože sú už väčšinou autotrofné, ich kultivácia, klíčenie a vývin na dospelú rastlinu prebiehajú ľahšie a stačia na to nutrične jednoduchšie kultivačné médiá. Proembryá a nezrelé embryá v rôznych vývinových štádiách, okrem zložitejšej izolácie, majú pre svoje prežitie v *in vitro* kultúre vyššie nutričné požiadavky. Až po globulárne štádium sú v heterotrofnej fáze vývinu a nie sú schopné syntetizovať si potrebné látky. Kultivačné médiá preto musia byť komplexnejšie. Sú tiež náchylnejšie na nežiadúce predčasné vyklíčenie a premenu na nediferencované kalusové pletivo.

Embryo kultúry majú viaceré praktické aplikácie. Umožňujú skracovať proces šľachtenia rastlín, prekonávať dormanciu a sterilitu semien, rozmnožovať unikátne genotypy rastlín, produkovať haploidné rastliny, tvoriť nové typy hybridov (medzidruhové, medzirodové), alebo introdukovať cudzie gény do rastlín (geneticky ich modifikovať).

2.3.3.4 Záchrana hybridných embryí („Embryo rescue“)

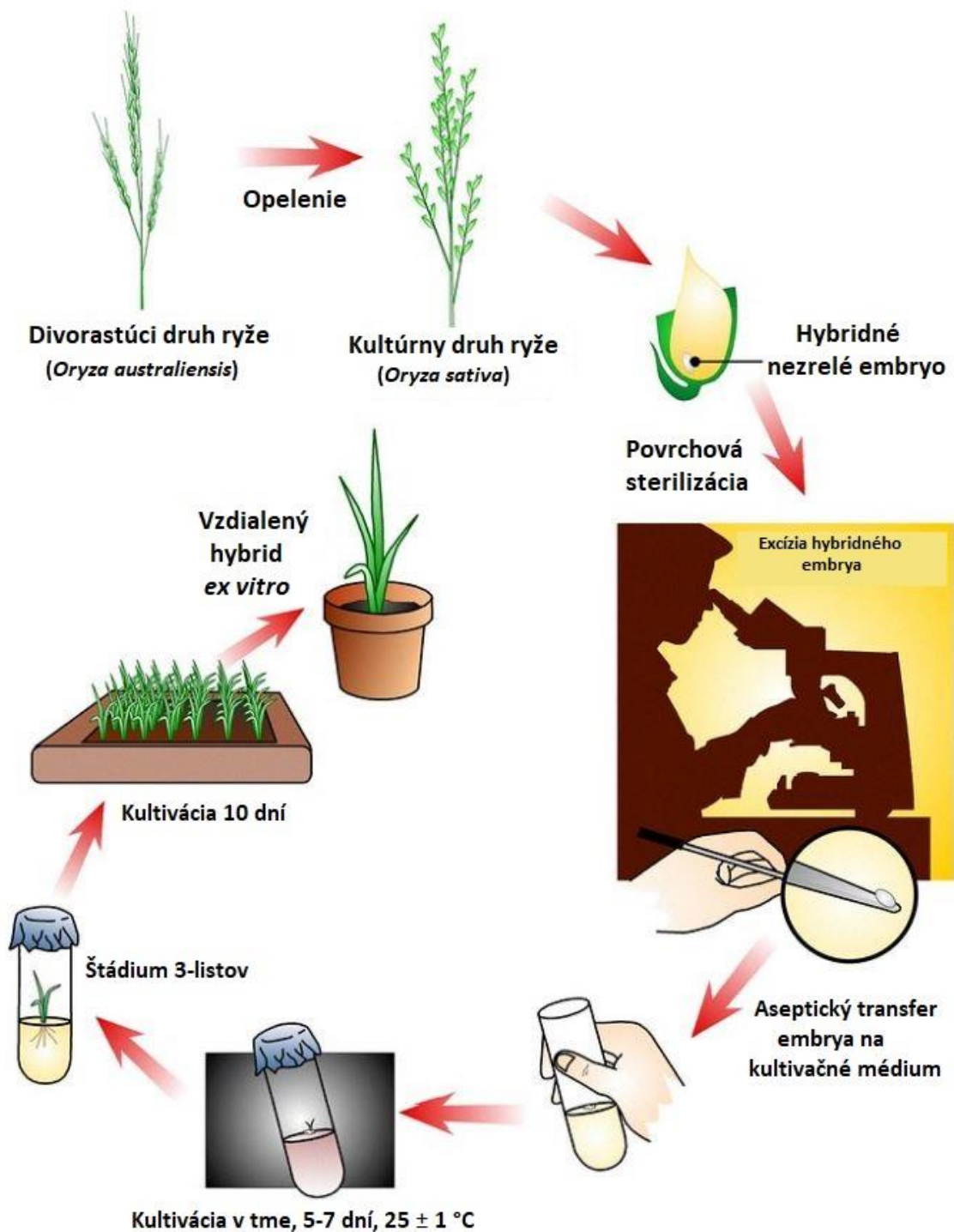
Z viacerých aplikácií majú embryokultúry veľmi významné uplatnenie v tvorbe (šľachtení) nových typov hybridov – medzidruhových a medzirodových, teda pri tzv. **vzdialených hybridizáciách**. V takýchto prípadoch je treba po opelení prekonať následné bariéry vzájomnej krížiteľnosti, ktoré bránia normálnemu vývinu semien, v ktorých sa slabo alebo abnormálne vyvíja endosperm, čo vedie k aborcii hybridného embrya. Nezrelé hybridné embryo, čo najneskôr po opelení (najlepšie ak je už aspoň v srdcovitom vývojovom štádiu), ešte však pred začiatkom jeho aborcie, po povrchovej sterilizácii sa vyberie z vyvíjajúceho sa semena a uloží sa na komplexné kultivačné médium a kultivuje v aseptickvej *in vitro* kultúre (Obrázok 2.18). Tento typ embryokultúry sa preto nazýva „záchrana embrya“, resp. v angl. „**Embryo rescue**“ technika.

Niekedy sa hybridné embryá pre ich záchranu, z nezrelého vajíčka vôbec neizolujú. Asepticky sa v *in vitro* kultúre môžu kultivovať už oplodnené vajíčka, vzniknuté iba krátko po oplodnení. Celé vajíčko vytvára pre rast a vývin hybridného embrya priaznivejšie chemické a fyzikálne prostredie, ako má izolované embryo kultivované *in vitro* na médiu mimo vajíčka.

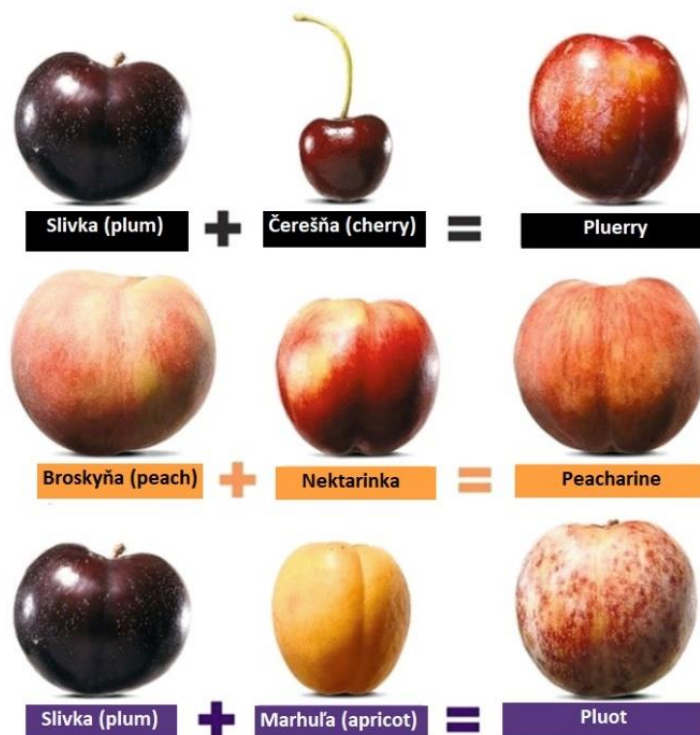
Významnými, realizovanými aplikáciami „embryo rescue“ techniky pre prax je produkcia nových typov vzdialených hybridov pri ovocných drevinách. Hybridizácia medzi niektorými druhmi kôstkového ovocia je možná (napr. broskyne so slivkou, slivky s marhuľou), medzi inými je prakticky nemožná (napr. čerešne s iným kôstkovým ovocím). Aj vtedy, keď je opelenie úspešné, vzniknuté hybridné embryá nie sú schopné dozrieť a vyvinúť sa na kompletnú rastlinu. Technika „embryo rescue“ dovoľuje prekonať tieto bariéry, zachrániť hybridné embryo, a umožňuje tak tvoriť zaujímavé a užitočné vzdialené hybridy, napríklad medzi slivkou a čerešňou, broskyňou a nektarinkou, slivkou a marhuľou (Obrázok 2.19) a ďalšími ovocnými drevinami.

Tieto nekonvenčné stratégie šľachtenia rastlín sa však aplikujú aj pri mnohých druhoch iných poľnohospodárskych plodín, napríklad zelenín, obilnín, okrasných kvetov, ale aj iných.

Cieľom je samozrejme tvorba nových hybridov so zaujímavými plodmi alebo vegetatívnymi časťami, ale tiež aj prenos génov, t. j. znakov a vlastností, medzi druhmi a rodmi.



Obrázok 2.18: Princíp techniky „embryo rescue“ na vytvorenie medzidruhového hybridu divorastúcej (*Oryza australiensis* Domin) a kultúrnej ryže (*Oryza sativa* L.) (Zdroj: Flickr, 2024, <https://www.flickr.com/photos/ricephotos/6808771084>, upravené).

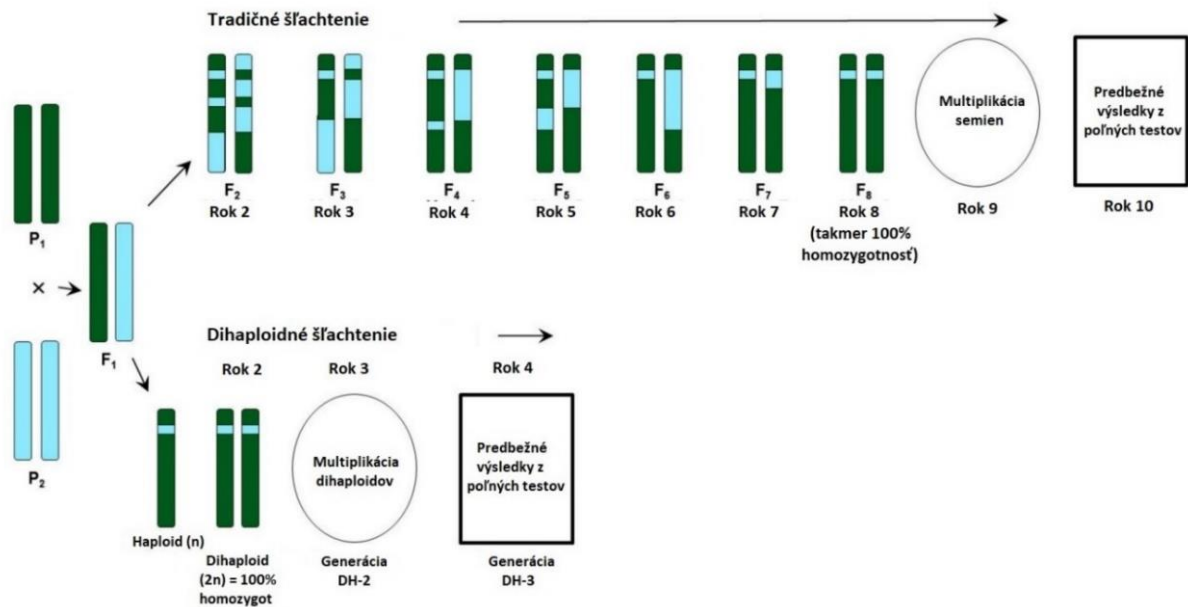


Obrázok 2.19: Nové typy vzdialených hybridov ovocných drevín vytvorené použitím techniky *in vitro* embryokultúr (Zdroj: Gharaghani, Solhjo, 2021, upravené).

2.3.3.5 Produkcia dihaploidov

Pre tvorbu žiadaných dihaploidných rastlín je potrebné zvládnuť najskôr tvorbu rastlín haploidných. **Haploidné** rastliny majú vo svojich bunkách iba jednu sadu chromozómov, teda iba polovicu oproti riadnemu počtu chromozómov v somatických bunkách. Haploidy vznikajú aj spontánne v prírode, ak sa z vajíčka vyvinie embryo bez jeho oplodnenia. Frekvencia tohto javu je však iba v stotínach alebo v tisícinách percenta. Je to však abnormálny stav a haploidné rastliny sú sterilné. Preto pre šľachtenie rastlín, haploidy sami osebe nie sú zaujímavé. Duplikovaním (haploidného) počtu ich chromozómov sa z nich však stávajú **dihaploidy**, ktoré už majú riadny počet chromozómov, sú životaschopné a fertily. Ich hlavnou vlastnosťou, pre ktorú sú zaujímavé a žiadané, je ich úplná **homozygotnosť** vo všetkých svojich lokusoch. Kompletne homozygotné dihaploidy majú v šľachtení rastlín veľký význam, pretože sa v nich fenotypovo môžu prejaviť už aj recesívne alely vo všetkých, predtým heterozygotných lokusoch. Ak sa dihaploid vytvorí zo samčích pohlavných buniek (peľových zŕn, resp. mikrospór), má duplikované sady samčích génov. Ak sa vytvorí zo samičích pohlavných buniek (neoplozených vajíčok), má duplikované sady samičích génov. V tomto spočíva význam a záujem o haploidy v šľachtení rastlín, pretože čas potrebný na vytvorenie odrody kompletne

homozygotnej sa pomocou haploidov a dihaploidov skráti o niekoľko generácií a rokov, v porovnaní s konvenčným postupom založenom na opakujúcom sa samoopelení (Obrázok 2.20).



Obrázok 2.20: Skrátenie procesu šľachtenia rastlín s využitím dihaploidov, oproti tradičnému postupu na dosiahnutie homozygotnosti (Zdroj: Eliby a kol., 2022, upravené).

Spontánna tvorba haploidov a ich spontánna dihaploidizácia sú však z praktického hľadiska nepoužiteľné. Ani rôzne skúšané metódy indukcie tvorby haploidov – ožarovaním peľu, teplotnými šokmi, rastovými hormónmi, ani ďalšie postupy, neumožnili získavanie haploidných a dihaploidných rastlín vo veľkých počtoch. Až v roku 1964 Guha a Maheshwari prezentovali možnosť získavať haploidné rastliny (podarilo sa im to pri durmane obyčajnom – *Datura stramonium* L.) kultiváciou nezrelých peľníc, obsahujúcich nezrelé peľové zrná – mikrospóry, v *in vitro* kultúre. Odvtedy sa rozvinuli techniky peľnicových kultúr, mikrospórových (nezrelých peľových zŕn) kultúr a vajíčkových kultúr pre mnohé druhy poľnohospodárskych plodín.

Homozygotizácia rastlinného materiálu má, okrem využitia v selektívnom šľachtení rastlín, využitie aj v genetike, genomike, a tiež v tvorbe nových genotypov rastlín vytváraných postupmi genetických modifikácií a editovania génov.

2.3.3.6 Tvorba haploidov a dihaploidov

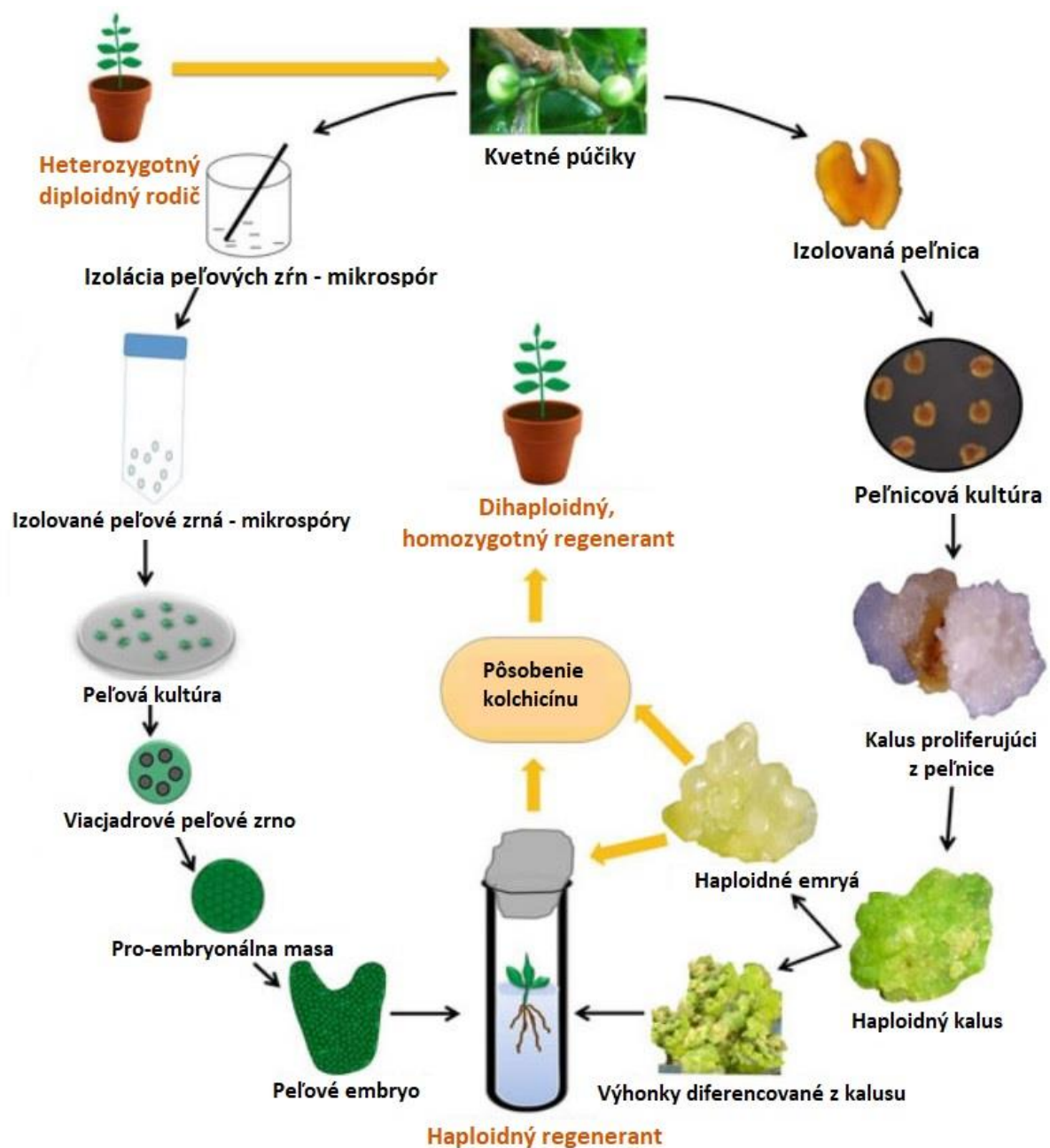
Pre efektívny proces šľachtenia rastlín je potrebné pripraviť, v krátkom čase, veľké počty (stovky, tisíce) haploidných a z nich dihaploidných rastlín. K tomu sú potrebné *in vitro* techniky, v ktorých sú východiskovými explantátmi gametické bunky, buď samčie (mikrospóry, nezrelé peľové zrná) alebo samičie (neoplozené vajíčka). Vývin haploidov a dihaploidov teda prebieha procesom androgenézy alebo procesom gynogenézy. Obe možnosti sa uskutočňujú v *in vitro* kultúre.

Androgenéza je vývin rastlín zo samčieho gametofytu – mikrospór alebo nezrelých peľových zrn, ktorého produktom sú androgenické haploidy. Použitie samčieho gametofytu na tvorbu haploidov a dihaploidov začalo kultiváciou celých, nezrelých peľníc *in vitro*. Ide o technicky jednoduchší spôsob založenia *in vitro* **peľnicovej kultúry** (niekedy používaný výraz z angl. „*antérové kultúry*“). Z ešte neotvorených kvetných púčikov alebo nerozkvitnutých kvetov sú, po povrchovej sterilizácii, vybrané nezrelé peľnice. Tie sa kultivujú celé, ale predmetom záujmu je ich obsah – mikrospóry, ktoré musia byť v čase izolácie peľníc vo svojom najresponzívnejšom vývinovom štádiu. Na kultivačnom médiu peľnice praskajú a uvoľňujú mikrospóry. Mikrospóry sa, ešte uzavreté v peľniciach, začínajú deliť. Procesom androgenézy sa indukuje tvorba haploidných, gametických embryí priamo, alebo častejšie haploidný kalus. Na haploidnom kaluse sa navodzuje tvorba haploidných embryí alebo haploidných výhonkov. V oboch prípadoch je výsledkom haploidný regenerant (Obrázok 2.21). Druhým typom explantátov pre androgenézu sú mechanicky izolované mikrospóry, t. j. nezrelé peľové zrná, z nezrelých peľníc. Kultivácia mikrospór v **peľovej kultúre** (Obrázok 2.21), oproti peľnicovej kultúre, vyžaduje komplexnejšie a nutrične bohatšie kultivačné médium.

Praktickými aj teoretickými výhodami peľových kultúr oproti peľnicovým kultúram sú:

- Homogénnejšia frakcia peľových zrn, z hľadiska ich vývinového štádia.
- Vyššia efektívnosť androgenézy oproti peľnicovým kultúram, z hľadiska produkcie získavania haploidov prostredníctvom gametických embryí.
- Eliminovanie vplyvu diploidného pletiva peľnice na androgenézu.
- Možnosť priamo ovplyvniť peľové zrná pred ich kultiváciou *in vitro* (geneticky, mutagenézou).
- Možnosti na štúdium bunkových a subcelulárnych zmien, ktoré sú základom prechodu z gametofytického na sporofytický vývin a procesu indukcie embryogenézy z individuálnych, izolovaných, haploidných buniek.

Androgenézou sa delením mikrospór, buď izolovaných, alebo uzavretých v peľniciach, indukuje tvorba haploidných gametických embryí, alebo haploidného kalusu. Obidvomi cestami morfo genetického vývinu, buď dozrievaním a klíčením embryí, alebo regenerovaním výhonkov a koreňov, sa dajú získavať kompletne haploidné rastliny, ktoré majú iba jednu sadu chromozómov – samčích.



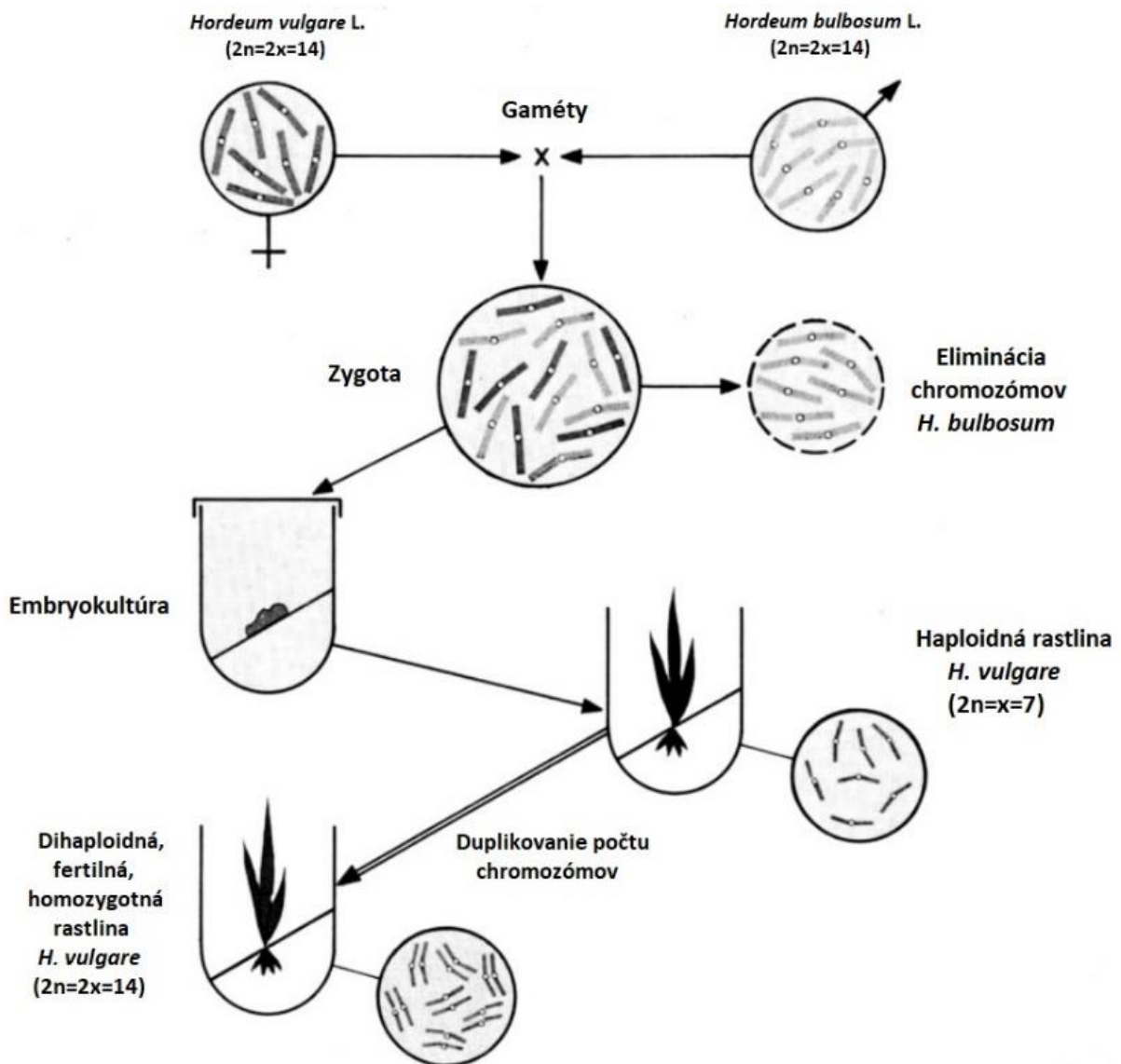
Obrázok 2.21: Produkcia haploidov a dihaploidov androgenézou z izolovaných mikrospór (ľavá strana schémy) alebo peľníc (pravá strana schémy) (Zdroj: Bajpai, Chaturvedi, 2018, upravené).

Gynogenéza je vývin rastlín zo samičieho gametofytu – neoplodneného vajíčka, ktoré je schopné, aj bez oplodnenia, vyvinúť sa na haploidnú zygotu, gynogenetické embryo, ktoré je tiež haploidné, a nakoniec na gynogenetického haploida. Z metodologického hľadiska je táto technika realizovaná kultiváciou vajíčok, vaječníkov, alebo celých nezrelých, ešte neopelených kvetov *in vitro* a všeobecne sa nazýva **vajíčková kultúra** (používaný sa aj výraz „*ovokultúra*“) *in vitro* a technicky je to metóda komplikovaná.

Pri niektorých rastlinných druhoch, najmä pri obilninách, je možné získavať haploidy a dihaploidy aj po **vzdialenej hybridizácii**, ktorá je spojená so **selektívnou elimináciou chromozómov** po takejto hybridizácii. Asi najznámejším a najvýznamnejším príkladom je tzv. „*technika Hordeum bulbosum*“ (Obrázok 2.22).

Podstatou tejto techniky je opelenie jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) s peľovými zrnami jeho divorastúceho, príbuzného druhu *Hordeum bulbosum* L. V určitej časti opelených kvietkov sa vyvinú haploidné embryá, ktoré vznikli po selektívnej eliminácii všetkých chromozómov *H. bulbosum* L. krátko po opelení. Haploidné embryá nie sú životaschopné a po 10 – 14 dňoch abortujú. Je ich možné zachrániť tak, že sa asepticky vyberú, uložia a kultivujú na kultivačnom médiu *in vitro*, kde dozrejú a vyklíčia na haploidné rastliny jačmeňa siateho. Na to sa využíva technika záchrany hybridných embryí („*embryo rescue*“), ktorá je opísaná v kapitole Záchrana hybridných embryí („*Embryo rescue*“).

Dihaploidizácia, teda premena haploidných rastlín na dihaploidné, získaných cestou androgenézy, gynogenézy, alebo vzdialeného kríženia, je záverečný krok v produkcii dihaploidov. Konverzia haploidných rastlín na dihaploidné sa vykoná **duplikovaním počtu ich chromozómov**. Pri niektorých rastlinných druhoch (niektorých obilninách) sa vyskytuje aj spontánna duplikácia počtu chromozómov, s frekvenciou vyššou ako 50 %. Vtedy nie je potrebné použiť žiadnu metódu na duplikovanie počtu chromozómov a získanie homozygotných dihaploidov. Vo väčšine prípadov sa však dihaploidizácia musí indukovať chemicky, pomocou antimikrotubulárnych činidiel, najčastejšie kolchicínom. Haploidné rastliny sa, v štádiu 3-4 listov, namočia do roztoku kolchicínu na niekoľko hodín a po premytí vodou sa vysadia do substrátu. Úspešnosť chemicky indukovanej dihaploidizácie dosahuje až okolo 90 %.



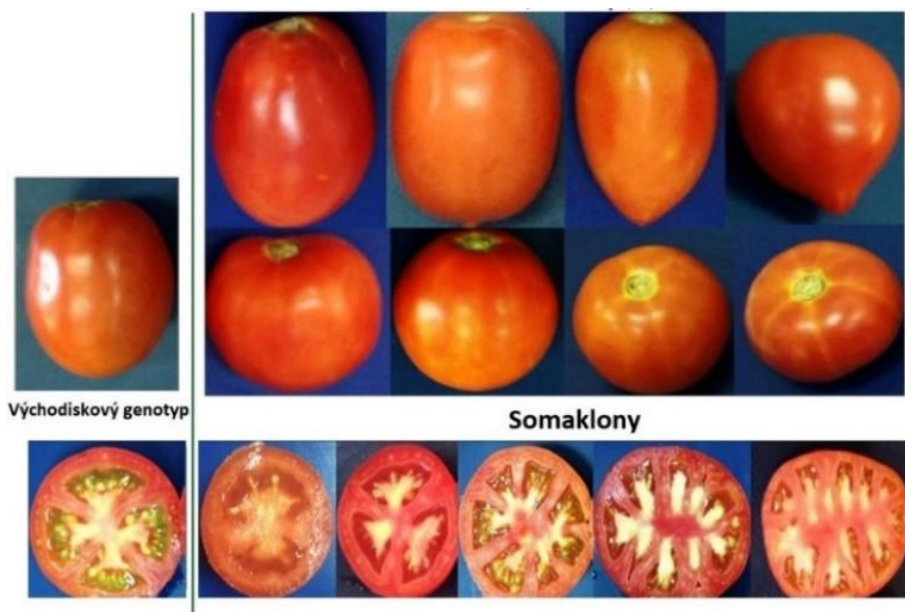
Obrázok 2.22: Schéma produkcie haploidov a dihaploidov jačmeňa siateho technikou „*Hordeum bulbosum*“ (Zdroj: Jensen, 1983, upravené).

2.3.4 Somaklonálna variabilita

Pri komerčnej masovej mikropropagácii *in vitro*, ktorej cieľom je produkcia identických klonov vybraných genotypov rastlín, sa medzi klonálne rozmnožovanými rastlinami objavujú aj fenotypové varianty s dočasnými alebo trvalými zmenami kvalitatívnych a kvantitatívnych znakov, oproti východiskovej, klonovanej rastline. Sú to tzv. **somaklonálne varianty** (somaklony). Výskyt somaklonov je častejší vtedy, keď sa na mikropropagáciu, namiesto meristemických pletív, použijú vysoko diferencované pletivá bez meristémov – z koreňov, listov, či stoniek.

Somaklonálna variabilita má dve hlavné príčiny svojho vzniku. Jednou je prirodzená variabilita pre-existujúca už v samotných rastlinných bunkách, ktorá sa môže za určitých podmienok viac alebo menej prejaviť. Druhou sú stresujúce podmienky *in vitro* kultúry pre rastlinné bunky a procesy preprogramovania buniek, t. j. dediferenciácie a rediferenciácie, ktorými diferencovaná bunka prejde v *in vitro* kultúre pred procesom regenerácie rastliny. Tieto procesy môžu pôsobiť ako mutagénne faktory a *de novo* generovať v regenerantoch širokú škálu epigenetických alebo genetických variácií, prejavovaných fenotypovo aj genotypovo. Epigenetické zmeny vznikajú približne dvakrát častejšie ako genetické, ale pohlavným spôsobom sa neprenášajú do potomstva. Mechanizmami, ktoré spôsobujú vznik somaklonov sú zmeny v počte a štruktúre chromozómov (delécie, inzercie, translokácie, inverzie), génové mutácie a amplifikácie, zmeny v mimojadrových génoch, aktivácia transponovateľných elementov, hypermetylácia alebo hypometylácia DNA.

Objavovanie sa somaklonov nie je žiadané v programoch mikropropagácie rastlín, ktorej cieľom je produkovať identické kópie východiskovej rastliny – klony. Na druhej strane, somaklonálna variabilita môže generovať aj nové a využiteľné genetické varianty, ktoré majú uplatnenie v šľachtení rastlín a v genetickom zlepšovaní rastlinných druhov. Fenómén somaklonálnej variability je možné aj zvýrazniť jej zámerným indukovaním. Univerzálnym spúšťačom *de novo* vzniku somaklonálnej variability je konverzia diferencovaných buniek explantátu na dediferencované bunky kalusu, z ktorých sú po ich rediferenciácii regenerované somaklony. Zvýšiť frekvenciu vzniku a variabilitu somaklonov je možné rôznymi spôsobmi, napríklad typom explantátu, počtom pasážovaní a predlžovaním kultivácie *in vitro*, zložením kultivačného média, najmä rastových regulátorov, navodením stresových podmienok počas kultivácie *in vitro* pridaním chemických látok do kultivačného média alebo pôsobením fyzikálnych faktorov, alebo spôsobom regenerácie (priama, nepriama) rastlín *in vitro*. Somaklonálna variabilita môže generovať aj varianty nedosiahnuteľné konvenčným šľachtením, somaklony so zmenenými agronomickými aj úžitkovými parametrami, tolerantné voči biotickým a abiotickým stresom (Obrázok 2.23), či s ďalšími zaujímavými vlastnosťami. Metódy a techniky na identifikáciu somaklonov sú od najjednoduchších fenotypových morfológických znakov (Obrázok 2.23), cez cytologické, až po molekulárne.

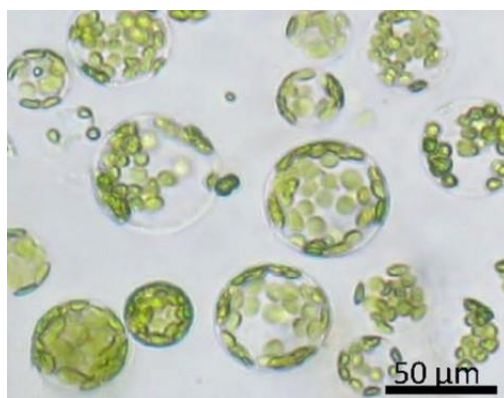


Obrázok 2.23: Variabilita vo veľkosti, tvare a štruktúre plodov somaklonov rajčiaka jedlého regenerovaných z kalusov a kultivovaných na médiu s obsahom soli (NaCl) a pri zvýšenej teplote (Zdroj: El-Banna a kol., 2015, upravené).

2.3.4.1 Somatická hybridizácia

Prenos genetického materiálu (DNA) a jeho „zmiešavanie“ pri krížení sa v eukaryotických organizmoch, teda aj rastlinách, uskutočňuje pohlavným spôsobom, po splynutí pohlavných buniek. Ani pri rastlinách nie je možné skrížiť jedince zo vzdialených druhov alebo až rodov, v dôsledku bariér vzájomnej inkompatibility. Prekonanie týchto limitov pri rastlinách dovoľuje využitie techník **somatickej hybridizácie**, t. j. fúzie somatických buniek. Fúzii somatických buniek pri rastlinách však bráni pevná bunková stena, s hlavnou zložkou celulózou a spojením susediacich buniek matricou bohatou na pektín. Bunkové steny sa dajú enzymaticky (zmesou celuláz, hemiceluláz a pektináz) degradovať a pripraviť sa dá veľké množstvo životaschopných „nahých buniek“ – protoplastov. **Protoplasty** sú individuálne bunky, bez bunkovej steny, obalené iba tenkou cytoplazmatickou membránou (Obrázok 2.24).

Izolované protoplasty sú, na rozdiel od rastlinných buniek, veľmi citlivé na osmotický tlak v prostredí, kde sú udržiavané. Tekuté kultivačné médium, v ktorom sú kultivované, musí byť stabilne mierne hypertonické, aby protoplasty nepraskli a zostali živé. Purifikované protoplasty (zbavené zvyškov rastlinných buniek) sa *in vitro* kultivujú viacerými spôsobmi, buď v tekutých, alebo na pevných kultivačných médiách.



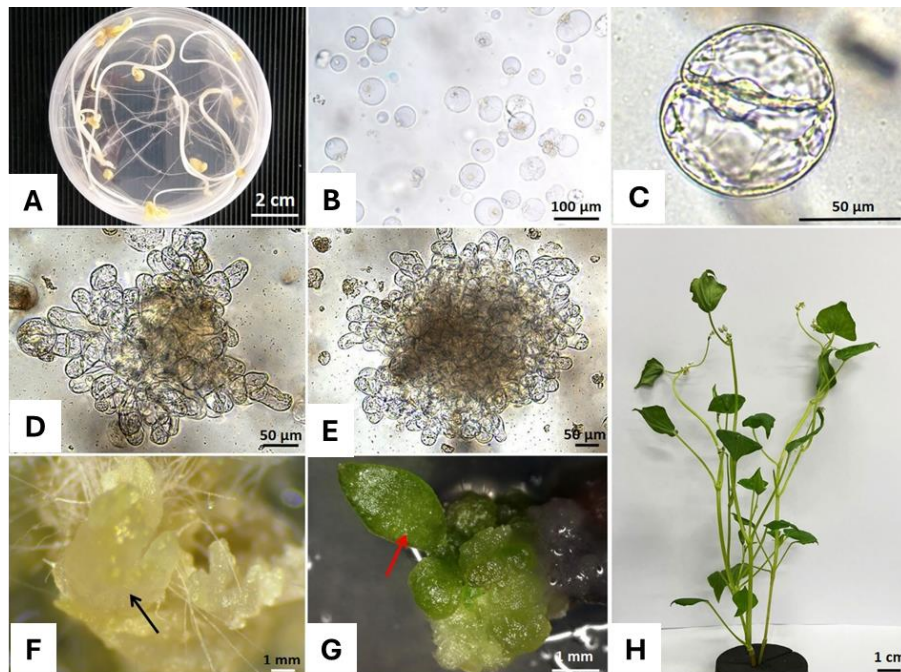
Obrázok 2.24: Protoplasty izolované z listov mladých rastlín kapusty občasnej hlávkovej (Zdroj: Kielkowska, Adamus, 2019, upravené).

V živých protoplastoch je možné indukovať proces morfogénzy, na konci ktorého sú regenerované rastliny (Obrázok 2.25). Protoplasty majú schopnosť deliť sa (Obrázok 2.25C-E) a dokážu si regenerovať bunkovú stenu. Vďaka totipotencii je možné iniciovať z nich tvorbu mikrokalusov a v nich proces regenerovania budúcej rastliny, buď cestou somatickej embryogenézy alebo organogenézy (Obrázok 2.25F-G).

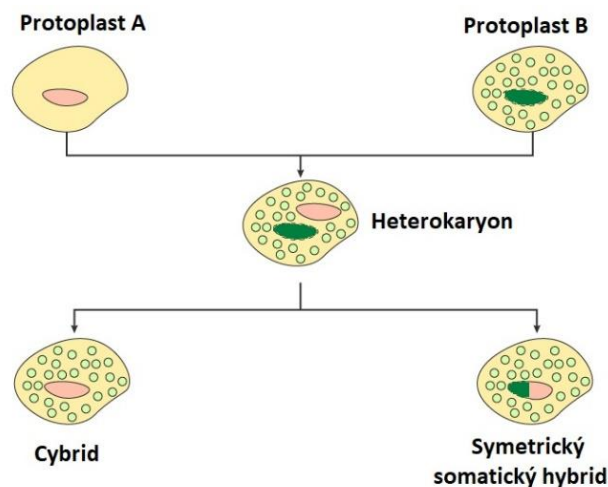
Počas kultivácie *in vitro* je možné na protoplasty pôsobiť selekčnými činidlami a mutagénmi, alebo využiť fenomén somaklonálnej variability na tvorbu nových variantov regenerovaných rastlín. Protoplasty majú aj schopnosť prijať cudzí genetický materiál, čím sa rozširujú možnosti tvorby nových genetických variantov. Hlavným dôvodom na zakladanie protoplastových kultúr je však tvorba somatických hybridov. Osobitnou vlastnosťou protoplastov totiž je, že keď sa dostanú do úzkeho vzájomného kontaktu majú tendenciu navzájom fuzovať (spájať sa), bez ohľadu na svoj pôvod (rastlinný druh, či rod). Fúzia môže prebehnúť aj spontánne, ale cielene sa indukuje pomocou chemických látok, najčastejšie polyetylénglykolom, dusičnanom sodným, chloridom vápenatým, alebo fyzikálne, pulzným elektrickým poľom (elektrofúzia).

Fúzia protoplastov, pripravených zo somatických buniek a regenerácia somatických hybridov, úplne obchádza pohlavnú reprodukciu a umožňuje kombináciu dvoch rodičovských genómov, bez ohľadu na ich taxonomický vzťah. Okrem toho má unikátny potenciál spojiť jadrové a cytoplazmatické gény súčasne, čo sa pri sexuálnej hybridizácii, ani genetickom inžinierstve dosiahnuť nedá. Fúziou dvoch protoplastov vzniká **heterokaryon**, ktorý obsahuje dve jadrá aj obe cytoplazmy, z oboch rodičovských protoplastov (Obrázok 2.26). V niektorých heterokaryonoch môžu jadrá fuzovať a vzniká **symetrický somatický hybrid** (Obrázok 2.26). V iných môžu byť zase chromozómy v jadre jedného z protoplastov eliminované, respektíve

eliminované celé jadro, ale cytoplazmy oboch protoplastov sa zlúčia a vzniká **asymetrický somatický hybrid** – cybrid (Obrázok 2.26).



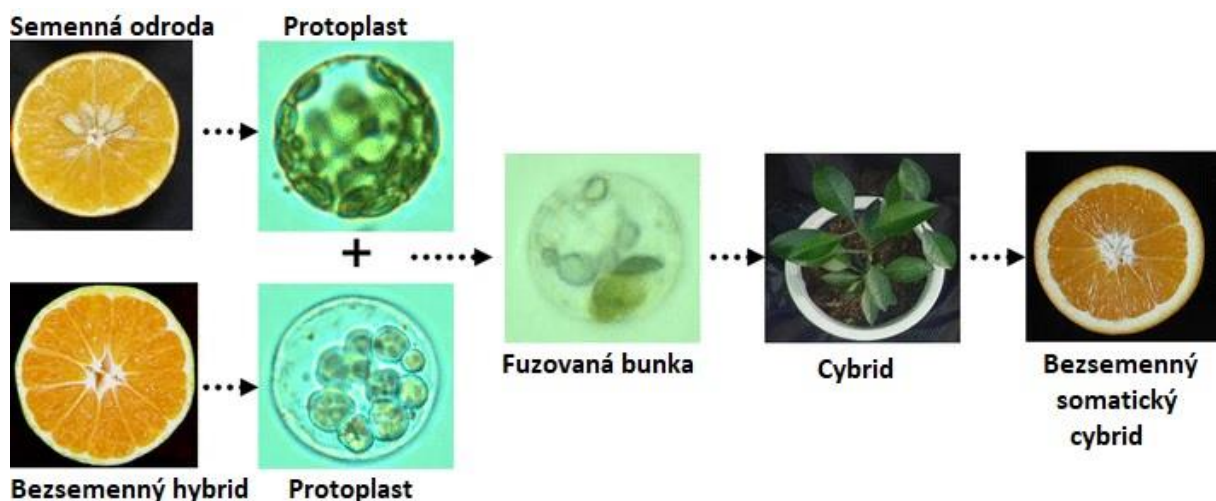
Obrázok 2.25: Regenerácia rastlín z protoplastov izolovaných z hypokotýlov pohánky jedlej. (A) 10-dňové klíčence; (B) čerstvo izolované protoplasty; (C) 2-bunkový zhluk po 1. delení protoplastu; (D-E) viacbunkové zhluky po 10. a 20. dni kultivácie; (F) mikrokalusy indukované z protoplastov so somatickým embryom (čierna šípka) po 2 mesiacoch kultivácie; (G) regenerovanie výhonku (červená šípka) z kalusu odvođeného z protoplastov; (H) kvitnúca regenerovaná rastlina v *ex vitro* podmienkach (Zdroj: Zaranek a kol., 2023, upravené).



Obrázok 2.26: Tvorba rôznych foriem somatických hybridov po fúzii protoplastov (Zdroj: <https://www.geeksforgeeks.org/difference-between-cybrids-and-hybrids/>, upravené).

Pomocou somatickej hybridizácie sa dokážu prenášať gény rezistencie voči patogénom a škodcom, odolnosti voči chladu a suchu, gény pre kvalitatívne parametre, gény cytoplazmatickej samčej sterility a ďalšie zaujímavé a významné gény. Najžiadanejším je symetrický somatický hybrid, ale aj cybrid je zaujímavým produktom, pretože obsahuje kombináciu genetických informácií obsiahnutých v chloroplastových a mitochondriálnych genómov oboch protoplastov. Tzv. cybridizácia sa využíva v šľachtení rastlín, veľmi intenzívne napríklad v tvorbe nových hybridov, i bezsemenných, v rámci rodu *Citrus* (Obrázok 2.27).

Jedinečnou výhodou somatickej hybridizácie je možnosť vytvárať nové kombinácie jadrových a/alebo cytoplazmatických organel prekonávaním pre-zygotických, i post-zygotických bariér sexuálnej nezlučiteľnosti. Genómová inkompatibilita po fúzii protoplastov, ale aj málo úspešná regenerácia rastlín z protoplastov, sú však naďalej vážnymi prekážkami väčšieho využívania somatickej hybridizácie v šľachtení rastlín.



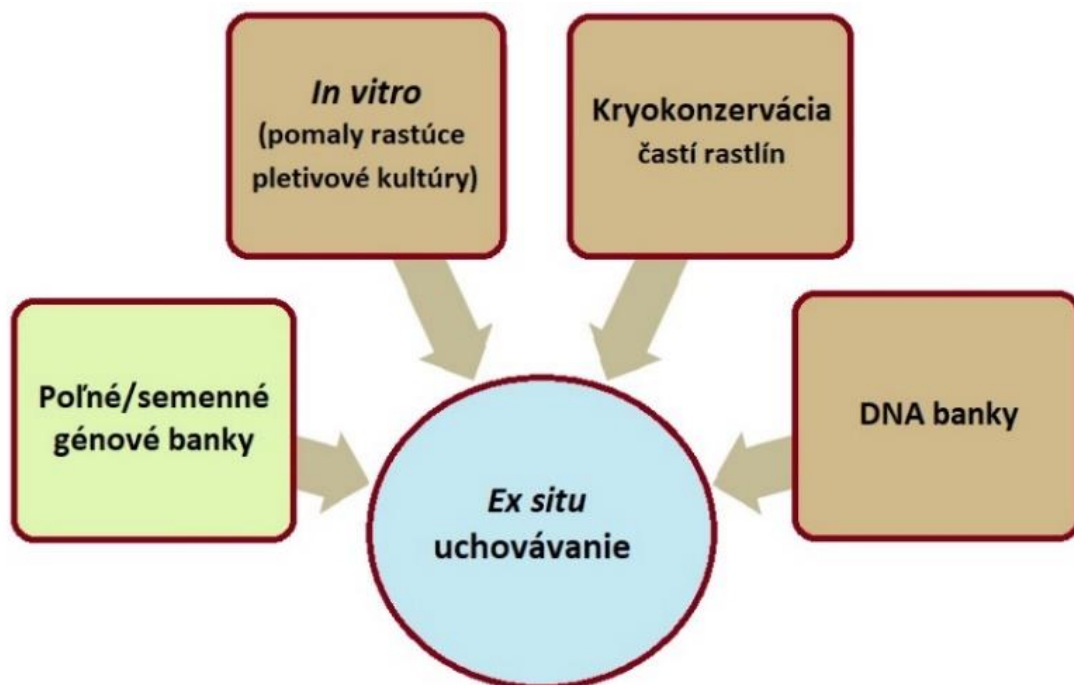
Obrázok 2.27: Tvorba bezsemenných somatických cybridov asymetrickou fúziou protoplastov, v tomto prípade protoplastov pripravených z mandarínkovníka a pomarančovníka (Zdroj: Xiao a kol., 2014, upravené).

2.3.4.2 Dlhodobé uchovávanie rastlín

Pre budúce šľachtenie rastlín, teda pre zabezpečenie existencie a potrieb ľudskej populácie na Zemi, je kľúčové zachovať genetickú diverzitu druhov, či už ide o vyšľachtené odrody, novošľachtené línie, staré odrody, krajové odrody, divorastúce, príbuzné druhy, vrátane ohrozených. **Genetická diverzita** je množstvo genetickej variability prítomnej medzi jednotlivcami odrody alebo populácie, v rámci daného druhu, a je predpokladom a kľúčovou

hybnou silou pre evolúciu druhu. Uchovávanie genetickej diverzity (inak vyjadrenej aj ako diverzita génov, pretože jej podstatou je variabilita v nukleotidovej sekvencii molekuly DNA) rastlín sa realizuje programami ochrany a uchovania **genetických zdrojov rastlín**. Genetickými zdrojmi rastlín sú časti rastlín, pomocou ktorých sa, pohlavným alebo vegetatívnym spôsobom, dajú rastliny rozmnožovať. Ak sa neuchovávajú na mieste svojho prirodzeného výskytu (*in situ*), ide o uchovávanie *ex situ*, t. j. mimo miesta svojho prirodzeného výskytu. Generatívne rozmnožované druhy rastlín sa spôsobom *ex situ* uchovávajú vo forme svojich semien, relatívne jednoduchým spôsobom. Po znížení obsahu vody v nich sa uchovávajú krátkodobo alebo dlhodobo pri zníženej (do 5 °C) alebo nízkej teplote (do -20 °C), v génových bankách. **Génové banky** sú technické zariadenia s chladenými komorami, špecializované na takéto uchovávanie genetických zdrojov *ex situ*.

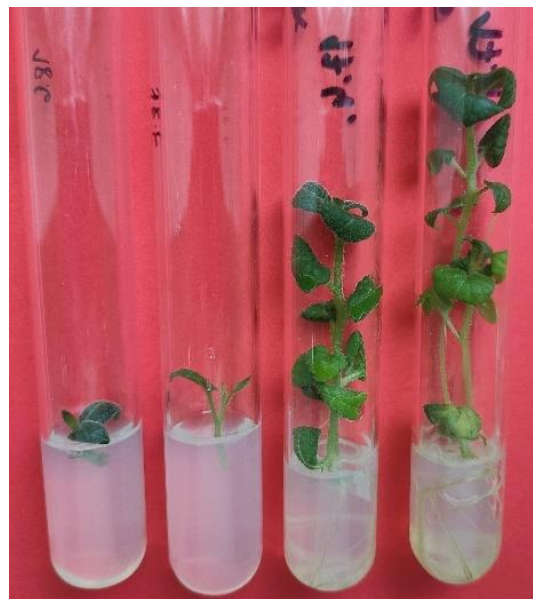
Inak je tomu pri vegetatívne rozmnožovaných druhoch. Pri nich sa využívajú biotechnologické prístupy. Prvým sú pletivové kultúry *in vitro*. Druhým je kryoprezervácia, teda uchovávanie pri ultranízkych teplotách. Tretím je uchovávanie rastlín iba vo forme ich molekúl DNA, respektíve iba *in silico* uchovávanie genetickej informácie z DNA (Obrázok 2.28).



Obrázok 2.28: Stratégie *ex situ* spôsobu uchovávanie genetických zdrojov rastlín (Zdroj: Bohra, Waman, 2019, upravené).

2.3.4.3 Uchovávanie rastlín v kultúrach *in vitro*

Jednou formou využitia *in vitro* kultúr rastlín, súvisiacou s uchovávaním genetických zdrojov, je mikropropagácia (opísaná v kapitole Mikropropagácia rastlín). Ak treba, takýmto spôsobom sa rozmnožujú jedince udržiavaného druhu. Kľúčovým spôsobom využitia je uchovávanie častí alebo celých, kompletných rastlín v kultúre *in vitro*, počas ktorého sa však manipuluje s vývinom a rastom. Princípom tohto spôsobu je **spomalenie vývinu a rastu** rastliny – genetického zdroja v *in vitro* kultúre. Dosiahne sa modifikovaním chemického zloženia kultivačného média a zmenou fyzikálnych podmienok kultivácie *in vitro*. V kultivačnom médiu sa znižuje koncentrácia jeho anorganických zložiek a zdrojov uhlíka (najčastejšie sacharózy), pridávajú sa osmoticky aktívne látky (napr. manitol), inhibítory rastových regulátorov (napríklad, kyselina abscisová), rastové retardanty (napríklad, ancymidol, paklobutrazol a ďalšie) a niekedy sa pridáva viac agaru na spevnenie média. Kultivačné podmienky sa menia znížením kultivačnej teploty na 0-20 °C, v závislosti od zemepisnej šírky ich pôvodu, znížením intenzity osvetlenia a zmenou fotoperiódou. Niekedy sa mení aj typ kultivačnej nádoby. Ak je to technicky možné, znižuje sa aj prístup kyslíka. Zmeny chemických aj fyzikálnych podmienok kultivácie sa obyčajne kombinujú. Na kultivačné médium v aseptickvej *in vitro* kultúre sa uložia explantáty, najčastejšie sú nimi rastové vrcholy alebo nodálne články (oba obsahujúce meristémy), z ktorých sa veľmi pomaly vyvíjajú kompletne rastliny (Obrázok 2.29).



Obrázok 2.29: Genetické zdroje ľuľka zemiakového, v rôznom vývinovom štádiu, udržiavané v *in vitro* kultúre za spomaleného vývinu a rastu (Zdroj: autor).

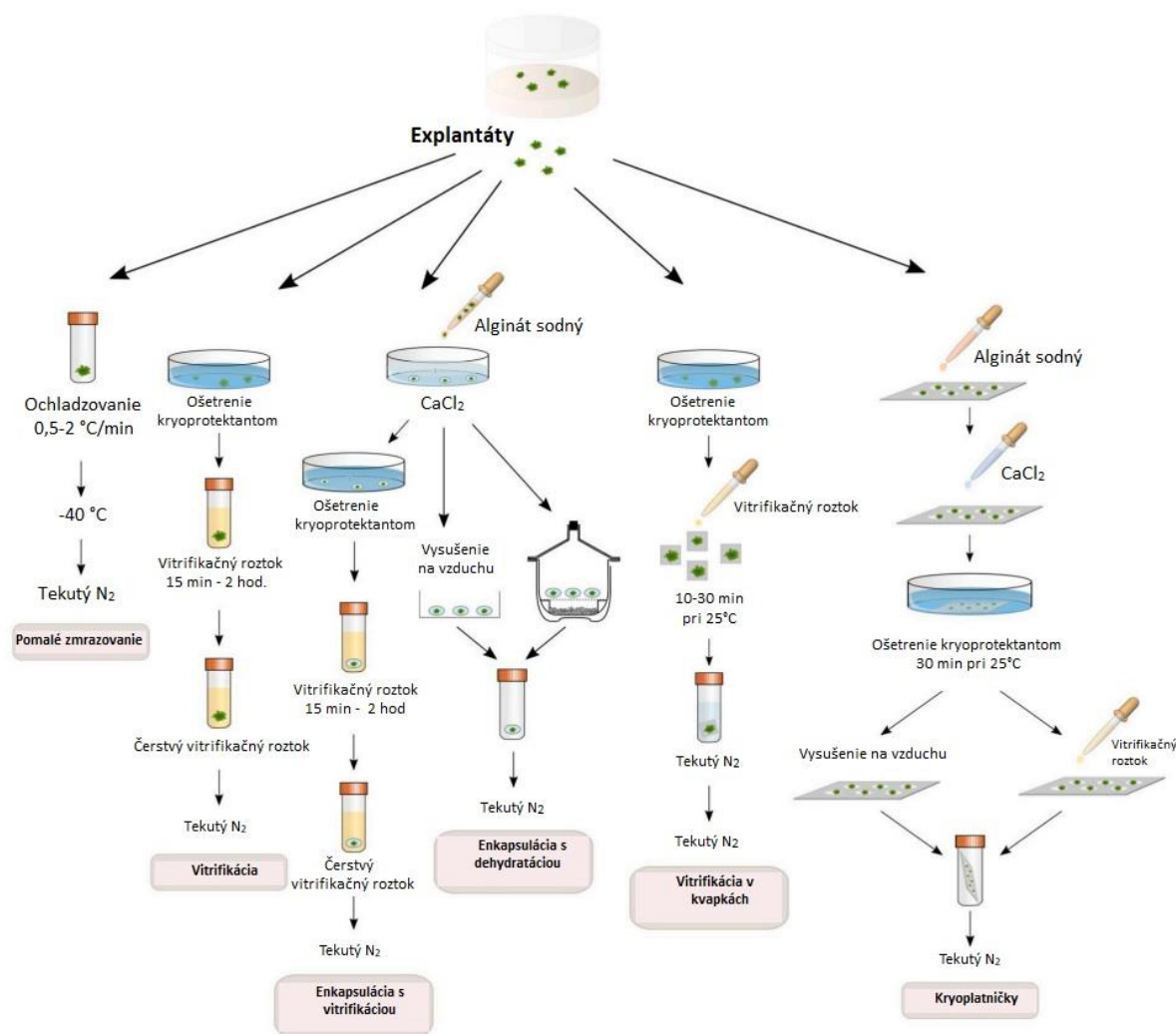
Po dosiahnutí žiadaného vývinového štádia sa z nich znova odoberú rovnaké explantáty a proces kultivácie *in vitro* sa po subkultivácii opakuje. Subkultivačný interval, t. j. doba od uloženia primárneho explantátu na udržiavacie kultivačné médium po odber explantátu z rastliny vyvinutej *in vitro* a jeho preloženie na čerstvé kultivačné médium, sa pri spomalení vývinu a rastu rastliny predĺži z niekoľkých týždňov na niekoľko mesiacov (aj na viac ako 1 rok). Takýmto spôsobom sa uchovávajú, napríklad genetické zdroje ľuľka zemiakového, cesnaku, banánovníka a mnohých ďalších.

Počas uchovávania *in vitro* sa musí aspoň minimalizovať nežiadúci efekt somaklonálnej variability a tiež vitrifikácie explantátu v *in vitro* kultúre. **Vitrifikácia** je proces, kedy normálne rastlinné bunky sa v *in vitro* kultúre stanú hyperhydrickými, teda malformovanými v dôsledku vysokého obsahu vody (sú sklovité, priesvitné). Celé vitrifikované, sklovité rastliny, respektíve explantáty, sa zdajú byť napnuté, hyperhydrické, ako keby bunky boli na prvý pohľad turgescenčné, na povrchu vodnaté a hypolignifikované. Vitrifikácia explantátov, či rastlín v *in vitro* kultúre je nežiadúcou komplikáciou, ktorá znižuje účinnosť mikropropagácie, kvalitu regenerantov a zoslabuje schopnosť regenerantov adaptovať sa neskôr na *in vivo* podmienky.

2.3.4.3.1 Uchovávanie rastlín kryokonzerváciou

Druhou možnosťou uchovávania častí rastlín *in vitro* je **kryokonzervovanie** pri ultranízej teplote, v tekutom dusíku pri $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pri tejto teplote sa zastavujú všetky metabolické aktivity v rastlinných bunkách. Princípom tohto spôsobu je teda úplné **zastavenie vývinu a rastu** rastliny – genetického zdroja, a jeho uchovanie na neobmedzene dlhú dobu, bez potrebnej akejkoľvek manipulácie (okrem dopĺňania tekutého dusíka). Uchovávanie vegetatívne rozmnožovaných rastlín kryokonzervovaním býva alternatívou pri rastlinných druhoch, ktoré sa uchovávajú v *in vitro* kultúrach, pretože systém na *in vitro* kultiváciu a regeneráciu kompletných rastlín je podmienkou pre kryokonzervačné postupy. Tých je niekoľko – pomalé zmrazovanie, vitrifikácia, enkapsulácia po vitrifikácii, enkapsulácia po dehydratácii, vitrifikácia v kvapkách, technika kryoplatničiek (Obrázok 2.30).

Kryokonzervujú sa rôzne typy **propagúl** (t. j. častí organizmu, z ktorých sa dá rastlina rozmnožiť). Môžu to byť **neorganizované** časti rastlín – kalusy, bunky z bunkovej suspenzie, peľové zrná, alebo **organizované** štruktúry – rastové vrcholy, dormantné púčiky, embryonálne osi, zygotické a somatické embryá. Hlavnú rolu v úspechu kryokonzervácii má voda obsiahnutá v bunkách a v medzibunkových priestoroch pletív, a teplota, pri ktorej nastáva tvorba ľadových kryštálov. Preto je pri zmrazovaní kritickým rozsah teplôt $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obrázok 2.30: Metódy uchovávanía rastlinných pletív na princípe kryokonzervovania (Zdroj: Mosa a kol., 2023, upravené).

Poškodeniu buniek sa v tomto rozsahu teplôt zabráňuje precízne riadenou rýchlosťou ochladzovania a zmrazovania 0,1–5 °C za minútu, až do teploty -35 °C až -40 °C. Pri **pomalom zmrazovaní** (Obrázok 2.30) sa používajú penetrujúce (napríklad glycerol, dimetylsulfoxid, etylénglykol, propylénglykol, glukóza, sacharóza, sorbitol) aj nepenetrujúce (polyméry s vysokou molekulovou hmotnosťou, napríklad polyetylénglykol) **kryoprotektanty**. Kryoprotektanty sú chemické látky, ktoré účinne dehydratujú rastlinný materiál a indukujú kryoprotektívny proces, čo chráni bunky a pletivá pred poškodením nízkou teplotou. Ak rýchlosť zmrazovania nie je príliš rýchla ani príliš pomalá, kryoprotektantmi ošetrené bunky prežijú a potom už môžu byť priamo ponorené a uložené do tekutého dusíka. Kontrolovaná rýchlosť ochladzovania bola prvou kryokonzervačnou technikou. Okrem tekutého a pevného skupenstva vody je možné kvapalinu (t. j. vodu s rozpustenými látkami) v bunkách premeniť

na sklovitý, amorfný stav, ktorý má mechanické a fyzikálne vlastnosti pevnej látky, procesom **vitrifikácie**. Vitrifikáciou sa koncentruje roztok (vodný) v bunke, zvyšuje sa jeho viskozita, čo bráni vzniku kryštálov ľadu v procese zmrazovania v bunkách aj v medzibunkových priestoroch. Vitrifikácia je veľmi vhodná v kryokonzervovaní komplexných, heterogénnych, rastlinných pletív. Tie sú najskôr ošetrené v kultivačnom médiu obsahujúcom rastové regulátory a kryoprotektanty. Nasleduje inkubácia, aj opakovaná, vo vybranom vitrifikačnom roztoku, ktorý obsahuje zmes kryoprotektantov v relatívne vysokej koncentrácii, a potom uloženie vitrifikovaných pletív do tekutého dusíka (Obrázok 2.30). Modifikovaním vitrifikačnej techniky je vitrifikácia v kvapkách (Obrázok 2.30). Vitrifikačný postup a uloženie do tekutého dusíka sa nevykoná v kryoskúmavkách, ale na pásičkoch hliníkovej fólie.

Pre kryokonzervovanie niektorých častí rastlín, zvlášť rastových vrcholov obsahujúcich meristémy, alebo somatické embryá, sú vhodné techniky ich **enkapsulácie** do alginátových kapsúl (Obrázok 2.30). Pripravené, aseptické časti rastlín (explantáty) sú vložené do roztoku alginátu sodného a spolu s roztokom sú kvapkané do roztoku chloridu vápenatého. Reakciou sa spustí polymerizácia alginátu sodného a okolo explantátu sa vytvorí sférické kapsuly s veľkosťou 4 – 5 mm, nazývané aj **syntetické (umelé) semená** (Obrázok 2.31).



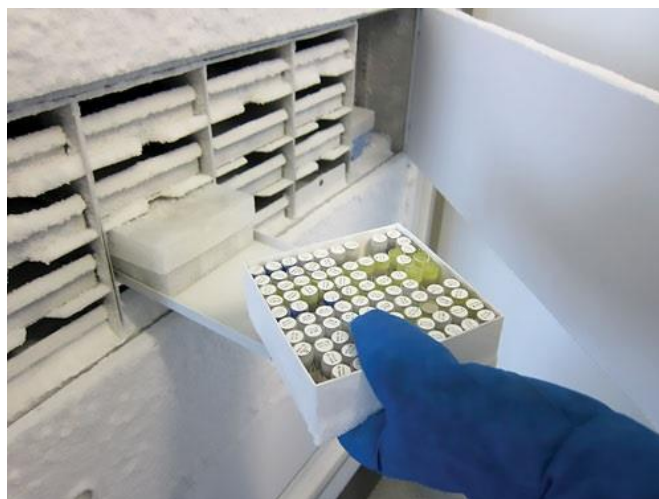
Obrázok 2.31: Enkapsulácia rastových vrcholov saturejky do alginátových kapsúl pripravených na kryokonzervovanie. A – *in vitro* kultúra rastových vrcholov, B – nodálny segment (mierka = 3 mm) a C – rastový vrchol, pripravený na enkapsuláciu, D – nodálne segmenty enkapsulované v algináte sodnom (Zdroj: Asadi a kol., 2022, upravené).

Enkapsulované časti rastlín sú najskôr inkubované v roztoku osmoprotektantu (napríklad sacharózy), alebo zmesi osmoprotektantov. Pred uložením do tekutého dusíka, sú kapsuly buď dehydratované alebo vitrifikované. Uchovávanie v tekutom dusíku už nie je časovo obmedzené. Enkapsulovanie s použitím kryoplatničiek je zlepšením a zjednodušením enkapsulačnej techniky. Kryoplatničky sú jednoduché hliníkové alebo plastové pomôcky, v ktorých sa

enkapsulácia, potom aj dehydratácia alebo vitrifikácia a uloženie do tekutého dusíka vykonajú technicky jednoduchšie.

2.3.4.4 DNA banky

Už aj súčasným, ale hlavne budúcim trendom v uchovávaní genetických zdrojov rastlín sú kolekcie izolovanej DNA. Práca s DNA je nenahraditeľná, nielen pri štúdiu rozsahu a zmien genetickej variability druhu, identifikovaní všetkých, ale zvlášť hospodársky významných génov a ostatných úsekov genómov, ale už aj pre samotné uchovávanie genetickej diverzity rastlinných druhov. Okrem živých častí rastlín, uchovávaných vo forme generatívnych orgánov alebo vegetatívnych častí rôznymi spôsobmi *in vitro*, je možné rastliny uchovávať aj vo forme ich molekúl DNA, ktoré obsahujú celú genetickú informáciu. DNA je veľmi ľahko extrahovaná, ak treba aj purifikovaná, a aj veľmi jednoducho a dlhodobo uchovateľná pri teplotách pohybujúcich sa okolo $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na krátkodobé a strednodobé skladovanie (4 – 7 rokov), alebo pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ na dlhodobé, až neobmedzene dlhé obdobie. Takto sú vytvárané banky izolovanej DNA, ktorých výhodou je obrovská skladovacia kapacita v počte uchovávaných vzoriek DNA a v extrémne malom priestore (Obrázok 2.32), bez potreby priebežnej manipulácie so vzorkami DNA.



Obrázok 2.32: Banka izolovaných DNA, uchovávaných pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Zdroj: Lishewski, 2015).

Veľmi jednoduchou a nenáročnou alternatívou k uchovávaniu izolovanej genomickej DNA, aj pri laboratórnych teplotách, je uloženie hrubého extraktu z rastlinných pletív na špeciálne pripravených papierových (celulóзовých) kartách (napríklad Whatman FTA

PlantSaver Cards, QIAcard FTA PlantSaver, FTA[®] Cards), ktoré sú schopné na seba pevne naviazať a uchovávať DNA. Priamo na karte sa rozťlačí rastlinné pletivo (Obrázok 2.33), napríklad časť listu, a extrakt nasiaknutý do papiera sa po vysušení na vzduchu, môže na karte uchovávať a archivovať pri laboratórnej teplote.



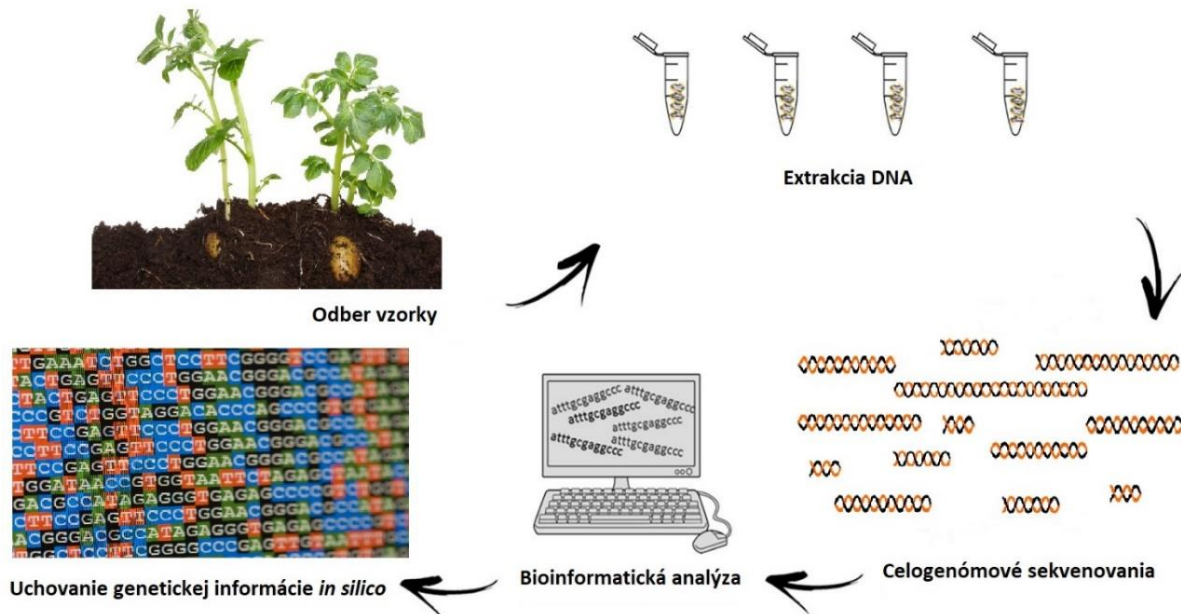
Obrázok 2.33: Roztlačenie vegetatívnej časti rastliny na FTA kartu (Zdroj: Ndunguru a kol., 2005, upravené).

Alternatívnym postupom je najskôr pripraviť jednoduchý homogénat z rastliny v extrakčnom roztoku, ten naniest' na kartu a nechať uschnúť. V budúcnosti, keď bude potrebné, sa z papiera s nasiaknutým extraktom vystrihne malý kúsok a z neho sa urobí extrakcia DNA, alebo sa iba vymyje a použije na akékoľvek analýzy.

Nevýhodou oboch prístupov uchovávania genetického zdroja vo forme DNA je to, že ešte zatiaľ nie sú k dispozícii postupy na regenerovanie kompletnej rastliny z jej DNA, teda z genetickej informácie v nej uloženej. Keď sa v budúcnosti podarí vyriešiť tento problém, veľký význam nadobudne aj ďalší spôsob uchovávania genetických zdrojov, ktorým bude uchovávanie genetického zdroja iba vo forme jeho genetickej informácie *in silico* (Obrázok 2.34).

V súčasnosti rastlinná genomika dovoľuje prečítať kompletne genetickú informáciu uloženú v nukleotidovej sekvencii aj veľkých molekúl rastlinnej jadrovej DNA a uchovávať ju ako informáciu v elektronických databázach, študovať a využívať ju.

Takéto elektronické databázy sa už tvoria, naplňajú dátami a využívajú sa mnohými spôsobmi, napríklad na štúdium rozsahu a zmien genetickej diverzity, taxonomické štúdie, mapovania genómov, ale aj na praktické šľachtenie rastlín pomocou identifikovaných molekulárnych (DNA) markerov a editovaní génov a genómov.



Obrázok 2.34: Princíp *in silico* uchovávania genetickej diverzity rastlín (Zdroj: Rubiola a kol., 2020, upravené).

2.3.4.5 Produkcia rastlinných sekundárnych metabolitov

Okrem základných primárnych metabolitov (sacharidov, lipidov, bielkovín a ďalších), vyššie rastliny sú schopné syntetizovať široké spektrum zlúčenín s nízkou molekulovou hmotnosťou – **sekundárne metabolity**. Ich množstvo a koncentrácia sú často nízke, silno závislé od fyziologického a vývinového štádia rastliny a podmienok prostredia, v ktorom vegetujú. Aj keď sa zdá, že sekundárne metabolity rastlín nemajú žiadnu úlohu v udržiavaní základných životných procesov rastlín, majú dôležitú úlohu v interakcii rastliny s jej prostredím, s biotickými faktormi (živočíšnymi škodcami, mikrobiálnymi patogénmi, inými rastlinami a ďalšími), s abiotickými faktormi (vysokou alebo nízkou teplotou, suchom, nadbytkom vody, zložením pôdy a ďalšími), ale sú aj atraktantmi pre opel'ovače a majú aj ďalšie funkcie. Ich atraktivita pre človeka spočíva v tom, že mnohé, ak nie všetky, majú dôležité farmaceutické, medicínske, kozmetické, potravinárske, chemické a ďalšie využitie.

Na základe biosyntetických dráh sa sekundárne metabolity rozdeľujú do troch veľkých skupín molekúl - terpény, alkaloidy a fenolické látky. Môžu byť produkované z rastlín *in vivo*, z vegetatívnych častí buď voľne rastúcich a zberaných rastlín, alebo zámerne pestovaných rastlín, rôznymi extrakčnými postupmi. V týchto prípadoch je však nevýhodou vysoká variabilita v ich obsahu a koncentrácii. Alternatívou je ich **biotechnologická produkcia v *in***

in vitro podmienkach. Z explantátov, odobratých z vegetatívnych častí rastliny, sa dajú zakladať *in vitro* orgánové, pletivové, alebo bunkové kultúry v tekutých alebo na pevných kultivačných médiách, za kontrolovaných podmienok, v sterilnom prostredí. Ide o produkciu rovnakých sekundárnych metabolitov, ktoré rastliny syntetizujú prirodzene. V *in vitro* kultúre sa však účinnejšie môže zvyšovať ich syntéza prostredníctvom stimulácie buniek chemickými alebo fyzikálnymi faktormi – elicitorami. Ich produkcia v kultúre *in vitro* má dve samostatné fázy, s rôznymi kultivačnými požiadavkami. Prvou fázou je nárast budúcej produkčnej rastlinnej biomasy a druhou je syntéza sekundárnych metabolitov v takto produkovanej biomase.

Najjednoduchšou formou aplikovania *in vitro* kultúr pre produkciu sekundárnych metabolitov je **klonálna mikropropagácia** (kapitola Mikropropagácia rastlín). V *in vitro* kultúre sa neprodujú sekundárne metabolity, cieľom je namnožiť z produkčnej materskej rastliny veľký počet rastlín (klonov), ktoré sa budú pestovať *in vivo* a z nich extrahovať sekundárne metabolity. To sa dá urobiť veľmi rýchlo, na malom priestore a v krátkom čase. V pripravených a pestovaných klonoch by produkcia sekundárnych metabolitov mala byť uniformnejšia.

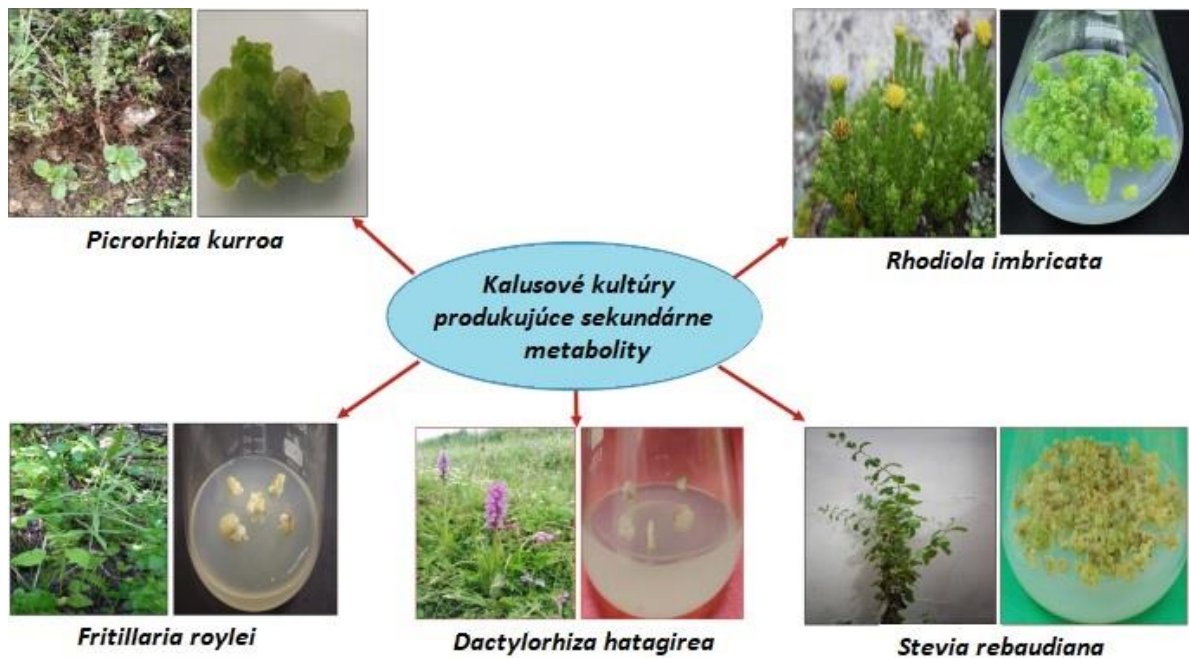
2.3.4.5.1 Produkcia sekundárnych metabolitov kalusovými kultúrami

Pletivovou kultúrou *in vitro*, ktorá sa dá využiť na produkciu rastlinných sekundárnych metabolitov, je aj **kalusová kultúra**. Obrázok 2.35 prezentuje päť rastlinných druhov, pri ktorých sú kalusové kultúry produkčnými systémami *in vitro* pre viaceré farmaceuticky, medicínsky a potravinársky zaujímavé sekundárne metabolity. Je medzi nimi, napríklad rozchodnica ružová (*Rhodiola imbricata* Edgew.), ktorá produkuje salidroside a tyrosol, ktoré majú antidepresívny, adaptogénny, antistresový, kardioprotektívny, hepatoprotektívny, imunomodulačný a ďalšie účinky. Stévia cukrová (*Stevia rebaudiana* Betoni) produkuje prírodné sladidlo steviozid, ktoré môže byť nielen alternatívou sacharózy, ale aj účinný pri profylaxii kardiovaskulárnych ochorení.

Kalus je špecifický druh heterogénneho pletiva vytvoreného dediferenciáciou pôvodne diferencovaných buniek explantátu v *in vitro*, najmä s pomocou rastových regulátorov pridaných do kultivačného média, hlavne auxínov, prípadne ich kombinácie s cytokinínmi (Obrázok 2.36).

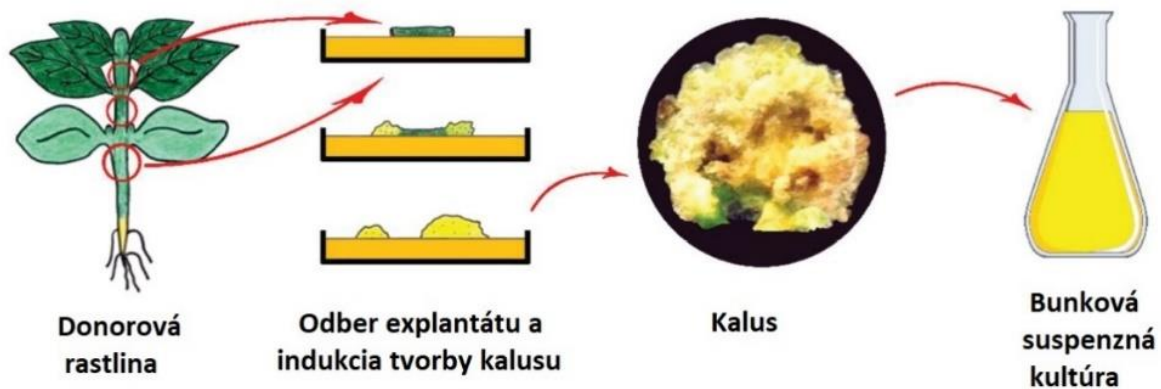
Kalus sa v *in vitro* kultúre sa tvorí ako výsledok neorganizovaného rastu buniek na povrchu explantátu kultivovaného na pevnom kultivačnom médiu. Na primárnom kaluse, t. j. kaluse vytvorenom priamo na explantáte, môže byť produkovaný sekundárny kalus, ktorého

bunky sa môžu opakovane rozmnožovať a môže byť udržiavaný ako dlhodobo rastúca kalusová kultúra *in vitro*. Rastlinná bunka si v *in vitro* kultúre, vďaka svojej totipotencii, zachováva aj schopnosť produkovať chemické látky, ktoré sa nachádzajú v materskej rastline, z ktorej bol odobraný explantát. Pre produkciu sekundárnych metabolitov sa tvorba kalusu indukuje zvyčajne z tej časti rastliny, v ktorej je biosystéza a kumulácia predmetného sekundárneho metabolitu najvyššia. Najvhodnejší je dlhodobo a stabilne kultivovateľný a trvalo rastúci neembryogénny a nemorfogénny kalus, v ktorom si homogénna masa kalusových buniek zachováva schopnosť produkcie sekundárnych metabolitov. Kompetencia (schopnosť) buniek regenerovať celú rastlinu, buď embryogénnou alebo organogénnou cestou, v prípade produkcie sekundárnych metabolitov, nie je žiadúca.



Obrázok 2.35: Produkcia sekundárnych metabolitov v kalusových kultúrach niektorých rastlinných druhov (Zdroj: Rattan a kol., 2022, upravené).

Z pohľadu produkčného potenciálu majú kalusové kultúry viaceré nevýhody, napríklad pomalý nárast ich biomasy, náchylnosť na zmeny produktivity v dôsledku fenoménu somaklonálnej variability, slabú možnosť elicitovania buniek kalusu prostredníctvom pevného kultivačného média a ďalšie.



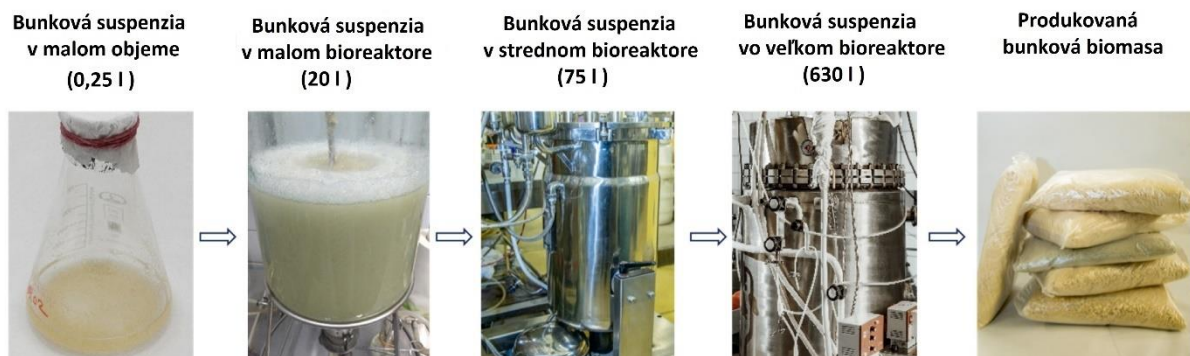
Obrázok 2.36: Postup založenia kalusovej kultúry a z nej bunkovej suspenznej kultúry (Zdroj: Ozyigit a kol., 2023, upravené).

2.3.4.5.2 Produkcia sekundárnych metabolitov bunkovými suspenznými kultúrami

Po založení kalusových kultúr je možné pokračovať v založení rastlinných bunkových suspenzných kultúr *in vitro*. V porovnaní s kalusovými kultúrami, sú bunkové suspenzné kultúry obyčajne schopné produkovať väčšie množstvo buniek a aj syntetizovať viac sekundárnych metabolitov, čo však nie je pravidlom. Sekundárne metabolity sú z buniek z bunkových suspenzných kultúr zvyčajne jednoduchšie extrahovateľné.

Bunkové suspenzné kultúry sa zvyčajne zakladajú prenesením už vytvoreného, optimálne rozpadavého kalusu, do tekutého kultivačného média (Obrázok 2.36). Kultivujú sa za kontinuálneho premiešavania, v laboratórnych podmienkach na trepačkách s horizontálnym, orbitálnym, alebo iným pohybom. Bunky kalusu by sa pritom mali čo najviac rozptýliť v tekutom médiu a vytvoriť homogénnu bunkovú suspenziu, ideálne zloženú z individuálnych buniek, prípadne obsahujúcu len malé bunkové zhľuky. Rastlinné bunky v bunkovej suspenzii, v tekutom kultivačnom médiu, rastú a rozmnožujú sa oveľa rýchlejšie a mohutnejšie než v kalusoch, čo si vyžaduje častejší prenos buniek do čerstvého média. Tekuté médium poskytuje výhodu možnosti účinného elicitovania buniek pomocou rôznych látok. Kultivácia bunkových suspenzných kultúr má veľkú výhodu hlavne v možnosti meniť objem kultivačného média a produkujúcich rastlinných buniek. Z menších objemov, zvyčajne v Erlenmayerových bankách, sa môže produkcia posúvať do bioreaktorov s väčšími objemami (Obrázok 2.37). Rastlinné bunky sú však náročné na podmienky kultivácie v bioreaktoroch, zvlášť na spôsob miešania a prevzdušňovania, pretože sú veľmi citlivé na mechanické poškodenie. Riešením je náhrada mechanického miešania za miešanie jemným vŕháním sterilného vzduchu.

Cieľom pri produkcii, prostredníctvom bunkových suspenzných kultúr, je získať takú bunkovú líniu, ktorá je geneticky stabilná, vysoko produkčná, dlhodobo udržateľná a kultivovateľná aj vo veľkých objemoch v bioreaktoroch.

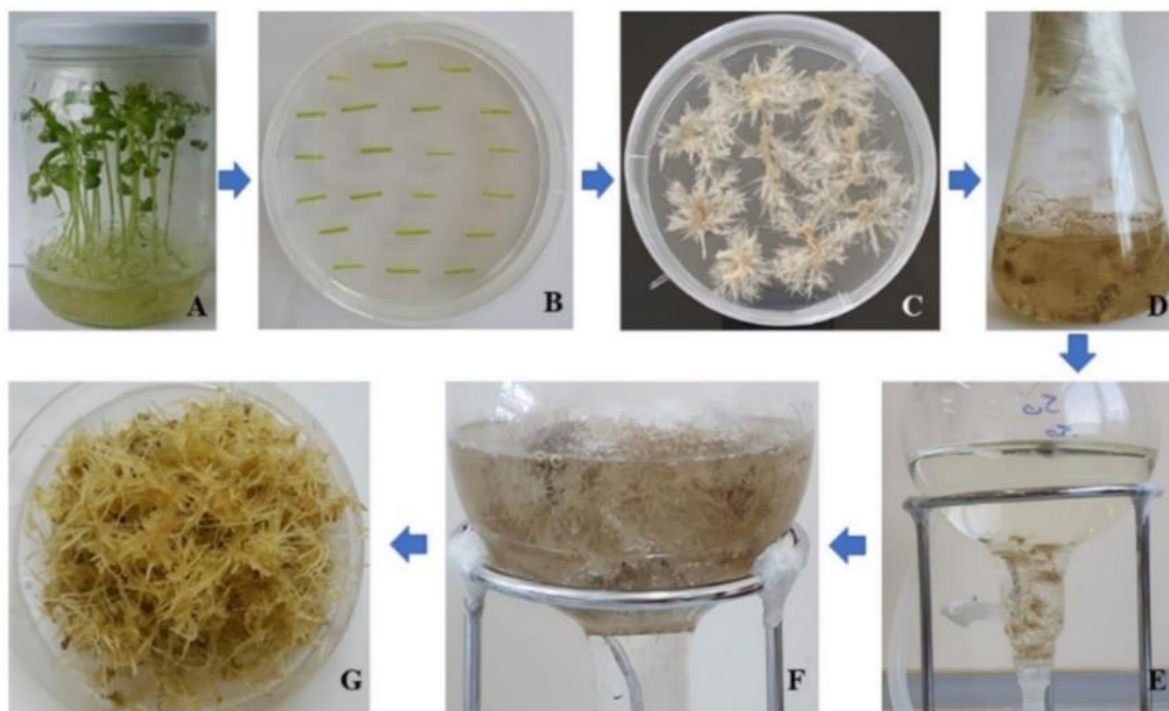


Obrázok 2.37: Postupné zväčšovanie objemu kultivácie rastlinných bunkových suspenzií, od Erlenmayerovej banky po veľkoobjemový bioreaktor (Zdroj: Titova a kol., 2024, upravené).

2.3.4.5.3 Produkcia sekundárnych metabolitov orgánovými kultúrami

Výhodnou alternatívou k produkcii sekundárnych metabolitov z rastlín *in vivo* sú *in vitro* orgánové kultúry. **Výhonkové kultúry**, v spojení s mikropropagáciou *in vitro*, sú spomenuté v inej kapitole. Ďalším orgánom a kultúrou z neho odvodenou sú **koreňové kultúry**. Vhodné sú hlavne vtedy, keď rastlina produkuje a akumuluje žiadaný sekundárny metabolit v koreňoch. Koreňové kultúry *in vitro* sa dajú založiť celkom jednoducho, najľahšie z koreňov rastlín už udržiavaných v *in vitro* kultúre. Z koreňov sú odobraté koreňové špičky alebo segmenty s koreňovými vláskami, a kultivujú sa v tekutom médiu, za stáleho miešania.

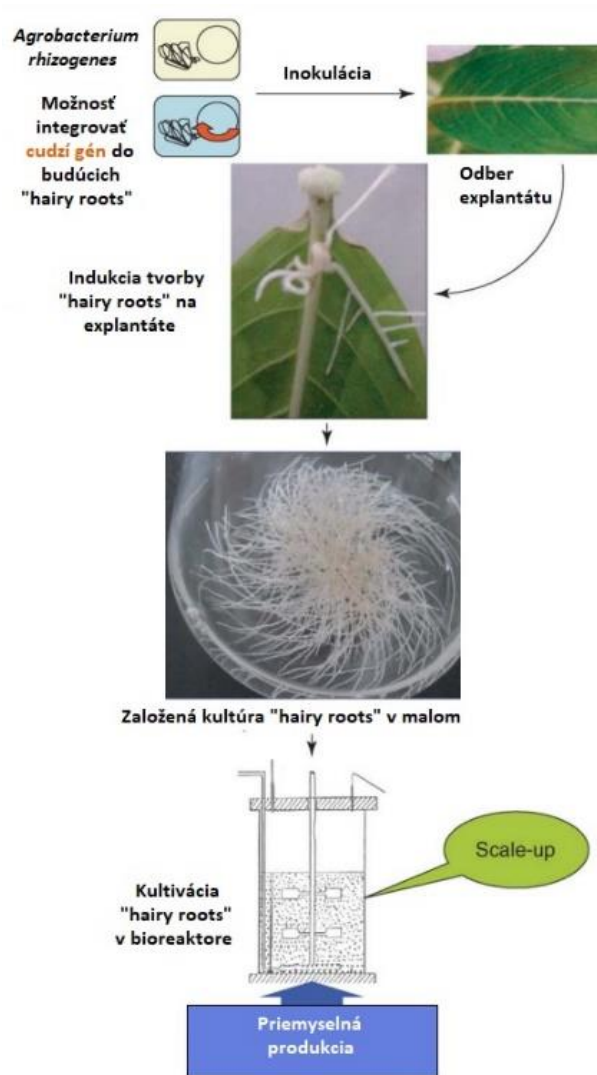
Veľmi podobným typom je *in vitro* kultúra **adventívnych koreňov**. Zakladá sa podobne, ale z adventívnych koreňov. To sú korene indukované *in vitro* na iných typoch explantátov (segmentoch listov, stoniek, hypokotýlov a ďalších), s pomocou rastových regulátorov (hlavne auxínov) v pevnom kultivačnom médiu. Adventívne korene sa zvyčajne indukujú z časti rastliny, v ktorej je syntéza a akumulácia sekundárneho metabolitu najvyššia. Z novovytvorených adventívnych koreňov sa založí kultúra v tekutom médiu, v ktorom adventívne korene voľne rastú, zvyšujú svoj objem a hmotnosť koreňovej biomasy (Obrázok 2.38).



Obrázok 2.38: Založenie kultúry adventívnych koreňov bazalky pravej: donorové rastliny (A), segmenty hypokotylov (B), indukcia tvorby adventívnych koreňov na hypokotyloch (C), proliferácia adventívnych koreňov v tekutom médiu (D), kultivácia adventívnych koreňov v jednoduchom bioreaktore (E-F), biomasa adventívnych koreňov (G) (Zdroj: Karataş, 2022).

Veľmi vhodným a často používaným typom orgánovej kultúry *in vitro* na produkciu sekundárnych metabolitov vo väčších objemoch aj v bioreaktoroch, sú tzv. „**hairy root**“ kultúry. „Hairy roots“ sú morfológicky veľmi zvláštne korene narastené na rastlinách po infikovaní s natívnou pôdnou baktériou *Agrobacterium rhizogenes* (novší názov *Rhizobium rhizogenes*). Táto baktéria je schopná do rastliny *in vivo*, aj do explantátu *in vitro*, introdukovať svoje gény zodpovedné za produkciu rastových hormónov. Ich expresia v rastline spustí syntézu rastových hormónov, ktoré vyvolajú vznik a rast týchto zvláštnych koreňov – tzv. „hairy roots“ (Obrázok 2.39). „Hairy roots“ majú veľmi rýchly, hormonálne nezávislý rast, intenzívne laterálne vetvenie, genetickú stabilitu, absenciu geotropizmu a zachovanú schopnosť produkovať sekundárne metabolity.

Pri kultivovaní v bioreaktoroch sú „hairy root“ kultúry citlivé na mechanický stres, preto sa v nich používajú prídavné konštrukčné prvky, napríklad mriežky, sieťky, kliečky, na ktorých sa „hairy roots“ zachytia a v tekutom kultivačnom médiu rastú (Obrázok 2.40) a produkujú koreňovú biomasu alebo v koreňoch obsiahnutý žiadaný metabolit.

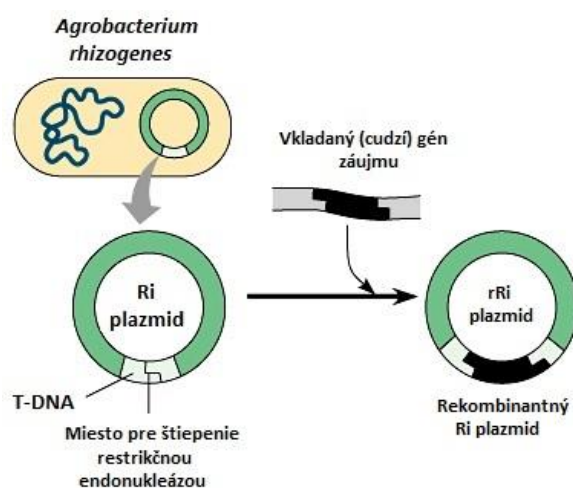


Obrázok 2.39: Indukcia tvorby „hairy roots“ na listových explantátoch pomocou *Agrobacterium rhizogenes* a kultúra „hairy roots“ produkujúcej sekundárne metabolity v malom aj väčšom objeme (scale-up) (Zdroj: Guillon a kol., 2006).



Obrázok 2.40: Bioreaktor s vnútornou konštrukciou na kultiváciu „hairy roots“ (v tomto prípade zo žejššenu amerického) (Zdroj: Kochan a kol., 2017).

„Hairy roots“ kultúry patria medzi najobľúbenejšie *in vitro* kultúry na produkciu sekundárnych metabolitov, pretože „hairy roots“ produkujú často rovnaké, alebo väčšie množstvo sekundárnych metabolitov, ako materská rastlina pestovaná v pôde. Navyše, baktéria *Agrobacterium rhizogenes* môže byť využitá aj ako evolučne vyvinutý, biologický vektor na transfer a integrovanie iných, ľubovoľných cudzích génov do rastliny, ktoré sa technikami rekombinantnej DNA *in vitro* vložia do T-DNA jeho Ri-plazmidu (Obrázok 2.41).



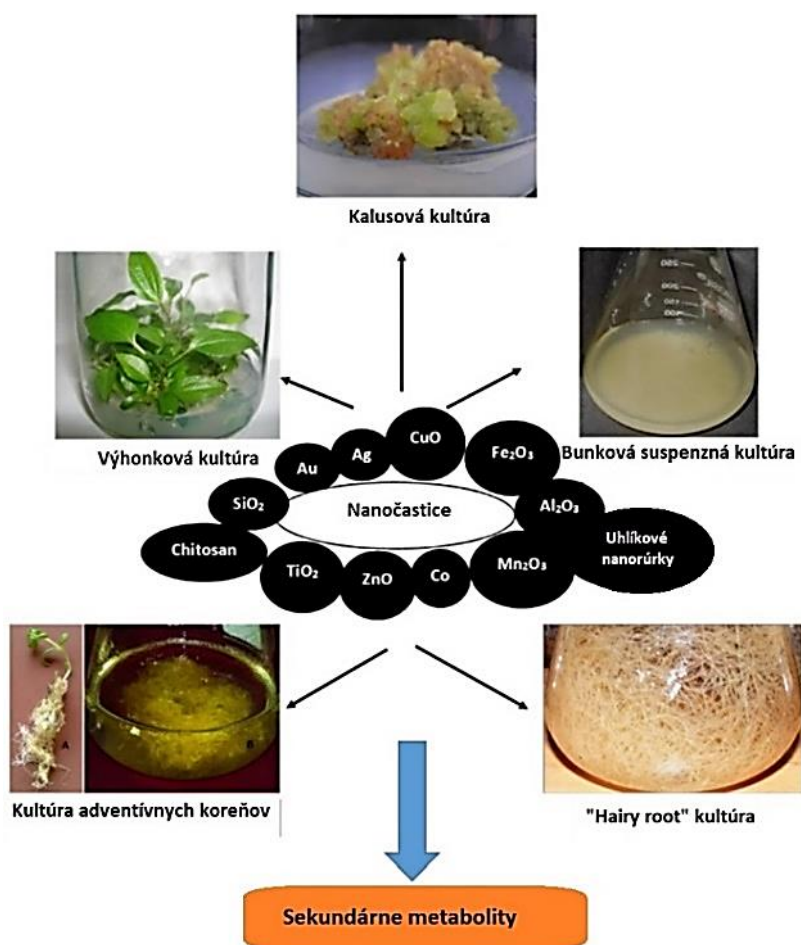
Obrázok 2.41: Príprava rekombinantného Ri plazmidu *Agrobacterium rhizogenes*_(Zdroj: Campbell a kol., 2005, upravené).

Geneticky upravená (geneticky modifikovaná) rekombinantná baktéria *Agrobacterium rhizogenes*, po infikovaní rastliny, respektíve explantátu z rastliny *in vitro*, iniciuje vývoj a rast „hairy roots“, ale už transgénnych, geneticky modifikovaných (Obrázok 2.39). Takáto „hairy root“ kultúra *in vitro* sa stáva producentom už nielen vlastných sekundárnych metabolitov, ale aj heterologických bielkovín kódovaných cudzími génmi.

2.3.4.5.4 Elicitácia produkcie sekundárnych metabolitov v *in vitro* kultúrach

Elicitory stimulujú a zvyšujú produkciu sekundárnych metabolitov a môžu aj spúšťať produkciu tých, ktoré sa bežne v daných rastlinách nesyntetizujú. Princíp používania všetkých typov elicitorov v *in vitro* kultúrach rastlín je rovnaký. Aplikujú sa v optimálnej koncentrácii do kultivačného média (Obrázok 2.42). Ich pôsobenie *in vitro* je efektívnejšie v tých kultúrach, v ktorých sa kultivuje v tekutých kultivačných médiách, teda hlavne v bunkových suspenzných a všetkých typoch koreňových kultúr (vrátane „hairy root“). V tekutom médiu je najlepší prístup elicitora k bunkám kultivovanej časti rastliny. Menej účinná, ale vykonateľná je aj

aplikácia elicitorov do pevných kultivačných médií, napríklad pri kalusových a výhonkových kultúrach, kde je však prístup elicitora limitovaný viac-menej iba do buniek, ktoré sú v priamom kontakte s kultivačným médiom. **Elicitácia** je navodenie chemického alebo fyzikálneho stresu aplikovaním rôznych biotických a abiotických elicitorov. Elicitory pôsobia ako signály a elicítácia začína prijatím signálu receptormi špecifickými pre elicitor, prítomnými na rastlinnej bunke. Po iniciácii signálnej transdukčnej kaskády sa mení (zvyšuje) úroveň expresie rôznych regulačných transkripčných faktorov a génov zúčastnených v metabolických dráhach syntézy a akumulácii sekundárnych metabolitov. Biotickými elicitorami sú, napríklad kyselina jasmónová, kyselina salicylová, chitosan, rôzne polysacharidy, rastové hormóny, proteínové extrakty, enzýmy, sterilizované mycélium húb, hrubé alebo purifikované extrakty z húb, baktérií, kvasiniek, rias a mnohé ďalšie. Abiotickými elicitorami sú, napríklad soli ťažkých kovov, vysoká alebo nízka teplota, pH, sucho, UV svetlo, svetlo s rôznou vlnovou dĺžkou, elektrické pole, rôzne typy nanočastíc (Obrázok 2.42) a ďalšie.



Obrázok 2.42: Schéma elicítácie produkcie sekundárnych metabolitov v *in vitro* kultúrach rastlín pomocou nanočastíc (Zdroj: Lala, 2021, upravené).

Pri voľbe elicitáčnej stratégie treba zvažovať mnoho faktorov, najmä typ elicitora, jeho koncentráciu, trvanie elicitácie, rastlinný druh, typ rastlinnej kultúry *in vitro*, zloženie a skupenstvo kultivačného média, prítomnosť alebo neprítomnosť regulátorov rastu, vek a vývinové štádium kultúry *in vitro* v čase elicitácie a ďalšie.

Aplikovanie exogénnych elicitorov nemusí iba zvyšovať produkciu žiadaného sekundárneho metabolitu, ale môže aj indukovať produkciu nových metabolitov. Navyše, elicitácia poskytuje v kontrolovaných podmienkach aj modelový systém na pozorovanie stresovej reakcie rastlinných buniek na moduláciu génovej transkripcie, syntézu bielkovín a metabolitov súvisiacich s biosyntézou sekundárnych metabolitov.

2.3.5 Genetické modifikácie rastlín

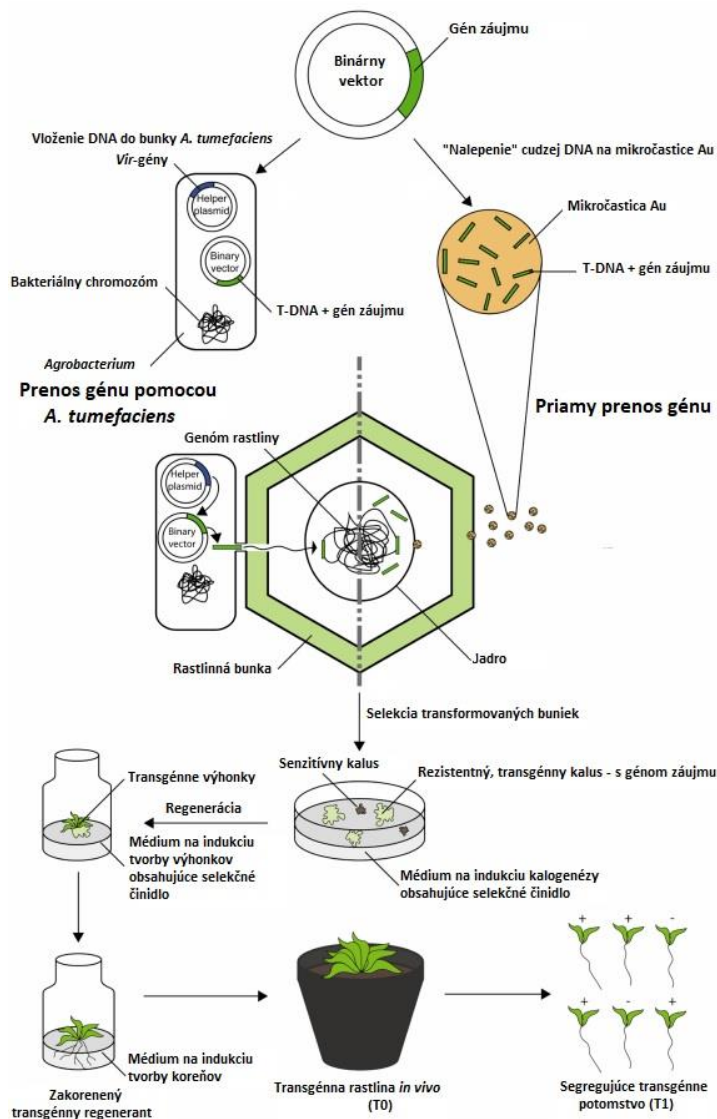
Už v 70. rokoch 20. storočia sa objavili techniky a technológie pre genetické úpravy rastlín na bunkovej úrovni, s potenciálom spolupracovať s tradičnými postupmi šľachtenia rastlín. Tradičné šľachtenie rastlín, založené na pohlavnom krížení dvoch želaných rodičov a selekcii v rámci potomstva, prinieslo dovtedy nepredstaviteľné zvýšenie produktivity a kvality pestovaných poľnohospodárskych plodín. Prekážkou ďalšieho zlepšovania však bola nemožnosť krížiť druhy navzájom. Navyše, krížením dvoch rodičov sa síce skombinujú žiadané znaky a vlastnosti, ale zároveň dochádza aj k zmiešaniu iných, čo treba následne riešiť časovo náročným procesom selekcie v potomstve počas niekoľkých generácií. Cieľom genetických modifikácií bolo prekonať a obísť tieto problémy pomocou postupov a techník, ktoré by umožnili iba prenos vybraných, konkrétnych génov a úsekov DNA (nezávisle od druhu), bez toho, aby došlo k narušeniu genetického usporiadania elitného genotypu prijímajúcej rastliny. Preteky vedeckých tímov k oznámeniu o prvej vytvorenej geneticky modifikovanej rastline (GMR) sa skončili 18. januára 1983. V ten deň bolo na 15. Zimnom sympóziu „*Advances in Gene Technology: Molecular Genetics of Plants and Animals*“ v Miami Beach, súčasne tromi vedeckými tímami oznámené, že sa im nezávisle na sebe, podarilo pripraviť prvé geneticky modifikované rastliny, teda rastliny s introdukovaným cudzím génom. Tento vysoko sofistikovaný postup genetickej modifikácie kultúrnych rastlín, ktorý je nazývaný aj ako genetická transformácia, technológia rekombinantnej DNA, genetické inžinierstvo, molekulárne šľachtenie, či precízne šľachtenie, nie je nijako obmedzený sexuálnou kompatibilitou, respektíve nekompatibilitou medzi rastlinnými druhmi.

Vývoj v pletivových kultúrach rastlín *in vitro* a ich spojenie s genetickým inžinierstvom otvorili úplne nové možnosti na zavedenie cudzej genetickej informácie (DNA) do rastlinných buniek, čím sa začala éra tvorby, testovania a komerčného pestovania geneticky modifikovaných plodín, ale aj produkcie rekombinovaných bielkovín v GMR, s veľmi širokým spektrom ich aplikácií, od potravinárstva až po humánnu medicínu.

Geneticky modifikovaná rastlina (GMR) je taká rastlina, ktorej genetický materiál bol zmenený spôsobom, ktorý sa prirodzene pri pohlavnom rozmnožovaní a prirodzenej rekombinácii nevyskytuje. Takto sú GMR a každý **geneticky modifikovaný organizmus** (GMO) definované v slovenskej legislatíve (Zákon č. 151/2002 Z. z. o používaní genetických technológií a geneticky modifikovaných organizmov v znení neskorších predpisov). Podľa rovnakého zákona sa GMR tvoria génovými metódami a génovými technikami. Sú nimi konkrétne metódy a techniky, ktorými sa použitím nosiča **vnáša genetický materiál** jedného organizmu do genetického materiálu iného organizmu, alebo sa **odníma** alebo **mení časť** prirodzeného **genetického materiálu organizmu**, a ktorých výsledkom je GMO/GMR.

Prvým krokom v príprave GMR je vnesenie (vlozenie, introdukovanie, prenos) genetického materiálu, jedného alebo niekoľkých génov či úsekov DNA do rastlinnej bunky, z ktorej treba regenerovať kompletnú GMR, zvyčajne so stabilne sa prejavujúcim cudzím génom (transgénom). GMR sú pripravované pomocou biologických a fyzikálnych techník. Kľúčovými sú dve – prenos génov sprostredkovaný pôdnou baktériou *Agrobacterium tumefaciens* a priamy prenos génov, tzv. **nastreľovaním génov** (Obrázok 2.43).

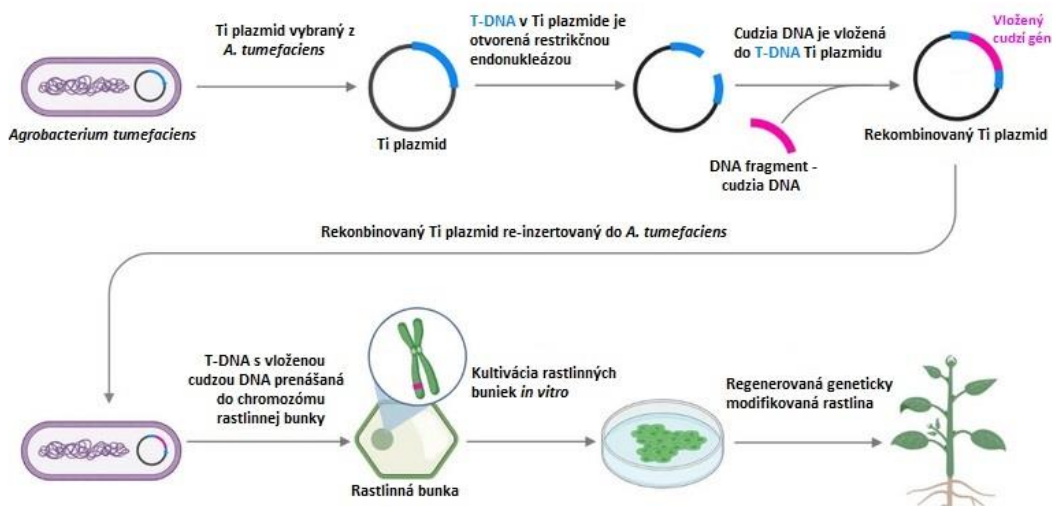
Oba tieto, a aj ďalšie postupy tvorby GMR, si vyžadujú mať pripravený systém na regeneráciu rastlín v *in vitro* kultúre, z toho typu explantátu, do ktorého buniek sa vkladala cudzia DNA. Regenerácia geneticky modifikovanej (transgénnej) rastliny môže prebiehať priamou či nepriamou organogenezou, či somatickou embryogenezou. Každá má výhody aj nevýhody. Ak prenos cudzej DNA do rastliny prebehol úspešne, vnesený genetický materiál (gén) sa prepisuje do RNA, tá sa prekladá do poradia aminokyselín príslušnej, cudzej (transgénnej) bielkoviny, ktorá má GMR priniesť novú vlastnosť. Do rastliny môžu byť prenášané a vkladané nové kombinácie génov a regulačných sekvencií jej vlastných alebo pochádzajúcich z rovnakého druhu – **inragenóza**, alebo nezmenené, pôvodné gény s regulačnými sekvenciami vlastné alebo pochádzajúce z príbuzného, krížiteľného druhu – **cisgenóza**, alebo gény a regulačné sekvencie cudzie, z nepríbuzného a nekrížiteľného druhu – **transgenóza**.



Obrázok 2.43: Dve kľúčové techniky na prípravu GMR – prenos génov sprostredkovaný baktériou *Agrobacterium tumefaciens* (vľavo) a priamy prenos génov tzv. “nastreľovaním” génov (biolisticky) (vpravo) (Zdroj: Anami a kol., 2013, upravené).

2.3.5.1 Systém *Agrobacterium tumefaciens*

Prvá z kľúčových techník prípravy GMR využíva biologický vektor, ktorým je baktéria *Agrobacterium tumefaciens*. Využíva sa evolučne vyvinutá, teda bežne v prírode sa vyskytujúca schopnosť tejto pôdnej baktérie. Je schopná časť svojej DNA vyčleniť, transportovať do jadrového genómu rastlinnej bunky a tam túto DNA integrovať do jadrovej (chromozomálnej) DNA. Je to biologická, nepriama metóda genetickej modifikácie rastlín, pretože táto baktéria môže fungovať ako prenášač nielen svojej, ale aj cudzej DNA, ktorá je vložená do špecifického úseku jej **Ti plazmidu**, ktorou je v Ti plazmide **T-DNA** (Obrázok 2.44).



Obrázok 2.44: Systém *Agrobacterium tumefaciens* – od prípravy rekombinovaného Ti plazmidu, po integrovanie T-DNA s cudzou DNA do chromozómu rastlinnej bunky (Zdroj: MicrobeWiki, https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Agrobacterium_tumefaciens_and_genetic_engineering, 2024, upravené).

Natívny Ti plazmid sa najskôr izoluje z baktérie *A. tumefaciens*, jeho T-DNA sa v *in vitro* podmienkach otvorí restriktívnou endonukleázou, do nej sa vloží cudzia DNA (napríklad gén), plazmid sa uzatvorí a už rekombinovaný Ti plazmid sa vráti späť do baktérie *A. tumefaciens*. Baktériou, už rekombinovanou (geneticky modifikovanou), sa infikuje rastlinné pletivo (spolu sa kultivujú) a do buniek sa špecifickým mechanizmom integruje T-DNA, už aj s cudzou DNA. Baktéria *A. tumefaciens* má prostriedky (viaceré gény a nimi kódované bielkoviny) a mechanizmus na prenos svojej T-DNA do jadra rastlinnej bunky, kde jej v integrovaní do chromozomálnej DNA pomôže aj samotná rastlina. Zo selektovaných, geneticky modifikovaných rastlinných buniek sa s pomocou *in vitro* kultúr regenerujú kompletne GMR (Obrázok 2.44). Genetická transformácia rastlín sprostredkovaná biologickým vektorom *A. tumefaciens* je vysoko účinná, jednoduchá a použiteľná na genetickú transformáciu veľkej väčšiny dvojkľúčolistových a niekoľkých jednokľúčolistových rastlín.

2.3.5.2 Biolistická technika

Väčšina jednokľúčolistových rastlín sa nedá prirodzene infikovať s *A. tumefaciens*. Preto bola vyvinutá **biolistická technika**, čo je fyzikálna metóda prenosu genetického materiálu do rastlinnej bunky. Jej podstatou je tzv. „nastreľovanie“ alebo „bombardovanie“ rastlinných

buniek mikroprojektilmi (najčastejšia mikročasticami zlata, prípadne volfrámu), na ktorých je naviazaná cudzia DNA. Biolistická technika sa stala druhou kľúčovou technikou. K nej potrebnými prístrojmi sú tzv. „génová puška“ alebo „génová pištoľ“ (Obrázok 2.45).

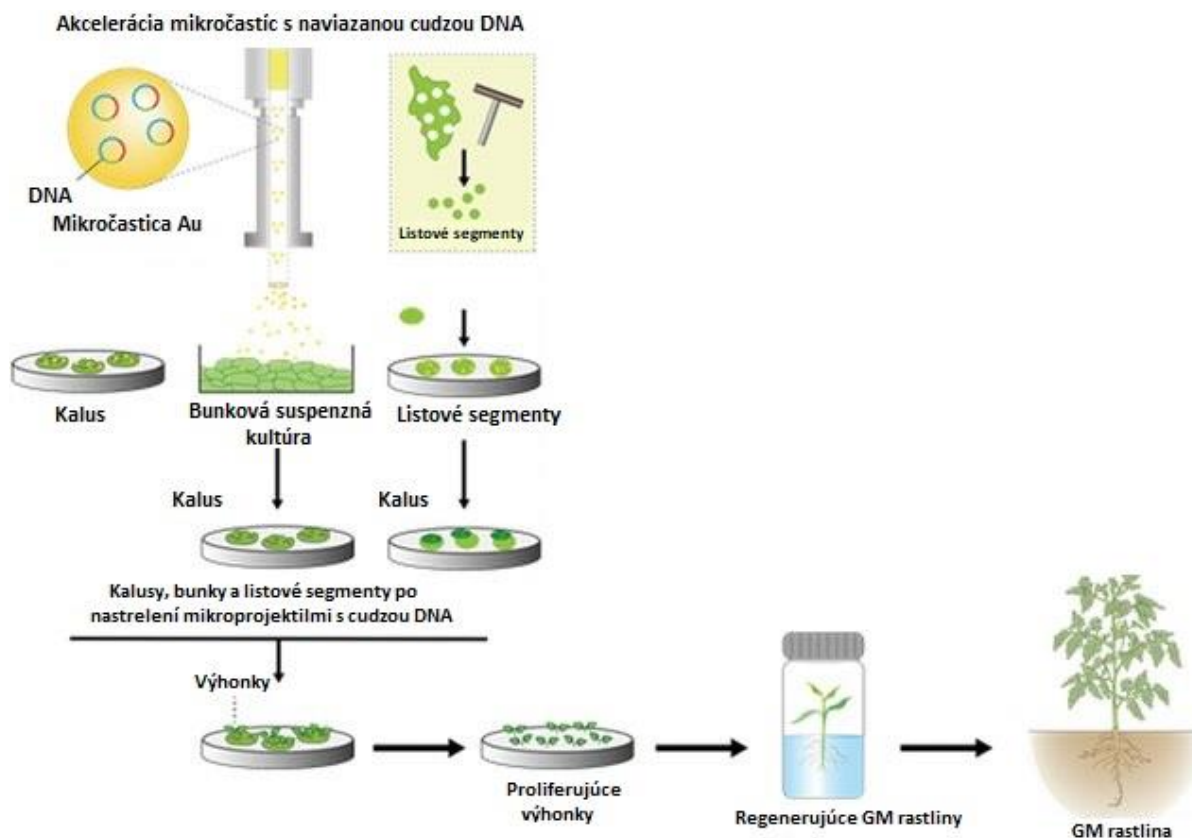


Obrázok 2.45: Tzv. „génová puška“ (vľavo), resp. „génová pištoľ“ (vpravo) pre biolistickú prípravu GMR (Zdroj: Bio-Rad Laboratories, Inc., https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5443.pdf, 2024, upravené).

„Génová puška“ je zariadenie, ktorým sú v sterilnom prostredí a vysokým tlakom plynu (obvyčajne hélia) akcelerované kovové mikročastice s naviazanou cudzou DNA, ktorými sa bombardujú cieľové rastlinné bunky v explantátoch umiestnených v sterilnej komore prístroja (Obrázok 2.46). Kovové mikročastice prechádzajú bunkami, pričom uvoľňujú na nich naviazanú DNA. Tzv. „génová pištoľ“ je v princípe to isté, ale používa sa v nesterilnom prostredí. Cudzia DNA sa nastreľuje priamo do kompletných rastlín, napríklad do listov rastlín pestovaných v substráte.

Na rozdiel od transformácie rastlín sprostredkovanej baktériou *A. tumefaciens*, biolistická technika je nezávislá od receptivity rastlinného druhu alebo genotypu. Biolistický prístup poskytuje príležitosť vnieŕ do rastlinnej bunky aj veľmi veľké fragmenty DNA. Ďalšou výhodou je, že pomocou kovových mikročastíc je možné geneticky modifikovať nielen jadrovú DNA, ale aj chloroplastové a mitochondriálne genómy.

Používa sa aj kombinácia techník *A. tumefaciens* a biolistiky, kedy sú na mikroprojektily zlata naviazané bunky baktérie *A. tumefaciens*. Kombinujú sa výhody efektívneho biolistického transferu kovovými mikroprojektilmi s eleganciou a presnosťou mechanizmu integrovania cudzej DNA prostredníctvom T-DNA *A. tumefaciens*. Táto technika sa nazýva **agrolistika**.



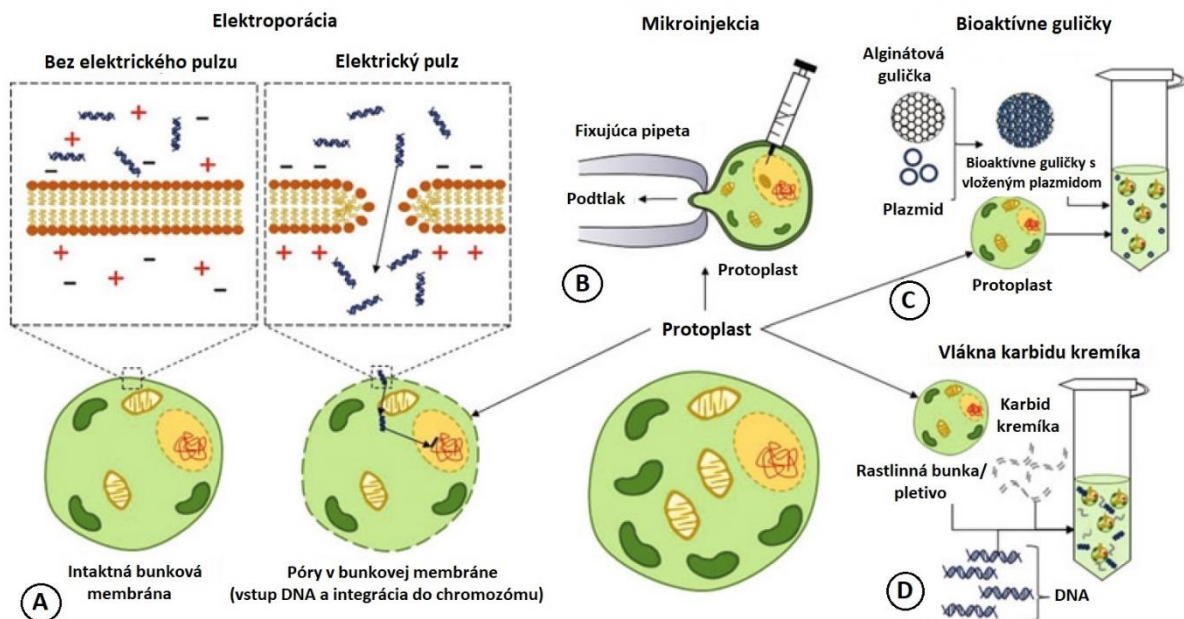
Obrázok 2.46: Postup genetickej transformácie rastlín (kalusov, buniek, listov) prostredníctvom bombardovania kovovými mikročasticami s naviazanou cudzou DNA a regenerácia GMR (Zdroj: Yan a kol., 2022, upravené).

2.3.5.3 Prenos cudzích génov do protoplastov

Na prenos cudzej DNA do rastlinných buniek sa využívajú aj protoplasty vytvorené z rastlinných buniek. Do protoplastov sa cudzia DNA introdukuje elektroporáciami, mikroinjekciami, pomocou vlákien karbidu kremíka alebo bioaktívnych guľčiek (Obrázok 2.47). Po odstránení bunkovej steny vstupuje cudzia DNA cez cytoplazmatickú membránu do vnútra bunky cez dočasne vytvorené póry elektrickým prúdom, iónmi vápnika, či abrazívnymi vláknami, alebo po prepichnutí mikroinjekciou. Ďalšie techniky využívajú na prenos cudzej DNA do protoplastov lipozómy, nanočastice, laserový lúč, ultrazvuk, alebo špecifické peptidy.

Všeobecným a frekventovaným problémom protoplastových techník je regenerácia kompletných rastlín, aj geneticky modifikovaných, z protoplastov samotných. Nie je jednoduchá, nefunguje univerzálne, často je nielen druhovo, ale aj genotypov závislá. Regenerovanie rastlín z protoplastov je skôr výnimkou. Je to oveľa zložitejšie ako z buniek, z ktorých sa bunková stena neodstraňuje. Pri niektorých hospodársky významných plodinách

(napríklad, repka olejná, banánovník, mrkva, vinič, kapustovité druhy zeleniny, olejová palma, niektoré okrasné kvety) je však tento postup súčasťou tzv. „Nových techník šľachtenia rastlín“.



Obrázok 2.47: Techniky prenosu cudzej DNA do protoplastov. A – elektroporácia, B – mikroinjekcia, C – sprostredkovanie bioaktívnymi guľôčkami, D – sprostredkovanie vláknami karbidu kremíka (Zdroj: Ramkumar a kol., 2020, upravené).

2.3.5.3.1 *In planta* techniky

Vytvorené boli, a aj sa používajú, tzv. „*in planta*“ metódy a techniky na genetickú modifikáciu rastlín. Ich podstatou je obísť potrebu *in vitro* kultivácie, pretože niekedy nie je možné z *in vitro* kultúry regenerovať geneticky modifikovanú rastlinu, resp. kompletnú rastlinu ako takú. V týchto technikách sa cudzia DNA prenáša priamo do rastlín pestovaných *ex vitro* v „nahej“ forme, teda bez akýchkoľvek vektorov. Technicky veľmi jednoduchou je tzv. „floral dip“ technika. Pri nej sa do suspenzie *A. tumefaciens* ponárajú kvetné púčiky (Obrázok 2.48) alebo rastové vrcholy, na ktorých sa kvetné púčiky ešte len vyvinú. Po takejto inokulácii sa rastliny dopestujú do dospelosti, do produkcie semien, a spomedzi získaných semien sú selektované tie, do ktorých sa podarilo introdukovať cudzí gén/gény.



Obrázok 2.48: Schéma tzv. „floral dip“ techniky na prenos génov do rastlín (Zdroj: Purwantoro a kol., 2023, upravené).

Rovnakým postupom sa môžu do suspenzie *A. tumefaciens* ponárať aj rastové vrcholy obsahujúce meristémy, alebo pletivá kvetných orgánov, napríklad nezrelé klasy, ktoré obsahujú zárodočné bunky – vajíčka alebo bunky, z ktorých sa vajíčka vyvinú.

Používa sa aj technika, kedy sa suspenzia *A. tumefaciens* priamo nanesie na bliznu a tá sa do vajíčka dostane prostredníctvom peľového vaku. V ďalšej technike sa používajú samčie zárodočné bunky, t. j. peľové zrná, ktoré sa najskôr inkubujú v suspenzii *A. tumefaciens*, potom sa, už ako geneticky modifikované, manuálne nanesú na bliznu a po splynutí s vajíčkom sa vyvinie geneticky modifikovaný jedinec.

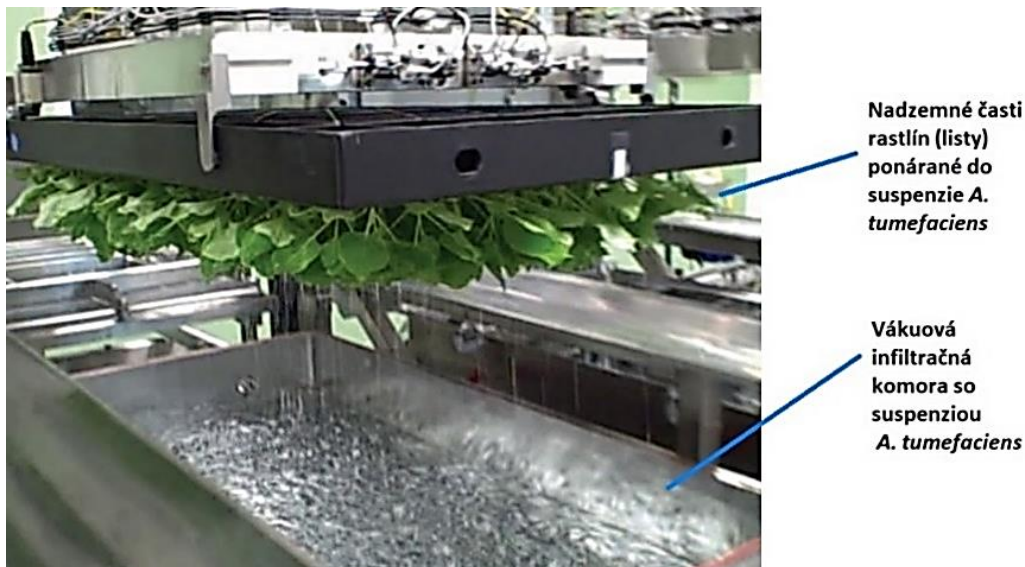
Existujú aj ďalšie varianty týchto techník, napríklad namiesto ponárania do suspenzie, sa *A. tumefaciens* aplikuje do kvetných pletív nakvapkaním, sprejovaním, injektovaním, alebo vákuovou infiltráciou cudzej DNA do peľových zrn. Iné techniky využívajú zygotické alebo somatické embryá, ktoré sa najskôr dehydratujú a potom nechajú nasiaknuť (napučať) roztokom, v ktorom je suspenzia *A. tumefaciens* alebo iba plazmid s cudzím génom.

Pre ciele a efektívnu produkciu cudzích – heterologických bielkovín v rastlinách nie je potrebná stabilná integrácia cudzej DNA do rastliny, ani jej prenos (dedenie) do potomstva. Stačí dosiahnuť vysokú, ale iba dočasnú expresiu cudzieho génu v rastlinných bunkách. Vtedy sa do rastliny cudzia DNA (gén) introdukuje prostredníctvom *A. tumefaciens*, ale už do plne vyvinutých rastlín prostredníctvom techniky nazývanej **agroinfiltrácia**. Dočasná expresia cudzieho génu ponúka výhodu väčšej celkovej akumulácie heterologickej bielkoviny v kratšom čase (už 1 – 2 týždne po agroinfiltrácii). *A. tumefaciens* sa pri tejto technike do rastlinného pletiva (najlepšie mladého listu) infiltruje jednoducho pod tlakom pomocou injekčnej striekačky (Obrázok 2.49).



Obrázok 2.49: Jednoduchý spôsob agroinfiltrácie suspenzie *A. tumefaciens* do listov rastliny injekčnou striekačkou. Urobienie vstupného otvoru na zadnej strane listu ihlou (A), nasadenie injekčnej striekačky do otvoru po ihle (B), injektovanie suspenzie *A. tumefaciens* do medzibunkového priestoru v liste (C) (Zdroj: Leuzinger a kol., 2013, upravené).

Oveľa účinnejšia je technika, v ktorej sa efektívnosť infiltrácie suspenzie *A. tumefaciens* do medzibunkových priestorov listov zvyšuje pomocou vákua. Táto technika sa nazýva **vákuová infiltrácia**. V laboratórnych experimentoch sa dajú na vákuovú infiltráciu využiť sklenené alebo plastové exikátory. Pre biotechnologickú produkciu sa používajú veľkokapacitné vákuové infiltračné komory, v ktorých je do suspenzie *A. tumefaciens* ponorených svojou nadzemnou časťou naraz niekoľko desiatok až stoviek listov rastlín (Obrázok 2.50).



Obrázok 2.50: Nadzemné časti rastlín (listy) ponárané do suspenzie *A. tumefaciens* vo vákuovej infiltračnej komore (Zdroj: Wirz a kol., 2012, upravené).

Najvhodnejšie rastlinné druhy pre produkciu heterologických bielkovín touto technikou sú rýchlorastúce druhy s veľkou listovou biomasou, napríklad hlávkový šalát a špenát.

Po infiltrácii sa pokračuje krátky čas (1 – 2 týždne) s pestovaním infiltrovaných rastlín. Vtedy, jednak pribúda listová biomasa, a zároveň sa v nej syntetizuje dostatočné množstvo heterologickej bielkoviny. Celá nadzemná časť sa potom pozberá a z nej sa extrahuje a izoluje cieľová heterologická bielkovina. Vákuová infiltrácia je veľmi efektívnou a rozšírenou technológiou, napríklad na produkciu humánnych vakcín a farmaceutík produkovaných v GMR technikou *in planta*. *In planta* techniky sú nenáročné na zariadenia, samozrejme okrem veľkokapacitných vákuových infiltračných komôr.

2.3.6 Geneticky modifikované rastliny v praxi

Biotechnologické postupy a metódy prenosu cudzej DNA do rastlinných buniek, v spojení s vývojom v *in vitro* technikách regenerovania geneticky modifikovaných rastlín z geneticky modifikovaných buniek, zásadne ovplyvnili nielen poľnohospodárstvo, produkciu potravín a krmív, ale aj mnohé iné odvetvia priemyslu, medicínu, životné prostredie, energetiku. Využívanie, hlavne pestovanie, GMR ovplyvňujú samozrejme aj ekonomické, sociálne, filozofické, náboženské a iné otázky a pohľady.

Nástup GMR do poľnohospodárskej praxe sa udial v relatívne krátkom čase, len v posledných troch desaťročiach. Prvou geneticky modifikovanou rastlinou bol rajčiak jedlý nazvaný „Flavr Savr“, predstavený v roku 1994. Pomocou genetickej modifikácie, technológiou „antisense“ (Obrázok 2.52) bol v ňom utlmený účinok enzýmu polygakturonáza, ktorý rozkladá bunkové steny, čím zrelý plod mäkne a kazí sa. Plody „Flavr Savr“ sa mohli zberať úplne zrelé a aj po zbere boli dlhšie skladovateľné počas distribúcie, v obchode aj v domácnosti. Predávali sa čerstvé plody a rajčiakový pretlak z nich vyrobený. Ten sa v rokoch 1996 – 1999 predával s úspechom aj v Európe, vo viacerých obchodných reťazcoch vo Veľkej Británii (Obrázok 2.51). Tento pretlak bol kvalitnejší, hustejší a približne o 20% aj lacnejší, pretože na jeho výrobu bolo treba menšie množstvo energie (ich plody obsahovali menej vody). Na trhu s rajčiakovými pretlakmi vo V. Británii dosiahol v roku 1998 podiel až 60%.

Oficiálny začiatok komerčného pestovania GMR vo svete sa datuje rokom 1996. V tom roku boli vysiate GMR na ploche 1,7 mil. hektárov. Celkové plochy pestovaných GMR sa medziročne zvyšovali, až na 206,3 mil. hektárov v roku 2023. Z GM plodín dominujú kukurica, sója, bavlník a repka olejná (resp. „kanola“, čo je repka olejná neobsahujúca v semenách kyselinu erukovú a glukozinoláty). Najväčšími pestovateľmi GMR boli v roku 2023 USA (74,4 mil. ha), Brazília (66,9 mil. ha) a Argentína (23,1 mil. ha). V Európe sa pestujú GMR, iba na

malých plochách – v Španielsku na 46 300 ha a v Portugalsku na 1 700 ha. Na Slovensku sa komerčne pestovala GM kukurica v období 2006 – 2016, ale iba na malých plochách (najviac v roku 2008, na ploche 1 930 hektárov).



Obrázok 2.51: Plody rajčiaka modifikovaného a nemodifikovaného po určitej dobe skladovania (vľavo) a pretlak vyrobený z GM rajčiaka predávaný vo V. Británii (vpravo). (Zdroj: Sciencephotogallery, Chillmaid, M.F., <https://sciencephotogallery.com/featured/genetically-engineered-tomatoes-martyn-f-chillmaidscience-photo-library.html>, a Godbey, 2014, upravené).

GMR sa začali tvoriť v prvom rade pre využitie v poľnohospodárstve, na produkciu potravín a krmív. Riešila sa nielen produkcia na kvantitatívnej, ale aj na kvalitatívnej úrovni. Súčasne s tým sa začala riešiť aj ochrana rastlín proti fytopatogénom a škodcom, odstraňovanie konkurujúcich burín a ďalšie agronomické problémy. Ďalšie stratégie tvorby GMR boli už nasmerované aj do ich nepotravinového využitia. Majú produkovať nielen fytoomasu, ale aj organické zlúčeniny pre priemyselné a energetické využitie, majú pozitívne riešiť environmentálne problémy a záťaž. Už v súčasnosti sú využívané GMR aj ako producenti rekombinovaných bielkovín, využívaných vo farmácii a humánnej medicíne. Od svojho zrodu (80. roky 20. storočia) sa GMR, na základe svojho určenia a významu, zaraďujú do „generácií“, ktoré však nemajú medzi sebou rigorózne hranice.

V prvej etape sa na pestovanie na poliach dostali **GMR 1. generácie**. Vo viacerých plodinách boli vykonané genetické modifikácie zabezpečujúce im rezistenciu proti živočíšnym škodcom, alebo toleranciu voči herbicídu. To boli vlastnosti veľmi výhodné pre ich pestovanie rôznymi pôdoochrannými technológiami, zvlášť bezorbovými, a s redukciou potreby používania chemických pesticídov. 1. generácia GMR teda priniesla výhody hlavne pre pestovateľov (farmárov).

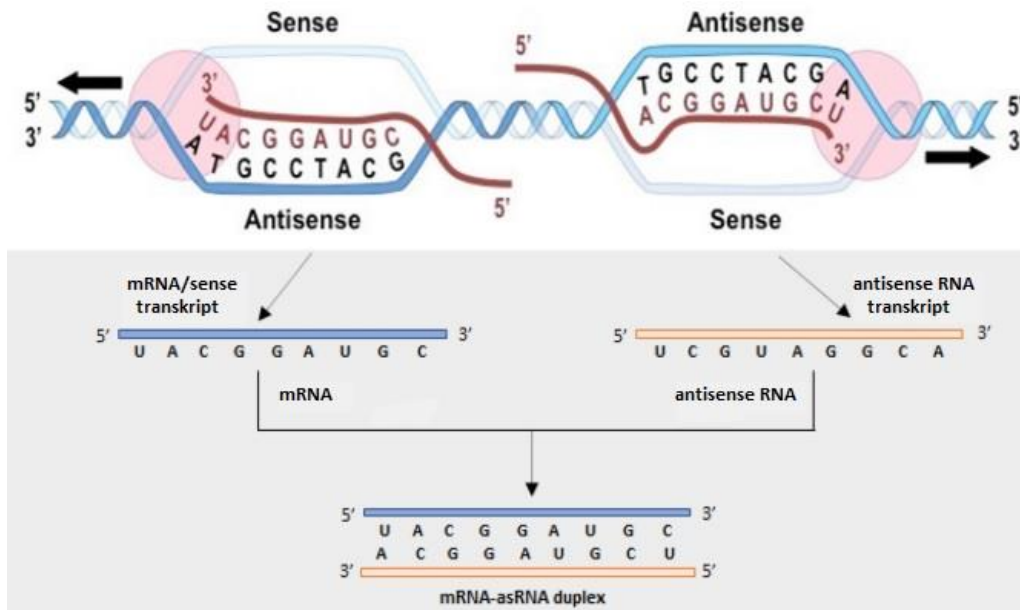
Za **GMR 2. generácie** sú označované tie, ktoré už priniesli výhody nielen pestovateľom, ale aj spotrebiteľom. Genetickými modifikáciami sú v nich zlepšené charakteristiky a vlastnosti zvyšujúce ich hodnotu pre koncového užívateľa (spotrebiteľa, spracovateľa), ale aj vyšší zisk pestovateľa. Majú, napríklad zvýšenú kvalitu svojich produktov, napríklad modifikovaný obsah a zloženie mastných kyselín, aminokyselín, bielkovín, sacharidov, vybraných prvkov, vitamínov a ďalších zložiek.

Hneď po nich prišli **GMR 3. generácie**, ktorými sa riešia vážne pestovateľské a zároveň aj environmentálne problémy. Po genetickej modifikácii majú, napríklad zníženú potrebu na ich výživu a chemickú ochranu, sú rezistentné alebo tolerantné voči viacerým nepriaznivým, biotickým a abiotickým faktorom prostredia, dokážu prekonať (tolerovať) nedostatok vody (sucho) v kritických vývinových štádiách, tolerujú prítomnosť solí a niektorých kovov v pôde. Poskytujú aj riešenia pre priemysel a energetiku. Dokážu produkovať viac a hodnotnejšiu biomasu (fytomasu) pre energetické využitie a priemyselné spracovanie. V súvislosti s produkciou potravín neobsahujú, napríklad toxické a alergénne zložky v semenách a plodoch. Sú schopné tiež riešiť problémy životného prostredia nadobudnutými fytoimediačnými schopnosťami. Zásadný je ich dopad na farmáciu a medicínu. Dokážu produkovať rekombinované terapeutické bielkoviny, antibiotiká, vakcíny (samé môžu byť tzv. „jedlými vakcínami“), protilátky a pod.

Novonadobudnuté vlastnosti sú v GMR dosiahnuté technikami prenosu génov vykonaných na základe niekoľkých stratégií:

1. **Prenos** a heterologická expresia **exogénov**, t. j. génov (alebo iných sekvencií DNA) izolovaných z geneticky vzdialených druhov, aj z inej taxonomickej ríše. Exogénne gény prenášané do rastliny sú zvyčajne skombinované so silnými, konštitutívnymi promótormi a upravené sú v nich kodóny.
2. **Zosilnená expresia** („over-expresia“) **endogénov** izolovaných z rovnakého organizmu a druhu, prípadne homológnych génov izolovaných zo sexuálne kompatibilných rastlinných druhov. Na zosilnenie expresie génu sa využívajú aj iné úseky DNA, najmä sekvencie regulačných elementov, ktoré pozitívne ovplyvňujú transkripciu génu. Prenášaný endogén môže byť pred jeho prenosom do rastliny upravený *in vitro*.
3. **Zoslabená** (utlmená, umlčaná) **expresia endogénov** alebo génov patogénu, pomocou **antisense RNA**, **RNA-interferencie** (RNAi) (Obrázok 2.56), alebo CRISPR/Cas (Obrázok 2.8) technológií. Podstatou princípov antisense RNA a RNAi je inhibícia translácie príslušnej mRNA. Interferencia prebehne medzi produktom antisense transgénu – transkribovanou antisense RNA, a produktom vlastného sense génu, čím

vznikne nefunkčný duplex mRNA-antisense mRNA, a vlastný gén sa zoslabý, resp. „umlčí“ (Obrázok 2.52). Vďaka komplementarite medzi mRNA a antisense mRNA vzniknutý duplex už nemôže podstúpiť proces translácie. Podstatou RNAi je interferencia syntetickej dvojvláknovej RNA s tou vlastnou mRNA, ktorú treba „umlčať“, alebo s mRNA cudzieho génu (napríklad génu patogéna). Vlastný gén môže byť zoslabený, resp. „umlčaný“ aj zásahom do neho samotného.



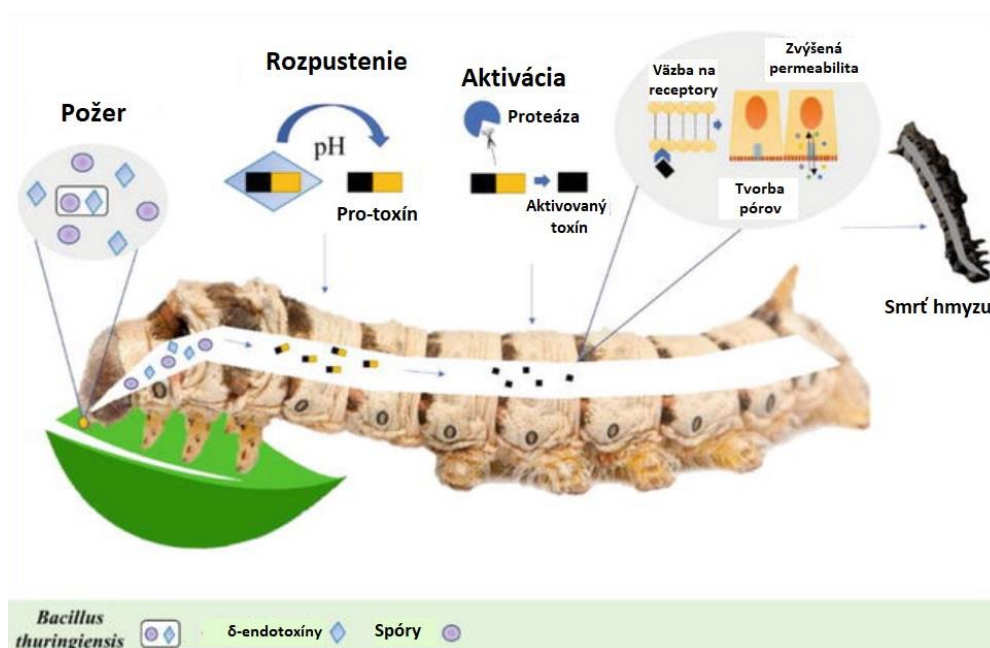
Obrázok 2.52: Mechanizmus antisense RNA technológie prípravy GMR (Zdroj: Animasaun, Lawrence, 2023, upravené).

Prvé dve stratégie sú relatívne jednoduché. Stratégia zoslabenia expície génov je komplikovanejšia. Pri nej nie sú do buniek cieľovej rastliny vkladané žiadne funkčné gény a teda nie sú ani syntetizované žiadne cudzie funkčné bielkoviny. Techniky RNAi a antisense RNA fungujú na princípe univerzálneho post-transkripčného mechanizmu, prítomného takmer vo všetkých eukaryotických organizmoch, ktorý vedie k strate funkčnosti cieľového génu blokovaním jeho molekúl mRNA, a tým blokovaním syntézy príslušnej bielkoviny. V súčasnosti sú najpoužívanejšími dve skupiny geneticky modifikovaných plodín. Jednou sú GMR rezistentné voči hmyzím škodcom a druhou GMR tolerujúce vybraný herbicíd. Už v priebehu pár rokov budú dominovať GMR s kombináciou rezistencie proti škodcom a tolerancie voči herbicídu.

2.3.6.1 Geneticky modifikované rastliny rezistentné proti hmyzím škodcom

Medzi prvé ciele technológií genetických modifikácií v poľnohospodárskych plodinách bolo vytvoriť v nich rezistenciu proti hmyzím škodcom prostredníctvom prenosu a zabudovania cudzích génov. GMR by sa mala sama proti nim brániť, bez aplikovania chemických insekticídov. Bol to dominantný cieľ pri tvorbe GMR 1. generácie. Začalo to vývojom a pestovaním tzv. **Bt-plodín**. Ide o GMR, ktoré vo svojich bunkách produkujú kryštalickú bakteriálnu bielkovinu – **Bt-toxín** (nazývaný aj δ -endotoxín), ktorý zabezpečuje rezistenciu GMR proti cieľovým hmyzím škodcom. Je zrejmé, že prenos bakteriálneho génu do rastliny nie je možné uskutočniť tradičnými šľachtiteľskými postupmi, krížením a selekciou.

V rastlinných bunkách syntetizovaný insekticídny Bt-toxín je produkt heterologickej expresie niektorého z génov *Cry* preneseného do rastliny z baktérie *Bacillus thuringiensis*. Využívajú sa tiež *Cyt* gény z *Bacillus thuringiensis israelensis*, ktoré produkujú kryštalickú bielkovinu s podobnými vlastnosťami. Po požere pletiva – listu, stonky, koreňa, či inej časti Bt-rastliny, ktoré obsahuje bunky syntetizujúce Bt-toxín, sa tento toxín v alkalickom prostredí (pH 8–10) tráviaceho traktu hmyzu aktivuje proteolytickými enzýmami, prechádza peritrofickú membránu a viaže sa na špecifické receptory na membráne epitelových buniek stredného čreva. Tam spôsobí lyzovaním buniek tvorbu pórov a cez póry unikajúce alkalické črevné šťavy spôsobia paralýzu a smrť cieľových hmyzích škodcov (Obrázok 2.53).



Obrázok 2.53: Mechanizmus pôsobenia Cry bielkoviny (Bt-toxínu) z buniek GMR na cieľového hmyzieho škodcu. (Zdroj: Fernández-Chapa a kol., 2019, upravené).

Baktéria *Bacillus thuringiensis* má viac ako dvadsať poddruhov a každý má mnoho rôznych kmeňov a izolátov. Tie majú vo svojej genetickej výbave ďalšie insekticídne Bt-gény. Množstvo iných bakteriálnych druhov má tiež vo svojej genetickej výbave gény kódujúce ďalšie insekticídne bielkoviny. To umožňuje, aby do GMR boli introdukované ďalšie insekticídne Bt-gény, alebo nim podobné gény, buď individuálne, alebo v rôznych kombináciách, tzv. pyramídovaním génov. Takto sa zabráni hmyzím škodcom nadobudnúť rezistenciu voči konkrétnym, frekventovane používaným Bt-génom. Ide o geneticky modifikované plodiny rezistentné proti škodcom, druhej generácie. Očakáva sa aj tretia generácia takýchto plodín, v ktorých sa budú kombinovať viaceré Bt-gény, prípadne iné insekticídne gény, s alternatívnymi insekticídnymi technológiami, ako je napríklad RNA interferencia (RNAi).

Perspektívnou skupinou génov, ktorých prenosom do rastlín sa zabezpečí rezistencia proti hmyzím škodcom sú gény kódujúce inhibítory proteínáz. Inhibítory proteínáz sa viažu na proteínázy cieľového hmyzu a inaktivujú ich. Ich antimetabolický účinok spôsobí neschopnosť hmyzu stráviť bielkoviny a získavať z nich dusík, čo spôsobí uhynutie hmyzieho škodcu. Proti larvám hmyzu, ktoré atakujú semená rastlín bohaté na škrob, sú perspektívne zase gény kódujúce inhibítory amyláz. Fungujú podobne ako inhibítory proteínáz. Viažu sa s cieľovými amylázami hmyzu a zabraňujú hmyzu štiepiť a využívať škrob. Insekticídne využiteľné gény, vhodné na prípravu GMR rezistentných proti škodcom, sú aj gény kódujúce lektíny, oxidatívne enzýmy, chitinázy, proteíny inaktivujúce ribozómy, mnohé sekundárne metabolity a ďalšie bielkoviny.

2.3.6.2 Geneticky modifikované rastliny tolerantné voči herbicídum

Dôvodom na vývoj geneticky modifikovaných poľnohospodárskych plodín **tolerujúcich herbicíd**, respektíve jeho aktívnu zložku, sú buriny v porastoch, čo je trvalý problém poľnohospodárstva. Buriny súťažia s plodinami o vodu, živiny, slnečné svetlo, priestor a sú aj zdrojom škodcov a patogénov. Výrazne znižujú kvantitu aj kvalitu produkcie plodín. Ich eliminovanie sa štandardne vykonáva mechanicky a pomocou chemických herbicídov, respektíve ich kombináciou. Oba spôsoby majú vážny a dlhodobý negatívny dopad na životné prostredie. Jeden odkrýva ornicu, vystavuje ju vodnej a veternej erózii, uvoľňuje z pôdy uhlík, druhým sa aplikujú chemické látky do prostredia pôdy a vody. Sofistikovaným riešením je zjednodušiť elimináciu burín, síce chemickým spôsobom, ale s možnosťou vykonať aplikáciu počas vegetačného obdobia, vtedy keď je to najúčinnnejšie, možno aj bez opakovania, navyše

aplikovaním iba jedného širokospektrálneho herbicidu. K tomu boli vyvinuté stratégie tvorby GMR tolerujúcich aplikáciu takýchto herbicidov, respektíve ich aktívnych zložiek, najmä voči glyfozátu a glufozinátu. Vytvárané a pestované sú aj GMR s toleranciou voči herbicidom obsahujúcim iné aktívne látky – sulfonylmočovinu, oxynily, triazíny, imidazolidóny, inhibítory acetolaktáz syntázy a acetylkoenzým A karboxylázy, syntetické auxíny a ďalšie. Na poliach s pestovanými GMR tolerantnými voči herbicidom sa buriny príslušným širokospektrálnym herbicidom eliminujú jednoduchšie a veľmi účinne (Obrázok 2.54).

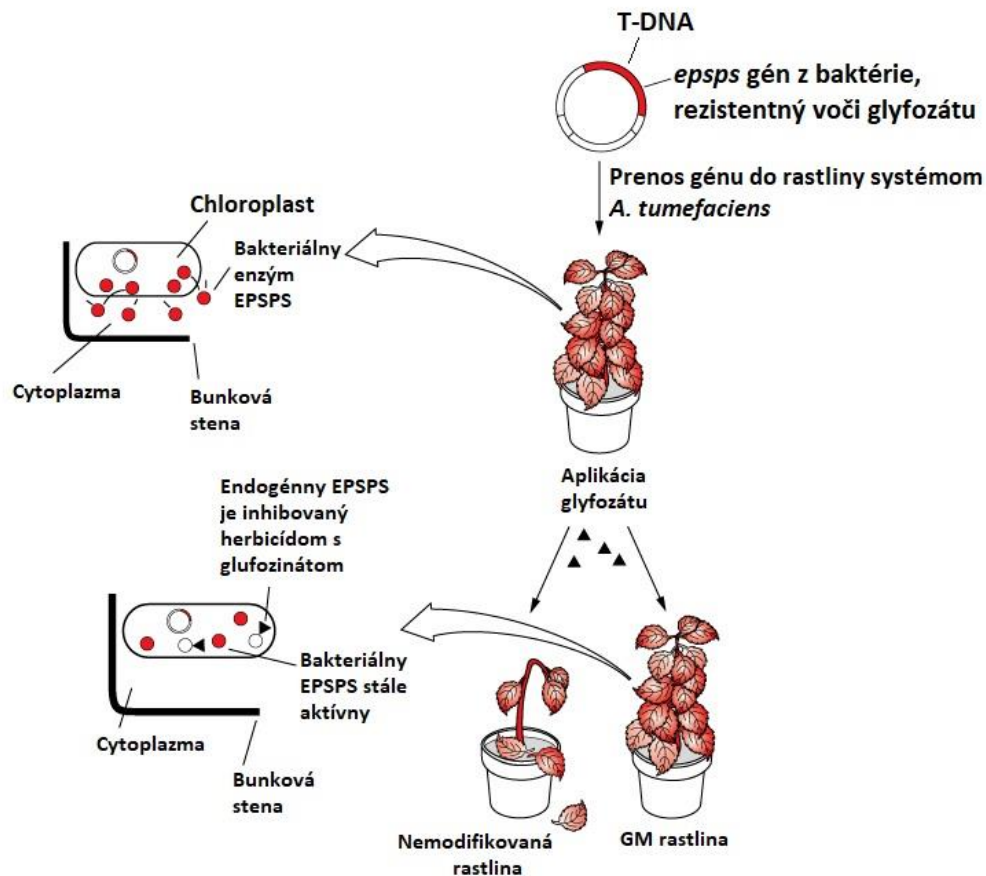


Obrázok 2.54: Porast kukurice neošetrený, s masívnym výskytom burín (vľavo), GM kukurica tolerantná voči glyfozátu po jeho aplikácii (vpravo) (Zdroj: Kraic, 2010).

Glyfozát, po aplikovaní na rastlinu, zablokuje (inaktivuje) jej enzým 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázu (EPSPS) z biosyntézy aromatických aminokyselín, vitamínov a sekundárnych metabolitov, bez ktorých rastlina (aj burina) zahynie. Kľúčovým génom introdukovaným do GMR tolerujúcich aplikáciu glyfozátu je gén *cp4epsps* z baktérie *Agrobacterium tumefaciens* (kmeň CP4). Tento gén kóduje enzým EPSPS s rovnakou funkciou, ale tolerantný voči glyfozátu, teda funkčný aj po kontakte GM rastliny s glyfozátom (Obrázok 2.55). Stratégiou v tomto prípade je náhrada vlastného génu *epsps* rastliny, ktorý je glyfozátom inaktivovaný, za bakteriálny gén *epsps*, ktorý je tolerantný voči aplikácii glyfozátu. To dovoľí geneticky modifikovanej rastline ďalej produkovať enzým EPSPS a syntetizovať aromatické aminokyseliny a ďalšie zlúčeniny.

GMR tolerujúce aktívnu látku glufozinát sú vytvárané na inom princípe. Herbicidy s aktívnou látkou glufozinát (respektíve jej amónnou soľou fosfíntricínom) eliminujú rastliny tak, že zablokujú funkciu enzýmu glutamín syntázy, ktorý je zodpovedný za metabolizmus dusíka a za detoxikáciu amoniaku. Do GMR tolerantných na aplikáciu glufozinátu nie je

vložený „náhradný“ gén pre glutamín syntázu, ktorý ju bude produkovať aj po aplikácii glufozinátu, ale gén *pat* alebo *bar* z baktérií druhu *Streptomyces*, ktoré kódujú enzým schopný fosfínocín, aplikovaný na rastlinu rozložiť a tak detoxikovať.



Obrázok 2.55: Stratégia tvorby GMR tolerujúcich aplikáciu herbicídu s aktívnou zložkou glyfozát. Endogénny EPSPS je inhibovaný herbicídrom s glyfozátom. (Zdroj: Manohar a kol., 2018, upravené).

2.3.6.3 Geneticky modifikované rastliny rezistentné voči fytopatogénom

Rastlinné patogény a choroby rastlín nimi vyvolané spôsobujú stratu na úrodách okolo 14 % (lokálne je to až 30–40 %), čím zásadne ovplyvňujú globálnu produkciu a zásoby potravín, hospodársky aj sociálny stav a stabilitu ľudskej spoločnosti. Príčinou sú najmä ochorenia rastlín spôsobené hubami, baktériami a vírusmi. Navyše, ochrana plodín proti nim si vyžaduje intenzívne používanie chemických pesticídov, čo zvyšuje náklady na produkciu a má negatívny dopad na zdravie konzumentov a životné prostredie. Najúčinnjším, najpriateľnejším a najbezpečnejším riešením je pestovať rastliny rezistentné proti patogénom. Ak také odrody nie

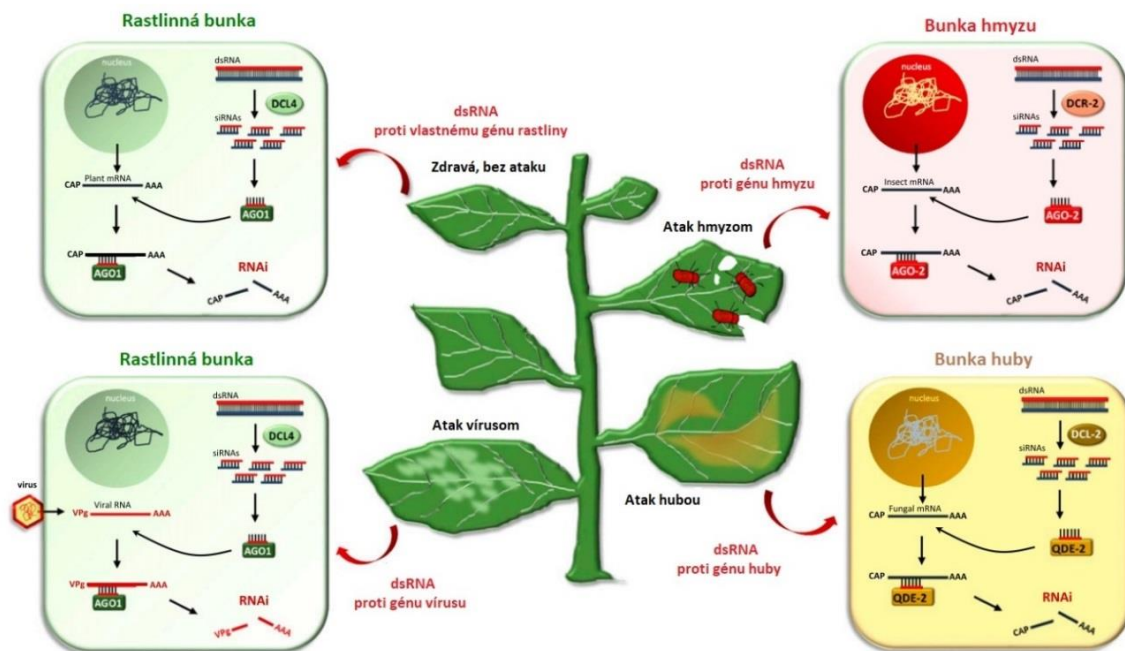
sú, treba ich vytvoriť. Jednou z možností sú techniky genetického inžinierstva a genetických modifikácií rastlín. Stratégie tvorby GMR rezistentných voči patogénom sú rôzne. Závisia od samotného patogénu, spôsobu jeho interakcie s rastlinou, s jej bunkami, pletivami a orgánmi, spôsobom vyvolania ochorenia, obrannými mechanizmami rastliny. Techniky genetických modifikácií však dovoľujú využívať, na budovanie rezistencie v rastlinách, aj gény izolované z mikroorganizmov, iných rastlinných druhov, živočíchov, vrátane človeka. Tvorba GMR rezistentných proti fytopatogénom je postavená na štandardných stratégiách, t. j. prenose cudzích génov, vlastných, ale so zosilnenou expresiou, technológiami RNAi a antisense RNA.

Prvé dve stratégie sú relatívne jednoduché. Predpokladom ich úspechu je poznanie interakcií medzi fytopatogénnou baktériou, respektíve hubou, a rastlinou, mechanizmy patogenézy, možnosti posilnenia alebo vybudovania obranného mechanizmu hostiteľskej rastliny. Stratégia rastliny brániť sa proti týmto patogénom je zameraná na jej schopnosť lyzovať bunku patogénu, zabrániť jeho schopnosti kolonizovať rastlinu, zastaviť alebo redukovať jeho rast, množenie a životaschopnosť, vyvolať hypersenzitívnu reakciu, degradovať jeho toxické metabolity alebo iné mechanizmy. Zvyčajne ide o prenos génu, alebo niekoľkých génov, vlastných alebo cudzích, do hostiteľskej rastliny, niektorou z vhodných techník prenosu génov. Prenášanými génmi sú gény rezistencie, avirulencie, kódujúce antibakteriálne peptidy a enzýmy detoxikujúce metabolity patogénu a ďalšie. Relatívne jednoduchým konceptom je využitie niektorého z veľkej skupiny **R-génov** (génov rezistencie). Po ich prenose do náchylnej rastliny sa vytvorí GMR rezistentná voči ochoreniu spôsobenému daným fytopatogénom. Z nej sa už klasickým krížením môže prenášať gén rezistencie do ostatných odrôd daného druhu.

Tretia stratégia – zoslabenie expície génov, je komplikovanejšia. Do cieľovej rastliny nie sú vkladané žiadne funkčné gény a nie sú ani syntetizované žiadne cudzie funkčné bielkoviny, ktoré by cielili na patogénny organizmus a zabezpečili rezistenciu voči patogénu. Využíva sa stratégia RNAi, ktorá je univerzálnou pri tvorbe GMR. Touto stratégiou sa tvoria nielen GMR rezistentné voči fytopatogénnym mikroorganizmom. Technika RNAi využíva prirodzený mechanizmus prítomný takmer vo všetkých eukaryotických organizmoch, ktorý vedie k strate funkčnosti cieľového génu blokovaním molekúl mRNA vytvorených jeho transkripciou. Zablockovaním mRNA sa zablokuje aj syntéza príslušnej bielkoviny.

Do RNAi geneticky modifikovaných rastlín je vkladaná genetická informácia, kódujúca krátku dvojláknovú molekulu RNA (dsRNA), ktorá sa v bunke rastliny rozštiepi na krátke interferujúce, dvojláknové RNA (siRNA) a tie na konečný produkt – jednovláknovú interferujúcu RNA (RNAi). RNAi sa dokáže špecificky viazať na komplementárnu mRNA,

ktorú post-transkripčne, čiastočne alebo úplne umlčí, čím sa zoslabí alebo úplne zastaví expresia cieľového génu (vlastného alebo génu patogéna), ktorého produkt je zodpovedný za ochorenie rastliny (Obrázok 2.56). RNAi technológia sa intenzívne využíva v tvorbe GMR rezistentných voči rastlinným vírusom.



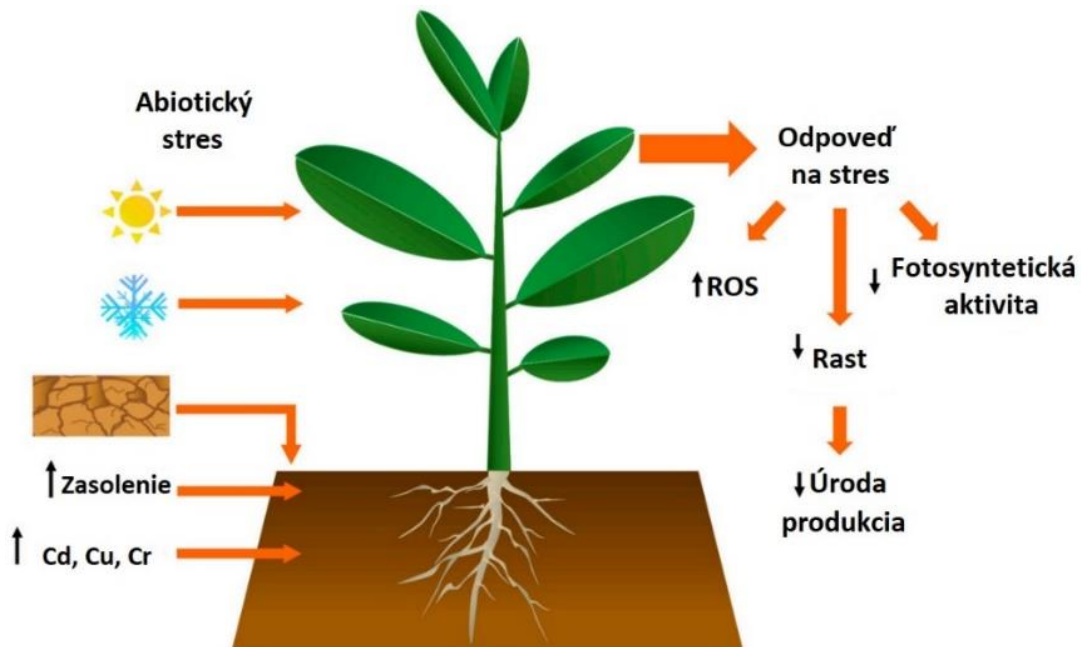
Obrázok 2.56: Technológia RNAi proti endogénnym génom rastliny, vírusov, húb, hmyzu, ale použiteľná aj pri iných cieľoch (Zdroj: Dalakouras a kol., 2020, upravené).

2.3.6.4 Geneticky modifikované rastliny rezistentné voči abiotickým stresom

Pred viac ako štyrmi desaťročiami bol publikovaný odhad, že negatívne vplyvy environmentálnych faktorov, t. j. **abiotické stresy**, môžu znižovať výnosy plodín až o približne 70 %. Prebiehajúce zmeny klímy prinášajú globálne otepľovanie, extrémne klimatické javy, teda zosilňujú a rozširujú účinok abiotických stresov pre rastliny, poľnohospodárstvo, globálnu potravinovú bezpečnosť a ľudskú populáciu. Hlavnými abiotickými faktormi sú extrémne teploty (niekedy vysoké, inokedy nízke), nedostatok vody (má ho až 45 % ornej pôdy), nedostatok organickej hmoty a živín v pôde, zasolenie a kumulácia ťažkých kovov v pôde (v dôsledku umelého zavlažovania a používania chemických hnojív a pesticídov), zvýšenie koncentrácie atmosférického CO₂ a mnohé ďalšie.

Na adaptovanie rastlín na tieto stresy, a aj za takýchto podmienok ešte zvyšovať ich produkciu, sa používajú všetky stratégie, od konvenčného šľachtenia, cez mutačné, bunkové,

molekulárne, až po prenos génov a genetické inžinierstvo. Rastlina reaguje na stresy spúšťaním rôznych molekulárnych mechanizmov, zmenami v regulácii expície génov súvisiacich s abiotickými stresmi, produkciou bielkovín a metabolitov pomáhajúcim im zvládnuť tieto stresy (Obrázok 2.57). Stresový faktor však má negatívny dopad na kvantitu aj kvalitu produkcie.

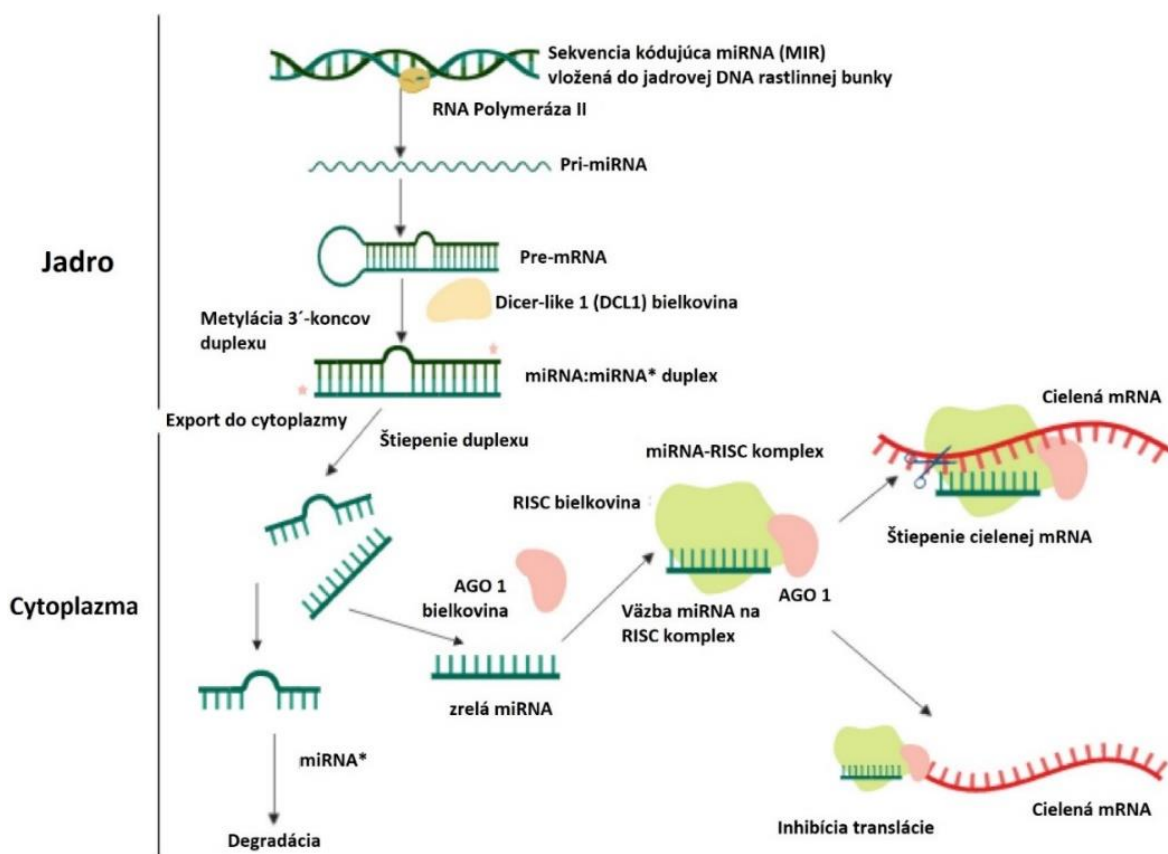


Obrázok 2.57: Abiotický stres vyvoláva v rastlinách stresové reakcie. ROS = reaktívne formy kyslíka. (Zdroj: Godoy a kol., 2021, upravené).

V mnohých prípadoch rastliny vykazujú podobnú reakciu na rôzne environmentálne stresové faktory, napríklad na prítomnosť solí, sucho alebo chlad. Na reakciách spúšťaných týmito stresmi sa podieľajú podobné gény.

Aj keď sa konvenčným spôsobom šľachtenie rastlín kontinuálne darí zlepšovať ich úrodnosť, žiadané zlepšenie tolerance voči abiotickým faktorom sa očakávať nedá. Najúčinnnejším prístupom, aj do budúcnosti, je alternatívna stratégia – genetické inžinierstvo a tvorba GM plodín. Mnohé štáty (USA, Brazília, Argentína, Kanada, India) už majú vo svojom poľnohospodárstve GM plodiny, sóju, kukuricu, bavlník a ďalšie, so zlepšenou toleranciou voči abiotickému stresu. Z genetického hľadiska je komplikáciou polygénna povaha reakcie rastlín na abiotické stresy, ktorá veľmi sťažuje prípravu rastlín tolerantných voči týmto stresom. Nachádzajú sa však aj jednoduchšie, a pritom funkčné riešenia. Efektívne je už aj manipulovanie iba s jediným génom z biosyntetických dráh rôznych funkčných bielkovín, enzýmov, metabolitov (napríklad osmolytov, antioxidantov, rastových hormónov, bielkovín zúčastnených vo fotosyntéze, detoxikačných a transportných bielkovín), alebo s regulačnými

sekvenciami, či transkripčnými faktormi. Na zásahy do regulácie expsie génov sa využívajú aj stratégie zoslabovania génovej expsie na post-transkripčnej úrovni degradáciou mRNA (RNAi, antisense RNA). V príprave GMR tolerantných voči abiotickým stresom majú veľmi významnú pozíciu aj krátke jednovláknové molekuly RNA (**miRNA**, mikroRNA), dlhé iba 21–24 nukleotidov. Sú kľúčovými regulátormi expsie špecifických génov na post-transkripčnej úrovni počas vývinu rastliny a môžu sprostredkovať obranné reakcie rastliny proti abiotickým (ale aj biotickým) stresom. Rastlina je geneticky modifikovaná tak, že do jej jadrovej DNA je vložená krátka sekvencia kódujúca miRNA, komplementárna s cieľovou mRNA špecifického génu, ktorý sa na tolerancii rastliny voči abiotickému stresu podieľa. miRNA sa v cytoplazme vytvorí špecifickým mechanizmom a po naviazaní sa na príslušnú mRNA spôsobí zoslabenie, respektíve “umlčanie” expsie príslušného génu, degradáciou mRNA, alebo inhibíciou jej translácie (Obrázok 2.58). Mechanizmus post-transkričného zoslabenia, respektíve umlčania génu pomocou miRNA je univerzálny, tvoria sa ním GMR aj s inými vlastnosťami, ako je tolerancia voči abiotickému stresu.

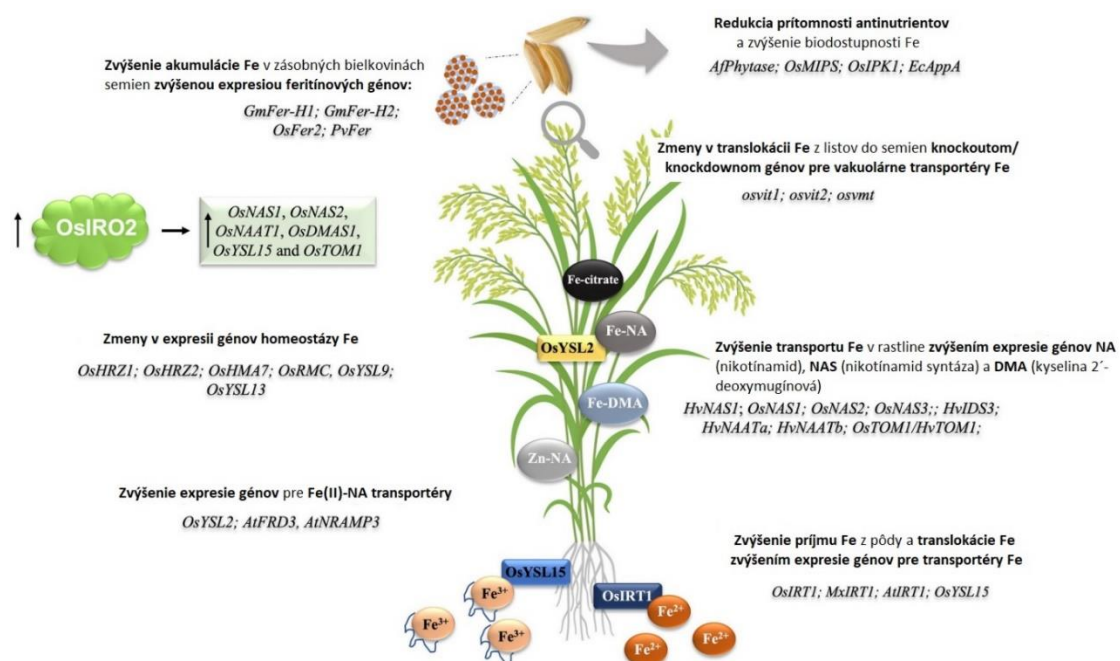


Obrázok 2.58: Biogenéza a mechanizmus mikroRNA (miRNA). RISC = RNA-induced silencing complex. (Zdroj: Chaudhary a kol., 2021, upravené).

2.3.6.5 Geneticky modifikované rastliny so zlepšenými nutričnými a funkčnými parametrami

Táto skupina GMR priniesla veľké výhody pre spotrebiteľov, presnejšie konzumentom, či už sú nimi ľudia, alebo hospodárske zvieratá. Tieto GMR poskytujú surovinu na priamy konzum, na spracovanie na potraviny a krmivá, alebo na priemyselné využitie. Takéto GMR možno klasifikovať do niekoľkých skupín:

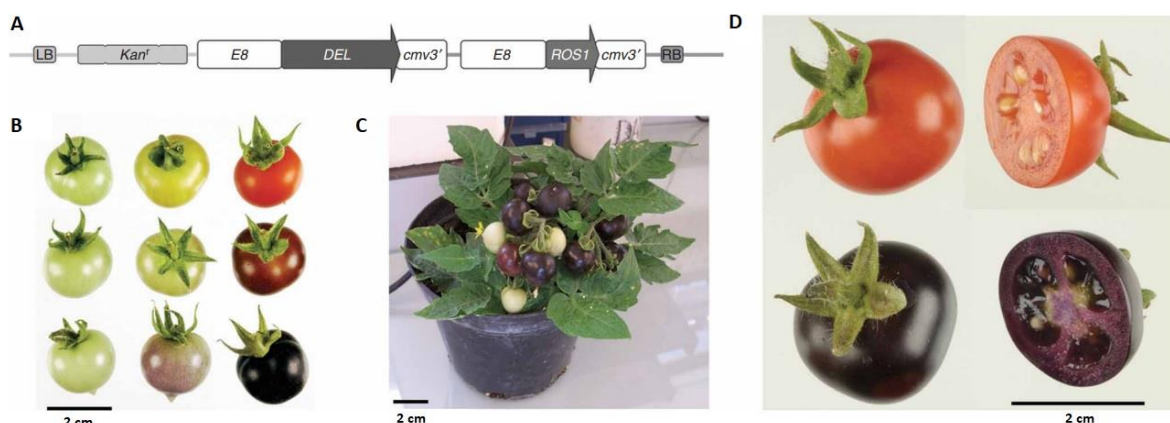
- GMR, ktoré majú **lepšie základné výživové parametre** a dopĺňajú výživu o esenciálne zložky, alebo poskytujú organizmu konzumenta prvky a zlúčeniny, ktoré si nedokáže potravou, či krmivom získať v dostatočnom množstve. Vo výžive človeka, ale aj zvierat, môže mať nedostatok niektorých zložiek, napríklad jódu, železa, zinku, vitamínov A, B, C, E, esenciálnych mastných kyselín a aminokyselín a ďalších zložiek, zničujúci vplyv na jeho zdravie a život. GMR prinášajúce takéto benefity sa dajú tvoriť introdukciou rôznych kódujúcich a regulačných úsekov DNA rôzneho pôvodu, ktorými sa zasiahne do rôznych biochemických a fyziologických mechanizmov v rastline. Príklad na viaceré možnosti biofortifikácie rastlinných semien o mikroprvky Fe a Zn, pomocou genetických modifikácií, ukazuje Obrázok 2.59.



Obrázok 2.59: Možnosti biofortifikácie semien GM ryže prvkami Fe a Zn prenosom rôznych génov ovplyvňujúcich a meniacich rôzne biochemické a fyziologické mechanizmy v GMR. (Zdroj: Wairich a kol., 2022, upravené).

Veľmi podobnou kategóriou sú GMR, ktoré nielen dopĺňajú potravu o chýbajúce zložky, ale dodávajú konzumentovi aj ďalšie zložky, ktoré ovplyvňujú pozitívne jeho kondíciu, zdravie a život:

- GMR schopné syntetizovať zlúčeniny, ktoré **zlepšujú zdravie a kondíciu** človeka a zvierat. Takýmito látkami sú napríklad antokyány, flavonoidy, karotenoidy, stilbény, polynenasýtené mastné kyseliny a mnoho ďalších. Z tejto kategórie GMR je určite najznámejšou tzv. „**Zlatá ryža**“ (informácie o nej sú dostupné napríklad na: <https://www.goldenrice.org/index.php>). Je to GM ryža, ktorá dokáže vo svojich semenách akumulovať β -karotén (prekursor vitamínu A). Prvá generácia „Zlatej ryže“ bola vyvinutá už v roku 2000. Dokázala syntetizovať a v semenách akumulovať β -karotén, vďaka dvom prijatým transgénom. Jedným bol gén z narcisu žltého a druhým gén z enterobaktérie *Erwinia uredovora*. Odvtedy boli na podobnom princípe a s rovnakým cieľom vyvinuté aj „Zlatý zemiak“ či „Zlatý banán“. Príkladov, v ktorých sú zlúčeniny prospešné pre zdravie konzumenta akumulované v jedlých semenách alebo plodoch je mnoho. Ide o relatívne jednoduchú koncepciu, ktorej princípom je obyčajne introdukcia cudzích génov, zvyčajne kódujúcich enzýmy katalyzujúce reakcie v konkrétnej biosyntetickej dráhe. Príkladom takejto schémy, aj s výsledkom, sú plody GM rajčiaka jedlého, ktoré sú obohatené o akumulované antokyány, po introdukcii dvoch génov (*DEL* a *ROS1*) z okrasnej rastliny papuľky väčšej (Obrázok 2.60).



Obrázok 2.60: Biofortifikácia antokyánov v plodoch rajčiaka jedlého prostredníctvom genetickej modifikácie. T-DNA obsahujúca dve kazety s génmi *DEL* a *ROS1* (A), fenotypy plodov (horný rad – netransgénnu kontrola, stredný rad – GMR s génmi *DEL/ROS1C*, spodný rad – GMR s génmi *DEL/ROSIN* (B), GMR rajčiaka s vloženými génmi *DEL/ROSIN* (C), plody netransgénného rajčiaka (hore) a GM s vloženými génmi *DEL/ROSIN* (dole) (D) (Zdroj: Butelli a kol., 2008, upravené).

V oboch vyššie uvedených skupinách GMR, sa genetickými modifikáciami pripravujú GMR, ktoré sú schopné poskytnúť nejaký prvok alebo zlúčeniny navyše, alebo syntetizovať a poskytnúť úplne novú zlúčeninu. Podstatou je **biofortifikácia** rastlín. Obsah niektorých mikroživín v rastlinách sa dá zvýšiť aj agronomicky, s použitím špeciálnych hnojív s obsahom mikroživín, alebo biotechnologicky – s využitím pôdných baktérií podporujúcich rast rastliny tým, že podporujú asimiláciu živín rastliny a uvoľňujú hormóny, antibiotiká a sekundárne metabolity. Genetické riešenie problému sa prostredníctvom konvenčných, šľachtiteľských postupov, ale aj molekulárnym šľachtením, nedá dosiahnuť. Reálnym riešením je biofortifikácia rastlín prostredníctvom genetických modifikácií. Od fortifikácie, bežne používanej v praxi, sa koncepcia biofortifikácie odlišuje tým, že potraviny a krmivá sú vyrobené z takých rastlín, ktoré už majú vyššiu nutričnú hodnotu a doplnky výživy sa nemusia pridávať do potravín a krmív počas procesu spracovania a výroby.

Ďalšou skupinou GMR so zlepšenými nutričnými a funkčnými parametrami sú:

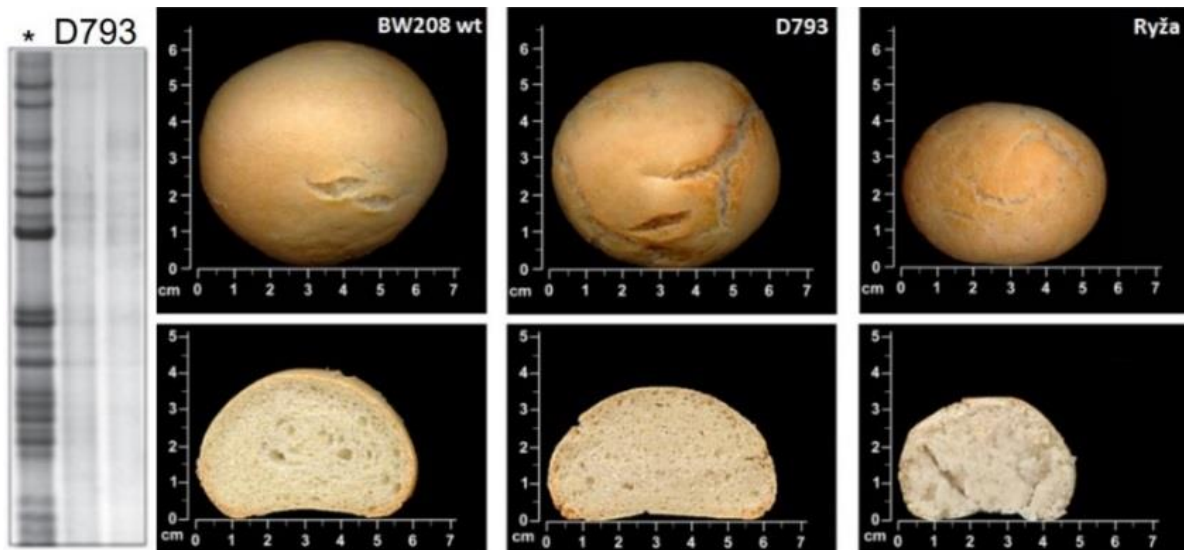
- GMR, v ktorých sú úplne alebo zásadne **eliminované zlúčeniny s negatívnym dopadom na kondíciu a zdravie konzumenta**. Ide napríklad o eliminovanie antinutričných (napríklad kyseliny fytoovej), alergénnych (rôznych bielkovín v strukovinách, orechoch, iných semenách a plodoch, prolamínov pšenice formujúcich lepok a ďalších), toxických látok (napríklad kyanogénnych glykozidov v manioku), alebo látok premieňajúcich sa počas spracovania na zložky škodlivé pre zdravie (napríklad akrylamid). Ak sa v rastline má zabrániť syntéze určitej bielkoviny, použije sa zvyčajne technológia RNAi (RNA interferencia) (Obrázok 2.56). Príkladom na takúto GMR môže byť GM pšenica, ktorá nesyntetizuje a neakumuluje vo svojich semenách gliadín (Obrázok 2.61), čo sú hlavné bielkoviny lepku zapríčínujúce celiakiu (autoimunitná porucha vyvolaná konzumáciou lepku, vedúca k poškodeniu čriev a príjmu živín).

Ku skupine GMR, ktoré do potravinového reťazca nedodávajú zlúčeniny s negatívnym dopadom na kondíciu a zdravie konzumenta (napríklad nebezpečné rezíduá pesticídov), sa zaraďujú aj GMR, ktoré nevyžadujú na svoju ochranu počas rastu používanie chemických pesticídov.

V ére genomiky už genetické modifikácie rastlín nie sú obmedzované iba na využitie v poľnohospodárstve, na výrobu potravín a krmív. GMR zásadne vstúpili do sveta priemyselných biotechnológií, kde historicky dominovali mikrobiálni producenti. V priemyselných biotechnológiách sa komerčne používanie biotechnologických procesov vzťahuje obvyčajne na nepotravinové produkty a na tzv. priemyselné plodiny. Vývoj nových GMR

bol nasmerovaný aj na GMR so zlepšenými funkčnými a technologickými parametrami, ktorými sa riešia problémy súvisiace s výrobnými procesmi iných odvetví, ako je poľnohospodárstvo, potravinárstvo a krmivárstvo, teda:

- GMR produkujúce **suroviny so zmenenými a zlepšenými parametrami** pre rôzne odvetvia priemyslu. Dokážu produkovať viac a hodnotnejšiu biomasu (fytomasu) pre priemyselné spracovanie a energetické využitie. Môžu mať, napríklad genetickými modifikáciami zmenené vlákna, lepšie parametre fytomasy pre výrobu papiera a celulózy (dendromasy lesných drevín), bioplastov, biopalív, olejov, mastných kyselín, aminokyselín a bielkovín a ďalších produktov. Žiadanou zmenou funkčných parametrov drevnej biomasy pre papierenský priemysel je zmena pomerov zložiek v lignocelulózovej biomase, v neprospech lignínu, čo by znížilo náklady na delignifikáciu a rozvlákňovanie pri výrobe buničiny. Takýto výsledok sa dosiahol technológiou **antisense RNA**, napríklad v GM hybridnej línii topoľa osikového × topoľa bieleho, do ktorého boli introdukované antisense transgény pre dva gény – *CAD* a *COMT*. GM hybrid obsahuje menej lignínu (Obrázok 2.62), čo umožňuje ľahšiu delignifikáciu, s použitím menšieho množstva chemikálií (o 6 %), pričom sa získa viac vysokokvalitnej buničiny (o 2 – 3 %).

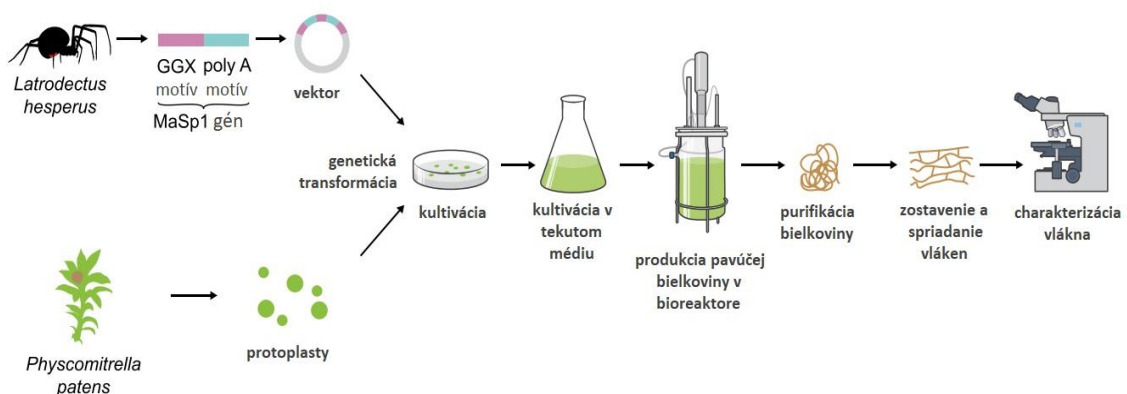


Obrázok 2.61: Vľavo – elektroforetická analýza gliadínov s takmer eliminovanými gliadínmi v GM pšenici D793 (technológiou RNAi) a prítomnými v kontrolnej pšenici (*). Vpravo – bochníky z kontrolnej BW208 wt, z GM pšenice D793 a z ryže (Zdroj: Gil-Humanes a kol., 2010, 2014, upravené).



Obrázok 2.62: Odkôrnené kmene nemodifikovaného (vľavo) a GM hybridného topol'a (vpravo). Červeno zafarbený je xylém so zníženým obsahom lignínu (Zdroj: Pilate a kol., 2002, upravené).

Genetické modifikácie rastlín, ktoré nie sú určené na produkciu potravín a krmív sa v súčasnosti zameriavajú nielen na modifikácie v obsahu lignínu. Ďalším smerom je produkcia škrobu so zmenenými vlastnosťami (obsah škrobu, veľkosť škrobových zrn, pomer amyloza : amylopektín), celulózy, bielkovín (napríklad elastínu a kolagénu), polymérov na výrobu biodegradovateľných plastov (napríklad polyesterov organických kyselín, najmä polyhydroxyalkanoátov), olejov s novými vlastnosťami (s vyšším obsahom a zmeneným zložením, obsahom zvláštnych lipidov, napríklad s acetylovanými triacylglycerolmi). V GMR sú už teraz produkované aj zvláštne suroviny, napríklad organické molekuly pôvodom z mikroorganizmov (napríklad bakteriálny cyanoficín na produkciu polyaspartátu pre výrobu superadsorbentov), či hmyzu (napríklad pavúcie vlákno pre textilný priemysel a medicínu, Obrázok 2.63).



Obrázok 2.63: Schéma produkcie bielkoviny vlákna snovačky kalifornskej (západnej čiernej vdovy) v rastline (čepenke odstálej) (Zdroj: Ramezaniaghdam a kol., 2002, upravené).

Produkcia pavúčieho vlákna sa v rastline dosiahla introdukovaním génu *MaSp1*, pôvodom zo západnej čiernej vdovy, a GMR produkuje novú bielkovinu – surovinu na výrobu nových a špeciálnych produktov.

Vo vzťahu GMR a životného prostredia sa obyčajne riešia len otázky možného negatívneho dopadu pestovania alebo výskytu GMR na životné prostredie (na biodiverzitu, ekosystémy, necieľový hmyz, vznik nových, rezistentných škodcov alebo patogénov, prenos génov a vlastností na iné rastliny a podobne). Genetickými modifikáciami môžu rastliny získať aj vlastnosti, ktoré pozitívne ovplyvňujú životné prostredie, dokážu ho zlepšovať:

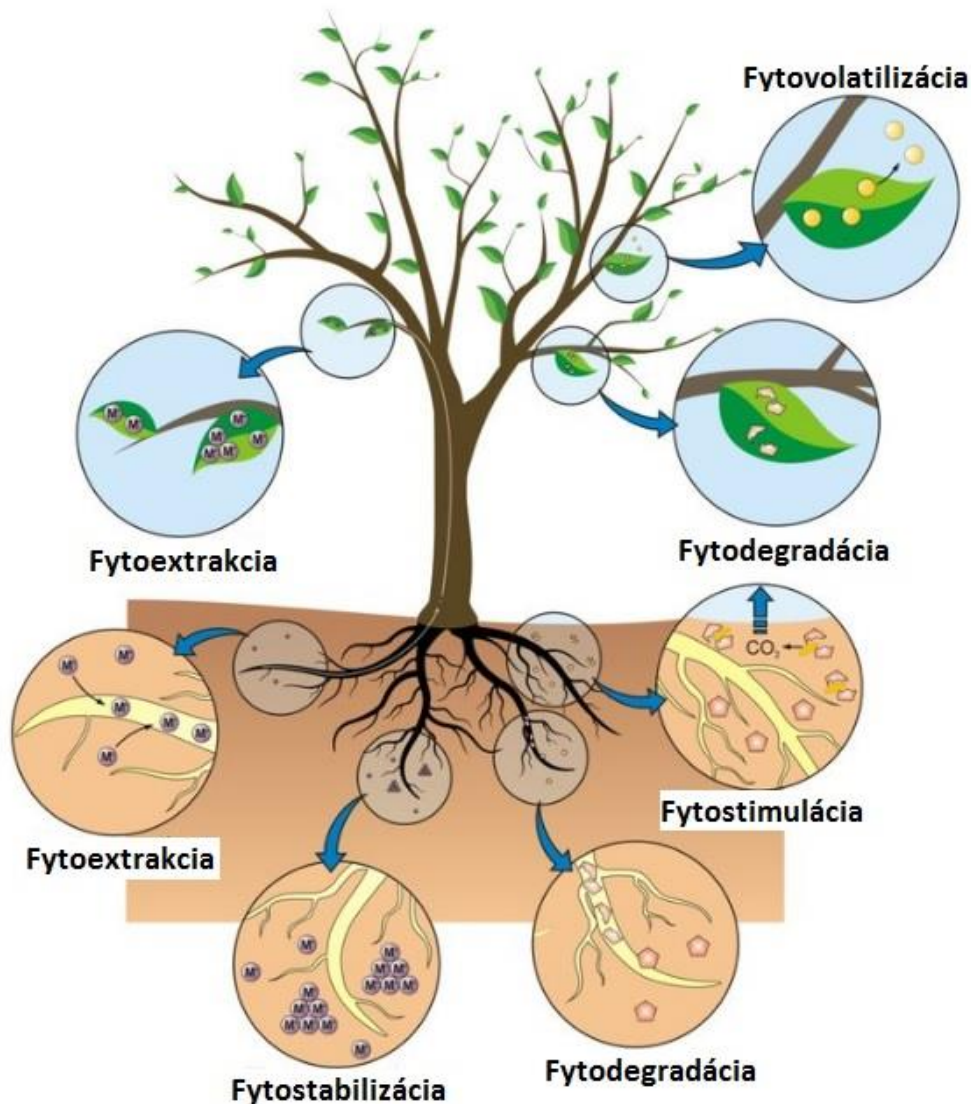
- GMR sú schopné riešiť aj niektoré **problémy životného prostredia**. Sú schopné vykonávať **fytoremediácie (bioremediácie)**, čo sú technológie využívajúce schopnosť GMR eliminovať kontaminanty (anorganické, organické, výbušniny, rádionuklidy) prítomné v pôde, vo vode i vo vzduchu, procesmi poháňanými energiou zo slnečného žiarenia. Tieto remedičné technológie sú približne 10-krát lacnejšie ako konvenčné postupy. Ich výhodou je bezpečnosť a tiež to, že po fytoremediáčnej aktivite sa rastliny dajú spracovať a využiť sa dá ich biomasa, drevo, buničina, alebo z nich vyrobiť energiu. Poskytujú aj živiny pre rizosférne baktérie, ktoré tiež môžu pozitívne ovplyvniť elimináciu znečisťujúcich látok. Fytoremediujúce rastliny poskytujú aj biotopy pre voľne žijúce zvieratá, tvoria prostredie, produkujú kyslík, stabilizujú pôdu, zadržiavajú vodu a poskytujú ďalšie služby.

Fytoremediácie zahŕňajú rôzne procesy, prebiehajú na základe rôznych mechanizmov, v závislosti od chemickej povahy a vlastností kontaminanta, t. j. či je inertný, prchavý, alebo podlieha degradácii v rastline alebo v pôde, a od vlastností rastliny. Základné stratégie fytoremediácií ukazuje Obrázok 2.64. Jedna a tá istá rastlina môže použiť súčasne viaceré mechanizmy.

Mechanizmami hlavných fytoremedičných mechanizmov sú:

- **Fytodegradácia** (fytotransformácia) – organické kontaminanty sú degradované (metabolizované) alebo mineralizované vo vnútri rastlinných buniek špecifickými enzýmami (nitroreduktázami, dehalogenázami a lakázami).
- **Fytoobilizácia** (fytoimobilizácia) – organické alebo anorganické kontaminanty sú začlenené do lignínu bunkovej steny buniek koreňov alebo do humusu. Kovy sú vyzrážané na nerozpustné formy pôsobením koreňových exsudátov a následne zachytené v pôdnej matrici.

- **Fytovolatilizácia** – schopnosť niektorých rastlín koreňmi absorbovať a volatilizovať určité kovy (Hg, Se, As), t. j. premeniť na netoxické formy a uvoľniť ich do atmosféry.
- **Fytoextrakcia** (fytoakumulácia, fytoabsorpcia, fytosekvestrácia) – zahŕňa absorpciu kontaminantov koreňmi a ich následnú translokáciu a akumuláciu v nadzemných častiach rastliny. Aplikuje sa hlavne na kovy (Cd, Ni, Cu, Zn, Pb), ale môže sa využiť aj pri iných prvkoch (Se, As) a organických zlúčeninách. Využíva hyperakumulačné schopnosti rastlín, ktoré dokážu ukladať vysoké koncentrácie kovov vo svojich nadzemných častiach.
- **Fytostimulácia** (rizodegradácia) – korene rastliny jednak podporujú množenie rizosférych mikroorganizmov, ktoré dokážu degradovať kontaminanty (organické), a zároveň aj samé dokážu vylučovať enzýmy, ktoré degradujú kontaminanty.



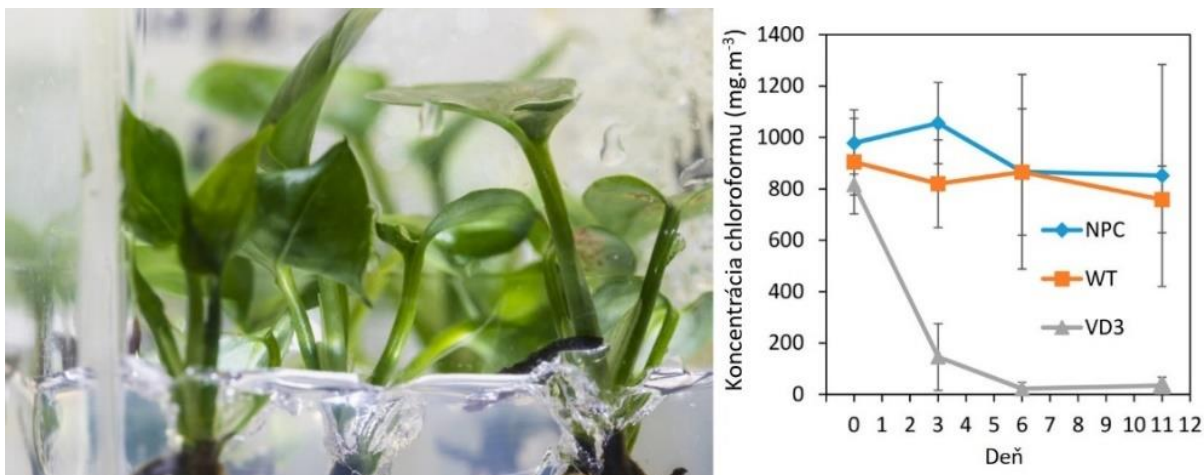
Obrázok 2.64: Hlavné fyto-remediačné stratégie rastliny. M = ióny kovu. (Zdroj: Favas a kol., 2014, upravené).

Ďalším mechanizmom, ktorý je viazaný na vodomilné rastliny a vodné prostredie („prírodná hydroponia“), sú schopné využívať aj mechanizmus:

- **Fytofiltrácia** (rizofiltrácia) – rastliny „filtrujú“, absorbujú, koncentrujú a/alebo zrážajú kontaminanty (hlavne ťažké kovy a rádioaktívne prvky) z vodného prostredia svojim koreňovým systémom, kde sa kontaminanty akumulujú.

Rastlina môže byť aj tzv. **hyperakumulátorom**, ak prirodzene, alebo po genetickej modifikácii, je schopná fytoremediovat' vysoké množstvá kontaminantov. Hyperakumulátory sú dobre definované pre fytoremediácie kovov. V 1 grame sušiny listov dokážu akumulovať >100 μ g Cd alebo Se, >300 μ g Co, Cu, Cr, >1000 μ g Ni, As, Pb, >3000 μ g Zn, alebo až >10000 μ g Mn. Prirodzene fytoremediujúce rastlinné druhy sú zvyčajne druhy s nízkou produkciou biomasy a čím je menej biomasy, tým je menší priestor pre realizovanie mechanizmov fytoremediácie. Prostredníctvom prenosu génov z iných rastlín, živočíchov, húb a baktérií, sa rastlinné druhy s vysokou produkciou biomasy, hlbokým a mohutným koreňovým systémom, schopnosťou rýchleho rastu, rýchlou regeneráciou po zbere biomasy, geneticky modifikujú, aby nadobudli aj silné fytoremedičné schopnosti.

Okrem GMR používaných na fytoremediáciu vo vonkajšom životnom prostredí, už sú vyvinuté aj „izbové“ geneticky modifikované rastliny. Tie sú určené na pestovanie v uzavretých priestoroch, kde sa nachádzajú prchavé organické látky, vrátane karcinogénnych, ako sú napríklad formaldehyd, benzén a chloroform. Vytvorený bol geneticky modifikovaný potos zlatý (iné názvy: potosovec, šplhavnica, Divný Jano a ďalšie) (Obrázok 2.65), ktorý je schopný detoxikovať uzavreté priestory od formaldehydu, benzénu aj chloroformu. Detoxikačná schopnosť chloroformu, meraná zmenami v koncentrácii chloroformu v uzavretom priestore počas 12 dní ukázala (Obrázku 2.65), že už počas prvých 3 dní klesla koncentrácia chloroformu o 82 % a po 6 dňoch už bol takmer nedetegovateľný (krivka VD3 v Obrázku 2.65).

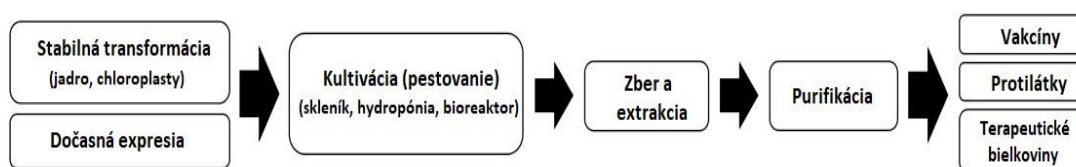


Obrázok 2.65: Geneticky modifikovaný potos zlatý (vľavo) s vloženým génom pre cicavčí cytochróm P450 2e1. V grafe vpravo je koncentrácia chloroformu v uzavretom priestore počas 12 dní: VD3 – v prítomnosti geneticky modifikovaného potosu, WT – v prítomnosti geneticky nemodifikovaného potosu, NPC – uzavretý priestor bez prítomného potosu (Zdroj: Mark Stone/University of Washington, https://www.washington.edu/news/2018/12/19/new-houseplant-can-clean-air/?utm_source=UW%20News&utm_medium=tile&utm_campaign=UW%20NEWS a Zhang a kol., 2019, upravené).

2.3.6.6 Geneticky modifikované rastliny pre farmáciu a medicínu

Použitie rastlín alebo extraktov z nich na liečbu ochorení a riešenie rôznych zdravotných problémov, pozná človek od najstarších civilizácií. Tzv. bylinná medicína, rozvíjajúca sa až do 17. storočia, priniesla mnohé objavy a nové farmakologické prostriedky. Následne boli identifikované liečivé rastliny, ktorých účinky na ľudský organizmus sa odvtedy používajú na terapeutické účely. Moderné biotechnológie a techniky prípravy GMR priniesli nové možnosti na tvorbu rastlín produkujúcich cudzie bielkoviny – **rekombinované bielkoviny**, nielen rastlinného pôvodu, ale aj živočíšne, vrátane ľudských. Produkcia cudzích bielkovín v GMR sa stala životaschopnou alternatívou ku konvenčným produkčným systémom, ako sú mikrobiálna fermentácia, alebo cicavčie bunkové kultúry *in vitro*. GMR, fungujúce ako bioreaktory, môžu účinne produkovať rekombinované bielkoviny vo väčšom množstve, ako sa vyrábajú pomocou cicavčích bunkových systémov. Využitie genetických modifikácií rastlín produkujúcich farmaceuticky a medicínsky žiadané látky sa netýka iba liečivých rastlín, ale rastlín, ktoré dokážu efektívne produkovať bielkoviny kódované cudzími génmi, ktoré sú do rastlín vložené. Do rastliny vložené cudzie gény poskytnú GMR informáciu o stabilnej alebo len dočasnej

produkcii **heterologickej bielkoviny**. Takáto GMR sa pestuje v pôde, substráte, v hydroponii, alebo sa z nej iniciuje určitý typ produkčnej *in vitro* kultúry. Z GMR vypestovanej *in vivo*, alebo z jej fytohmoty vyprodukovanej *in vitro*, sa cieľová bielkovina extrahuje, purifikuje a použije na výrobu liekov a medicínske aplikácie (Obrázok 2.66).



Obrázok 2.66: Schéma produkcie farmaceutík v GMR (Zdroj: Lee a kol., 2023, upravené).

Rastliny, respektíve GMR, sa označujú aj ako „molekulárne továrne“ („cell factories“). Sú schopné poskytovať mnoho užitočných molekúl pre rôzne účely. V posledných desaťročiach sa využívajú aj na produkciu špecifických heterologických bielkovín pre ľudí. Táto produkcia je veľmi atraktívna. Oproti fermentačným mikrobiálnym technológiám je lacnejšia. GMR sa dajú jednoducho pestovať a dokážu vyprodukovať veľké množstvá biomasy a heterologickej bielkoviny v nej. Terapeutické bielkoviny sú syntetizované a kumulované v jedlých častiach rastlín, čím sa zjednodušuje purifikačný proces. Veľkou výhodou je to, že produkčné GMR sú bez prítomných ľudských patogénov, cicavčích vírusových vektorov, onkogénnych sekvencií DNA a endotoxínov a tiež to, že rastlina, ako eukaryotický organizmus, dokáže správne syntetizovať inú, komplexnú eukaryotickú bielkovinu, vrátane ľudskej.

Organizmu človeka, prípadne hospodárskeho zvieratá, poskytujú priamy zdravotný benefit, preventívny alebo liečebný. Farmaceutiká vyrobené v GMR zahŕňajú tri skupiny bielkovín s rôznymi funkciami:

- **Vakcíny** (aj tzv. „jedlé vakcíny“)
- **Monoklonálne protilátky**
- **Terapeutické bielkoviny** (aj glykozylované, s rôznymi aktivitami, vrátane enzymatickej, hormonálnej, antikoagulačnej a iných, personalizovaných liekov a ďalších produktov).

2.3.6.6.1 Vakcíny produkované v geneticky modifikovaných rastlinách

Vakcíny a vakcinácia poskytujú ľuďom a hospodárskym zvieratám imunitu proti špecifickým patogénom a ochoreniam. Obsahujú antigény, ktoré stimulujú imunitný systém, aby produkoval špecifické protilátky proti patogénom. Aktivovaný imunitný systém dokáže rýchlo a účinne

reagovať na infekciu patogénom. Vakcíny produkované v rastlinách majú nízke výrobné náklady, ponúkajú množstvo unikátnych výhod, ako sú zvýšená bezpečnosť, stabilita, všestrannosť a účinnosť. Môžu byť pestované lokálne, tam kde je to potrebné, eliminujú sa náklady na extrakciu, purifikáciu, skladovanie a dopravu. Relevantné antigény sú uložené v rastlinnom pletive, vo vegetatívnej časti alebo generatívnom orgáne. V GMR produkované vakcíny, aplikovateľné tradičným spôsobom, hlavne injekčne, sú napríklad vakcíny proti vírusom chrípky (H5N1, H1N1), SARS-CoV-2, Ebola, Zika, Dengue, hepatitíde HBV a HCV, mnohým zoonotickým vírusom a ďalším patogénom.

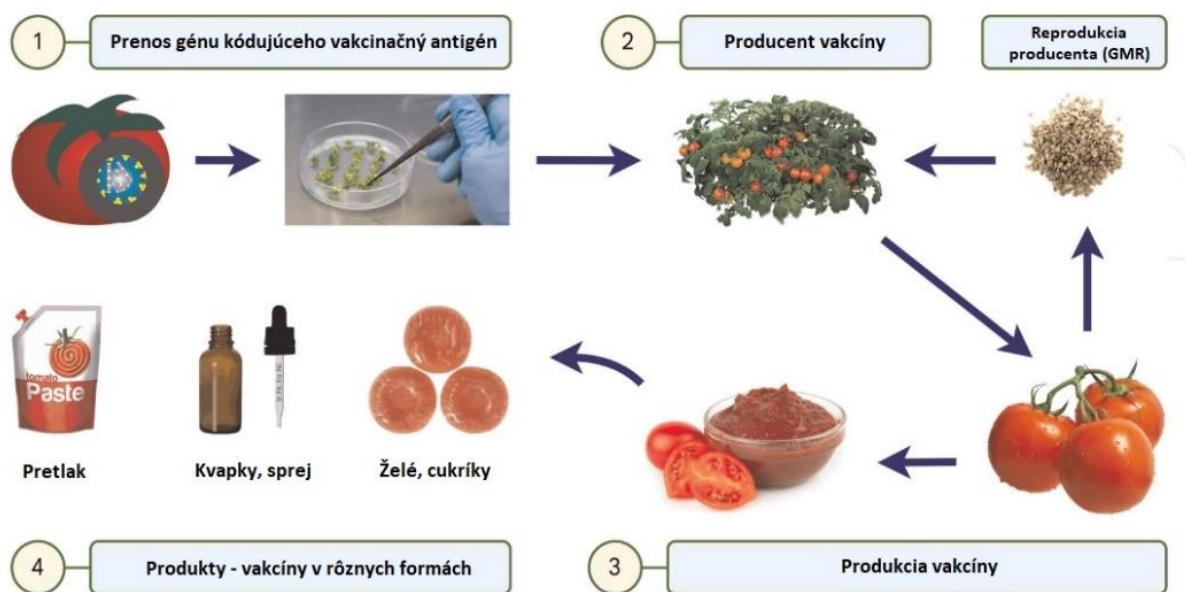
Zvlášť veľký záujem je o vývoj a produkciu tzv. jedlých vakcín produkovaných v GMR. **Jedlé vakcíny** je možné účinne podávať priamo ako potravinu, pretože je ňou samotná rastlina. Jedna GMR môže produkovať niekoľko vakcín proti rôznym patogénom. Už podľa názvu, ide pri jedlých vakcínach o vakcináciu prostredníctvom konzumácie rastlinnej časti –semen, plodov, alebo vegetatívnych častí. Záujem o jedlé vakcíny vychádza z významných výhod, ktorými sú:

- Schopnosť vyvolať imunitu prostredníctvom slizníc, čo nie je pozorované prostredníctvom konvenčných vakcín.
- Bezpečnejší spôsob imunizácie, keďže nepotrebujú sterilné injekcie a vyškolené zdravotnícke osoby.
- Proces ich purifikácie nie je potrebný, vakcinuje sa priamym konzumom.
- Nepotrebujú tzv. „chladiaci reťazec“ na skladovanie, oproti tradičným vakcínam. Jedlé vakcíny, akumulované v semenách, môžu byť v nich skladované aj niekoľko rokov.
- Jednoduchá a nákladovo efektívne je ich masová produkcia. Ich pestovanie, zber, skladovanie a spracovanie nevyžadujú sofistikované prístrojové, ani personálne vybavenie.
- Vysoká stabilita aj počas skladovania pri izbovej teplote.
- Nevyžadujú adjuvans (súčasť lieku zosilňujúca jeho účinok, respektíve zvyšujúca antigénnu vlastnosť očkovacej látky).
- Nie je tu možnosť reverznej (spätnej) virulencie.

Vhodnými plodinami na produkciu jedlých vakcín sú druhy, ktorých semená, plody, korene a vegetatívne časti sa konzumujú čerstvé, bez potrebného spracovania a úpravy, napríklad jablko, banán, rajčiak, melón, mrkva, karfiol, uhorka, hrozno, kivi, šalát, papája, hrach, paprika, slivka, jahoda, orechy a ďalšie. Rastlinná biomasa obsahujúca antigény môže

byť aj šetrne spracovaná na jedlé formy, napríklad na pretlak, pyré, žuvacie želé, cukríky, prípadne na kvapky či aerosóly (Obrázok 2.67). Iné plodiny, napríklad, kukurica, ryža, repka olejná, tabak, lucerna a ďalšie, majú výhodu, že dokážu produkovať veľké množstvá biomasy, s veľkým obsahom vakcín. Doteraz boli vyvinuté GMR produkujúce jedlé vakcíny proti cholere, malárii, besnote, COVID-19, žltacke typu B, AIDS, osýpkam, hnačkovým ochoreniam, reumatoidnej artritíde, antraxu a mnohým ďalším ochoreniam.

Ďalšou skupinou sú vakcíny produkované v GMR, ale určené na vakcináciu hospodárskych zvierat, napríklad proti vírusom vtáčej chrípky (AIV), Newcastleskej choroby (NDV), mnohým vírusom a baktériám napádajúcim hovädzí dobytok, ošípané, malé hospodárske zvieratá a chovy rýb. Aj tu je záujem produkovať jedlé vakcíny. Rastliny sú obzvlášť vhodné na výrobu vakcín pre zvieratá, pretože už aj surové, nepurifikované rastlinné extrakty sa im môžu podávať na vakcináciu.



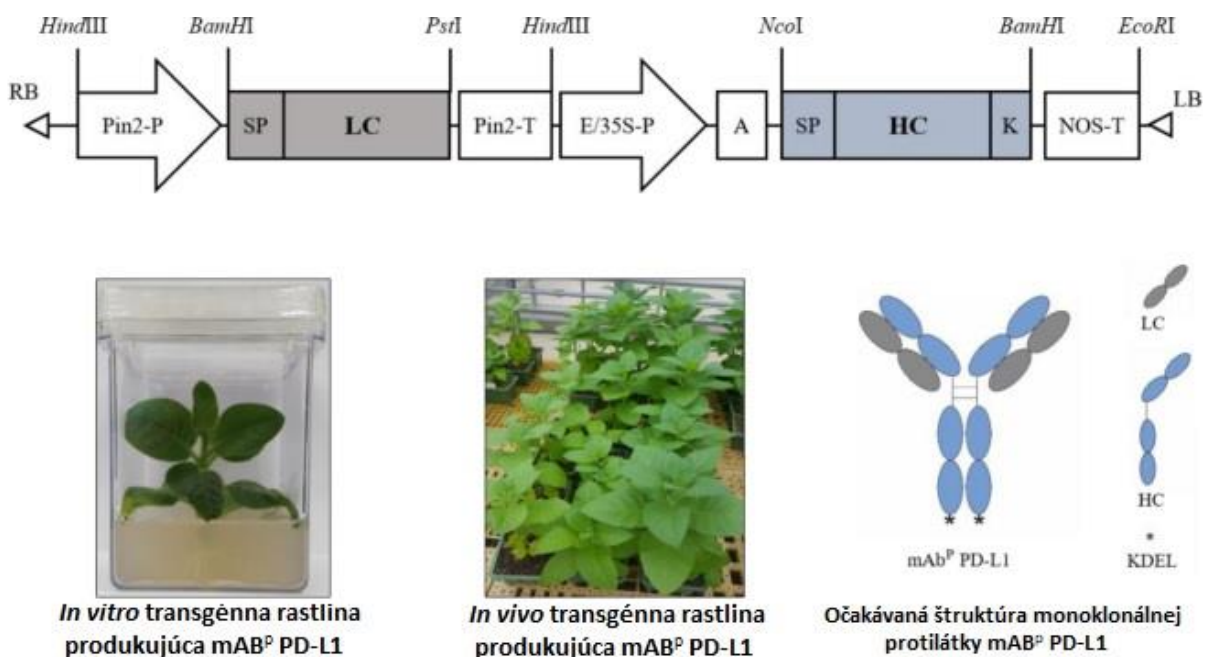
Obrázok 2.67: Princíp produkcie rôznych foriem mukonazálnej jedlej vakcíny produkovanej v GM rajčiaku [Zdroj: Kindt Jr. a kol., 2023, upravené) na platforme spoločnosti FruitVaccine Inc. (<https://www.fruitvaccine.org/>)].

2.3.6.6.2 Monoklonálne protilátky produkované v geneticky modifikovaných rastlinách

Protilátky (imunoglobulíny) sú veľké molekuly bielkovín produkované imunitným systémom ako odpoveď na stimuláciu antigénmi. Ich základná štruktúra obsahuje dva ľahké reťazce a dva ťažké reťazce, ktoré vytvárajú molekulu v tvare písmena Y. Polyklonálne protilátky obsahujú

heterológnu zmes imunoglobulínov proti rôznym epitopom antigénu. Monoklonálne protilátky obsahujú jeden imunoglobulín proti jednému epitopu antigénu. GMR sú schopné produkovať prakticky neobmedzené množstvo a typy protilátok, vrátane monoklonálnych, humanizovaných aj chimérických. Ľahký a ťažký reťazec protilátky môžu byť produkované samostatne, v dvoch GMR, alebo spolu, v tej istej GMR. Obrázok 2.68 zobrazuje produkciu monoklonálnej protilátky PD-L1 používanej na liečbu niekoľkých typov rakoviny, v GM tabaku. V tomto príklade, expresné kazety vložené do T-DNA Ti plazmidu obsahujú, okrem promótorov a terminátorov, gény kódujúce ľahký (LC) a ťažký (HC) reťazec protilátky.

Na rovnakom princípe bola v GM tabaku dosiahnutá produkcia zmesi troch chimérických monoklonálnych protilátok (experimentálny liek ZMapp), ktoré neutralizujú a z tela eliminujú vírus Ebola, či monoklonálna protilátka mAb CO17-1A pre liečbu rakoviny hrubého čreva. Geneticky modifikovaná kukurica je údajne schopná vyprodukovať na ploche 1 ha až 2,5 kg humánnych protilátok. V GMR sa produkujú aj monoklonálne protilátky proti vírusom HIV, Zika, herpes, Dengue, Chikungunya, západonílskemu vírusu a ďalším. Okrem tabaku, sa na produkciu monoklonálnych protilátok používajú aj ďalšie rastlinné druhy, vrátane ľuľka zemiakového, sóje, lucerny, ryže, kukurice, šalátu, špenátu, rajčiaka, cukrovej repy a ďalších.



Obrázok 2.68: Produkcia monoklonálnej protilátky mAB PD-L1 v transgenných rastlinách tabaku. LC – ľahký reťazec, HC – ťažký reťazec (Zdroj: Lee a kol., 2023, upravené).

2.3.6.6.3 Terapeutické bielkoviny produkované v geneticky modifikovaných rastlinách

Producentmi terapeutických rekombinovaných bielkovín, určených pre ľudí aj hospodárske zvieratá sú, okrem tabaku, čoraz častejšie potravinárske plodiny (ľuľok zemiakový, ryža, kukurica, sója, rajčiak a ďalšie). Sú vysoko produktívne a technológie ich pestovania sú výborne zvládnuté. Produkcia terapeutických bielkovín sa uberať čoraz viac od mikrobiálnych producentov smerom k rastlinným systémom, buď *in vivo*, alebo *in vitro*, aj z dôvodu nižších nákladov na ich produkciu, teda pestovanie (polia, skleníky, pestovateľské komory), alebo kultiváciu *in vitro* (kultivačné komory, trepačky, bioreaktory).

Terapeutické bielkoviny majú v organizme funkcie hormonálne, enzymatické, regulačné, transportné, inhibičné a ďalšie. Prvou, biotechnologicky produkovanou, rekombinovanou bielkovinou pre ľudskú medicínu, bol ľudský inzulín. Vyrábala a vyrába sa v bakteriálnych a kvasinkových bunkách, ale plne funkčný ľudský inzulín môže byť úspešne produkovaný aj v rastlinách, v ich semenách alebo vegetatívnych orgánoch. Úspešne to bolo realizované pri kukurici, rajčiaku, šaláte, požití, ale môže to byť vykonané aj v akejkoľvek inej plodine. Príkladom komerčnej produkcie ľudskej terapeuticko-enzymatickej bielkoviny s enzymatickou aktivitou je rekombinovaná glukocerebrozidáza (obchodný názov lieku je Elelyso™) v bunkovej suspenzii mrkvy *in vitro*, v bioreaktoroch (Obrázok 2.69). Glukocerebrozidáza sa používa v enzýmovej substitučnej terapii pri liečbe pacientov s Gaucherovou chorobou.

Ďalšími ľudskými bielkovinami, produkovanými v GMR, sú „náhradné“ bielkoviny, teda bielkoviny, ktoré v ľudskom organizme chýbajú, alebo je ich málo, čo spôsobuje vážne zdravotné problémy. Medzi takéto patria rastový hormón, sérový albumín, α -interferón, erythropoetín, alkalická fosfatáza, aprotinín, kolagén, α 1-antitrypsín, osteopontín, lumbrokináza, aprotinín a mnohé ďalšie. Medzi nimi je veľmi známy, napríklad ľudský rastový hormón (hGH), ktorý má rôzne biologické funkcie pri syntéze bielkovín, bunkovej proliferácii a metabolizme. Je ho možné produkovať aj po vložení syntetického génu *hGH* (*shGH*) do ryže, v transgénej bunkovej suspenznej kultúre. Jeho biologické aktivity sú podobné ako pri konvenčnom rekombinantnom hGH produkovanom v *Escherichia coli*. Podobným príkladom je ľudský sérový albumín (HSA), ktorý je najviac zastúpenou bielkovinou v ľudskej krvnej plazme. Jeho ročná potreba v medicíne je viac ako 500 ton. Jediný polypeptid HSA pozostáva z 585 aminokyselín s radom štruktúrnych konfigurácií, ktoré sa skladajú do troch helikálnych domén. Tiež je produkovaný vo viacerých druhoch rastlín.



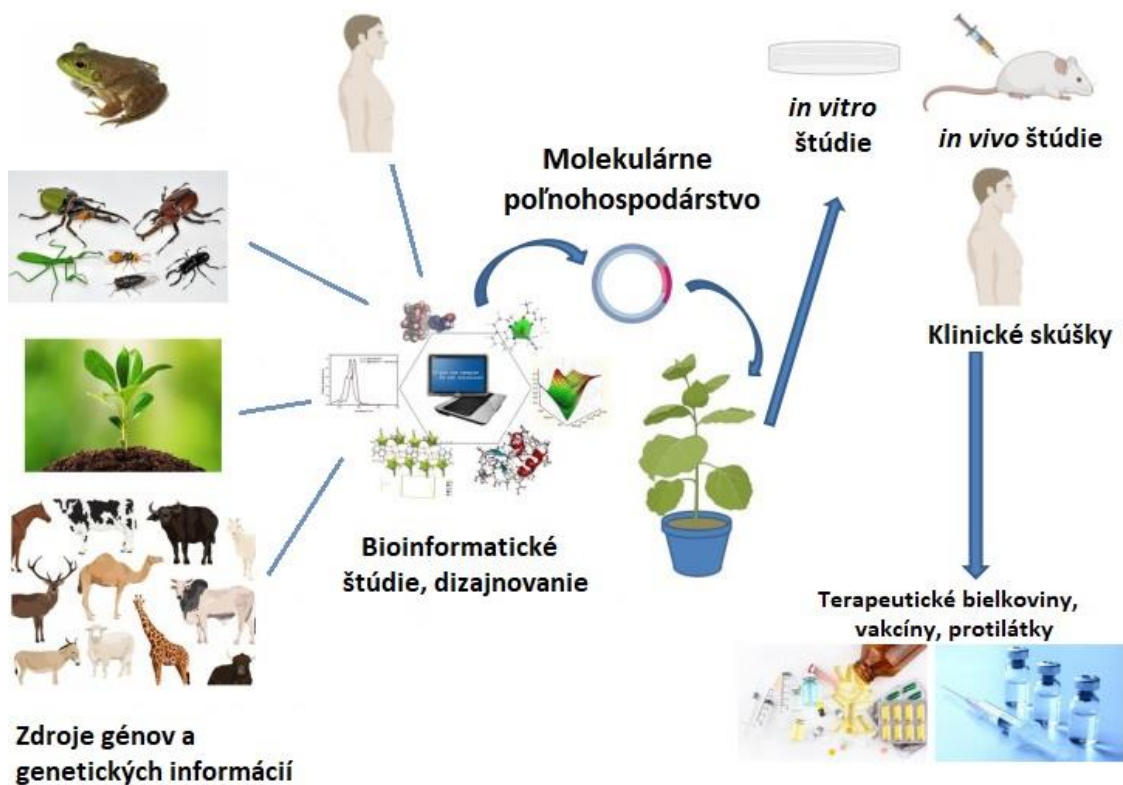
Obrázok 2.69: Produkcia terapeutickkej bielkoviny (ľudského enzýmu glukocerebrosidázy) v bioreaktoroch, v bunkovej suspenznej kultúre GM mrkvy (Zdroj: <https://www.facebook.com/photo.php?fbid=238557006327929&id=188833094633654&set=a.232920403558256>, upravené).

2.3.6.7 Molekulárne poľnohospodárstvo

Priekopnícke práce zo začiatku 90. rokov 20. storočia prezentovali využitie rastlín ako hostiteľských platforiem, ktoré sú schopné produkovať veľmi žiadané a cenné rekombinantné bielkoviny, vrátane ľudských. Sem siahajú začiatky tzv. „**molekulárneho poľnohospodárstva**“, ktoré sa od začiatku orientovalo hlavne na produkciu farmaceutických bielkovín. Okrem samotnej možnosti, bolo na tomto prístupe atraktívne aj zníženie nákladov, v porovnaní s produkciou heterologických bielkovín, produkovaných v mikroorganizmoch a bunkách cicavcov, čo je spojené s nákladnou infraštruktúrou, čistými priestormi a dodržiavaním správnej farmaceutickej výrobnjej praxe. Pestovanie rastlín v skleníku alebo na poli je podstatne lacnejšie a škálovateľnejšie ako fermentačné systémy. Aj keď je tu sťažená kontrola kvality a bezpečnosti produktu, následné spracovanie rastlinnej matrice a purifikácia cieľových bielkovín, v prospech molekulárneho poľnohospodárstva zavážila aj jedinečná vlastnosť expresie rastlinných bielkovín, ktorou je rozmanitosť rastlinných druhov a expresných

systémov na produkciu heterologických bielkovín v nich. Zvlášť vo farmaceutických a medicínskych aplikáciách sa hovorí o prechode z „farming“ na „pharming“, respektíve na „molecular farming“, teda na „**molekulárne poľnohospodárstvo**“ alebo „**bunkové poľnohospodárstvo**“ (Obrázok 2.70).

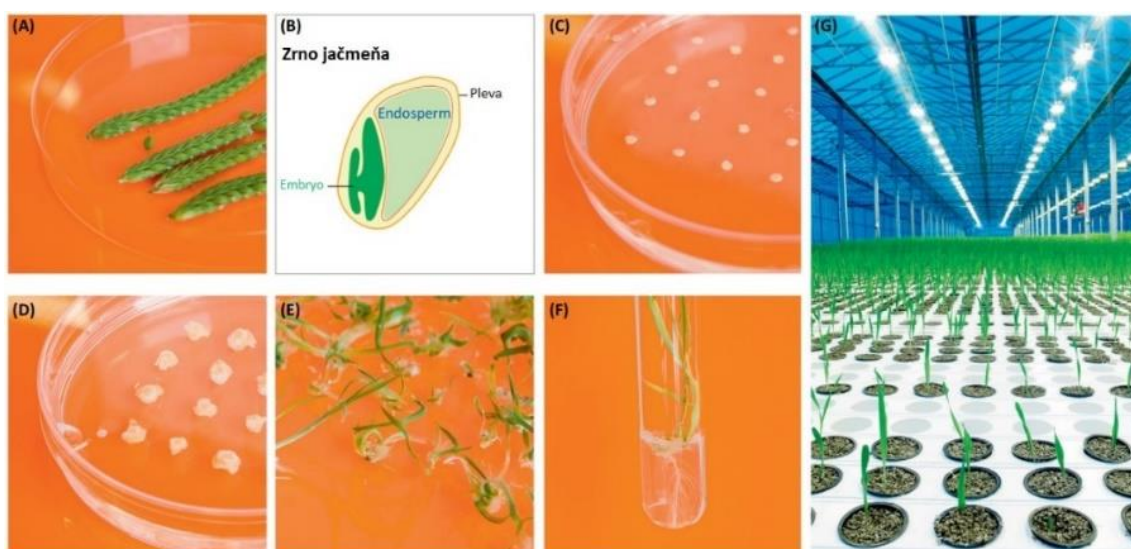
Ide o použitie rastlín, hlavne GMR, ako bioreaktorov pre produkciu rekombinantných bielkovín a rekombinantných farmaceutických produktov na prevenciu a liečbu rôznych chorôb človeka a hospodárskych zvierat. Prvé produkty molekulárneho poľnohospodárstva, ktoré boli aj komercializované už koncom 90. rokov 20. storočia, boli avidín a β -glukuronidáza produkované v transgénnych rastlinách kukurice. Neboli ešte použité pre medicínske účely, ale obe tieto bielkoviny sú aj v súčasnosti používané ako laboratórne reagenty.



Obrázok 2.70: Všeobecný princíp molekulárneho poľnohospodárstva – príklad produkcie terapeutických bielkovín pre humánnu medicínu (Zdroj: Kordi a kol., 2023, upravené).

Príkladom, na trhu dostupného produktu molekulárneho poľnohospodárstva je aj ľudský epidermálny rastový faktor (hEGF). Celoročne je produkovaný, udržateľným spôsobom, v GM rastlinách jačmeňa, v islandských skleníkoch poháňaných geotermálnou energiou (Obrázok 2.71). Vyčistená bielkovina hEGF sa používa ako bioaktívna kozmetická zložka.

Silným akcelerátorom molekulárneho poľnohospodárstva bola pandémia COVID-19. Vtedy sa odhalil jeho skrytý potenciál. Ten však GMR ponúkajú už od polovice 90. rokov 20. storočia, ale jeho využitie uviazlo v diskusiách o geneticky modifikovaných organizmoch a GMR zvlášť. Ani v súčasnosti, rastlinné molekulárne poľnohospodárstvo ešte nie je kľúčovou produkčnou platformou, z hľadiska počtu na trh uvádzaných bielkovinových produktov. Produkcia heterologických bielkovín v rastlinnom producentovi má však niekoľko jedinečných výhod. Okrem už spomenutých, sú medzi nimi aj možnosť glykozylácie produkovaných bielkovín, výroba bez živočíšnych organizmov (dôležité pre tvorbu terapeutík pre niektoré náboženské komunity, vegánov a ľudí s alergiou na zvieratá), bez endotoxínov a alergénov. Asi najdôležitejšou výhodou je rýchlosť výroby (v priebehu niekoľkých dní), s využitím možnosti dočasnej expresie cudzích génov v GMR. Je to zvlášť dôležité pre výrobu vakcín a diagnostiky v núdzových scenároch a časovej tiesni pri rýchlom nástupe pandémie ochorení.



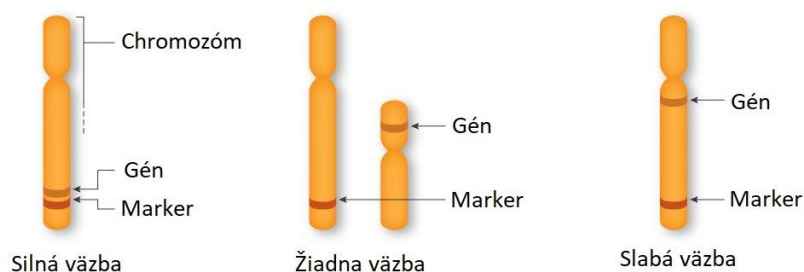
Obrázok 2.71: Nezrelé klasy jačmeňa, obsahujúce nezrelé embryá (A), izolované nezrelé embryá kokultivované s *A. tumefaciens* (B-C), indukcia kalusu (D), regenerácia výhonkov a koreňov (E-F), transgénne rastliny produkujúce hEGF (G) (Zdroj: Magnutsdottir a kol., 2013, upravené).

2.3.7 Molekulárne šľachtenie rastlín

Ďalšiu možnosť na zlepšovanie rastlín priniesli pokroky v poznatkoch o génoch a ich funkcií na molekulárnej úrovni. Toto šľachtenie dostalo rôzne pomenovania – pokročilé, nekonvenčné, moderné, ale ujal sa názov **molekulárne šľachtenie** a má začiatky už v roku 1980. Má rôzne

definície, ale jeho podstatou je aplikovanie molekulárnych techník a molekulárnych biotechnológií v šľachtení rastlín. Kľúčovým molekulárnym nástrojom molekulárneho šľachtenia sú **molekulárne markery**. Už podľa názvu, molekulárnymi markermi sú molekuly. Najskôr to bývali, a v mnohých prípadoch stále sú, molekuly bielkovín, respektíve ich časti (napr. ich podjednotky). Neskôr, a v súčasnosti dominantne, sa ako molekulárne markery používajú molekuly DNA, samozrejme nie celé, ale len ich fragmenty (časti, úseky).

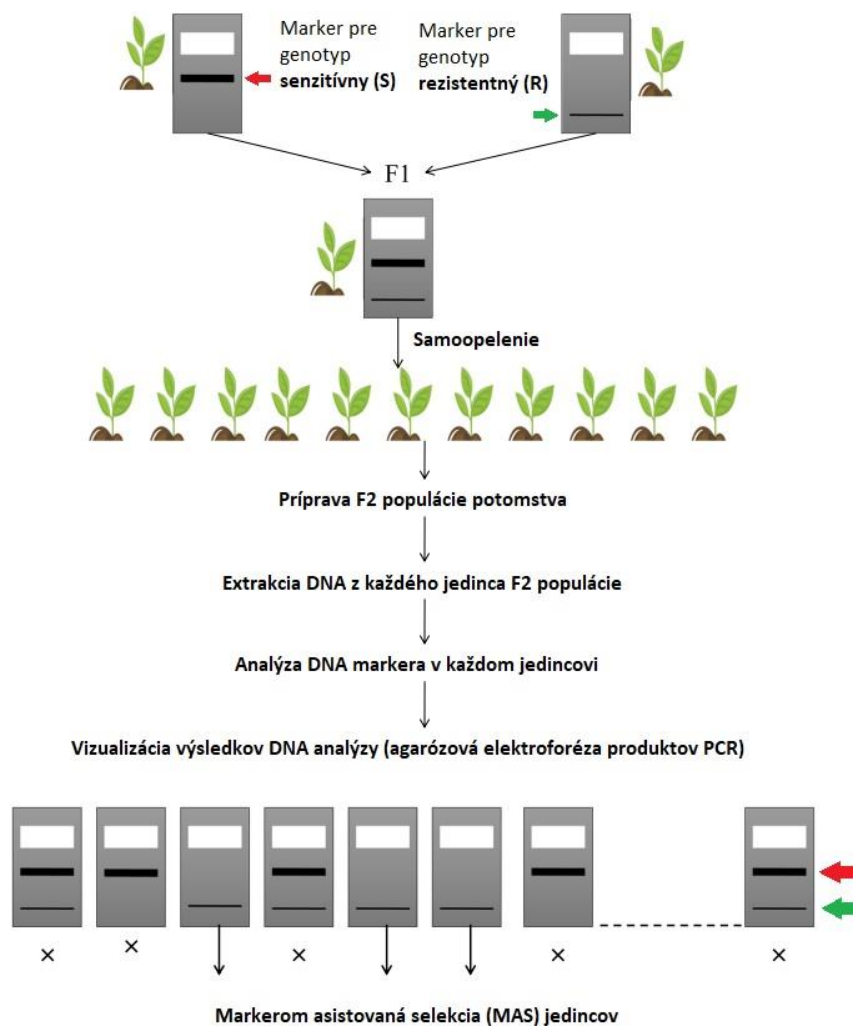
Molekulárne markery dokážu dopĺňať, v procese selekcie žiadaných jedincov v rámci vytvorenej populácie potomstva, tradičné fenotypové markery, prípadne biochemické markery. Molekulárnymi markermi sa dajú identifikovať aj gény, na ktorých detekciu nie sú žiadne metódy. Ak sa majú molekulárne markery identifikovať a použiť, najskôr musia byť identifikované konkrétne gény, ktoré zodpovedajú za vlastnosti a znaky zaujímavé pre šľachtenie. Ak sú tieto gény lokalizované na konkrétnych chromozómoch a lokusoch, potom sa hľadajú k nim molekulárne markery, ktoré sú s nimi v genetickej väzbe. Ak sa nájdu, je charakterizovaný ich vzťah k predmetnému génu a sú z hľadiska spoľahlivosti ich použitia, prípadne jednoduchosti ich detekcie, prakticky použiteľné. Kľúčová je **genetická väzba** medzi konkrétnym génom a molekulárnym markerom. Je to vlastnosť génov (v prípade molekulárnych markerov skôr lokusov), ktorou sa odchyľujú od Mendelových zákonov dedičnosti (pravidla o voľnej kombinovateľnosti alel). Niektoré páry génov nesegregujú (nerozdeľujú sa) nezávisle, ale sú dedené spoločne do potomstva. Dôvodom je ich umiestnenie na rovnakom chromozóme a tento jav je známy ako väzba génov (genetická väzba). Čím sú gény fyzicky lokalizované bližšie na chromozóme, tým viac sa zvyšuje pravdepodobnosť ich spoločného dedenia. Naopak, čím sú gény lokalizované ďalej od seba, tým je väčšia pravdepodobnosť, že sa počas rekombinácie rozdelia a do potomstva putujú nezávisle od seba. To platí univerzálne, nielen vo vzťahu gén – gén, ale aj vo vzťahu gén – marker (Obrázok 2.72).



Obrázok 2.72: Väzba génu s markerom a jej sila závislá od vzájomnej vzdialenosti (Zdroj: University of Utah, Genetic Science Learning Center, 2024, <https://learn.genetics.utah.edu/>, upravené).

Fyzická vzdialenosť medzi génom a markerom (t. j. medzi dvomi lokusmi) rozhoduje o sile genetickej väzby. Platí priama úmernosť, čím je fyzická vzdialenosť medzi génom a markerom menšia, tým je sila väzby medzi nimi silnejšia, t. j. pravdepodobnosť, že budú do potomstva zdedené spolu je vysoká. Zvyšujúcou sa vzdialenosťou medzi nimi sa sila väzby znižuje a tým aj pravdepodobnosť, že budú do potomstva zdedené spolu. V prípade, že sú gén a marker lokalizované na rôznych chromozómoch, žiadna genetická väzba medzi nimi nie je. Sila genetickej väzby medzi génom a markerom rozhoduje o hodnote a praktickej použiteľnosti molekulárneho markera v šľachtení.

Použitiu molekulárnych markerov v šľachtení, v etape selekcie v rámci potomstva, predchádza úsilie na získanie poznatkov z genomiky, transkriptomiky, proteomiky, metabolomiky, ale aj genetických transformácií, a samozrejme genetiky. Použitím je myslená tzv. **markerom asistovaná (sprostredkovaná) selekcia (MAS)** (Obrázok 2.73).

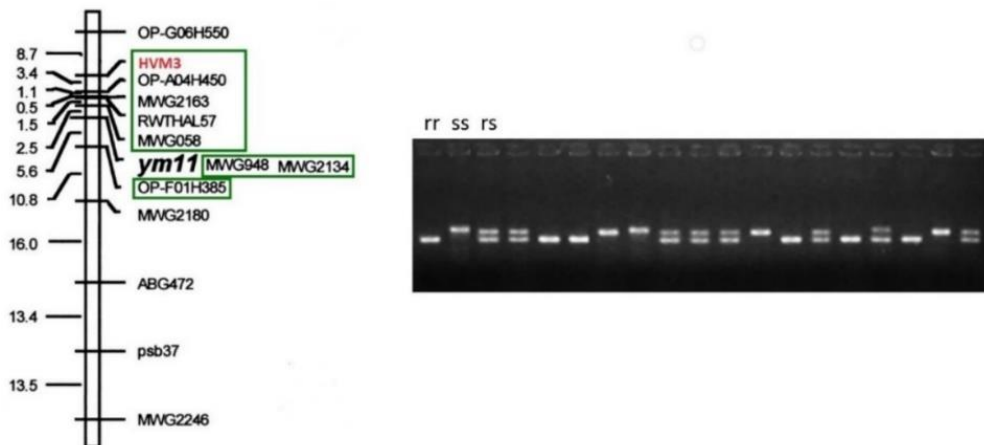


Obrázok 2.73: Princíp markerom asistovanej selekcie (MAS) v molekulárnom šľachtení (Zdroj: Hasan a kol., 2021, upravené).

Príklad na Obrázku 2.73 ukazuje schému molekulárneho šľachtenia, s použitím F_2 generácie. Pomocou DNA markera, viazaného na lokus podmieňujúci rezistenciu, respektíve senzitivitu voči určitému patogénu a ochoreniu, sú procesom MAS selektované príslušné jedince. Molekulárne markery sú buď dominantné, alebo kodominantné. Keďže MAS je založená na výbere (selekcii) jednotlivcov z populácie potomstva pomocou markeru, ktorý je vo väzbe so žiadaným génom a vlastnosťou s ním kódovanú (napríklad produktivitu, kvalitu, odolnosť voči chorobám, toleranciu voči abiotickému stresu a mnohými ďalšími kvalitatívnymi aj kvantitatívnymi znakmi), ide o nepriamu selekciu.

MAS je tým účinnejšia a efektívnejšia, čím je genetická väzba medzi génom a markerom silnejšia. Sila tejto väzby je vyjadrená v jednotkách cM (centimorgan). Tieto informácie sa nachádzajú vo väzbových genetických mapách. Obrázok 2.74 (v ľavej časti) prezentuje, ako príklad, časť dlhého ramena chromozómu 4H jačmeňa (vertikálna úsečka), na ktorom sú lokalizované viaceré lokusy (od OP-G06H550 hore až po MWG2246 dole). Medzi nimi je aj lokus, v ktorom je lokalizovaný recesívny gén *ym11*. Ten zodpovedá za rezistenciu jačmeňa voči vírusu jemnej mozaiky jačmeňa (BaMMV). Lokusy v zelených rámečkoch sú DNA markery lokalizované v rôznych vzdialenostiach (hodnoty v centimorganoch vľavo od chromozómu) od génu *ym11*. Vďaka ich blízkej lokalizácii od lokusu *ym11* sú všetky použiteľné ako DNA markery, na nepriamu selekciu jedincov na prítomnosť génu *ym11*. Obrázok 2.74 (v pravej časti) ukazuje analýzu (MAS) markeru HVM3 v jedincoch potomstva populácie F_2 . Marker HVM3 je kodominantný marker, lokalizovaný 5,3 cM od génu *ym11*. Umožňuje identifikovať recesívnych rezistentných homozygotov (rr), recesívnych senzitívnych homozygotov (ss) aj heterozygotných (rs) jedincov. Identifikovanie je vykonané nepriamou selekciou, pretože prítomnosť, respektíve neprítomnosť génu rezistencie *ym11*, hodnotíme podľa prítomnosti, respektíve neprítomnosti markera HVM3.

Výsledným efektom molekulárneho šľachtenia, v uvedenom príklade, sú selektované jedince rezistentné voči vírusu BaMMV (Obrázok 2.75), vďaka prítomnosti homozygotne recesívneho génu rezistencie *ym11*. Rezistencia, respektíve senzitivita, sa prejavila po umelej infekcii vírusom BaMMV na úrovni listov (vľavo), v štádiu klasenia (v strede) a počas dozrievania (vpravo).



Obrázok 2.74: Parciálna genetická väzbová mapa lokusov lokalizovaných okolo génu *ym11* (vľavo) a analyzované v individuálnych rastlinách potomstva F₂ generácie, pomocou kodominantného markera HVM3 (vpravo). rr = recesívni homozygoti rezistentní, ss = recesívni homozygoti senzitivní, rs = recesívni heterozygoti (Zdroj: Bauer a kol., 1997, upravené a Hudcovicová a kol., 2008, upravené).



Obrázok 2.75: Genotyp jačmeňa rezistentný voči BaMMV vďaka prítomnosti génu rezistencie *ym11* v homozygotne recesívnom stave. rr – recesívni homozygoti rezistentní, ss – recesívni homozygoti senzitivní (Zdroj: Yang a kol., 2014, upravené).

Najdôležitejším faktorom pre šľachtenie pomocou markerov je znalosť asociácií medzi markermi a génmi (znakmi, vlastnosťami) záujmu. Iba tie markery, ktoré sú v dostatočne silnej genetickej väzbe s cieľovými génmi (lokusmi) alebo znakmi, môžu poskytnúť dostatočne spoľahlivý a správny výber požadovaných jedincov z populácií potomstva. Na konštrukciu genetických väzbových máp je potrebné vykonať lokalizovanie individuálnych génov, kódujúcich kvalitatívne znaky, alebo lokusov pre kvantitatívne znaky (OTL) a stanovenie asociácií (väzieb) väzbovými alebo rekombinačnými analýzami.

Už známe a publikované genetické väzbové mapy (napríklad na Obrázok 2.74 vľavo), čím sú „hustejšie“, tým lepšie, dovoľujú molekularnému šľachtiteľovi vybrať najvhodnejší marker pre MAS žiadaného génu (lokusu). Molekulárných – DNA markerov je mnoho typov, analyzovaných rôznymi molekularnými technikami a metódami. Vhodné molekularne markery dovoľujú šľachtiteľovi vykonávať aj tzv. „pyramídovanie génov“ (postupné kumulovanie viacerých génov do jediného genotypu) i rekurentnú selekciu počas spätného kríženia (prenos požadovanej vlastnosti z jedného genotypu do uprednostňovaného genetického pozadia iného genotypu, viacerými spätnými krížzeniami a opakovanými výbermi, čím sa neustále zvyšuje alebo znižuje frekvencia alely dedených znakov v rámci populácie).

Treba uviesť, že aj molekularne šľachtenie, a ďalšie nové metódy šľachtenia rastlín, dopĺňajú tradičné, konvenčné šľachtenie. Limitujúcimi faktormi sú zatiaľ vysoké náklady, potrebné technické vybavenie a skúsený personál. Je však isté, že bude stále viac a viac integrované do praktických šľachtiteľských programov pri viacerých druhoch poľnohospodárskych plodín.

2.4 Zoznam použitej literatúry

ABBAS, M.S.T. 2018. Genetically engineered (modified) crops (*Bacillus thuringiensis* crops) and the world controversy on their safety. In Egyptian Journal of Biological Pest Control. ISSN: 2536-9342, 2018, roč. 28, 52.

ANAMI, S. – NJUGUNA, E. – COUSSENS, G. – AESAERT, S. – VAN LIJSEBETTENS, M. 2013. Higher plant transformation: principles and molecular tools. In International Journal of Developmental Biology. ISSN: 0214-6282, 2013, roč. 57, 483-494.

ANIMASAUN, D.A., LAWRENCE, J.A. 2023. Antisense RNA (asRNA) technology: the concept and applications in crop improvement and sustainable agriculture. In Molecular Biology Reporter. ISSN: 1573-4978, 2023, roč. 50, 9454-9557.

ASADI, R. – ABDOLAAHI, M.R. – MOOSAVI S.S. 2022. Alginate encapsulation of micro-cuttings in endangered *Satureja khuzistanica* species: a promising method for obtaining genetically stable plants with high rosmarinic acid content. In Plant Cell, Tissue and Organ Culture. ISSN: 1573-5044, 2022, roč. 151, 307-320.

AYAN, A. – MERİÇ, S. – GÜMÜŞ, T. – ATAĞ, Ç. 2022. Next generation of transgenic plants: From farming to pharming. In Sithole-Niang, I. (Ed.). Genetically Modified Plants and Beyond. IntechOpen Ltd., London, 2022, ISBN: 978-1-83969-876-7, s. 1-33.

BAJPAI, R. – CHATURVEDI, R. 2018. Haploid embryogenesis in tea. In Mohan Jain, S. – Gupta, P. (Eds.). Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants. Springer, 2021, ISBN: 1875-1334, s. 349-368.

BANJAC, N. – KRSTIĆ-MILOŠEVIĆ, D. – MIJALKOVIĆ, T. – PETROVIĆ, M. – ĆOSIĆ, T. – STANIŠIĆ, M. – VINTERHALTER, B. 2023. *In vitro* shoot multiplication and regeneration of the recalcitrant rocket (*Eruca sativa* Mill.) variety Domaća rukola. In Horticulturae. ISSN: 2311-7524, 2023, roč. 9, 533.

BAUER, E. – WEYEN, J. – SCHIEMANN, A. – GRANER, A. – ORDON, F. 1997. Molecular mapping of novel resistance genes against Barley Mild Mosaic Virus (BaMMV). In Theoretical and Applied Genetics. ISSN: 1432-2242, 1997, roč. 95, 1263-1269.

BOHRA, P. – WAMAN, A.A. 2019. Conservation of horticultural genetic resources. In Gangaiah, B a kol. (Eds.). An Overview of Integrated Farming Systems of Coastal India. ICAR-Central Inland Agricultural Research Institute, Port Blair, 2019, ISBN: 978-93-85414-60-0, s. 55-59.

- BUTELLI, E. – TITTA, L. – GIORGIO, M. – MOCK, H.-P. – MATROS, A. – PETEREK, S. – SCHIJLEN, E.G.W.M. – HALL, R.D. – BOVY, A.G. – LUO, J. – MARTIN, C. 2008. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. In *Nature Biotechnology*. ISSN: 1546-1696, 2008, roč. 26, 1301-1308.
- CAMPBELL, N.A. 2005. DNA technology and genomics. In Campbell, N.A. – Reece, J.B. – Taylor, M.R. – Simon, E.J. (Eds.). *Biology: Concepts & Connections*. Pearson College Div, 2005, ISBN: 9780131934801, s. 276-299.
- CHAUDHARY, S. – GROVER, A. – SHARMA, P.C. 2021. MicroRNAs: Potential targets for developing stress-tolerant crops. In *Life*. ISSN: 2075-1729, 2021, roč. 11, 289.
- CHÁVEZ-PESQUEIRA, M. – NÚÑEZ-FARFÁN, J. 2017. Domestication and genetics of papaya: A Review. In *Frontiers in Ecology and Evolution*. ISSN: 2296-701X, 2017, 155.
- DALAKOURAS, A. – WASSENEGGER, M. – DADAMI, E. – GANOPOULOS, I. – PAPPAS, M.L. – PAPADOPOULOU, K. 2020. Genetically modified organism-free RNA interference: Exogenous application of RNA molecules in plants. In *Plant Physiology*. ISSN: 0176-1617, 2020, roč. 182, 38-50.
- DOUDNA, J.A. – CHARPENTIER, E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. In *Science*. ISSN: 0036-8075, 2014, roč. 346, 1258096.
- EL-BANNA, A.N. – DORA, S.S. – ABOSHOSHA, A.A. – EL-MORSY, N.A. 2015. Horticultural and genetical characterization of tomato somaclones under salt and heat stress. In *International Journal of Current Biosciences in Plant Biology*. ISSN: 2349-8080, 2015, roč. 2, s. 128-142.
- ELIBY, S. – BEKKUZHINA, S. – KISHCHENKO, C. – ISKALOVA, G. – LYLISHBAYEVA, G. – JATAYEV, S. – SOOLE, K. – LANGRIDGE, P. – BORISJUK, N. – SHAVRUKOV, Y. 2022. Developments and prospects for doubled haploid wheat. In *Biotechnology Advances*. ISSN: 1873-1899, 2022, roč. 60, 108007.
- FAVAS, P.J.C. – PRATAS, J. – VARUN, M. – D'SOUZA, R. – PAUL, M.S. 2014. Phytoremediation of soils contaminated with metals and metalloids at mining areas: Potential of native flora. In Hernandez Soriano, M.C. (Ed.). *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*. IntechOpen Ltd., London, 2014, ISBN: 978-953-51-4235-5, s. 1-32.
- FERNÁNDEZ-CHAPA, D. – VILLALOBOS, J.R. – GALÁN-WONG, L. 2019. Toxic potential of *Bacillus thuringiensis*: An overview. In Jia, Y. (Ed.). *Protecting Rice Grains in the Post-Genomic Era*. IntechOpen Ltd., London, 2019, ISBN: 978-1-83962-227-4, s. 1-22.

GERSZBERG, A. – HNATUSZKO-KONKA, K. 2022. Compendium on food crop plants as a platform for pharmaceutical protein production. In *International Journal of Molecular Sciences*. ISSN: 1422-0067, 2022, roč. 23, 3236.

GHARAGHANI, A. – SOLHJOO, S. 2021. Varietal diversification of stone fruits. In Mir, M.M. – Iqbal, U. – Mir, S.A. (Eds.). *Production Technology of Stone Fruits*. Singapore: Springer, 2021, ISBN: 978-981-15-8920-1, s. 1-56.

GIL-HUMANES, J. – PISTÓN, F. – TOLLEFSEN, S. – SOLLID, L.M. – BARRO, F. 2010. Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. In *Proceedings of the National Academy of Sciences*. ISSN: 1091-6490, 2010, roč. 107, 17023-17028.

GIL-HUMANES, J. – PISTÓN, F. – ALTAMIRANO-FORTOUL, R. – REAL, A. – COMINO, I. – SOUSA, C. – ROSELL, C. – BARRO, F. 2014. Reduced-gliadin wheat bread: An alternative to the gluten-free diet for consumers suffering gluten-related pathologies. In *PLoS ONE*. ISSN: 1932-6203, 2014, roč. 9, e90898.

GODBEY, W.T. 2014. Transgenics. In Godbey, W.T. (Ed.) *An Introduction to Biotechnology The Science, Technology and Medical Applications*. Elsevier, 2014, ISBN: 978-1-907568-28-10, s. 375-392.

GODOY, F. – OLIVOS-HERNÁNDEZ, K. – STANGE, C. – HANDFORD, M. 2021. Abiotic stress in crop species: Improving tolerance by applying plant metabolites. In *Plants*. ISSN: 2223-7747, 2021, roč. 10, 186.

GOSTIMSKAYA, I. 2022. CRISPR-Cas9: A history of its discovery and ethical considerations of its use in genome editing. In *Biochemistry (Moscow)*. ISSN: 0006-2979, 2022, roč. 87, 777-788.

GUERTLER, P. – PALLARZ, S. – BELTER, A. – ECKERMANN, K.N. – GROHMAN, L. 2023. Detection of commercialized plant products derived from new genomic techniques (NGT) - Practical examples and current perspectives. In *Food Control*. ISSN: 1873-7129, 2023, roč. 152, 109869.

GUILLON, S. – TRÉMOUILLAUX, J. – PATI, P.K. – RIDEAU, M. – GANTET, P. 2006. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. In *Current Opinion in Plant Biology*, ISSN: 1369-5266, 2006, roč. 9, 341-346.

HASAN, N. – CHOUDHARY, S. – NAAZ, N. – SHARMA, N. – LASKAR, R.A. 2021. Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes. In *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. ISSN: 1687-157X, 2021, roč. 19, 128.

HODKINSON, T.R. – WALDREN, S. – PARNELL, J.A.N. – KELLEHER, C.T. – SALAMIN, K. – SALAMIN, N. DNA banking for plant breeding, biotechnology and biodiversity evaluation. In *Journal of Plant Research*. ISSN: 1618-0860. 2007, roč. 120, 17-29.

HUDCOVICOVÁ, M. – ŠUDYOVÁ, V. – ŠLIKOVÁ, S. – GREGOVÁ, E. – KRAIC, J. – ORDON, F. – MIHÁLIK, D. – HOREVAJ, V. – ŠRAMKOVÁ, Z. 2008. Marker-assisted selection for the development of improved barley and wheat lines. In *Acta Agronomica Hungarica*. ISSN: 1588-2527, 2008, roč. 56, 385-392.

JENSEN, C.J. 1983. Producing haploid plants by chromosome elimination. In *Proceedings of a workshop Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement*. Science Press, Beijing, 1983, ISBN: 971-104-108-1, s. 55-90.

JIROUTOVÁ, P. – SEDLÁK, J. 2020. Cryobiotechnology of plants: A hot topic not only for gene banks. In *Applied Sciences*. ISSN: 2076-3417, 2020, roč. 10, 4677.

KARATAŞ, İ. 2022. Production of rosmarinic acid and biomass from adventitious root cultures of *Ocimum basilicum* by optimization of medium components in airlift bioreactors. In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. ISSN: 1573-5044, 2022, roč. 151, 235-251.

KASHTWARI, M. – MANSOOR, S. – WANI, A.A. – NAJAR, M.A. – DESHMUKH, R.K. – BALOCH, F.S. – ABIDI, I. – ZARGAR, S.M. 2022. Random mutagenesis in vegetatively propagated crops: opportunities, challenges and genome editing prospects. In *Molecular Biology Reports*. ISSN: 0301-4851, 2022, roč. 49, 5729-5749.

KAUR, R.P. – DEVI, S. 2019. In planta transformation in plants: A review. In *Agricultural Reviews*, ISSN: 0976-0741, 2019, roč. 40, 159-174.

KIEŁKOWSKA, A., ADAMUS, A. 2019. Peptide growth factor phytosulfokine- α stimulates cell divisions and enhances regeneration from *B. oleracea* var. *capitata* L. protoplast culture. In *Journal of Plant Growth Regulation*. ISSN: 1435-8107, roč. 38, 931-944.

KINDT Jr, J.W. – KAZI, N. – KAHANDA, I. – DE COSTA, C. – CARNAHAN, R. – WILSON, B.A. – MASON, H. – RUPASSARA, S.I. 2023. The most natural possible vaccine administered in the most natural possible way - Noninvasive over injectable vaccine delivery routes. In Aribi, M. (Ed.) 2023. *New Topics in Vaccine Development*. IntechOpen Ltd., London, 2023, s. 1-26. Online First (<https://www.intechopen.com/online-first/88119#>)

KOCHAN, E. – SZYMCZYK, P. – KUŹMA, Ł. – LIPERT, A. – SZYMAŃSKA, G. 2017. Yeast extract stimulates ginsenoside production in hairy root cultures of American ginseng cultivated in shake flasks and nutrient sprinkle bioreactors. In *Molecules*. ISSN: 1420-3049, 2017, roč. 22, 880.

- KORDI, M. – BORZOUYI, Z. – SALAMI, R. – LAJAYER, B.A. 2023. Peptide production by molecular farming with antiviral effects. In Keswani, C. a kol. (Eds.) 2023. *Agricultural Bioeconomy: Innovation and Foresight in the Post-COVID Era*. ISBN: 978-0-323-90569-5, Elsevier Inc., s. 77-84.
- KUROP, V.M. – THOMAS, J. 2020. Edible vaccines: Promises and challenges. In *Molecular Biotechnology*. ISSN: 1559-0305, 2020, roč. 62, 79-90.
- LALA, S. 2021. Nanoparticles as elicitors and harvesters of economically important secondary metabolites in higher plants: A review. In *IET Nanobiotechnology*. ISSN: 1751-875X, 2017, roč. 15, 28-57.
- LARKIN, P.K. – SCOWCROFT, W.R. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. In *Theoretical and Applied Genetics*. ISSN: 0040-5752, roč. 60, 197-214.
- LEE, C.E. – LEE, J.H. – CHUNG, H.J. – LEE, D.W. – LIM, J.S. – KIM, K. – LEE, Y.S. – KIM, K.S. – MIN, H.J. – KO, K. – MYUNG, S.C. 2023. Expression and in vitro function of anti-PD-L1 human antibody expressed in plant. In *Plant Biotechnology Reports*. ISSN: 1863-5466, roč. 17, 531-539.
- LEE, J. – CHIN, J.H. – AHN, S.-N. – KOH, H.-J. 2015. Brief history and perspectives on plant breeding. In Koh, H.J. – Kwon, S.Y. – Thomson, M. (Eds.) *Current Technologies in Plant Molecular Breeding*. ISBN: 978-94-017-9995-9, 2015, Springer, Dordrecht. Netherlands. s. 1-14.
- LEE, J. – LEE, S.-K., PARK, J.-S. – LEE, K.-R., 2023. Plant-made pharmaceuticals: exploring studies for the production of recombinant protein in plants and assessing challenges ahead. In *Plant Biotechnology Reports*. ISSN: 1863-5466, roč. 17, 53-95.
- LEUZINGER, K. – DENT, M. – HURTADO, J. – STAHNKE, J. – LAI, H. – ZHOU, X. – CHEN, Q.. 2013. Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. In *Journal of Visualized Experiment*. ISSN: 1940-087X, 2013, roč. 77, e50521.
- LIANG, G.-L. 2015. Molecular marker-assisted breeding: A plant breeder's review. In Al-Khairi, J.M. – Mohan Jain, S. – Johnson, D.V. (Eds.). 2015. *Advances in Plant Breeding Strategies: Breeding, Biotechnology and Molecular Tools*. ISBN: 978-3-319-22521-0, 2015, Springer Ing., s. 431-472.
- LISHEWSKI, K. 2015. Biobanking on translational omics: Bulging with molecular eiches, next-generation biobanks plan to back personalized medicine. In *Genetic Engineering and Biotechnology News*. ISSN: 1935-472X, roč. 35, 30-32.

- LIZÁRRAGA, A. – ASCASÍBAR, J. – GONZÁLEZ, M.L. 2017. Fast and effective thermotherapy treatment for in vitro virus eradication in apple and pear trees. In *American Journal of Plant Sciences*. ISSN: 2158-2742, 2017, roč. 8, 2474-2482.
- LÓPEZ J. – RAYAS, A. – SANTOS, A. – MEDERO, V. – BEOVIDES, Y. – BASAIL, M. 2017. Mutation induction using gamma irradiation and embryogenic cell suspension in plantain (*Musa spp.*). In Jankowicz-Cieslak, J. – Tai, T. – Kumlehn, J. – Till, B. (Eds.) 2017. *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding. Protocols*. ISBN 978-3-319-45021-6, 2017, Springer, s. 55-72 (kapitola aj celá kniha sú dostupné na: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-45021-6>).
- MA, L. – KONG, F. – SUN, K. – WANG, T. – GUO, T. 2021. From classical radiation to modern radiation: Past, present, and future of radiation mutation breeding. In *Frontiers in Public Health*. ISSN: 2296-2565, 2021, 768071.
- MAGNUSDOTTIR, A. – VIDARSSON, H. – BJÖRNSSON, J.M. – ÖRVAR, B.L. 2013. Barley grains for the production of endotoxin-free growth factors. In *Trends in Biotechnology*. ISSN: 1879-3096, roč. 31, 572-580.
- MALUSZYNSKI, M. – AHLOOWALIA, B.S. – SIGURBJÖRNSSON, B. 1995. Application of in vivo and in vitro mutation techniques for crop improvement. In *Euphytica*. ISSN: 0014-2336, 1995, roč. 85, 303-315.
- MANOHAR, B. – SEEMA – SUSHMITA – SINHA, A. – PANDIT, S.K. 2018. Biotechnology applications in weed management. In *Current Journal of Applied Science and Technology*. ISSN: 2457-1024, 2018, CJA5888.
- MOSA K.A. – AHMED, A.E. – HAZEM, Y. – KANAWATI, I.S. – ABDULLAH, A. – HERNANDEZ-SORI, L. – ALI, M.A. – VENDRAME, W. 2023. Insights into cryopreservation, recovery and genetic stability of medicinal plant tissues. In *Fitoterapia*. ISSN: 0367-326X, 2023, roč. 169, 105555.
- MULLINS, E. – BRESSON, J.-L. – DALMAY, T. – DEWHURST, I.C. – EPSTEIN, M.M. – FIRBANK, L.G. – GUERCHE, P. – HEJATKO, J. – MORENO, F.J. – NAEGELI, H. – NOGUÉ, F. – SÁNCHEZ SERRANO, J.J. – SAVOINI, G. – VEROMANN, E. – VERONESI, F. – CASACUBERTA, J. – LENZI, P. – GUAJARDO, I.M. – RAFFAELLO, T. – ROSTOKS, N. 2021. *In vivo* and *in vitro* random mutagenesis techniques in plants. In *EFSA Journal*. ISSN: 1831-4732, 2021, roč. 19, 6611.
- NARAYANI, M. – SRIVASTAVA, S. 2017. Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. In *Phytochemistry Reviews*. ISSN: 1572-980X, 2017, roč. 16, 1227-1252.

NDUNGURU J. – TAYLOR, N.J. – YADAV, J. – ALY, H. – LEGG, J.P. – AVELING, T. – THOMPSON, G. – FAUQUET, C.M. 2005. Application of FTA technology for sampling, recovery and molecular characterization of viral pathogens and virus-derived transgenes from plant tissues. In *Virology Journal*. ISSN: 1743-422X, 2005, roč. 2, 45.

OZYIGIT, I.I. – DOGAN, I. – HOCAOGLU-OZYGIT, A. – YALCIN, B. – ERDOGAN, A. – YALCIN, I.E. – CABI, E. – KAYA, Y. 2023. Production of secondary metabolites using tissue culture-based biotechnological applications. In *Frontiers in Plant Science*. ISSN: 1664-462X, 2023, roč. 14, 1132555.

PILATE, G. – GUINEY, E. – HOLT, K. – PETIT-CONIL, M. – LAPIERRE, C. – LEPLÉ, J.-C. – POLLET, B. – MILA, I. – WEBSTER, E.A. – MARSTORP, H.G. – HOPKINS, D.W. – JOUANIN, L. – BOERJAN, W. – SCHUCH, W. – CORNU, D. – HALPIN, C. 2002. Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. In *Nature Biotechnology*. ISSN: 1546-1696, 2002, roč. 20, 607-612.

PURWANTORO, A. IRSYADI, M.. ITRI, W.D. – FATUMI, N.C. – FAJRINA, S.N. 2023. Efficient floral dip transformation method using *Agrobacterium tumefaciens* on *Cosmos sulphureus* Cav. In *Saudi Journal of Biological Sciences*. ISSN: 1319-562X, 2023, roč. 30, 103702.

RAMEZANIAGHDAM, M. – NAHDI, N.D. – RESKI, R. 2002. Recombinant spider silk: Promises and bottlenecks. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. ISSN: 2296-4185, 2022, roč. 10, 835637.

RAMKUMAR, T.R. 2020. A short history and perspectives on plant genetic transformation. In Rustgi, S. – Luo, H. (Eds.). *Biolytic DNA Delivery in Plants*. Humana Press, 2020, ISBN 978-1-0716-0355-0, s. 39-68.

RATTAN, S. – PARTAP, M. – ASHRITA – KUMAR, P. – SOOD, A. – WARGHAT, A.R. 2022. Callus culture approach towards production of plant secondary metabolites. In Kumar Srivastava, D.K. – Kumar Thakur, A. – Kumar P. (Eds.). *Agricultural Biotechnology: Latest Research and Trends*. Springer, Singapore, 2021, ISBN: 978-981-16-2339-4, s. 171-183.

RATTANPAL, H.S. – SINGH, G. – GUPTA, M. 2019. Studies on mutation breeding in mandarin variety Kinnow. In: *Current Science*. ISSN: 0011-3891, 2019, roč. 116, 483-487.

REEVES, R.D. – BAKER, J.M. – JAFFRÉ, T. – ERSKINE, P.D. – ECHEVARRTIA, G. – VAN DER ENT, A. 2017. A global database for plants that hyperaccumulate metal and metalloids trace elements. In *New Phytologist*. ISSN: 1469-8137, 2017, roč. 218, 407-411.

RUBIOLA, S. – CHIESA, F. – DALMASSO, A. – DI CICCIO, P. – CIVERA, T. 2020. Detection of antimicrobial resistance genes in the milk production environment: Impact of host

DNA and sequencing depth. In *Frontiers in Microbiology*. ISSN: 1664-302X, 2020, roč. 11, 1983.

SAHIJRAM, L. – SONEJI, J.R. – NAREN, A. – RAO, B.M. 2013. Hybrid embryo rescue: a non-conventional breeding strategy in horticultural crops. In *Journal of Horticultural Science*. ISSN: 0973-354X, 2013, roč. 8, 1-20.

SALGOTRA, R.K. – CHAUHAN, B.S. 2023. Genetic diversity, conservation, and utilization of plant genetic resources. In *Genes*. ISSN: 2073-4425, 2023, roč. 14, 174.

SMÝKAL, P. – NELSON, M.N. – BERGER, J.D. – VON WETTBERG, E.J.B. 2018. The impact of genetic changes during crop domestication. In *Agronomy*. ISSN: 2073-4395, 2018, roč. 8, 119.

SOMSSICH, M. 2019. A short history of plant transformation. In *PeerJ Preprints*, ISSN: 2167-9843, 2019, 1-28.

SU, H. – VAN EERDE, A. – RIMSTAD, E. – BOCK, R. – BRANZA-NICHITA, N. – YAKOVLEV, I.A. – CLARKE, J.L. 2023. Plant-made vaccines against viral diseases in humans and farm animals. In *Frontiers in Plant Science*. ISSN: 1664-462X, 2023, roč. 14, 1170815.

SU, W. – XU, M. – RADANI, Y. – YANG, L. 2023. Technological development and application of plant genetic Transformation. In *International Journal of Molecular Sciences*. ISSN: 1422-0067, 2023, roč. 24, 10646.

TITOVA, M. – POPOVA, E. – NOSOV, A. 2024. Bioreactor systems for plant cell cultivation at the Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences: 50 Years of technology evolution from laboratory to industrial implications. In *Plants*. ISSN: 2223-7747, 2024, roč. 13, 430.

VU, T.V. – DAS, S. – HENSEL, G. – KIM, J.-Y. 2022. Genome editing and beyond: what does it mean for the future of plant breeding? In *Planta*. ISSN: 1432-2048, 2022, roč. 255, 130.

WAIRICH, A., RICACHENEVSKY, F.K., LEE, S. 2022. A tale of two metals: Biofortification of rice grains with iron and zinc. In *Frontiers in Plant Science*. ISSN: 1664-462X, 2022, roč. 13, 944624.

WIRZ, H. – SAUER-BUDGE, A.F. – BRIGGS, J. – SHARPE, A. – SHU, S. – SHARON, A. 2012. Automated production of plant-based vaccines and pharmaceuticals. In *Journal of Laboratory Automation*. ISSN: 22110682, 2012, roč. 17, 449-457.

XIAO, S.-X. – biswar, m.k. – li, m.-y. – deng, x.-x., a kol. 2014. Production and molecular characterization of diploid and tetraploid somatic cybrid plants between male sterile Satsuma mandarin and seedy sweet orange cultivars. In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. ISSN: 1573-5044, 2014, roč. 116, 81-88.

YAN, Y. a kol. 2022. Nanotechnology strategies for plant genetic engineering. In *Advanced Materials*. ISSN: 1521-4095, 2022, roč. 34, 2106945.

YANG, P. – LÜPKEN, T. – HABEKUS, A. – HENSEL, G. – STEUERNAGEL, B. – KILIAN, B. – ARIYADASA, R. – HIMMELBACH, A. – KUMLEHN, J. – SCHOLZ, U. – ORDON, F. – STEIN N. 2014. Protein disulfide isomerase like 5-1 is a susceptibility factor to plant viruses. In *Proceedings of the National Academy of Sciences*. ISSN: 1091-6490, 2014, roč. 111, 2104-2019..

YOON, J.B. – KWON, S.-W. – HAM, T.-H. – KIM, S. – THOMSON, M. – HECHANOVA, S.L.S. – JENA, K.K. – PARK, Y. 2015. Marker-assisted breeding. In Koh, H.-J. – Kwon, S.-Y. – Thomson, M. (Eds.). *Current Technologies in Plant Molecular Breeding*. Springer, 2015, ISBN: 78-94-017-9996-6, s. 95-144.

YUAN, H.Y. – KAGALE, S. – FERRIE, A.M.R. 2024. Multifaced roles of transcription factors during plant embryogenesis. In *Frontiers in Plant Science*. ISSN: 1664-462X, 2024, roč. 14, 1322728.

ZARANEK, M. – PÉREZ-PÉREZ, R. – MILEWSKA-HENDEL, A. – GRZEBELUS, E. – BETEKHTIN, A. 2023. Efficient and rapid system of plant regeneration via protoplast cultures of *Fagopyrum esculentum* Moench. In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. ISSN: 1573-5044, 2023, roč. 154, 673-687.

ZHANG, L. – ROUTSONG, R. – STRAND, S.E. 2019. Greatly enhanced removal of volatile organic carcinogens by a genetically modified houseplant, pothos ivy (*Epipremnum aureum*) expressing the mammalian cytochrome P450 *2e1* gene. In *Environmental Science and Technology*. ISSN: 1520-5851, roč. 53, 325-331.

151/2002 Z.z. z 19. februára 2002 Zákon o používaní genetických technológií a geneticky modifikovaných organizmov (dostupný na: <https://www.slov-lex.sk/pravne-predpisy/SK/ZZ/2002/151/>).

291/1996 Z.z. z 13. septembra 1996 Zákon Národnej rady Slovenskej republiky o odrodách a osivách (dostupný na: https://www.slov-lex.sk/pravne-predpisy/SK/ZZ/1996/291/vyhlasene_znenie.html).

Časť 3. Živočíšne biotechnológie

doc. RNDr. Ján Rafay, CSc.

Časť 3 opisuje vznik živočíšnych biotechnológií od prvých výsledkov domestikácie zvierat poľnohospodársky usadených spoločností ľudí po moderné metódy schopné cielene modifikovať genómy a využívať reprodukčný, rastový, behaviorálny a imunitný potenciál zvierat pre potreby človeka.

V samostatných častiach sú základné informácie o existujúcich metódach na zlepšenie živočíšnej reprodukcie, využitie genomických techník v chove hospodárskych a voľne žijúcich zvierat, význam nových techník pri terapii a tvorbe aktívneho zdravia hospodárskych zvierat, transfer poznatkov zo živočíšnych biotechnológií v medicínskom výskume a praxi, dobré životné podmienky zvierat, ktoré sú výsledkom biotechnologických manipulácií, možnosti zlepšenia výživy zvierat, z hľadiska využitia súčasných biotechnologických metód a biotechnologické aplikácie zlepšujúce výživu zvierat a využitie sekundárnych surovín zo spracovania rastlinných surovín v kŕmení zvierat.

Živočíšne biotechnológie tak predstavujú akcelerujúcu oblasť biotechnológií s intenzívne sa vyvíjajúcimi poznatkami a bezprostrednými komerčnými aplikáciami. Tento rozvoj však ide paralelne s rozvojom vedomostí o biologických potrebách produkčných zvierat z hľadiska ich fyziologických, anatomických a behaviorálnych požiadaviek na chovné prostredie. Na rozdiel od mikroorganizmov a rastlín majú zvieratá nervovú sústavu. A preto biotechnologické manipulácie sú spojené s etickými normami, ktoré vychádzajú z konštatovania, že nervová sústava zvierat sprostredkováva podnety z vonkajšieho prostredia a teda, podobne ako pri ľuďoch, môžu pociťovať negatívne vnemy a vyvolávať reakcie (strach, bolesť, bránenie, prejavovať prirodzené inštinkty). Využívanie biotechnologických postupov pri zvieratách môže tieto negatívne dopady na zvieratá eliminovať alebo znížiť.

3 Živočíšne biotechnológie

3.1 Vznik a história využívania biotechnologických postupov v chove zvierat

Termín „biotechnológia“ zaviedol v roku 1919 maďarský poľnohospodársky inžinier Karl Ereky (Obrázok 3.1), ktorý týmto pojmom opísal procesy umožňujúce vyrábať produkty pomocou živých organizmov. Táto oblasť sa v priebehu desaťročí vyvíjala, ale skutočná akcelerácia poznatkov nastala v druhej polovici 20. storočia s príchodom nových techník genetického inžinierstva. Techniky, ako je editácia genómu alebo technológia rekombinantnej DNA po prvýkrát umožnili výber fragmentov reťazca DNA z jedného organizmu a ich vloženie do DNA iného organizmu. Schopnosť prinútiť bakteriálne alebo eukaryotické bunky produkovať cudzie rastlinné a živočíšne molekuly viedla k novej biologickej revolúcii. Predovšetkým genetické inžinierstvo prinieslo biotechnológii do popredia záujmu s následnými komerčnými aplikáciami.



Obrázok 3.1: Karl (Károly) Ereky (1878–1952) (Zdroj:

<https://www.medboundtimes.com/biotechnology/kroly-ereky-an-agro-engineer-who-gave-birth-to-the-biotechnology>).

Prvé úspechy prišli postupne so zlepšenými laboratórnymi metódami, ale významný pokrok bol spojený s výrobou nových liekov a geneticky upravených plodín. Syntéza ľudského inzulínu v bakteriálnej kultúre v roku 1978 poukázala na obrovský potenciál nových biotechnologických postupov a biotechnologický priemysel začal akcelerovať. Úspechy v rastlinných biotechnológiách sú dnes zrejmé, keďže asi 70 % spracovaných potravín v obchodnej sieti

obsahuje zložky získané z biotechnologických plodín. Prvá komoditná plodina, odroda kukurice odolná voči hmyzu, bola vypestovaná a predávaná v roku 1996. Na druhej strane, aplikácie biotechnológií v živočíšnej výrobe mali obmedzené komerčné využitie.

Počiatočný prielom v živočíšnych biotechnológiách prišiel s vytváraním klonov zvierat. Míľnikom na tejto ceste bolo narodenie ovce Dolly, prvého zvierat'a klonovaného pomocou prenosu diploidného jadra diferencovanej bunky (mliečna žľaza) do oocyту zbaveného jadra. Vedci odvtedy naklonovali ďalšie cicavce vrátane kráv, kôz, ošípaných a myší. Celkovo nízka miera úspešnosti klonovania a častý výskyt vývinových abnormalít pri klonovaných zvieratách však poukázal na potrebu ďalšieho výskumu. V súčasnosti existuje niekoľko stoviek klonovaných jedincov mliečnych a mäsových plemien hovädzieho dobytku, napriek tomu, že ich potravinové produkty nemôžu byť určené na spotrebu. Pozoruhodný vedecký prielom v živočíšnych biotechnológiách prišiel vo forme technológie, pomocou ktorej bolo možné vložiť cudzorodý gén do genómu zvierat'a a zabezpečiť jeho expresiu.

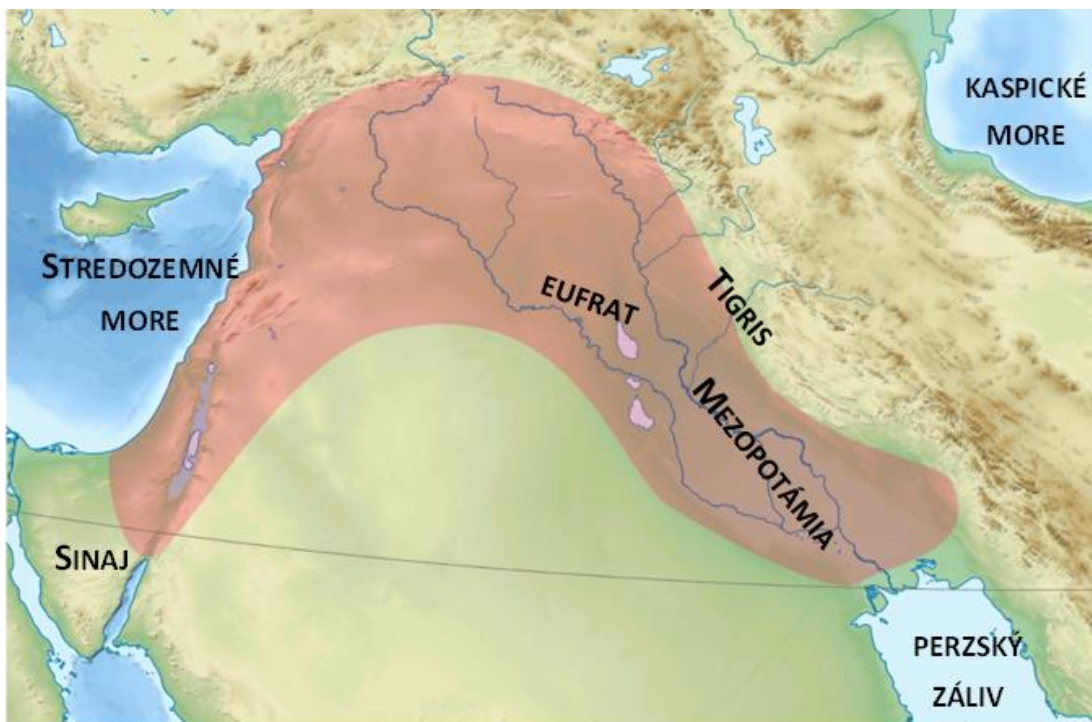
Jednou z prvých zvažovaných komerčných aplikácií bolo použitie transgénnych (geneticky modifikovaných) hospodárskych zvierat ako **bioreaktorov** na výrobu liekov alebo ako darcov orgánov pre **xenotransplantácie**. Výrazné obmedzenie aplikácií týchto technológií spôsobili obavy týkajúceho sa rizika kontaminácie konečného produktu živočíšnymi patogénmi (napr. BSE – boviná spongiformná encefalopatia - choroba „šialených kráv). Komerčné využitie transgénnych hospodárskych zvierat na výrobu potravín taktiež nie je povolené, keďže regulačné orgány a verejnosť vyjadrili obavy o bezpečnosť potravín, dobré životné podmienky zvierat a životné prostredie. Preto aj prvé transgénne živočíchy, ktoré sa začali predávať boli spoločenské zvieratá.

Živočíšne biotechnológie teda predstavujú technologické aplikácie, ktoré využívajú živočíchy na tvorbu alebo modifikáciu produktov metabolizmu zvierat (suroviny pre potravinárstvo, pre farmaceutické a medicínske využitie, využitie behaviorálnych charakteristík zvierat).

3.1.1 Domestikácia zvierat

Za prvé praktické výsledky v oblasti živočíšnych biotechnológií možno považovať proces zdomácnovania (domestikácie) zvierat pred viac ako 11 000 rokmi. Pravekí ľudia boli pôvodne lovci a zberači, ktorí sa živili tým, že sledovali migráciu zvierat a dozrievanie rastlín vhodných na konzum. Početnosť populácií lovcov bola závislá na nestabilných a nepredvídateľných

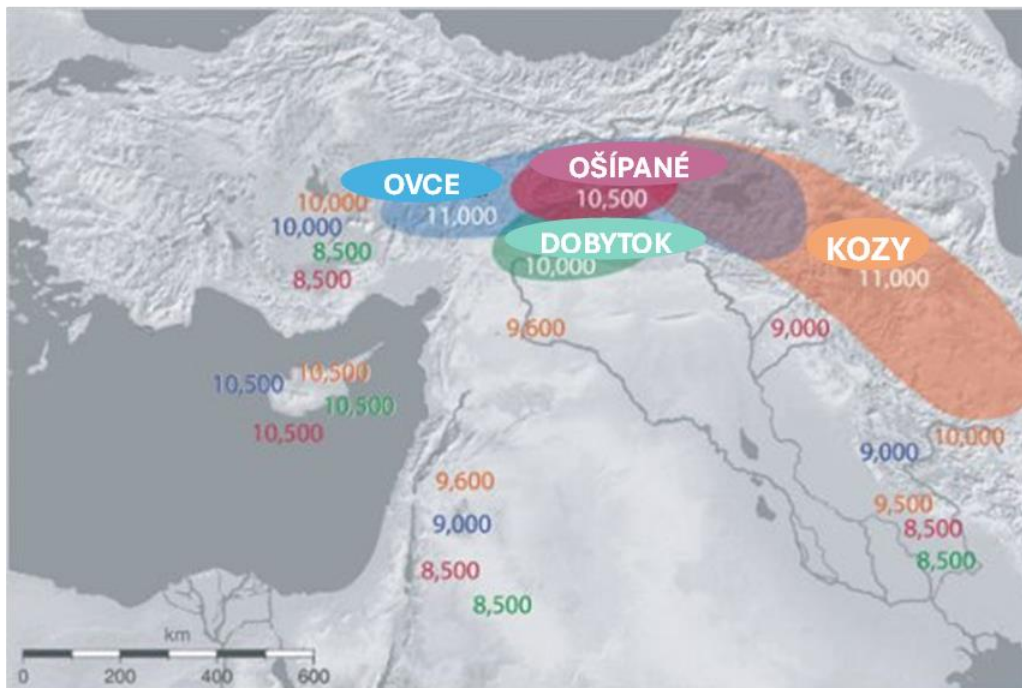
zdrojoch obživy. Predpokladá sa, že na konci doby ľadovej (približne pred 12 000 rokmi) sa vytvorili klimatické podmienky vhodné na prechod zo životného štýlu lovcov-zberačov na poľnohospodárske komunity. Tento prechod, známy ako neolitická revolúcia, je počiatkom raného poľnohospodárstva. Neolitická revolúcia prebehla podľa súčasných poznatkov nezávisle v siedmich až deviatich veľkých centrách vrátane Mezopotámie, Číny, Strednej Ameriky, východnej a západnej Afriky. Väčšina paleontologických nálezov označuje Mezopotámiu (oblasť Úrodného polmesiaca) za pôvodný región raného poľnohospodárstva (Obrázok 3.2).



Obrázok 3.2: Úrodný polmesiac (Zdroj: <https://www.worldhistory.org/image/12521/map-of-the-fertile-crescent/>, upravené).

Prechod z lovecko-zberačského spôsobu života na poľnohospodársky sa pokladá za najdôležitejší technologický pokrok, ktorý sa odohral v histórii ľudstva. Usadnutý spôsob života prvých poľnohospodárskych spoločností umožnil ľuďom zhromažďovanie sa vo väčšom počte, zabezpečoval lepšiu výživu a umožňoval rozvoj špecializovaných technológií. K domestikácii dobytka došlo pred 10 000 rokmi, oviec pred 11 000 rokmi a kôz pred 11 000 rokmi (Obrázok 3.3). Byvoly, kone a ťavy boli domestikované približne pred 5 000 rokmi. Domestikačný proces treba chápať ako kumulatívny jav, počas ktorého sa partnerské populácie stávajú navzájom závislé. Ako človek selektívne vyberal vhodné typy zvierat, zároveň im

poskytoval ochranu pred predátormi a zabezpečoval stály prísun krmiva. Proces domestikácie je charakterizovaný špecifickými vlastnosťami prostredia, biologickými a behaviorálnymi zvláštnosťami domestikovaných druhov ako aj kultúrnymi súvislosťami v poľnohospodárskych komunitách. Typickými zmenami vyvolanými domestikáčnym procesom sú morfológické zmeny na tele zvierat (zmeny vo veľkosti zvierat, alometrii rastu v anatómických pomeroch kostí atď.), zmenšenie relatívnej veľkosti mozgu, fyziologické zmeny, vývojové zmeny a zmeny v reakciách nervovej sústavy na podmienky prostredia. Predpokladá sa, že domestikácia pri svojom začiatku nemala podstatný vplyv na hospodárenia v spoločnostiach, ktoré boli založené na loveckých a zberačských zvyklostiach. Postupne však začala zabezpečovať dostatok potravy pre komunity, čo umožnilo ich ďalšiu expanziu do nových a často klimaticky a geograficky náročnejších prostredí.



Obrázok 3.3: Oblasti domestikácie niektorých druhov zvierat. Čísla označujú vek v rokoch archeologických nálezov kostí so znakmi domestikáčneho procesu (pomocou stratigrafických údajov) (<https://www.worldhistory.org/image/12521/map-of-the-fertile-crescent/>, upravené).

Chov zvierat umožnil vytvorenie stálych ľudských spoločností namiesto dočasných skupín, ktoré prevládali pri nomádskych lovcoch a zberačoch. Začali sa budovať stále prístrešky na ustajnenie zvierat a skladovanie úrody. Okrem toho sa začali vyvíjať nové poľnohospodárske nástroje a technológie. Úspešnou domestikáciou prešlo približne 20 divožijúcich druhov,

z ktorých 7 sa vyskytuje po celom svete (hovädzí dobytok, ovce, kozy, ošípané, kone, mačky a psy).

Prvými domestikovanými zvieratami boli psy, ktoré prešli týmto procesom pravdepodobne vo východnej Afrike a Ázii. Podľa archeologických nálezov začali psy vykazovať rozdiely oproti divožijúcim populáciám vlkov približne pred 17 000 rokmi. Predpokladá sa, že domestikáčny proces naštartovalo zdržiavanie sa divokých vlkov v blízkosti ľudských obydli. Ľudia ich následne začali chovať na strázenie svojich osád, pričom jedným z výsledkov domestikácie bolo zníženie agresivity zvierat.

Najstaršie záznamy o domestikácii oviec (*Ovis aries*) pochádzajú z obdobia 17 000–11 000 rokov. Kostry zvierat, ktoré prešli domestikáciou boli nájdené v celom rade miest raného osídlenia pravekých ľudí na Blízkom Východe, Európe a v strednej Ázii. Podľa analýzy DNA a mitochondriálnej DNA (**mtDNA**) európskych, afrických a ázijských oviec sa predpokladá ich pôvod minimálne z troch poddruhov muflóna divokého (*Ovis gmeliny*), z ktorých vznikli tri hlavné a odlišné línie: typ A – ázijský, typ B – európsky a typ C – identifikovaný pri recentných populáciách oviec v Číne a Turecku.

Koza (*Capra hircus*) bola cieľom domestikácie pre mlieko, mäso a suroviny využívané pri odevoch a stavbách (srst', koža, šľachy, exkrementy). Prevláda názor, že boli domestikované na území dnešného Iránu a priľahlých krajinách približne 10 000–11 000 rokov p.n.l. Analýza mtDNA ukázala, že zvieratá chované v súčasnosti geneticky pochádzajú zo širokého spektra zvierat s viacerými domestikáčnymi centrami.

Ošípaná (*Sus scrofa*) bola domestikovaná hlavne pre produkciu mäsa a tuku. Neskôr sa k mäsovej úžitkovosti pridali aj ďalšie suroviny (koža, srst', kosti). Archeologické záznamy poukazujú na to, že ošípaná bola domestikovaná z diviaka pred 13 000 rokmi v povodí Tigrisu. Avšak kostrové nálezy domestikovaných ošípaných boli nájdené aj v juhovýchodnej Anatólii (ázijská časť dnešného Turecka) vo vrstvách starých približne 13 000 rokov. Analýza DNA biologických vzoriek neolitických ošípaných poukázala na to, že domestikované zvieratá sa rozšírili na západ do Európy a na východ do Číny. V Číne však boli identifikované samostatné domestikáčne centrá pre ošípané. Znamená to, že domestikácia ošípaných prebiehala nezávisle na niekoľkých miestach v Euroázii.

Pratur (*Bos primigenius*) bol domestikovaný najneskôr od raného neolitu (mladšia doba kamenná – 9 000 rokov p.n.l.) s hlavným selekčným zameraním na mäso, mlieko, kožu a neskôr pre svoju ťažnú silu pre prenose nákladov a poľnohospodárskych prácach. Podľa archeologických záznamov doplnených genetickými analýzami sa proces domestikácie začal na populácii len 80 ks praturov v oblasti Mezopotámie pred 10 000 rokmi p.n.l. Z tejto

skupiny geneticky pochádzajú všetky v súčasnosti hospodársky využívané populácie hovädzieho dobytku. Popri týchto živočíchoch dochádzalo v neskorších obdobiach k domestikácii aj ďalších živočíšnych druhov (hrabavá a vodná hydina, kone, králiky, vodné živočíchy, hmyz).

Predpokladom nástupu éry moderných biotechnologických postupov v oblasti chovu zvierat boli objavy štruktúry a funkcie DNA, genetického kódu a technológií umožňujúcich manipuláciu s molekulami nukleových kyselín zabezpečujúce procesy uskladnenia, prenosu a realizácie genetickej informácie. Tento pokrok vytvoril nové možnosti využívania živočíchov pre potreby spoločnosti. V súčasnosti majú nové biotechnologické nástroje vrátane vysokého počítačového výkonu potenciál dramaticky meniť biologické vlastnosti zvierat pre širokú škálu potrieb človeka. Medzi najdôležitejšie ciele patrí produkcia kvalitnejších surovín živočíšneho pôvodu, optimalizácia výživy zvierat z hľadiska ich biologických potrieb, zlepšovania pohody chovaných zvierat (welfare), zabezpečenie biodiverzity voľne žijúcich druhov zvierat, využitie živočíchov v oblasti výskumu ľudských chorôb, prevencia chorôb zvierat a budovanie ich aktívneho zdravia, produkcia biologicky aktívnych molekúl pre farmaceutické odvetvia a ďalšie aplikácie, ktoré sa v súčasnosti objavujú len v náznakoch.

3.2 Biotechnologické postupy v reprodukcií hospodárskych zvierat

Domestikácia divožijúcich zvierat predpokladala okrem výberu vhodných jedincov aj človekom riadenú reprodukciu takýchto zvierat. Výsledkom bolo lepšie využitie reprodukčného potenciálu živočíchov, ktoré produkovali podstatne viac potomkov v reprodukčných cykloch s vyššou frekvenciou ako vo voľnej prírode.

Potenciál asistovanej reprodukcie zvierat sa však naplno prejavil až v druhej polovici 20. storočia, keď sa začali aplikovať poznatky z reprodukčnej biológie do chovateľskej praxe. Výsledkom boli postupy ako je odber a kryokonzervácia gamét, umelá inseminácia, inseminácia *in vitro*, klonovanie a ďalšie technológie, ktoré podstatným spôsobom zvýšili efektivitu reprodukčného procesu. V súčasnosti sú biotechnologické postupy v reprodukcií zvierat plošne rozšírené v praxi a výsledky intenzívneho výskumu v tejto oblasti sa často využívajú aj v biológii reprodukcie človeka.

3.2.1 Umelý prenos spermií (umelá inseminácia)

Pri väčšine suchozemských živočíšnych predchodcov v súčasnosti využívaných druhov zvierat evolúcia vytvorila a optimalizovala proces vnútorného oplodnenia, spočívajúci v prenesení samčích **gamét** (spermií) do pohlavných orgánov samice, kde dochádza k splynutiu so samičimi gamétami (vajíčkami). V prirodzených podmienkach je tento proces riadený neurohumorálnymi signálmi (hypotalamo-hypofyzárny komplex a pohlavné hormóny), ktoré spúšťajú súbor fyziologických a behaviorálnych zmien pri oboch pohlaviach. Výsledkom týchto procesov je oplodnenie (fertilizácia) – vniknutie (penetrácia) spermie do vajíčka (oocytu), vytvorenie dvoch **haploidných prvojadier** v cytoplazme vajíčka a ich splynutie do **diploidného jadra zygoty**.

Umelé oplodnenie je technologický postup zameraný na prenesenie odobratých spermií buď do reprodukčných orgánov samice, alebo odobraté vajíčka sa oplodnia mimo samičieho organizmu napr. v Petriho miske („v skle“ = *in vitro*). Prvý spôsob sa plošne využíva v praxi, kým *in vitro* oplodnenie slúži väčšinou pre výskumné účely. Talian Lazzaro Spallanzani (1729–1799) bol zrejme prvým človekom, ktorý dokázal možnosť umelého prenosu spermií (inseminácia) a následného oplodnenia, keď v rokoch 1777–1780 experimentálne overil a popísal umelú insemináciu pri hmyze, obojživelníkoch a psoch. Plošné využívanie umelej inseminácie s komerčným zameraním sa začalo v USA v druhej polovici tridsiatych rokov minulého storočia. V súčasnosti je inseminácia prevládajúcou metódou v reprodukcii hovädzieho dobytku vo veľkochovných podmienkach intenzívnej produkcie.

3.2.2 Získavanie a skladovanie gamét

Predpokladom umelej inseminácie je získanie samčích gamét – spermií. Najčastejšou metódou odberu je stimulovanie reprodukčných inštinktov samca (ejakulácia) na mechanickom chovnom zariadení s umelou vagínou. Niekedy sa používa namiesto mechanického zariadenia živá samica (kone, ošípané, ovce) a ejakulačná dávka sa zbiera do umelej vagíny. V minulosti sa využívala metóda ejakulácie pomocou dráždenia elektrickými impulzami.

Po odbere ejakulátu sa spermie podrobia kvantitatívnemu a kvalitatívnemu hodnoteniu (hustota, pohyblivosť, vitalita...) a v závislosti od ďalšieho využitia sa buď bezprostredne aplikujú samiciam alebo sa hlboko zmrazia (kryokonzervácia) špeciálnymi postupmi. V prirodzených podmienkach samci produkujú v jednej ejakulačnej dávke redundantný počet

spermií, čo sa využíva na riedenie špeciálnymi **izotonickými** riedidlami s prídavkom energeticky bohatých látok (glukóza). Napr. ejakulačná dávka býka obsahuje priemerne 500 mil./ml spermií a podľa ich kvality (hustota, pohyblivosť) sa riedi na inseminačnú dávku s koncentráciou 100–50 miliónov spermií/ml roztoku. **Čerstvé odobraté spermie majú schopnosť oplodnenia niekoľko hodín** (v závislosti od teploty, pH prostredia, zdroja energie a biologickej kvality), čo v praktických podmienkach nie je dostatočný čas na ich prenos do reprodukčných orgánov samíc.

Pre dlhodobé uchovávanie spermií sa preto používa technológia zmrazovania (kryokonzervácia) v tekutom dusíku. V atmosfére prítomný dusík (v koncentrácii približne 78 %) možno opätovným stlačovaním a ochladzovaním až na teplotu -196°C skvapalniť. Tekutý dusík je hlavným kryokonzervačným médiom nielen pre gaméty ale aj iné biologické štruktúry (rané embryá, kmeňové bunky, krvné bunky...). Existujú špeciálne postupy zmrazovania, ktoré zohľadňujú biologické požiadavky jednotlivých druhov zvierat a typov buniek. **Kritickým bodom pri zmrazovaní je teplota, pri ktorej sa môžu v cytoplazme buniek vytvárať ľadové kryštály.** Tie následne mechanicky poškodzujú bunkové štruktúry a spôsobujú dezintegráciu bunky s jej smrťou. Na prekonanie tohto bodu sa využívajú techniky:

- a) riadeného pomalého poklesu teploty,
- b) prudkému zníženiu teploty - **vitrifikácie** alebo
- c) pridávania špeciálnych látok (kryoprotektíva) do média, v ktorom sa nachádzajú bunky určené na kryokonzerváciu.

Kryoprotektívum zabraňuje tvorbe kryštálov v zmrazovaných bunkách. Všetky tieto postupy zabezpečujú, že intracelulárna voda prechádza z tekutej fázy do tuhej vo forme amorfnej látky bez tvorby kryštálov.

Skontrolované a nariadené spermie sa vo forme inseminačných dávok vkladajú do plastových trubičiek (pejety) a zmrazujú sa na teplotu tekutého dusíka. Inseminačné dávky sa individuálne označujú a dlhodobo uchovávajú v špeciálnych termoskách (Dewarove nádoby). Podľa súčasných skúseností je životaschopnosť rozmrazených spermií zaznamenaná aj po zmrazení niekoľko desiatok rokov.

Novšie manipulácie so spermiami *in vitro* umožňujú aj ich triedenie podľa pohlavia. Pri cicavcoch sa počas spermiogenézy vytvára 50 % spermií nesúcich X chromozóm a 50 % spermií s Y chromozómom. Na separáciu spermií sa najčastejšie používa metóda prietokovej fotocytometrie umožňujúca s presnosťou 90–97 % vytvoriť frakcie spermií nesúce rovnaký typ pohlavného chromozómu. Väčšinou sú takéto inseminačné dávky pripravované pre

hospodárske druhy, pri ktorých existujú významné medzipohlavné rozdiely v produkcii (tvorba mlieka, vajec...).

Odber vajíčok (oocytov) samíc cicavčích druhov hospodárskych zvierat je podstatne zložitejší. V procese oogenézy dozrievajú postupne vo vaječníkoch a v pravidelných cykloch (**estrálne cykly**) sa uvoľňujú z **Graafových folikulov** do vajcovodov (**ovulácia**). Predpokladom získania dostatočného počtu vitálnych vajíčok je preto príprava samičieho pohlavného cyklu pre potreby získavania vajíčok. Najčastejšie sa aplikujú exogénne pohlavné hormóny, ktoré synchronizujú ovuláciu aj pri väčšej skupine zvierat. Pri druhoch, kde aplikácia hormónov nie je žiaduca, sa monitoruje štádium prirodzeného cyklu podľa koncentrácie estrogénov v krvi. Takýmto spôsobom možno veľmi presne stanoviť čas ovulácie a možnosť využitia samice na získanie oocytov.

V začiatkoch výskumu v tejto oblasti sa oocyty získavali chirurgicky z vajcovodov. Cez otvorenú brušnú dutinu sa zavádzali do oviduktov katétre a vyplavovaním fyziologickým roztokom sa zachytávali ovulované vajíčka. Vajíčka bolo možné získať aj z dozretých Graafových folikulov tesne pred ich prasknutím. Tenkou ihlou sa folikuly perforovali a odobrala sa z nich folikulárna tekutina spolu s vajíčkom. Neskôr sa prešlo k nechirurgickému získavaniu ovulovaných vajíčok vyplachovaním katétrom zavedeným cez vagínu a uterus.

3.2.3 Oplodnenie – fertilizácia

Nový jedinec pri väčšine hospodársky využívaných druhov zvierat vzniká splynutím haploidných gamét - vajíčka a spermie - do diploidnej zygoty. **V zásade existujú tri spôsoby oplodnenia: prirodzeným spôsobom, insemináciou *in vivo* a *in vitro* oplodnením (IVF).** Vo všetkých prípadoch vzniká zygota a formujú sa podmienky na jej ďalšie delenie (embryogenéza).

V prirodzených podmienkach k splynutiu gamét dochádza vo vajcovodoch (oviduktoch) a deliace sa rané embryo putuje cez ovidukt do maternice, kde dochádza k zahniezdeniu (**nidácii**) v stene maternice.

Pri umelej inseminácii je dôležitá príprava samíc na oplodnenie, ktorá spočíva v určení štádia pohlavného cyklu (estrus). Pri väčšej skupine samíc určených na oplodnenie sa unifikujú (synchronizujú) rôzne štádiá estra aplikáciou syntetických alebo prirodzených pohlavných hormónov. K ovulácii dochádza na konci fázy estrálneho cyklu, čo sa využíva pri deponovaní inseminačnej dávky niekoľko hodín po nástupe estra. Zaisť sa tým prítomnosť spermii vo

vajcovodoch v čase ovulácie a tým aj vyššia miera oplodnenia uvoľnených vajíčok. Keď je samica pripravená k inseminácii, použije sa inseminačná dávka buď z čerstvo odobratého ejakulátu alebo z kryokonzervačnej banky. Kryokonzervované spermie sú najprv rozmrazené a temperované na fyziologickú teplotu tela inseminovanej samice (približne 37°C). Na deponovanie spermií do uteru cez cervix sa používajú špeciálne katétre alebo inseminačné pištoly. Takáto transcervikálna inseminácia zabezpečuje vysokú pravdepodobnosť oplodnenia, ale pri väčšine druhov vyžaduje použitie endoskopu na lokalizáciu cervixu. V praxi sa na úspešnosť inseminácie používa kritérium koncepcný pomer, ktorý označuje podiel oplodnených samíc z celkového počtu inseminovaných.

3.2.4 *In vitro* oplodnenie

V 30. rokoch 20. storočia sa začali experimenty na živočíchoch s cieľom oplodnenia vajíčok mimo tela samice (IVF – *in vitro* fertilizácia, oplodnenie mimo reprodukčného traktu samice – v Petriho miske). Pri oplodnení *in vitro* je dôležitý proces prebiehajúci v spermiiach v prirodzených podmienkach počas putovania reprodukčným traktom samice (**kapacitácia** spermií). Až objav kapacitácie umožnil prvé *in vitro* oplodnenie vajíčok kráľika. Proces *in vitro* oplodnenia je založený na vložení vajíčok do kvapalného fyziologického prostredia v Petriho miske a následného pridania kapacitovaných spermií. Po vniknutí jedinej spermie do vajíčka vzniká zygota, ktorá sa začne deliť. Komplikovanejšou modifikáciou IVF je technika intracytoplazmatického prenosu spermie do oocyту. Používa sa mikromanipulátor – prístroj na manipuláciu s mikroskopickými objektami. Oocyt sa fixuje podtlakom na mikropipete a druhou mikropipetou sa injikuje jedna spermia cez obaly vajíčka (Obrázok 3.4). Vzhľadom na použitie špeciálneho zariadenia a vyškolenia odborného personálu je tento postup takmer výlučne využívaný na výskumné účely. V praktických podmienkach má výnimočné použitie pri imobilných spermiiach alebo spermiiach, v ktorých neprebehla akrozómová reakcia (uvoľnenie enzýmov z vrcholovej časti hlavičky spermie potrebných na vniknutie do vajíčka).

Na rozdiel od prirodzenej fertilizácie sa pomocou *in vitro* oplodnenia získavajú embryá, ktoré sa vyvíjajú v *in vitro* podmienkach len do určitého vývinového štádia a ak sa neprenesú včas do reprodukčného orgánu samice, zanikajú. Napriek tomuto obmedzeniu je IVF komerčne využívané v krajinách s vyspelým chovom hospodárskych zvierat na tvorbu hlavne hovädzích embryí, ktoré sú následne predávané alebo vymieňané po celom svete.



Obrázok 3.4: Intracytoplazmatické oplodnenie (Zdroj: www.allure.com/story/in-vitro-fertilization-overview).

Zvládnutie techník umelého oplodnenia v polovici minulého storočia prinieslo mnoho výhod v reprodukcii hospodárskych zvierat. Najväčšie benefity boli zaznamenané v plemenárskych postupoch tým, že inseminácia umožnila rýchly prenos žiadaných alel génov na veľké množstvo potomkov. Ďalšou výhodou je možnosť takmer neobmedzeného transportu gamét po celom svete. Nezanedbateľným prínosom je aj eliminácie chorôb prenosných pri prirodzenom párení, vyšší koncepčný pomer a presnejšie plemenárske záznamy.

In vitro oplodnenie umožňuje podobne ako umelá inseminácia masovú a synchronizovanú produkciu potomkov s vysokou **plemennou hodnotou** (t.j. súčet efektov alel génov pre konkrétnu vlastnosť, napr. produkciu mlieka). Napríklad IVF pri hovädzom dobytku umožňuje získať od jednej vysokoúžitkovej kravy (darkyňa - donorka) až 20 životaschopných embryí ročne, ktoré sa prenášajú do reprodukčného traktu kráv (príjemkyňa - recipientka) s nižšou geneticky podmienenou úžitkovosťou. Výhody IVF sú zrejmé aj pri druhoch voľne žijúcich a ohrozených. Technika prenosu embryí umožňuje diverzifikáciu druhov v rámci geografických oblastí, pretože ich transport je v porovnaní s presunom živých zvierat podstatne lacnejší, efektívnejší a biologicky bezpečnejší.

3.2.5 Rané embryá

Samostatnou kapitolou v biotechnologických reprodukčných manipuláciách je príprava a využitie raných embryí. **Rané embryo** je definované embryonálnym štádiom blastocysty, ktorá sa napr. pri hovädzom dobytku formuje na siedmy deň po oplodnení (Obrázok 3.5). Takéto embryá možno získavať buď prirodzeným spôsobom po oplodnení samice alebo *in vitro* oplodnením, keď odobraté vajíčka sa vo fyziologických kultivačných podmienkach oplodňujú

spermiami. Získavanie a uchovávanie embryí umožňuje efektívnejší šľachtiteľský proces, keď z geneticky vysoko cenných zvierat možno získať niekoľkonásobne viac potomstva ako pri prirodzenej **plemenitbe**. Ďalšou výhodou, podobne ako pri gametách, je jednoduchý transport embryí. Kryokonzervované embryá sa dajú bez väčších ťažkostí prenášať na neobmedzenú vzdialenosť.



Obrázok 3.5: Bovinné embryá v štádiu blastocysty (Zdroj: vuzv.sk/ziv/pivko.pdf).

Podmienkou úspešného prenosu je zosynchronizovanie samíc - recipientiek v cielei transportu tak, aby ich reprodukčný cyklus umožnil nidáciu embryí v maternici. Ďalším potenciálnym smerom využitia raných embryí je možnosť ich hodnotenia podľa pohlavia, podľa vitality, genotypu alebo možnosť klonovania prostredníctvom rozdelenia raného embrya mikromanipulátorom na niekoľko **omnipotentných** buniek (blastomér), z ktorých sa každá môže vyvinúť do životaschopného jedinca.

3.2.5.1 Získavanie raných embryí

Kým metóda IVF slúži väčšinou na výskumné účely, v praktických podmienkach sa rané embryá získavajú tak, že k oplodneniu dochádza *in vivo* a následne po určitom čase sa embryá vyplavujú z maternice (uterus). Cez katéter (Foleyho katéter) (Obrázok 3.6) zavedený do uteru sa aplikuje vyplavovací roztok, ktorým sa voľne unášané embryá vyplavujú do zbernej nádoby. Prvé úspešné získanie embryí touto metódou sa vykonalo pri samiciach kráľika už v roku 1890; v súčasnosti sa technika vyplavovania embryí aplikuje väčšinou pri hovädzom dobytku a v menšej miere pri ošípaných. Vyplavovaniu embryí predchádza synchronizácia ruje kráv a následná ovulácia. Použitie sofistikovaných protokolov umožňuje získať od jednej samice

podstatne viac oocytov ako pri prirodzenej ovulácii (**superovulácia**). Superovuláciou možno získať až 30 oocytov od jednej kravy. Pomocou umelej inseminácie sa oocyty oplodnia *in vivo* spermiami býka, ktorý má vysokú plemennú hodnotu vo vybraných znakoch a vlastnostiach. Po 6–8 dňoch od umelej inseminácie sa od takýchto vysokoúžitkových kráv získavajú embryá vyplachovaním z uteru. Priemerne sa získava 5 až 9 vitálnych embryí, ktoré sa bezprostredne podrobujú mikroskopickému vyšetreniu a buď sa aplikujú do pripravených recipientiek alebo sa kryokonzervujú podobne ako pri oocytoch. Aj keď je *in vivo* oplodnenie a následné vyplavovanie embryí lacnejšie, jednoduchšie a efektívnejšie, existuje niekoľko prípadov, keď použitie *in vitro* oplodnenia je výhodnejšie. Jedným z príkladov je chirurgický odber oocytov z uhynutej samice. Oocyty zostávajú životaschopné po dobu 8–13 hodín od smrti a *in vitro* oplodnením možno vytvoriť embryá z oocytov aj z mŕtveho zvierat'a. Ďalej sa *in vitro* oplodnenie používa pri geneticky cenných samiciach, ktoré sú neplodné, ale majú funkčné vaječníky. Ďalšou príčinou neplodnosti môže byť imunitná reakcia organizmu samice v dôsledku dlhodobého podávania hormónov. Tvorba raných embryí je jednou z metód pri reprodukcii druhov voľnežijúcej zveri, ktorým hrozí vyhynutie.



Obrázok 3.6: Foley katéter (Zdroj: <https://www.medi7.sk/>).

3.2.6 Kultivácia embryí

Po splynutí gamét, možno vzniknutú zygotu ďalej kultivovať *in vitro*. Jednou z používaných metód kultivácie embryí je spoločná kultúra, pri ktorej kultivačné médium obsahuje bunky vajcovodu. Tie sú metabolicky aktívne, množia sa a produkujú (exprimujú) esenciálne látky potrebné pre ďalšiu embryogenézu. Niektoré živočíšne druhy vyžadujú, aby sa embryá už v štádiu 2–8 buniek preniesli do vajcovodov samice.

Inou metódou kultivácie je použitie sekvenčných médií. Počas kultivácie sa mení chemické zloženie médií v závislosti od vývinového štádia embrya, čím sa napodobňujú rôzne biochemické prostredia v ranej embryogenéze.

3.2.7 Prenos embryí

Po určitej dobe kultivácie (pri hovädzích embryách je to 7-9 dní) dosiahnu embryá štádium blastocysty a možno ich preniesť do reprodukčného traktu recipientky. Dôležitým predpokladom úspešného prenosu je navodenie estrálneho cyklu recipientky do štádia, ktoré je synchronizované s aktuálnym vývinovým štádiom embrya. Tým sa zabezpečí, že intrauterinné prostredie samice je pripravené na zahniezdenie (nidáciu) a ďalší vývin embrya. Vlastný prenos sa uskutočňuje nechirurgickou cestou pomocou endoskopicky navádzanou pipetou cez cervix do rohu maternice.

3.2.8 Výhody oplodnenia *in vitro* a prenosu embryí

Podobne ako pri inseminácii *in vivo* aj techniky *in vitro* oplodnenia a prenosu embryí umožňujú masovú produkciu potomkov so želanými, geneticky fixovanými znakmi a vlastnosťami úžitkovosti (intenzita rastu, kvalita živočíšnych produktov, znáška, dojivosť, zdravotná a behaviorálna odolnosť voči podmienkam chovného prostredia). Ako recipientky sa využívajú samice s nižšou plemennou hodnotou, ale dobrými reprodukčnými vlastnosťami. Prenos embryí umožňuje druhovú diverzifikáciu v rámci geografických oblastí, vzhľadom k tomu, že embryá možno jednoducho prepravovať aj na veľké vzdialenosti.

3.2.9 Vyplavovanie embryí

Namiesto oplodnenia oocytov a kultivácie embryí *in vitro* sa embryá produkujú *in vivo* (prirodzenou cestou v reprodukčných orgánoch samice) a následne sa vyplavujú z vajcovodov a maternice. Prvé úspešné získanie embryí a ich prenos do darykyne bol uskutočnený už v roku 1890 pri králikoch, ale v súčasnosti sa táto metóda využíva väčšinou pri hovädzom dobytku. Vyplavovaniu predchádza superovulácia (ovulácia veľkého počtu vajíčok – až 30 vajíčok) vysokouúžitkových kráv, ktorá sa uskutočňuje aplikáciou pohlavných hormónov (LH - luteinizačný a FSH – folikulostimulačný hormón). Po umelom oplodnení spermiami býka

s vysokou genetickou plemennou hodnotou sa embryá po šiestich až ôsmich dňoch vyplavujú pomocou špeciálneho vyplachovacieho roztoku a katétra (Foleyho katéter). Súčasťou katétra je nafukovací balónik, ktorý uzatvára hrdlo maternice a bráni spätnému toku preplachovacieho média (Obrázok 3.6). Preplachovacie médium sa odoberá do nádoby, z ktorej sa izoluje najčastejšie 5–7 ks životaschopných embryí. Po mikroskopickej kontrole sa embryá bezprostredne prenášajú do darykyne (recipientky) alebo sa zmrazia v tekutom dusíku a uskladňujú pri teplote -196°C na neskoršie využitie.

3.2.10 Uchovávanie gamét a raných embryí

Na dlhodobé uskladnenie vajíčok, spermií a raných embryí sa používa metóda hlbokého zmrazenia buniek v tekutom dusíku pri -196°C (kryoprotekcia). Priestor pre kryogénne uskladnenie pohlavných buniek a raných embryí sa nazýva kryobanka (Obr. 3.7). Nachádza sa tu sústava Dewarových nádob, v ktorých sú v tekutom dusíku uskladnené biologické vzorky. Organizačne je kryobanka zabezpečená pracovným režimom zabezpečujúcim pravidelné dopĺňanie tekutého dusíka a presnú evidenciu uskladnených vzoriek. Kryoprotekcia je plošne rozšírená pri skladovaní insemináčnych dávok geneticky vysokohodnotných plemenníkov, ale čoraz častejšie sa využíva aj pri uskladňovaní oocytov a raných embryí napríklad pri snahe o uchovávanie vzácných plemien hospodárskych zvierat a druhov voľnežijúcej zveri (tzv. genetické zdroje).



Obrázok 3.7: Uskladnenie gamét a blastocýst v kryobanke VÚŽV NPPC v Nitre (Zdroj: autor).

3.2.11 Klonovanie

Klon možno definovať ako organizmus, ktorý pochádza z iného organizmu a oba majú identickú DNA. Kým pri rastlinách sa vegetatívne rozmnožovanie využíva plošne (napr. produkcia zemiakov), pri živočíchoch je tento typ reprodukcie obmedzený v prirodzených podmienkach na niekoľko primitívnych druhov (napr. nezmar), resp. pri vyšších organizmoch sa môže zygota niekedy prirodzene rozdeliť na dve alebo viac samostatných buniek za vzniku geneticky identických jedincov (napr. jednovaječné dvojčatá).

Prvé pokusy s umelo vytvorenými klonmi morských ježoviek vytvoril Nemecký vedec Hans Adolf Eduard Driesch, ktorý v roku 1891 rozdelil dvojbunkové embryo ježovky za vzniku dvoch identických organizmov ježoviek. Tieto experimenty pokračovali až do prelomu 19. a 20. storočia, kde vynikal nositeľ Nobelovej ceny Nemecký vedec Hans Spemann svojimi prácami o raných štádiách embryogenézy. V roku 1952 Američan Róbert Briggs po prvýkrát preniesol bunkové jadro z blastoméry embrya žaby do vajíčka s odstráneným jadrom (enukleovaný oocyt). Ďalšie experimenty v oblasti klonovania vyvrcholili v roku 1996, keď Ian Wilmut s kolektívom v Roslinovom ústave v Edinburhu vytvoril klon ovce. Z bunky mliečnej žľazy šesťročnej ovce bieleho plemena Finn Dorset vybrali jadro a vložili ho do enukleovaného oocytu zo samice plemena Blackface. Keď embryo prešlo normálnym vývinom do 6. dňa embryogenézy, bolo vložené do maternice inej ovce plemena Blackface. Po 148 dňoch gravidity sa samica obahnila a normálne životaschopné jahňa nazvali Dolly (Obrázok 3.8).



Obrázok 3.8: Ovca Dolly (Zdroj: www.livescience.com)

O nízkej účinnosti tohto postupu svedčí skutočnosť, že z 277 bunkových fúzií, 29 vyprodukovaných embryí a 13 náhradných matiek bola Dolly jediným živým klonom. Dolly žila 6 a pol roka. Trpela nevyliciteľnou chorobou oviec (pľúcna adenomatóza), artritídou a mala skrátene teloméry chromozómov. Počas svojho života porodila 6 potomkov. Význam tohto experimentu bol v tom, že potvrdil schopnosť jadra špecializovanej bunky dediferencovať sa a začať embryogenézu. Potvrdilo sa, že diferenciácia buniek nie je jednosmerný proces a väčšina somatických buniek má schopnosť preprogramovania sa na iný typ. Prenos jadra somatickej bunky („Somatic cell nuclear transfer“, SCNT) je v súčasnosti najčastejšie používanou metódou klonovania zvierat. Existujú desiatky druhov živočíchov, pri ktorých sa podarilo získať touto metódou životaschopné jedince. Navyše integrácia génovej editácie pomocou techniky CRISPR/Cas9 s klonovacími metódami umožnila modifikovať gény klonovaných zvierat pre rôzne účely vrátane rezistencie voči chorobám a zlepšenia úžitkových vlastností. Centrom záujmu je klonovanie hlavných hospodárskych zvierat (hovädzí dobytok, ošípaná). Predpokladá sa, že metóda môže zrýchliť šľachtiteľský progres zameraný na zvyšovanie úžitkovosti a kvality zvierat pri produkcii mäsa a mlieka. Významné postavenie našlo klonovanie aj v úsilí o zachovanie ohrozených a vyhynutých zvierat s cieľom zachovať ich biodiverzitu. Techniky klonovania sú úzko spojené s výskumom kmeňových buniek a zvlášť sa profiluje záujem o využitie pluripotentných buniek z klonovaných zvierat v medicínskych aplikáciách. Okrem toho biomedicínsky výskum využíva živočíšne klony pri tvorbe živočíšnych modelov rôznych ochorení. Je dôležité poznamenať, že klonovanie zvierat bolo síce v týchto prípadoch úspešné, ale často zahŕňa zložité a náročné postupy s nízkou efektivitou získavania živočíšnych klonov. S klonovaním sa v poslednom čase spájajú etické otázky a otázky dobrých životných podmienok zvierat zvlášť pre poľnohospodárske účely a účely ochrany prirodzenej biodiverzity.

V 80. rokoch 20. storočia sa vo Výskumnom ústave živočíšnej výroby v Nitre (VÚŽV) rozpracovali metódy klonovania hovädzieho dobytka založené na mikrochirurgickom rozdelení raných embryí. Na 3. deň po fertilizácii sa z ampuly vajcovodu vyplavovali embryá v štádiu štyroch buniek (blastomér) s pluripotentnými vlastnosťami (embryonálne kmeňové bunky). Po mechanickom rozdelení embrya každá z blastomér má potenciál vytvoriť samostatného jedinca. V prirodzených podmienkach rozdelením jedného raného embrya na viac buniek vznikajú jednovaječní súrodenci.

Potenciálne možnosti klonovania sú veľké pre mnohé oblasti poľnohospodárstva, potravinárstva, medicíny a farmácie (Obrázok 3.9). Táto oblasť živočíšnych biotechnológií je však stále relatívne nová a jej efektívne a bezpečné praktické aplikácie si stále vyžadujú

rozsiahly výskum. Účinnosť klonovania hodnotená ako počet živých zvierat na jedno manipulované embryo sa pohybuje pri hovädzom dobytku 10–20 %, ošípaných 6–10 %, králikoch 20–30 %, ale pri niektorých druhoch sa klonovanie nedarí. Okrem nízkej účinnosti bolo pozorované, že niektoré klony sa rodia s fenotypovými anomáliami ako je neobvykle vysoká pôrodná hmotnosť, cukrovka alebo odchýlky od normálnych anatomických pomerov vnútorných orgánov. Zistilo sa, že tieto ochorenia sa neprenášajú na potomkov klonu, čo naznačuje, že suboptimálne podmienky *in vitro* počas manipulácie s bunkami menia epigenetické vzory (značky) klonovaného embrya. Preto sa intenzívne študujú podmienky *in vitro* s cieľom ich optimalizácie na úroveň prirodzených podmienok *in vivo*.



Obrázok 3.9: Klonované šteňatá plemena bígl (Zdroj: <https://education.nationalgeographic.org>).

3.2.12 Transgenéza

Transgenéza („horizontálny“ prenos génov, na rozdiel od „vertikálneho“ prenosu z rodičov na potomkov) alebo genetická modifikácia (tzv. geneticky modifikované organizmy, GMO) sa vzťahuje na proces zavedenia exogénnych sekvencií DNA (génov) do genómu recipienta s cieľom vytvoriť geneticky modifikovaný organizmus s unikátnymi metabolickými, fyziologickými, morfológickými alebo behaviorálnymi vlastnosťami.

Na transgenézu možno využiť v podstate dva postupy. Prvou možnosťou je *in vitro* prenos, keď nukleotidová sekvencia (gén, konštrukt) je zavedená do izolovaných buniek mimo hostiteľský organizmus a následne sú tieto bunky prenesené do hostiteľského organizmu.

Druhou možnosťou je *in vivo* prenos, keď sú modifikované priamo bunky hostiteľského organizmu.

Génový konštrukt možno preniesť do tela dospelého organizmu, do embrya alebo do konkrétnej bunkovej línie. Pre konkrétny prenos genetickej informácie sa využívajú nasledovné postupy:

- Mikroinjekcia – prenesenie génového konštraktu mikropipetou do zygoty. Často sa využíva technika samčieho prvojadra a úspešnosť tohto typu transgenézy je okolo 25 %. Ešte donedávna bol proces integrácie (zabudovania) konštraktu do genómu náhodný. Využitím novej techniky editácie genómu (CRISPR/Cas9) možno cielene vyhľadať na vlákne DNA konkrétne miesto zabudovania. Vplyvom vonkajších podmienok pri *in vitro* manipulácii však môže dochádzať k náhodným mutáciám alebo umiestneniu na miesto v chromozóme s nízkou expresivitou. Väčšina injikovanej DNA sa neintegruje a je endonukleázami degradovaná.
- Retrovírusový prenos – konštrukt DNA je umiestnený do RNA modifikovanej vírusovej častice. Modifikácia vírusu zabezpečí, že nevytvára v bunke nové vírusy. Problémom môže byť imunitná obrana organizmu voči vírusom.
- Prenos prostredníctvom spermie („Sperm mediated germ transfer“, SMGT) – polynukleotidový konštrukt sa imunologickou reakciou napojí na cytoplazmatickú membránu spermie a v procese *in vitro* oplodnenia je zabudovaný do jadra zygoty (samčie prvojadro v zygote).
- Nukleárny prenos – prenos diploidného jadra bunky transgénneho organizmu do enukleovaného oocyty.
- Lipozómový prenos – konštrukt je uzatvorený v častici, ktorá je tvorená fosfolipidovou dvojvrstvou. Tá je schopná interakcie s cytoplazmatickými membránami buniek a tým umožňuje prenos úseku DNA do jadra bunky. Podobný princíp sa používa pri mRNA vakcínach na zabezpečenie prenosu molekúl mRNA do buniek na miesto translácie v ribozómoch.

3.2.13 Editácia genómu

Ešte donedávna miesto prenosu génu do hostiteľskej bunky podliehalo náhodným procesom bez preukaznej možnosti ovplyvniť lokalizáciu integrácie a počet integrovaných kópií. Situácia

sa zmenila po roku 2012, keď sa podarilo objaviť proces súvisiaci s obrannými mechanizmami baktérií proti bakteriofágom.

V roku 2020 získali Američanka Jennifer Doudnová a Francúzka Emmanuelle Charpentierová Nobelovu cenu „za vývoj úpravy genómu“. E. Charpentierová skúmala baktériu *Streptococcus pyogenes* a pritom objavila neznámu molekulu tracrRNA („trans activating“ RNA). Ďalším výskumom a v spolupráci s J. Doudnovou zistili, že táto molekula je súčasťou imunitného systému baktérií, vďaka ktorému si baktérie „zapamätajú“, aké vírusy ich napadli v minulosti a keď sa vírusy znova pokúšajú o infekciu, baktérie cieľavedome napadnú určité časti vírusovej DNA a rozstrihnutím nukleovej kyseliny bakteriofágov ich deaktivujú. Objav bol základom postupu, ktorý nazvali CRISPR/Cas9 („Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“ a endonukleáza Cas9 spojená s CRISPR) a našiel uplatnenie pri výmene, náhrade alebo vystrihnutí génov (editácii) väčšiny organizmov.

Mechanizmus CRISPR/Cas9 má tri kroky. Najprv sa kópia vírusovej nukleovej kyseliny integruje do lokusu CRISPR. Potom sa z tohto lokusu CRISPR transkripciou vytvárajú reťazce RNA (crRNA). CrRNA sú následne začlenené do efektorových komplexov, kde crRNA vedie komplex k inváznej nukleovej kyseline a Cas nukleáza degraduje vírusovú nukleovú kyselinu. Na rozdiel od predchádzajúcich techník editácie („Zink fingers“, „TALEN“) je CRISPR/Cas9 podstatne presnejšou, jednoduchšou a teda efektívnejšou metódou manipulácie s genómom.

Intenzívny výskum v oblasti rezistencie baktérií voči bakteriofágom priniesol v poslednom období ďalšie prevratné poznatky, ktoré bude možné zrejme využiť v ďalších biotechnologických aplikáciách. Ukázalo sa napríklad, že v baktérii, ktorá je napadnutá vírusom začne **reverzná transkriptáza** syntetizovať reťazec DNA podľa predlohy krátkych RNA. Táto DNA predstavuje za sebou opakované úseky takejto RNA. Keď sa z takto vytvorenej DNA transkripciou syntetizuje dlhý reťazec RNA, je predlohou pre syntézu novej molekuly bielkoviny, ktorá nie je kódovaná vlastnou bakteriálnou DNA. Znamená to, že vznikol nový gén (bol pomenovaný „neo“). Zistilo sa, že novovytvorená bielkovina tohto génu „uspí“ baktériu a znemožní tak vírusu využiť bakteriálne mechanizmy **transkripcie** a **translácie** na tvorbu nových vírusov. Objav „neo“ génu a úloha enzýmu reverznej transkriptázy otvára nové možnosti spresnenia CRISPR resp. tzv. „prime editing“ CRISPR.

3.3 Využitie genomických techník v chove hospodárskych zvierat

Tradičné plemenárske postupy využívajú genotypovú variabilitu v populáciách hospodárskych zvierat na genetické zlepšenie úžitkových ukazovateľov ekonomického významu (jatočné ukazovatele, produkcia mlieka, vajec, vlny...). Klasické šľachtenie bolo založené na záznamoch o fenotypových ukazovateľoch úžitkovosti produkčných populácií. Štatistickými metódami sa separovali jednotlivé zložky fenotypovej variability a pri ukazovateľoch s vysokou genetickou podmienenosťou (t.j. s vysokým koeficientom **dedivosti**) sa používali vhodné plemenárske metódy. Celý proces je však náročný na čas, chovné priestory, personálne kapacity a teda je ekonomicky nákladný. Situácia sa zmenila po objavení možnosti sekvenovania genómov a stanovenia genetických markerov, ktoré sú zviazané s jednotlivými ukazovateľmi úžitkovosti. Genetický marker je gén alebo krátky segment DNA, ktorý možno použiť na detekciu úžitkovosti alebo v širšom zmysle na identifikáciu organizmu. Marker môže predstavovať jeden nukleotid (SNP – jednonukleotidové **polymorfizmy**) alebo dlhšiu sekvenciu nukleotidov napr. minisatelity a mikrosatelity. Myšlienka využiť selekciu na základe markerov (MAS – markerovo asistovaná selekcia) je však podstatne staršia. Už v roku 1923 americký šľachtiteľ rastlín Karl Sax potvrdil vzťah medzi kvalitatívne dedičným znakom (farba semena fazule) a kvantitatívnym ukazovateľom (hmotnosť semena fazule) pričom došiel k záveru, že gén sfarbenia musí byť spojený s génmi kontrolujúcimi hmotnosť.

Koncom 20. storočia bolo objavených a vyvinutých mnoho molekulárno-genetických markerov vrátane izoenzymov, polymorfizmu dĺžky restričných fragmentov (RFLP), náhodne amplifikovanej polymorfnej DNA (RAPD), mikrosatelitov a jednonukleotidových polymorfizmov (SNP). Schopnosť analyzovať tieto markery sa zlepšovala počas niekoľkých desaťročí a umožnila zmapovanie **lokusov** pre gény s kvantitatívnou dedičnosťou („Quantitative traits loci – QTL) vo veľkom rozsahu. Rozšírenou skupinou sú markery SNP (jednonukleotidové polymorfizmy, single nukleotid polymorphism), pretože ich veľký počet je rozmiestnený po celom genóme. Klesajúce náklady a rýchly pokrok v metódach sekvenovania viedli pri hospodárskych zvieratách k identifikácii veľkého množstva týchto markerov. V súčasnosti sú k dispozícii desiatky tisíc SNP, ktoré sú v asociácii s QTL. Nevýhodou pri využívaní živočíšnych MAS je, že celogenómové asociačné štúdie (Genome-Wide Association Studies - **GWAS**) nie sú schopné odhaliť SNP spojený s určitou vlastnosťou, pokiaľ má požadovaná alela frekvenciu menej ako 5 %. Súčasná technika analýzy umožňuje sledovať

všetky tieto markery na predikciu genomicky odhadovanej plemennej hodnoty (odhad genetického založenia jedinca pre určitú vlastnosť) bez toho, aby bolo potrebné poznať umiestnenie génu v genóme.

Presná a efektívna úprava genómu otvára veľké možnosti pre aplikačné formy transgenézy. Umožňuje vytvárať genómové úpravy, ktoré vylepšujú alebo modifikujú vlastnosti zvierat s možnosťou ich využitia pri zlepšovaní úžitkovosti a modelovaní ľudských chorôb.

V chove hospodárskych zvierat je významný ukazovateľ intenzita rastu živej hmotnosti. Genomické techniky umožňujú manipulovať s génmi pre rastové faktory, receptory rastových faktorov a rastové modulátory. Z tohto dôvodu je produkcia geneticky modifikovaných zvierat kľúčovým zdrojom pre pochopenie mechanizmov pôsobenia génov na intenzitu rastu počas ontogenézy zvierat. V súčasnosti sú vytvárané transgénne zvieratá, ktoré vykazujú nielen zvýšenú rýchlosť rastu, ale aj zlepšenú kvalitu potravinárskych surovín živočíšneho pôvodu. Záujem vzbudili gény exprimujúce hormóny ovplyvňujúce intenzitu rastu (rastový hormón - GH a inzulínu podobný rastový faktor - IGF), ktoré sú exprimované v rôznych štádiách vývinu zvierat. Transgénne ošípané s cudzorodým genóm pre rastový faktor GH ukázali, že zvýšenie GH produkovaného ošípanými prispelo k zvýšeniu rastu a účinnosti krmiva. Podobne bol pozorovaný dramatický nárast intenzity rastu transgénneho atlantického lososa.

Príkladom je losos AquaAdvantage (Obrázok 3.10) vyvinutý americkou firmou AquaBounty Technologies ešte v roku 1989. Normálny gén determinujúci syntézu rastového hormónu tohto atlantického lososa bol nahradený genóm opAFP-GHc2 z tichomorského lososa kráľovského (činuk). Táto ryba dosahuje dĺžku 1 m a hmotnosť až 14 kg. Expresia génu je regulovaná modifikovaným promótorom preneseným z genómu atlantickej tresky.



Obrázok 3.10: Porovnanie veľkosti lososa AquaAdvantage (vľavo) s atlantickým lososom (vpravo) (Zdroj: <https://aquabounty.com>).

V genóme kurčiat bol zistený gén *SKI*, ktorý má úlohu, okrem iného, v terminálnej diferenciácii buniek kostrového svalstva. Prenos tohto génu vyvoláva svalovú hypertrofiu ošípaných a hovädzieho dobytku.

Gén Rendement Napole ovplyvňuje spracovateľské vlastnosti bravčového mäsa. Umlčaním expresie tohto génu pri ošípaných sa zlepšuje kvalita ich mäsa.

Pri modifikácii rastu majú významnú úlohu aj gény pre faktor uvoľňujúci **GH** (GHRF) a bielkoviny viažuce IGF. Záujem vzbudzuje aj gén pre syntézu myostatínu, bielkoviny, ktorá *in vivo* limituje intenzitu rastu svalových vlákien. Zvieratá (hovädzí dobytok, ošípané, králiky) s **knockout** génom pre myostatín sa vyznačujú nadmerným osvalením (Obrázok 3.11). Napriek tomu, že zvieratá s nefunkčným myostatínovým génom vykazujú intenzívnejší rast, lepšiu konverziu krmiva (t.j. spotreba krmiva na dosiahnutie jednotky prírastku živej hmotnosti a lepší pomer telesného tuku a svalov), mali aj väčšie zdravotné komplikácie (rýchla únava, výskyt žalúdočných vredov, zníženie libida). Spontánnou mutáciou myostatínového génu je komerčne chované plemeno hovädzieho dobytku belgické modré.



Obrázok 3.11: Zvieratá s knock-out génom pre syntézu myostatínu (Zdroj: www.icbf.com, www.yahoo.com, www.thesun.co.uk).

Transgénne ošípané s génovým konštruktom ľudského metalotioneínového promótoru a rastového hormónu ošípaných vykazovali významné zlepšenie jatočných vlastností, ako je rýchlosť rastu, konverzia krmiva a pomer telesného tuku a svalov. Podobne transgénne ošípané s ľudským **IGF-I** mali o 10 % viac chudej svaloviny v jatočnom tele, o 30 % väčšiu jatočnú výťažnosť (t.j. podiel jedlých častí z celkovej živej hmotnosti) a o 20 % menej celkového jatočného tuku. Transgénne ošípané s génom pre enzým **FAD2**, ktorý bol izolovaný z genómu špenátu generovali zvýšené množstvá nenasýtených mastných kyselín. Takéto ošípané mali vyšší pomer nenasýtených a nasýtených mastných kyselín v priečne pruhovanom svalstve, čo môže mať význam v racionálnej výžive človeka. Omega 3 mastné kyseliny sa nachádzajú hlavne v rybích olejoch a sú považované za látky prospešné ľudskému zdraviu. Konvenčné mäsové

výrobky obsahujú veľké množstvo omega 6 mastných kyselín a nízke hladiny omega 3 mastných kyselín. Dlhodobé stravovanie s vysokým podielom Ω -6 mastné kyseliny/ Ω -3 mastné kyseliny je v preukaznej negatívnej korelácii s kardiovaskulárnymi, onkologickými, metabolickými (cukrovka) a psychiatrickými ochoreniami (napr. depresie). Transgenéza môže byť vhodným postupom pre zvýšenie obsahu prospešných živín ako sú Ω -3 mastné kyseliny pri hlavných hospodárskych zvieratách. Boli vytvorené transgénne ošípané a hovädzí dobytok s vysokým obsahom Ω -3 mastných kyselín, ktoré produkovali vo svojich tkanivách a mlieku. Experiment sa realizoval vložением génu, ktorý kóduje desaturázu pre Ω -3 mastné kyseliny do genómu ošípaných a hovädzieho dobytku. Desaturázy Ω -3 mastných kyselín sú potrebné na premenu Ω -6 mastných kyselín na Ω -3 mastné kyseliny. Obdobne sa uvažuje o využití génov pre **receptory** lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL) a hormónov, ako je leptín, pri znižovaní tuku a cholesterolu v živočíšnych produktoch.

Skupina výskumníkov z Univerzity Waikato na Novom Zélande vytvorila transgénnu kravu, ktorá v mlieku neprodukuje β -laktoglobulín. Táto srvátková bielkovina sa pokladá za hlavnú príčinu alergií na mlieko a vyradenie tohto génu z funkcie by umožnilo výrobu hypoalergénnych mliečnych výrobkov.

Okrem génov ovplyvňujúcich potravinové suroviny sa techniky transgenézy použili aj pri génoch ovplyvňujúcich kvalitu a množstvo vlny pri ovciach. Zavedením génu pre IGF1 (inzulínu podobný rastový faktor) spojeného s keratínovým promótorom sa umožňuje expresia exogénneho génu v koži, čo fenotypovo predstavuje zvýšenie produkcie čistej vlny prinášajúce významnú ekonomickú výhodu pre chovateľov takýchto transgénnych oviec oproti konvenčným plemenám.

Niektoré druhy pavúkov vo svojich pavučinách tkajú nosné vlákna, ktoré sa vyznačujú pozoruhodnými mechanickými a optickými vlastnosťami („Dragline silk“ – ťažný hodváb) (Obrázok 3.12). Vzhľadom ku svojej hmotnosti ide o jeden z najpevnejších materiálov na svete pričom je veľmi elastický a má schopnosť rôznymi spôsobmi odrážať a lomiť svetlo. Na viacerých výskumných pracoviskách sa podarilo vložiť gény pre syntézu bielkovín pavučiny z genómu pavúka do kozích embryí. Promótormi bola nasmerovaná produkcia do mliečnych žliaz, z ktorých sa tieto bielkoviny izolovali. Po zvládnutí ďalšieho spracovania (extrakcia, čistenie, spriadanie) výsledné vlákno by mohlo nájsť uplatnenie v rôznych komerčných aplikáciách.



Obrázok 3.12: Ťažné vlákna v pavučine (Zdroj: www.graphene-info.com).

Samostatnou časťou súčasného výskumu je snaha o vytvorenie transgénnych hospodárskych zvierat, ktoré by efektívnejšie využívali živiny a produkovali menej exkrementov znečisťujúcich životné prostredie. Na kanadskej univerzite v Guelphu (v štáte Ontário) vyvinuli ošípané (**EnviroPig**), ktoré majú vo svojom genóme gén pre fytázu. Ten je riadený promótorom na expresiu v slinných žľazách. Enzým fytáza uvoľňuje fosfát z nestráviteľného fytátu, ktorý tvorí až 80 % obsahu fosforu v krmive. Schopnosť tráviť rastlinný fosfor redukuje spotrebu nákladných krmovinových doplnkov ako sú minerály fosforu alebo komerčne vyrábaná fytáza. Navyše ošípané EnviroPig vylučujú vo svojich exkrementoch o 30 až 70 % menej fosforu ako konvenčné ošípané. Je to dôležité z hľadiska ochrany životného prostredia, pretože nadbytok fosforu v hnoji mení lokálne vodné prostredie, čo vedie k premnoženiu rias, produkcii skleníkových plynov a zvýšenému úhynu vodných živočíchov. Nedostatočný dopyt po transgénnych ošípaných EnviroPig však nakoniec viedol k ukončeniu projektu a existujúce zvieratá boli eliminované. Je to príklad negatívneho pôsobenia verejnej mienky na zrejme benefity z výskumu.

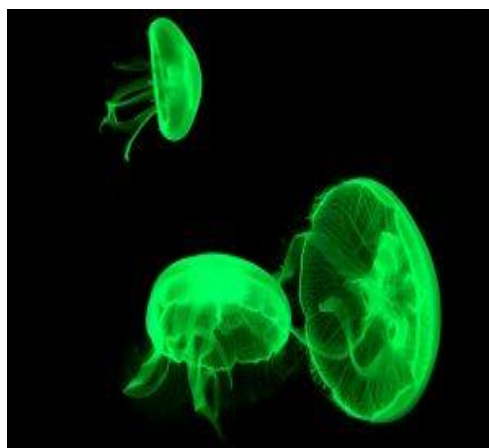
Spoločnosť Yorktown Technologies vytvorila geneticky modifikovanú rybu **Dánio** (*Danio sp.*), medzi akvaristami známu pod názvom zebrička (Obrázok 3.13).

GloFish sa stal prvým druhom ryby, pri ktorom sa podarilo integrovať a exprimovať gén pre zelenú fluorescenčnú bielkovinu (GFP) pochádzajúci z morskej medúzy (*Aequorea victoria*) (Obrázok 3.14). Zhiyuan Gong so svojim tímom z National University of Singapore vložil gén GFP do embrya zebričky a po úspešnej integrácii v genóme sa gén expimoval vo forme fluorescencie za bieleho a ultrafialového svetla. Pôvodným zámerom pri tvorbe tejto transgénej ryby bolo vytvoriť organizmus, ktorý by odhaľoval selektívnym fluorescenčným

sfarbením prítomnosť toxínov vo vodnom prostredí. Komerčnému rozšíreniu tohto druhu okrem atraktívneho fenotypu (popri fluorescenčnej zelenej boli neskoršie vytvorené červené, purpurové, oranžové a modré fenotypy) a nepotravinovému využitiu pomohla skutočnosť, že pôvodný druh zebričky pochádza z tropického pásma Indie a Bangladéša a v studených vodách iných podnebných pásiem nedokázal prežiť. Popri zebričke sa podarilo neskôr vytvoriť fluorescenčné fenotypy aj pri druhoch tetra čierna (*Gymnocorymbus ternetzi*), mrenka štvorpruhová (*Puntius tetrazona*), labeo červenoplutvé (*Epalzeorhynchus frenatum*), bojovnica pestrá (*Betta splendens*) a najnovšie pancierniček zelený (*Corydoras aeneus*). Fluorescenčné ryby patria medzi prvé geneticky modifikované druhy, ktoré sa stali verejne dostupnými a komerčne úspešnými transgennými živočíchmi.



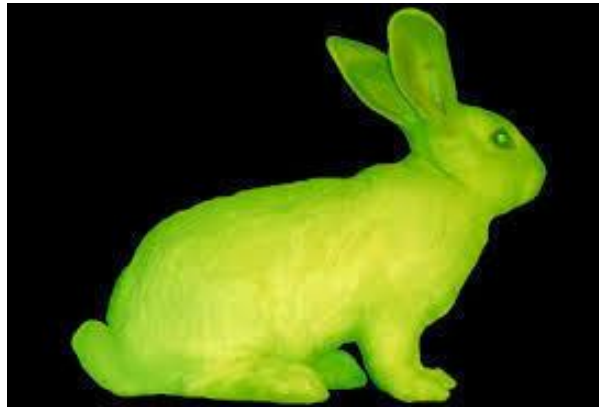
Obrázok 3.13: Danio, Tetra, Labeo (zľava - doprava) (Zdroj: www.amazon.com/glofish-live-fish-collection-active/).



Obrázok 3.14: *Aequorea victoria* (Zdroj: <https://blogs.ubc.ca>).

Experimenty s prenosom génu pre fluorescenčnú bielkovinu do rôznych organizmov sa začali využívať aj v oblasti **umenia** („Bioart“). Príkladom je fluoreskujúca srst' kráľika, ktorého

tvorcovia pomenovali Alba (Obrázok 3.15). Bol vytvorený vo francúzskom INRA genetikom Louis-Marie Houdebine. Brazílsko-americký umelec Eduardo Kac v spolupráci s jeho tvorcom ho využil pri umeleckej prezentácii. Po publikovaní tohto „diela“ však počínanie E. Kaca vyvolalo celosvetový odpor a Houdebine sa dištancoval od takejto prezentácie umenia.



Obrázok 3.15: Králik Alba pri ultrafialovom ožiarení (Zdroj: www.ekac.org/gfpbunny.html).

V roku 2024 neboli v Európskej únii povolené žiadne potravinové produkty pochádzajúce z klonovaných alebo transgénnych zvierat. Hlavné obavy sa týkajú nedostatku informácií a teda možného nebezpečenstva z expresie exogénnych génov. Existuje možnosť tvorby bielkovín, ktoré by mali alergénne, toxické, antinutričné alebo inak fyziologicky nevyhovujúce vlastnosti pre ľudský organizmus. Tieto výhrady sú považované za obavy strednej úrovne bezpečnosti potravín a líšia sa podľa génového produktu, potravinového výrobku a cieľového spotrebiteľa.

Z hľadiska životného prostredia existuje možnosť manifestácie nepredvídateľných dôsledkov na prírodné ekosystémy v prípade rozšírenia transgénnych zvierat do voľnej prírody. Príkladom je losos AquAdvantage. Americký schvaľovací Úrad pre liečivá a potraviny (FDA) v roku 2015 konštatoval, že táto transgénna ryba nepredstavuje riziko pre životné prostredie a jeho mäso je možné použiť pre ľudskú konzumáciu. Popritom sa však nariadili chovné opatrenia, ktoré znižujú resp. eliminujú možnosť úniku rýb do voľných oceánskych vôd (vylúčený chov v sieťach na voľnom oceáne, viac bariérový systém pri pozemných rybochovných zariadeniach). Ďalším predmetom obáv, zatiaľ len v teoretickej oblasti, sú zamýšľané pokusy s klonovaním vyhynutých zvierat (napr. dront nelietavý nazývaný aj dodo, vlkovec tasmanický, mamut srstnatý).

Podobne ako pri každej nastupujúcej technológii, aj v oblasti živočíšnych biotechnológií vystupujú do popredia obavy z ich využitia. Existujú námietky, že potravinárske produkty

z transgénnych a klonovaných zvierat môžu predstavovať riziká pre zdravie ľudí. Namiesto je aj znepokojenie z možných dopadov nových technológií na životné prostredie a dobré životné podmienky zvierat („Welfare“). Diskutovanou je legislatívna regulácia z hľadiska primeranosti a kontroly rizík spojených s týmito technológiami. Na rozdiel od podobných technológií pri rastlinách, pri živočíchoch existujú masívnejšie obavy a pochybnosti o dobrých chovných podmienkach takýchto zvierat a dôsledkoch plošného rozšírenia geneticky *in vitro* manipulovaných populácií. Preto sú priebežne a plošne monitorované všetky geneticky modifikované zvieratá a vyhodnocujú sa ich dopady na ľudí a životné prostredie.

3.4 Využitie poznatkov zo živočíšnych biotechnológií v medicínskom výskume

Transgénne zvieratá majú potenciál nielen na zlepšenie produkcie v poľnohospodárstve a potravinárstve, ale môžu znamenať významný prielom v biomedicínskom výskume. Doterajšie technológie na výrobu biologicky aktívnych bielkovín využívali bakteriálne alebo kvasinkové kultúry (inzulín, rastový hormón). Mikrobiálne kultúry však majú v tomto smere určité obmedzenia. Niektoré zložité bielkovinové molekuly ako sú zrážacie faktory krvi alebo monoklonálne protilátky vyžadujú zložité vzorce skladania s ďalšími molekulami ako sú napr. cukry, vďaka ktorým majú biologickú aktivitu. Tieto sofistikované modifikácie vyžadujú, aby sa bielkoviny produkovali v cicavčích bunkách.

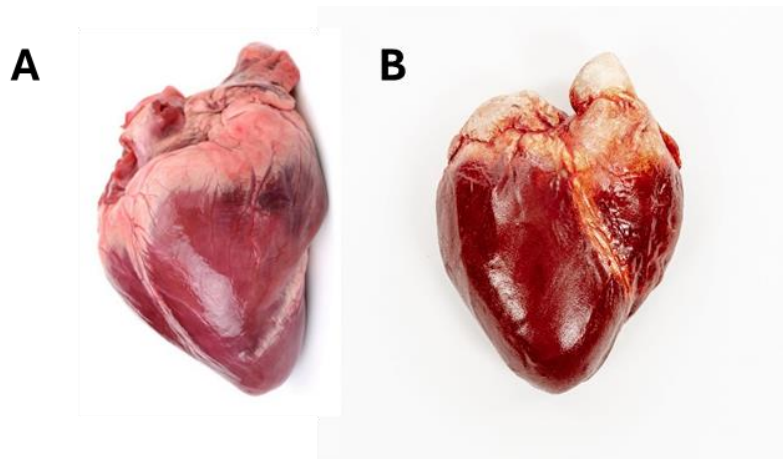
Napríklad spoločnosť GTC Biotherapeutic ako prvá vytvorila transgénnu kozu (pomocou iných metód ako CRISPR/Cas9), ktorá produkovala antitrombín (antikoagulačná látka) a vylučovala ho v mlieku. Pharmin Group obdobne vytvorila transgénne králiky tak, aby podobne produkovali a vylučovali inhibítor C1-esterázy, ktorý je významným pri liečbe **angioedému**. Skúmajú sa tiež možnosti vytvorenia transgénnych ošípaných, v mlieku ktorých by sa nachádzali zrážacie faktory VII a IX, hemoglobín, ľudský proteín C a ľudský erytropoetín, faktor stimulujúci kolónie makrofágov a von Willebrandov faktor (glykoproteín potrebný pri **hemostáze**). Ešte v roku 1997 bola vytvorená prvá transgénna krava, ktorá vo svojom mlieku mala bielkovinu alfa laktoalbumín. Je súčasťou ľudského mlieka a v kravskom mlieku vytvára vyvázenejší pomer pre ľudí so špeciálnymi výživovými alebo tráviacimi potrebami. Boli tiež vytvorené kravy vylučujúce ľudský laktoferín - glykoproteín zapojený do reakcií v rámci vrodenej imunity. Vďaka antibakteriálnym, antimykotickým, antiendotoxínovým

a antivírusovým aktivitám laktoferínu sa zvažovalo viac lekárskeho využitia pri liečbe infekčných a zápalových chorôb.

Existujú oblasti biomedicínskeho výskumu, v ktorých majú transgénne zvieratá veľký potenciál aj ako modely pre ľudské choroby. Čoraz viac preferovaným druhom sú ošípané, ktoré sa svojou veľkosťou a podobnými fyziologickými procesmi približujú ľudským parametrom. Konvenčné ošípané možno použiť pri štúdiu kardiovaskulárnych chorôb, aterosklerózy, oftalmofarmakológie, onkogénnych procesov, metabolických ochorení alebo procesov hojenia rán. Transgénne technológie umožňujú v súčasnosti vytvárať modely ošípaných pre také ochorenia ako je Alzheimerova choroba, cystická fibróza, retinis pigmentosa, spinálna svalová atrofia, cukrovka alebo zlyhávanie funkcie orgánov. Hneď po otestovaní charakteristík transgénneho zvieratá, môžu byť na nich testované pred klinickými skúškami, nové lieky alebo terapeutické postupy.

Celosvetovo prevyšuje počet pacientov zaradených v transplantačných programoch počty darcov vhodných orgánov a tkanív. Jednou z možností je využitie živočíšnych organizmov ako donorov štepov vhodných na transplantácie do ľudského organizmu. Tento typ prenosu sa označuje ako **xenotransplantácia** na rozdiel od alogénnej transplantácie (prenos orgánov a tkanív v rámci druhu, od jedného jedinca na druhého) a autológnej transplantácie (prenos v rámci jedného organizmu, napr. kmeňové bunky z pupočníkovej krvi a ich neskoršie použitie pri výskyte ochorenia), pri xenotransplantáciách je významné zohľadňovať vysokú genetickú príbuznosť dvoch druhov, ktorá znižuje pravdepodobnosť imunitného odmietnutia orgánu (reakcia) v organizme prijímateľa (recipienta). Na druhej strane, pri takýchto druhoch (napr. šimpanz, gorila, orangutan) je zvýšené nebezpečenstvo prenosu spoločných ochorení a nezanedbateľnou skutočnosťou je, že patria k ohrozeným živočíchom a ich úroveň inteligencie vyvoláva aj vážne etické otázky. Pozornosť sa preto sústreďuje na ošípané, ktoré svojimi biologickými vlastnosťami (vysoká reprodukcia, podobné fyziologické a anatomické parametre) (Obrázok 3.16) a ekonomickými charakteristikami (efektívne veľkochovy s vysokou rentabilitou pri produkcii jatočných zvierat) sa zdajú byť vhodným zdrojom xenotransplantátov. Už v súčasnosti sa používajú na zaistenie niektorých náhradných tkanív (napr. srdcové chlopne). Na rozdiel od alogénnych transplantácií je potrebné pri xenotransplantátoch zabezpečiť zhodu (resp. elimináciu) antigénov na cytoplazmatických membránach buniek v oveľa širšom rozsahu a zabrániť tak imunitnej reakcii (hyperakútna reakcia). Jedným z možných riešení je pomocou transgénnych techník vložiť gény kontrolujúce tvorbu týchto membránových antigénov do embrya ošípanej. Cieľom je, aby sa antigény ošípanej podobali ľudským antigénom. Je to však len jeden z problémov, ktoré bude

potrebné pri xenotransplantáciách vyriešiť. Existujú však aj ďalšie imunologické bariéry, ktoré bude treba prekonať (humorálna rejekcia, trombotická mikroangiopatia, koagulačné deregulácie...). Okrem toho sú obavy z prenosu medzidruhových vírusov (prasací cytomegalovírus, prasacie endogénne retrovírusy), ktoré by sa po prenose do ľudského organizmu mohli transformovať na ľudské patogény. Jeden z postupov, ako toto nebezpečenstvo eliminovať by mohla poskytnúť **gnotobiológia**. V roku 2022 sa na Univerzite v Marylande v USA uskutočnila prvá xenotransplantácia srdca ošípanej do tela 57 ročného pacienta. Geneticky modifikovaná ošípaná mala vo svojich bunkách vyradené gény pre tvorbu xenoantigénov (napr. α -1,3-galaktozidáza kódovaná génom GGTA1). Pacient prežil 2 mesiace a potvrdil možnosť použitia xenotransplantácie z transgénovo upravenej ošípanej.



Obrázok 3.16: Veľkosť srdca ošípanej (A) a človeka (B) v rovnakej mierke (www.express.co.uk/news/science/1169312/).

3.5 Využitie biotechnológií pri tvorbe a ochrane aktívneho zdravia hospodárskych zvierat

Genetické modifikácie genómov hospodárskych zvierat by mohli pomôcť aj pri zvyšovaní rezistencie voči infekčným chorobám. V súčasnosti prebieha niekoľko štúdií zameraných na vyvolanie biologickej odolnosti rôznych druhov hospodárskych zvierat proti nebezpečným patogénom. Medzi takéto ochorenia patrí napr. choroba šialených kráv (bovinná spongiformná encefalopatia, BSE), krívačka a slintačka pri párnokopytníkoch alebo vtáčia chrípka. Využívajú sa pritom stratégie založené na knockout technike (napr. vyradenie génu *PRNP* vyvolávajúceho tvorbu bielkovinových domén spôsobujúcich chorobu BSE), RNA interferencii (pri krívačke,

slintačke, reprodukčnom a respiračnom syndróme ošípaných...) alebo tvorba transgénnych kurčiat neschopných prenášať vírus vtácej chrípky na iné vtáky.

Imunitný systém novorodených mláďat nie je plne funkčný a preto je táto kategória zvierat citlivá na mnoho mikrobiálnych infekcií. V minulosti sa na prekonanie tohto obdobia plošne používali kŕmne antibiotiká, čo však časom viedlo k rastu rezistentných kmeňov patogénov. Jednou z možností alternovať účinok antibiotík sú transgénne techniky. Napríklad, boli vytvorené transgénne kozy s vysokou koncentráciou **lyzozýmu** (prírodná látka s antibiotickým účinkom). Keď sa toto mlieko použilo v mliečnej výžive teliat, pomáhalo im chrániť sa pred patogénnymi kmeňmi *Escherichia coli* a zlepšovalo stav gastrointestinálneho systému.

Ďalšou možnosťou v tejto oblasti je použitie **peptidov s antimikrobiálnym účinkom**. Medzi takéto látky patrí Cecropín B, ktorý sa produkuje v bunkách motýľa *Hyalophora cecropia*. Je syntetizovaný z génu, ktorý sa podarilo preniesť do genómu sumca a japonskej rybky medaka. Obidva transgénne druhy vykazovali preukazne zvýšenú odolnosť proti početnej skupine mikrobiálnych patogénov.

Očakáva sa, že systém CRISPR/Cas9 urýchli produkciu nových zvierat ako **"bioreaktorov" pre farmaceutickú výrobu**. V živočíšnych biotechnológiách sa vyskytli pokusy o využitie veľkých transgénnych zvierat ako "bioreaktorov", napr. na efektívnu produkciu farmaceutík s vysokou koncentráciou v krvi alebo mlieku. Často sa na účely produkcie bielkovín využívajú zvieratá s vysokou produkciou mlieka. Napríklad dojnica môže ročne vyprodukovať približne 10 000 l mlieka, z ktorého sa dajú izolovať desiatky kilogramov terapeutických bielkovín. Relatívne malé stáda laktujúcich kráv, kôz alebo oviec tak môžu produkovať ročne niekoľko sto kilogramov separovaných a vyčistených bielkovín.

Hoci tieto príklady preukázali, že transgénne zvieratá môžu byť vynikajúcim zdrojom rekombinantných liečiv, takéto stratégie je v súčasnosti ťažké zovšeobecniť kvôli technickým ťažkostiam. Predpokladá sa, že s akceleráciou nových postupov a ujasnením etických otázok sa budú vytvárať aplikácie s reálnymi výstupmi vo všetkých spomenutých oblastiach.

Ako bolo spomínané v predchádzajúcom texte, klonované a transgénne druhy zvierat môžu byť použité ako zdroj tkanív a orgánov pre xenotransplantačné techniky alebo výrobu bioaktívnych látok. Napriek nesporným výhodám však stále existujú určité riziká s ich využívaním (rejekcia, infekcia...).

Niektoré z najhmatateľnejších aplikácií živočíšnych biotechnológií sú v **oblasti prevencie zdravia zvierat**. Globalizovaný obchod so živými zvieratami, živočíšnymi produktmi a krmivami vedie k neustále rastúcej hrozbe infekčných chorôb na celom svete.

Epizootologickú situáciu ďalej ohrozuje čoraz intenzívnejšia a pravidelná **vnútrokontinentálna a medzikontinentálna preprava zvierat** na súťaže, výstavy a chovateľské účely. Stále otvorenejšie hranice medzi mnohými krajinami tiež prispievajú k novej vysoko rizikovej situácii, keď infekčné patogény môžu ľahko prekonať tisíce kilometrov a náhle sa objavia v oblastiach, kde sú neočakávané a pravdepodobne neznáme.

Náhly výskyt infekčnej choroby v novom regióne môže viesť k oneskorenej alebo nesprávnej diagnóze, čo vedie k nekontrolovanému šíreniu agens na vnímavé populácie zvierat vo veľkých neobmedzených geografických oblastiach. Celosvetovo rastúcou hrozbou je výskyt chorôb prenášaných vektormi, ako je horúčka Rift Valley, katarálna horúčka oviec a africký mor ošipaných. Táto hrozba sa zvyšuje aj v súvislosti s klimatickými zmenami v jednotlivých regiónoch sveta.

Prevratné úspechy biotechnologických postupov významne prispievajú k vývoju nových výkonných diagnostických testov. Rôzne metódy PCR (RT-PCR, q-PCR), izotermické amplifikačné metódy, mikročipy, rekombinantné proteíny, syntetické proteíny, biosenzory a mnoho ďalších prístupov na detekciu patogénov alebo imunitných reakcií po infekcii tvoria účinné nástroje rýchlej a presnej detekcie. Fylogenetická analýza amplifikovaných sekvencií nukleových kyselín poskytuje nové informácie o vývoji patogénov a podporuje štúdie molekulárnej epidemiológie. Dôkazy o výmene DNA medzi rôznymi mikrobiálnymi organizmami v priebehu evolúcie nanovo definujú naše chápanie patogénov a korigujú doteraz používanú klasifikáciu mikroorganizmov a ich systematiku. Vzhľadom na to, že 70 % až 80 % všetkých novo sa objavujúcich chorôb celosvetovo je zoonotických, biotechnológia tiež významne prispieva k preventívnej medicíne. Otvára nové spôsoby konštrukcie geneticky modifikovaných markerových vakcín („Differentiating Infected from Vaccinated Animals“, DIVA vakcíny), DNA a RNA vakcín a iných nástrojov na zlepšenie a bezpečnejšiu **imunizáciu proti infekčným chorobám** zvierat a človeka. Biotechnológie poskytujú prostriedky, pomocou ktorých možno špeciálne navrhnuť nové a účinné nástroje na kontrolu a eradikáciu infekčných ochorení. Vďaka akcelerácii biotechnologického výskumu sú zdravotnícke orgány na celom svete postupne v lepšej pozícii v boji proti infekčným chorobám, vrátane veľmi ničivých cezhraničných chorôb zvierat. Vzhľadom na vznikajúce globálne biologické hrozby poskytujú biotechnológie aj nástroje na zisťovanie, prevenciu a riadenie prírodných pandémieí a pandémieí vyvolaných bio-terorizmom. Rozvíjajúce sa genomické techniky však poskytujú nástroje na navrhnutie oveľa smrteľnejších patogénov v rukách bioteroristov. Súčasne sa však v posledných rokoch výrazne zlepšila aj schopnosť reagovať na vznikajúce pandémie s cieľom znížiť mortalitu zvierat v chovoch. Podľa najnovších publikácií existuje niekoľko desiatok

biotechnologických produktov určených pre zvieratá. Väčšina z týchto produktov sú biologické látky vrátane veterinárnych vakcín a diagnostických súprav.

Koncom 20. storočia sa otvorila nová oblasť biológie, ktorá bola nazvaná **genomika**. Termín „genomika“ bol prvýkrát vytvorený v roku 1986 na pomenovanie časopisu, v ktorom mali byť publikované články z experimentov pri sekvenovaní ľudského genómu. Technológie používané v tom čase zahŕňali využitie bakteriálnych restričných endonukleáz na vizualizáciu rozdielov v sekvencii DNA a mapovaní chromozómov. Od roku 1985 rýchlo nasledoval vývoj metódy polymerázovej reťazovej reakcie (PCR), ktorá otvorila nové možnosti na detekciu a štúdium rozdielov v sekvenciách DNA rôznych génov zvierat. V spojení s genetickými markermi sa PCR stala účinnou metodikou, ktorá začiatkom 90. rokov 20. st. umožnila vývoj genetických máp genómov hospodárskych zvierat. Začiatkom 21. storočia, keď sa finalizovali práce na ľudskom genóme boli v laboratóriách k dispozícii ďalšie nové technológie umožňujúce vykonávať rozsiahle štúdie génovej expresie s cieľom vizualizovať zmeny na úrovni expresie stoviek tisícov génov v špecifických tkanivách. Poľnohospodárska výskumná komunita dokázala využiť infraštruktúru vybudovanú projektom ľudského genómu na sekvenovanie genómu kury domácej (*Gallus domesticus*) a genómu hovädzieho dobytká (*Bos taurus*).

V oblasti zdravia zvierat je teraz k dispozícii výkonný súbor nástrojov na pochopenie genetickej variability spojenej s náchylnosťou na choroby, interakcií hostiteľ-patogén a komplexnými fenotypmi pre ukazovatele zdravia. Pred úspešnou aplikáciou genomiky na zdravie zvierat je potrebné vyplniť kritické medzery v chápaní génovej štruktúry a funkcie pri domácich zvieratách. Domáce zvieratá poskytujú jedinečný zdroj pre štúdium primárnych biologických mechanizmov, ktoré sú základom štruktúry a funkcie génu, regulácie génovej expresie a genetického príspevku k celkovej fenotypovej variabilite. Výhoda spočíva v tom, že domáce zvieratá, na rozdiel od ľudí, možno cielene selektovať na expresiu alebo potlačenie špecifických vlastností génov. Ďalšie pokroky v genomike zvierat si budú vyžadovať interdisciplinárne prepojenia zamerané na komplexné problémy v oblasti chorôb zvierat s najmodernejším vybavením a prístupmi, ktoré zahŕňajú infekčné choroby, patológiu, fyziológiu, imunológiu a komparatívnu mikrobiálnu genomiku.

Príkladom takéhoto pokroku sú biotechnologické postupy založené na **interferencii RNA**. Gény v genóme zvierat sa prepisujú, keď sú v danej bunke prítomné vhodné aktivačné signály. Výsledkom pôsobenia transkripcie je produkcia mediátorovej (informačnej) RNA (mRNA). Molekula mRNA obsahuje reťazec nukleotidov, ktorý sa translačným procesom prekladá do sekvencie aminokyselín v molekule bielkoviny. Dôležitou funkčnou zložkou

využitia metódy interferencie RNA je krátka jednovláknová molekula iRNA s dĺžkou približne 20 nukleotidových báz, ktorá sa môže viazať na cieľovú mRNA. Táto interakcia zníži produkciu bielkoviny, ktorá je kódovaná týmto úsekom mRNA (**génový knockdown**).

Ak je molekula iRNA navrhnutá tak, aby sa zamerala na vírusový gén, potom jej aktivita môže zabrániť normálnej produkcii vírusu. Molekuly iRNA môžu byť v rôznych formách. Ako nezávislé malé dvojláknové molekuly RNA nazývané krátke interferujúce RNA („Small interfering RNA“, siRNA), ktoré môžu pri živočíchoch prežiť iba krátkodobo. Pre predĺženie aktivity musí byť siRNA začlenená do expresného vektora, ktorý funguje ako gén. V tomto prípade sa nazývajú krátke vlásenkové RNA („Short hairpin RNA“, shRNA) kvôli ich fyzickej štruktúre alebo mikroRNA (miRNA). miRNA sa vyskytuje pri zvieratách prirodzene a predpokladá sa, že má hlavnú úlohu pri normálnom raste a metabolizme buniek.

Pokrok v laboratórnych technikách teraz naznačuje, že biotechnológie založené na RNA sa rýchlo blížia k realizácii v praxi. Najpravdepodobnejšou oblasťou použitia bude prevencia alebo zmiernenie klinických prejavov chorôb. Existuje niekoľko biotechnologických postupov založených na RNA, ale vo všeobecnosti sa všetky zameriavajú na zníženie produkcie bielkoviny z daného génu. Najreálnejšie sa zdajú byť RNA technológie v boji proti vírusovým infekciám zvierat prostredníctvom zníženia aktivity vírusových génov.

Napriek potenciálnym možnostiam technológie založenej na interferencii RNA, existujú aj iné typy molekúl RNA, ktoré by sa dali aplikovať na zvieratá. Sľubnou aplikáciou je blokovanie aktivity vírusovej polymerázy a tým zabránenie replikácii vírusu. Existujú niektoré molekuly RNA, ktoré obsahujú svoju vlastnú enzymatickú aktivitu - ribozýmy. Ribozýmy, ktoré sa špecificky viažu a následne katalyzujú štiepenie iných cieľových molekúl RNA predstavujú zaujímavú alternatívu k iRNA. Je pravdepodobné, že budú identifikované ďalšie molekuly RNA. Napríklad molekuly RNA, ktoré môžu inhibovať funkciu miRNA, nazývané antagomiry.

Väčšina aplikácií, ktoré by bolo možné aplikovať na zvieratách, je stále v experimentálnej fáze vývoja. Existuje však niekoľko predklinických štúdií v humánnej medicíne a je zrejmé, že tieto poznatky urýchlia využitie biotechnológií na báze RNA pri zvieratách. Snáď najpravdepodobnejšou aplikáciou biotechnológií na báze RNA bude ovplyvnenie vírusových infekcií. Niekoľko štúdií sa zameriava na použitie iRNA pri prevenciu replikácie vírusov významných infekcií (slintačka, krívačka, infekčná anémia koní).

Alternatívne použitia biotechnológií založených na RNA zahŕňajú aj moduláciu niektorých aspektov imunitného systému. Predpokladá sa, že variabilita génovej aktivity pozorovaná v prirodzených populáciách zvierat by mohla simulovať proces knockdownu, ktorý

spôsobuje interferencia RNA. Podobne by mohli byť ovplyvňované aj iné aspekty metabolizmu zvierat (intenzita rastu, jatočné ukazovatele atď.).

Tak ako pri väčšine nových technológií aj tu treba brať do úvahy potenciálne riziká nových postupov. Použitie technológií založených na RNA môže vyvolať vnútornú imunitnú reakciu v bunkách zvierat. V extrémnych podmienkach to môže viesť až k bunkovej smrti. Ďalšia široko diskutovaná obava sa týka možných účinkov na necieľové gény. To je možné prostredníctvom slabej interakcie molekuly RNA s mRNA transkribovanej z génov, ktoré nie sú cieľom interakcie.

3.6 „Welfare“ – dobré životné podmienky zvierat a ich ochrana v biotechnologických aplikáciách

V druhej polovici 20. storočia sa s rozvojom veľkovýrobných systémov chovu začali formovať a presadzovať názory smerované na napĺňanie biologických potrieb úžitkových zvierat chovaných v intenzívnych veľkochovných podmienkach. Na zvieratá sa začalo pozeráť nielen ako na produkčné objekty, ale aj ako na organizmy majúce nervovú sústavu, ktorá im sprostredkováva podnety nielen z vnútorného prostredia (hlad, smäd, bolesť, infekcie) ale aj z vonkajších chovných podmienok (teplota a vlhkosť vzduchu, pohoda, stres, strach...). Optimálne napĺňanie fyziologických a behaviorálnych potrieb – dobré životné podmienky úžitkových zvierat (tzv. „Welfare“ zvierat) sa začali spočiatku presadzovať v poľnohospodársky vyspelých krajinách Európy, ale vďaka legislatívnym opatreniam (napr. zákaz importu zvierat a ich produktov z chovov nespĺňajúcich základné podmienky humánneho chovu) sa začali šíriť aj do iných častí sveta.

Využívanie nových biotechnologických postupov na zvieratách nastolilo nové otázky, ktoré sú spojené s dobrými životnými podmienkami zvierat. Geneticky modifikované zvieratá sa doteraz používali najmä v rámci biologického výskumu a ako biologické modely pre humánne choroby. Zvyčajne je cieľom modifikácie produkovať zvieratá, ktoré buď nedostatočne alebo nadmerne exprimujú určité gény, alebo ktoré exprimujú zmutovaný ľudský transgén spôsobujúci ochorenie. Vo všetkých týchto prípadoch je normálna funkcia v organizme nejakým spôsobom narušená. V zásade môžu úpravy zahŕňať akúkoľvek časť živočíšneho genómu a fenotypové účinky sa môžu prejaviť v širokom spektre (t.j. od letálnych až po nevýznamné resp. neidentifikovateľné). Účinky genetických modifikácií (alebo všeobecne biotechnologických postupov) však možno rozdeliť do dvoch hlavných kategórií: zamýšľané a

nezamýšľané. Problémom s welfare vyplývajúcim zo zamýšľanej genetickej zmeny je ťažké vyhnúť sa. Napríklad myši nesúce alely spôsobujúce Huntingtonovu chorobu budú pri rozvoji choroby nevyhnutne trpieť, vrátane rýchlej progresívnej straty nervov a ich kontroly, ktoré povedú k ich predčasnému úhynu. Nežiaduce účinky sú spojené so súčasným stavom poznatkov a technológií. Je zrejmé, že aspoň niektorým z týchto problémov welfare sa dá vyhnúť vďaka novým technológiám a vedeckému pokroku. Kde sa predpokladajú dôsledky genetickej modifikácie (napríklad pri vzniku fenotypového modelu choroby), je možné predpovedať dôsledky pre welfare pomocou informácií o účinkoch podobných mutácií pri iných druhoch, vrátane symptómov ľudských chorôb. Znamená to, že niektoré štúdie sa snažia vopred vyhodnotiť dôsledky na welfare. To potenciálne umožňuje zväžiť tieto dôsledky skôr, ako sa zvieratá skutočne vyprodukuje.

Zvieratá sa klonujú buď na produkciu geneticky identických kópií požadovaných jedincov alebo pri zlepšovaní techník klonovania. Pri klonovaní sa časť genetického materiálu nachádza v oocyte (mitochondriách) a časť sa manifestuje prostredníctvom epigenetických procesov výsledkom čoho je skutočnosť, že klonované zvieratá nebude identické s donorom a to ani na genotypovej ani fenotypovej úrovni. V súčasnosti je miera úspešnosti klonovania zvierat nízka (3–5 %) a z narodených jedincov mnohé trpia chorobami, čo sa prenáša do ich welfare. Ako príklady problémov tohto typu možno spomenúť abnormality placenty, nadmerný rast plodu, predĺžená gravidita, pôrod mŕtveho plodu, hypoxia, respiračné zlyhanie a obehové problémy, malformácie v urogenitálnom trakte, malformácie pečene a mozgu, imunitné dysfunkcie alebo lymfoidná hypoplázia. Niektoré z týchto stavov sú súčasťou syndrómu početného potomstva („Large Offspring Syndrome“, LOS). LOS sa často vyskytuje nielen pri klonovaných zvieratách, ale aj pri iných reprodukčných technológiách. Zatiaľ nie je jasné, či problémy s welfare klonovaných zvierat sa dajú riešiť technologickými alebo metodologickými postupmi alebo či za nimi existujú hlbšie epigenetické faktory.

V súčasnosti neexistuje všeobecná zhoda na tom, čo by sa už malo považovať za narušenie welfare a čo nie. Existujú dve koncepcie etických obáv o dobré životné podmienky zvierat, ktoré sú vyvolané biotechnológiami.

V zásade sa na problematiku welfare zvierat možno pozeráť z hľadiska subjektívnych skúseností zvierat a z hľadiska umožnenia zvieratú vykonávať jeho druhovo špecifické potreby. Ak má zvieratá negatívne skúsenosti v dôsledku biotechnologických aplikácií (bolesť, strach, stres), potom využitie takýchto biotechnologických postupov je eticky problematické. Ak zvieratá nemá žiadne negatívne skúsenosti (napríklad myš s indukovanou rakovinou v

počiatočných štádiách), ale má zabezpečené všetky biologické potreby (fyziologické, sociálne) môže byť takýto postup tolerovaný.

Zo širšieho pohľadu sa otázka welfare zvierat týka aj toho, do akej miery môže zvieratá vykonávať svoje biologické potreby (**behaviorálne**, fyziologické, sociálne), čo možno nazvať jeho druhovo špecifickým potenciálom, bez ohľadu na jeho subjektívny charakter skúsenosti. Umožnenie zvieratám zapájať sa do určitých druhov správania, nevylučuje pôsobenie subjektívnych skúsenosti zvieratá.

Ako príklad takejto dilemy možno uviesť hodnotenie welfare nosníc chovaných v klietkach a sliepok vo voľnom výbehu. V zásade neexistuje žiadna etická námietka proti tomu, že sa sliepkam neumožní vykonávať niektoré inštinkty (napr. popolenie – „kúpanie sa“ v prachu ako prevencia proti parazitom v perí) pri klietkovom chove, pokiaľ to neovplyvní subjektívny welfare zvieratá, to znamená, že vedie k negatívnym skúsenostiam. Šľachtením možno vytvoriť populácie, ktoré takéto inštinkty neprejavujú, čo je v súlade s produkčnými podmienkami, v ktorých zvieratá žijú. A keďže by to nemalo žiadne negatívne subjektívne dôsledky pre sliepky, takéto využitie biotechnológie by sa mohlo považovať za eticky bezproblémové. V praktických podmienkach je však takýto postup ťažko realizovateľný. Po prvé, behaviorálne vlastnosti sú geneticky determinované komplikovaným systémom polygénov a ich interakciami, čo znemožňuje efektívne šľachtenie na vybrané vlastnosti správania sa. Po druhé, bude náročnou úlohou zabezpečiť, aby sa vyšľachtili zvieratá s obmedzeným požiadavkami na podmienky prostredia, ale nie zvieratá, ktoré reagujú pasívne alebo dokonca s apatiou na nepriaznivé chovné podmienky. Samotná myšlienka, že by sa mohli chovať sliepky, ktoré by boli „odolné“ voči klietkovým technológiám vyvoláva vážne obavy a otázky o tom, aký je prirodzený život kurčiat a aké skúsenosti tvoria takýto život. Namiesto zmeny v genotypu sliepok a kurčiat by sa teda mali hľadať spôsoby, ako zvieratám umožniť v čo najväčšej miere naplniť ich prirodzené biologické potreby prostredníctvom zmien vo výrobnom systéme. Brojlerové kurčatá vo voľnom výbehu sú viac atakované ako kurčatá v klietkach. Prenos chorôb, vzájomné klovanie peria a kanibalizmus sa častejšie vyskytuje vo väčších krdľoch pri voľnom výbehu ako pri individuálnom ustajnení v klietkach. Napriek tomu môže byť voľný výbeh z pohľadu welfare prijateľnejší, pretože je vyvážený skutočnosťou, že kurčatá žijú prirodzenejšie (s prihliadnutím na vyhovujúcu koncentráciu zvierat vo výbehu).

Zo širšieho pohľadu vyvolávajú živočíšne biotechnológie obavy o welfare zvierat. V prvom rade rozšírili technologickú kontrolu reprodukčného procesu (odberu ejakulátu, umelé oplodnenie *in vivo* a *in vitro*, superovulácia, prenos embryí, transvaginálne vyplavovanie oocytov a raných embryí atď.). To ovplyvňuje jednak reprodukčný proces dospelých zvierat ale

aj ich potomstvo. V oboch prípadoch možno pochybovať o tom, či je tento zásah etický prijateľný, keďže všetky spomínané technológie možno veľmi všeobecne označiť za neprirodzené v porovnaní s „normálnym“ životom zvierat. Po druhé však priebeh prirodzených reprodukčných procesov ako norma vyvoláva otázky, ako treba chápať prirodzený stav. O zvieratách používaných v základnom výskume až po hospodárske zvieratá chované na produkciu možno pochybovať, či niečo v ich živote je prirodzené. Otázka by mala byť skôr zameraná na to, do akej miery má domestikované zviera možnosť naplniť svoje druhovo špecifické potreby, ktoré boli sformované v procese zdomácnenia. Laboratórna myš prežije svoj život v kletke, no napriek tomu môže naplňovať svoje biologické potreby (napr. reprodukčné inštinkty). Ďalším prípadom ilustrujúcim rozdiel medzi užším a širším pohľadom na welfare je prípad slepých sliepok. V roku 1985 bola publikovaná práca vedcami Ali a Cheng, v ktorej sa hodnotila produkcia vajec a niektoré behaviorálne ukazovatele sliepok s geneticky determinovanou slepotou v porovnaní s normálne vidiacimi jedincami. Podľa záverov práce by nevidiace sliepky pomohli riešiť problémy s welfare kurčiat vo voľnom výbehu. Vidiace kurčatá pri vyšších koncentráciách vo výbehu sa navzájom poškodzujú klovaním a niekedy dokonca kanibalizáciou slabších členov krdľa. Slepota zjavne obmedzila tento druh správania. Z užšieho pohľadu na welfare sa slepé sliepky zdajú byť na tom lepšie ako vidiace. Na tento problém existujú v zásade dva názory. Prvé stanovisko je zamerané na neetické správanie sa chovateľov, ktorí by využívali slepé zvieratá. Vychádza zo skutočnosti, že zámerne rozmnožované slepé kurčatá majú obmedzené svoje prirodzené schopnosti s cieľom zvýšiť ich úžitkovú hodnotu. V tomto stanovisku je implicitné rešpektovanie prirodzeného stavu zvierat. Hoci je takéto stanovisko intuitívne presvedčivé, nemožno si nevšimnúť určitú nejednoznačnosť. Keď sa hovorí o domestikovaných zvieratách je takmer nemožné poukázať na tie štádiá vývoja takýchto zvierat, ktoré by tvorili ich prirodzený stav a tým aj východiskový stupeň domestikácie. Druhé stanovisko predpokladá rešpektovanie prirodzeného správania sa zvierat, ale prirodzené správanie nepovažuje za niečo statické. Domestikované zvieratá boli v procese zdomácnenia šľachtené na vyššiu úžitkovosť a dobrú adaptáciu na podmienky v umelých chovných priestoroch. V minulosti sa používali konvenčné plemenárske postupy, ale v súčasnosti biotechnologické postupy umožňujú pomocou genetickej modifikácie, aby boli lepšie a rýchlejšie prispôbené pre moderné výrobné systémy. Teda skutočnosť, že človek môže zmeniť genotyp zvierat a geneticou modifikáciou nepredstavuje etický problém. Pri hodnotení etického hľadiska treba mať na zreteli ďalšie dve dôležité otázky živočíšnych biotechnológií. Zdá sa, že vo welfare zvierat je rozdiel medzi tradičnými šľachtiteľskými technológiami a novými biotechnologickými postupmi skôr kvantitatívnym rozdielom

z hľadiska aplikácií. Druhým problémom je, že rozsah etických obáv vyvolaných živočíšnymi biotechnológiami presahuje otázky rizík pre welfare zvierat. Existuje početná skupina obáv, ktorá sa týka vplyvu genetických manipulácií na ľudské zdravie. Tieto úvahy sa zvyčajne riešia v rámci hodnotenia rizík. Potom je tu známa obava, že metódy v súčasnosti používané na zvieratách môžu byť základom pre genetické manipulácie s ľudským genómom.

V súvislosti s touto témou je tiež dôležitým etickým aspektom, ktorý treba zväziť spoločenský dopad živočíšnych biotechnológií na agropotravinársky sektor. Obavy vzbudzuje akcelerácia a čoraz väčšia dostupnosť techník zameraných na manipuláciu s genómami, čo môže ovplyvniť celkový vzťah medzi človekom a prírodou. Previazanosť „starých“ živočíšnych biotechnológií (plemenárstvo, testy na zvieratách...) s „modernými“ biotechnológiami (riadená reprodukcia, klonovanie, editácia genómu...) býva často používaná ako argument pre rozvoj nových biotechnologických postupov. Naďalej geneticky meníme zvieratá tak, aby vyhovovali našim vlastným potrebám. Zmenila sa len presnosť a účinnosť metód. Z tohto pohľadu živočíšne biotechnológie nevyvolávajú žiadne etické problémy. Väčšinu averzií časti spoločnosti spojených s klonovaním a genetickým inžinierstvom možno nájsť aj v konvenčnejších technológiách. Spomínaný syndróm veľkého potomstva (LOS) nie je problémom len v rámci technológie klonovania, ale aj v iných prípadoch, kde sa využívajú konvenčnejšie druhy biotechnologických postupov. Problémy welfare zvierat vyplývajúce z genetického inžinierstva zvierat možno nájsť aj v selekčných programoch, keď príliš úzke zameranie selekcie na úžitkovosť vedie napr. k poruchám zdravia brojlerových kurčiat alebo zvýšeným výskytom mastitíd pri kravách. Je paradoxom, že najväčší rozdiel medzi starými a novými biotechnológiami môže byť v neistote týkajúcej sa neúmyselných vedľajších účinkov biotechnologických manipulácií, čo je v rozpore s tvrdením o vysokej presnosti moderných genomických techník. Nie je však možné odmietnuť kritiku dopadov živočíšnych biotechnológií iba poukázaním na podobnosti medzi „starými“ a „novými“ postupmi. Problém s týmto argumentom je, že ľudia nemusia nevyhnutne akceptovať staršie techniky. Časť spotrebiteľskej verejnosti je proti intenzívnym chovateľským podmienkam (klietkový chov, vysoká koncentrácia zvierat, riadená reprodukcia), ale neuvedomujú si dôsledky plemenárskych postupov na tieto podmienky.

V súčasnosti patrí Európska únia, v oblasti dobrých životných podmienok zvierat medzi priekopníkov zvyšovania úrovne welfare. Celoeurópsky prieskum v roku 2023 zistil, že 84 % Európanov sa domnieva, že welfare úžitkových zvierat by mal byť ešte na vyššej úrovni. Väčšina spotrebiteľov je ochotná si priplatiť za produkty z chovu zvierat ak je presvedčená, že pochádzajú z chovov spĺňajúcich dobré životné podmienky zvierat (vajcia z podstielkových

chovov, mäso jatočných zvierat, ktoré boli chované v obohatenom chovnom prostredí a predjatočné ustajnenie zvierat im nespôsobovalo stres...) (Obrázok 3.17) .

Welfare zvierat je oblasť, ktorá presahuje hranice jednotlivých členských krajín EÚ. V decembri 2023 Komisia navrhla balík opatrení na zlepšenie životných podmienok zvierat v celej Európe. Návrhy by predstavovali najväčšiu reformu pravidiel EÚ v oblasti dobrých životných podmienok zvierat za posledných 20 rokov.



Obrázok 3.17: Klasický príklad chovu sliepok vo výbehu a v intenzívnych produkčných podmienkach (Zdroj: <http://extension.umn.edu/small-scale-poultry><https://extension.umn.edu/small-scale-poultry/raising-chickens-eggs>).

3.7 Biotechnológie vo výžive zvierat

Hlavným prínosom biotechnológií vo výžive hospodárskych zvierat je používanie účinných látok na zvýšenie **nutričnej hodnoty** a obsahu **živín** pre zvieratá, ako aj **stráviteľnosti** nekvalitných krmív vrátane objemových krmív. Zabezpečením požadovanej úrovne bielkovín, esenciálnych aminokyselín a tukov dokážu moderné biotechnologické postupy zvýšiť nutričnú hodnotu krmív vo výžive zvierat. Medzi takéto technológie zaradíme využívanie rôznych enzýmov na zvýšenie dostupnosti živín z krmiva, aplikáciu látok stimulujúcich imunitu zvierat voči gastrointestinálnym patogénnym mikroorganizmom, biotechnologické technológie zamerané na výrobu rastlinných krmív s vysokými nutričnými hodnotami alebo pridávanie protilátok do krmnej dávky na prevenciu proti infekčným ochoreniam. Príkladmi takýchto techník je aj genetické inžinierstvo bachorových mikroorganizmov prežúvavcov na zlepšenie zdravia a lepšie využitie krmiva.

3.7.1 Zlepšenie kvality objemového krmiva

Pri extenzívnom chove prežúvavcov (hovädzí dobytok, ovce, kozy) tvorí hlavný podiel krmnej dávky rastlinná zložka s vysokým podielom vlákniny. Vlákna ako zložka krmiva je nedegradovateľná vlastnými enzýmami zvierat, ale evolučne sa pri bylinožravcoch vytvoril symbiotický stav s mikroorganizmami, ktoré produkujú celulytické enzýmy. V pletivách rastlín sa nachádza vo veľkom množstve aj lignín tvoriaci 25 % celkovej rastlinnej biomasy. Na degradáciu týchto polymérnych molekúl sa využívajú anaeróbne baktérie alebo niektoré huby (napr. hlíva ustricová - *Pleurotus ostreatus*). Na hydrolýzu lignocelulózy sa využívajú napríklad *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *Fusarium moniliforme* a *Chaetomium cellulolyticum*.. Tieto organizmy dokážu degradovať lignínové polyméry, štiepiť aromatické molekuly a uvoľňovať fragmenty s nízkou molekulovou hmotnosťou, ktoré sa následne využijú v tráviacom trakte zvierat. Ďalšie techniky na zvýšenie kvality krmovín s vysokým podielom vlákniny (napr. slama z obilnín) zahŕňajú aj mechanické procesy (mletie, drvenie), fyzikálne procesy (**extrúzia**) alebo rôzne chemické procesy. Okrem vlastnej degradácie lignocelulóзовých väzieb tieto techniky zlepšujú aj schopnosť bachora prežúvavcov mikrobiálne rozkladať objemové krmivo.

Gastrointestinálna mikrobiota prežúvavcov je objektom výskumu zameraného na aplikáciu biotechnologických metód s cieľom zlepšiť črevné prostredie. Využívajú sa genetické manipulácie s prirodzene sa vyskytujúcimi mikroorganizmami v čreve s cieľom zvýšiť ich degradačnú schopnosť. Efektom takýchto zásahov je zlepšenie metabolizmu a aktivity črevných mikroorganizmov. Geneticky zmenené mikroorganizmy môžu efektívnejšie degradovať lignín a vláknité časti krmív, môžu rozkladať toxíny, produkovať potrebné aminokyseliny alebo redukovať tvorbu metánu v tráviacom trakte prežúvavcov. Ďalšou biotechnologickou metódou je transformácia baktérií, ktoré sa už v čreve nachádzajú. Takýto postup má väčší potenciál zlepšiť zdravie a rast zvierat, ako aj stráviteľnosť jednotlivých zložiek krmiva.

3.7.2 Biotechnologické produkty ako krmne doplnkové látky

3.7.2.1 Ionofóry

Na zvýšenie intenzity rastu a **konverzie krmiva**, sa do krmných dávok pridávajú látky, ktoré zabezpečujú prenos molekúl cez bunkovú fosfolipidovú bariéru – ionofóry. Pri prežúvavcoch, ako je hovädzí dobytok, sa ionofóry používajú na zvýšenie stráviteľnosti krmiva nasmerovaním fermentácie v bachore na tvorbu väčšieho množstva kyseliny propiónovej, ktorú môže zviera využiť a menšieho množstva metánu, ktorý sa z tela uvoľňuje. Ionofóry menia mikrobiálny metabolizmus v bachore tak, že sa produkuje menej acetátu, butyrátu a metánu a viac propionátu.

3.7.2.2 Enzýmy

Hlavnou funkciou exogénne pridávaných enzýmov je zvýšenie stráviteľnosti krmiva, najmä ak sú v krmnej dávke nestráviteľné zložky z objemového krmiva. Exogénne pridávaný enzým fytáza zlepšuje trávenie aminokyselín a lepšie využitie fosforu.

Na rozdiel od prežúvavcov ošípaným chýba niekoľko tráviacich enzýmov, ako je pektináza, xylanáza, celuláza, β -1,3-1,4-glukanáza a fytáza, ktoré sú nevyhnutné na hydrolýzu bunkových stien zrn, aby sa uvoľnili endocelulárne živiny do ich tráviaceho traktu. Metódou transgenézy boli vytvorené ošípané, ktoré produkovali takéto enzýmy v slinných žľazách. Zvieratá sa vyznačovali lepším využitím krmiva a nižšou koncentráciou látok v exkrementoch, ktoré znečisťujú životné prostredie.

Na rozklad vlákniny v krmných dávkach pre ďalšie monogastričné druhy (hydina) možno použiť celulólytické enzýmy. Aby sa zlepšilo trávenie neškrobových polysacharidov pridáva sa do krmiva, ktoré obsahuje vedľajšie produkty zo pšenice enzým celuláza.

3.7.2.3 Probiotiká a prebiotiká

Sú to krmne doplnky, ktoré možno použiť vo výžive hospodárskych zvierat, aby udržiavali homeostázu črevnej mikrobioty. Pridávanie probiotík do krmiva má podporovať špecifické kmene baktérií v čreve na úkor patogénnych druhov. Keďže nedochádza k interferencii s bachorovými baktériami, sú pri prežúvavcoch čoraz efektívnejšie pri liečbe chorôb tráviaceho

traktu hlavne pri mladých zvieratách. Kvasinky môžu byť použité ako probiotiká pri dospelých prežúvavcoch na zlepšenie fermentácie v bachore. Na rast probiotických organizmov sa využívajú prebiotické látky (napr. oligosacharidy), ktoré selektívne podporujú rast mikrobioty v rôznych častiach gastrointestinálneho traktu.

3.7.2.4 Ochrana bielkovín, aminokyselín a tukov

Ruminálne mikroorganizmy využívajú nebielkovinový dusík na syntézu mikrobiálnych bielkovín ktoré bachorové enzýmy rozkladajú za vzniku amoniaku. Rozložiteľné bielkoviny by mali byť chránené pred rozkladom v bachore chemickými úpravami (napr. formaldehydom) alebo fyzikálnymi úpravami, ako je tepelné spracovanie alebo extrúzia .

3.7.2.5 Odstránenie antinutričných faktorov z dostupných krmív

V rastlinných pletivách sa často nachádzajú látky, ktoré znižujú stráviteľnosť živín – antinutričné látky. Príkladom sú inhibítory proteáz ako sú tanín a kyanogén v strukovinách alebo glukozinoláty a saponín v repke. Negatívne účinky týchto látok sú výraznejšie pri neprežúvavcoch ako pri prežúvavcoch. Konvenčným šľachtením rastlín boli vytvorené odrody s minimálnou koncentráciou týchto nežiaducich zložiek rastlín. Príkladom sú odrody repky olejnej, ktoré buď neobsahujú alebo majú minimálny obsah kyseliny erukovej a glukozinolátov. Najčastejšie sa vyskytujúce antinutričné látky pri dôležitých rastlinných druhoch používaných ako krmivo pre zvieratá sa dajú výrazne znížiť alebo eliminovať kombináciou genetického inžinierstva a konvenčného šľachtenia rastlín.

3.7.2.6 Zlepšenie nutričnej hodnoty konzervovaného krmiva

Konzervácia rastlinnej hmoty vo forme **siláže** závisí od anaeróbnej fermentácie cukrov v rastlinnej hmote, ktorá je ovplyvnená schopnosťou prirodzene sa vyskytujúcich baktérií mliečneho kvasenia rýchlo rásť na dostupných živinách. Baktérie mliečneho kvasenia sú prítomné bez ohľadu na to, ako je pripravovaná silážovaná hmota. Silážne podmienky však nemusia byť vždy optimálne pre metabolizmus týchto mikroorganizmov. Kvalitu konzervovanej siláže môžu okrem množstva a typu baktérií ovplyvňovať aj iné prvky, ako je prítomnosť vo vode rozpustných sacharidov, množstvo prítomnej sušiny, pH atď. Na

urýchlenie syntézy kyseliny mliečnej sa často pridáva do silážovanej hmoty aj bakteriálna kultúra.

3.7.2.7 Antimikrobiálne peptidy

Bakteriálna rezistencia na antibiotiká a reziduá antibiotík v mäse a vajciach sú výsledkom plošného používania antibiotík v minulosti na stimuláciu rastu pri mnohých druhoch úžitkových zvierat. Najväčšou antibiotickou náhradou môžu byť antimikrobiálne peptidy. Sú to malé molekuly s molekulovou hmotnosťou menšou ako 10 kDa a počtom aminokyselín nižším ako 100. Sú prítomné pri všetkých druhoch, od rastlín a zvierat až po hmyz a vykazujú široké spektrum antibakteriálnych, antivírusových a antimykotických účinkov. Medzi dôležitú skupinu vtáčích antimikrobiálnych proteínov patria katelicidíny a defenzíny. Defenzíny sú hydrofóbne, na cystín bohaté, kationové antimikrobiálne peptidy, ktoré sú zapojené do imunologických signálnych systémov a majú schopnosť priamo zabíjať rôzne mikroorganizmy, vrátane baktérií, húb a niektorých vírusov.

3.7.2.8 Elektronický nos

Elektronický nos je súčasťou technológie, ktorá napodobňuje ľudský čuchový systém na detekciu chutí a vôní. Použitím detekčného systému (rôzne senzory ako MOS, CP, PCS, MOSFET atď.) a počítačového softvéru sa simuluje fungovanie ľudského čuchu. Analýza prchavých látok prítomných vo vzorke sa môže použiť na hodnotenie siláže, hodnotenie živočíšnych bielkovín, detekciu mykotoxínov a hodnotenie krmiva pre domáce zvieratá.

3.7.2.9 Nutrigenomika

Genetické dôsledky prijímania krmiva pri zvieratách študujú nové oblasti nutrigenomiky (vplyv výživy na funkciu génov) a nutrigenetiky (vplyv génov na výživu organizmov). Oblasti výživy, bioinformatiky, molekulárnej biológie, genomiky, funkčnej genomiky, epidemiológie a epigenomiky spolupracujú na pochopení toho, ako bioaktívne látky v krmivách a krmovinových doplnkoch menia génovú expresiu, čo následne ovplyvňuje metabolizmus zvierat. Aplikácia multidisciplinárnych technológií umožňuje skúmať komplexné vzťahy medzi krmivami a genómom. Tieto metódy zdôrazňujú význam geneticko-nutričných interakcií na

rôzne fyziologické a metabolické procesy, ktoré ovplyvňujú stráviteľnosť krmiva, zdravotný stav zvierat, výsledné živočíšne produkty a v konečnom dôsledku ekonomiku chovu.

3.8 Zoznam použitej literatúry

- ALI, A. AND CHENG, K.M., 1985. Early egg production in genetically blind (rc/rc) chickens in comparison with sighted (Rc+/rc) controls”, in Poultry Science, 64, 5, 789-94
- AIGNER, B., RENNER, S., KESSLER, B., 2010. Transgenic pigs as models for translational biomedical research. Journal of Molecular Medicine (Berlin) 88 (7), 653–664.
- AJMONE-MARSAN, P., GARCIA, J.F., LENSTRA, J.A., 2010. On the origin of cattle: How aurochs became cattle and colonized the world. Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews 19 (4), 148–157.
- ALLAN, M.F., SMITH, T.P.L., 2008. Present and future applications of DNA technologies to improve beef production. Meat Science 80 (1), 79–85.
- FIESTER, A., 2005. Ethical issues in animal cloning. Perspectives in Biology and Medicine 48 (2), 328–343.
- FISHMAN, J.A., PATIENCE, C., 2004. Xenotransplantation: Infectious risk revisited. American Journal of Transplantation 4 (9), 1383–1390.
- SAX, K., 1923. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. Genetics 8 (6), 552–560.
- WANG H., LI G., ZHONG C., MO J., SUN Y., SHI J., ZHOU R., LI Z., WU Z., LIU D. and ZHANG X., 2020. Generation of Multi-Transgenic Pigs Using PiggyBac Transposons Co-expressing Pectinase, Xylanase, Cellulase, β -1.3-1.4-Glucanase and Phytase. Front. Genet. 11:597841. doi: 10.3389/fgene.2020.597841
- WILKINSON, M.E., LI, D., GAO A., MACRAE, R.K.,ZHANG F., 2024. Phage-triggered reverse transcription assembles a toxic repetitive gene from noncoding RNA. Science, 29, DOI: 10.1126/science.adq3977
- WU, X., OUYANG, H., DUAN, B., et al., 2012. Production of cloned transgenic cow expressing omega-3 fatty acids. Transgenic Research 21 (3), 537–543.
- http://www.nifa.usda.gov/nea/animals/in_focus/reproduction_if_assisted.html
- <http://emedicine.medscape.com/article/432418-overview#a1>
- <http://www.roslin.ed.ac.uk/public-interest/dolly-the-sheep/>
- <http://www.fao.org/docrep/004/T0117E/T0117E02.htm#ch2.6>
- <http://www.fda.gov/animalveterinary/safetyhealth/animalcloning/ucm124765.htm>

Časť 4. Potravinárske biotechnológie

doc. RNDr. Michaela Havrlentová, PhD.

Potravinové biotechnológie nie sú v živote človeka novinkou. Ľudia už v dávnych časoch pozorovali, že ovocné šťavy sú schopné za istých podmienok vykvasiť na víno, z mlieka vznikajú mliečne výrobky ako syry a jogurty a fermentáciou sladu a chmeľu sa dá vyrobiť pivo. Potravinové biotechnológie sa zaoberajú využitím biotechnologických princípov v produkcii potravín a zastrešujú širokú škálu procesov využívania rôznych živých organizmov – rastliny, živočíchy, mikroorganizmy alebo akékoľvek ich časti – na vývoj nových alebo vylepšených potravinárskych produktov. Predmetom výskumu potravinových biotechnológií je napr. výroba kvasníc, produkcia mliečnych a pekárenských výrobkov, piva, vína a podobne. V dnešnej dobe rastie záujem o produkciu potravín s pridanou hodnotou, tzv. funkčné potraviny. Pre konzumenta prinášajú nielen zdroj energie a výživy, ale aj pozitívny vplyv na jednu alebo viacero funkcií tela nad rámec nutričnej funkcie. Podporujú zdravie, telesnú a psychickú pohodu a redukujú riziko vzniku chorôb.

Kapitola Potravinové biotechnológie sa v úvode venuje základným pojmom ako potraviny, výživa a samotná definícia potravinových biotechnológií. V ďalších podkapitolách postupne rozoberá vybrané nutrične významné látky - ich dôležitosť pre konzumenta, zdroje a faktory vplývajúce na ich obsah a biologické a funkčné vlastnosti a biotechnologické prístupy súvisiace s ich vyšším obsahom, prípadne úpravou fyzikálno-chemických vlastností v primárnej potravinovej surovine a technológii spracovania. Pozornosť je venovaná nutrične významným sacharidom rastlinného pôvodu, ako potravinová vlákna, arabinoxylány, β -D-glukány, škrob a rezistentný škrob, ktoré majú v ľudskom jedálničku stredoeurópskej diéty nezastupiteľné miesto. Medzi makronutrienty patria aj oleje a tuky a uvedené sú nutrične významné mastné kyseliny a ich deriváty, biosyntéza lipidov ako nástroj pre biotechnologické prístupy a genetická modifikácia rastlinných olejov pre potravinárske aplikácie. Bielkoviny zastávajú v organizme širokú paletu funkcií a podobne ako iné biomakromolekuly sú pre život esenciálne. Bioaktívne peptidy v potravinovej matrici, ich fyziológia, produkcia a využitie vo vývoji funkčných potravín sú tiež analyzované v samostatnej kapitole.

Neodmysliteľnou súčasťou ľudskej výživy sú okrem makronutrientov aj produkty sekundárneho metabolizmu, ktoré dávajú potravinám nielen sensorickú hodnotu, ale aj zdraviu prospešné vlastnosti. Pozornosť je preto venovaná polyfenolickým látkam, ako najčastejšie sa vyskytujúcej skupine sekundárnych metabolitov v rastlinách a poľnohospodárskym plodinám

ako ich zdrojom. Na produkty sekundárneho metabolizmu je napojená oblasť nutraceutík, ktorá sa v dnešnej dobe enormne rozvíja a tvorí akési prepojenie medzi potravinovým a farmaceutickým priemyslom s obrovským potenciálom pre biotechnológie.

Problematika potravinových biotechnológií je veľmi široká a dynamicky sa rozvíjajúca oblasť výskumu a vývoja. Nie je možné v predmetnej kapitole obsiahnuť všetko, ale cieľom je priniesť čitateľovi základné informácie, súvislosti a potenciál biotechnológií v oblasti ľudskej výživy a čiastočne zdravia. Verím, že text čitateľa zaujme a podporí ho v hlbšom individuálnom štúdiu toho, čo je súčasťou našej stravy a čo do výraznej miery vplýva aj na naše zdravie a duševnú pohodu a aké široké možnosti potravinárske biotechnológie ponúkajú.

4 Potravinárske biotechnológie

4.1 Úvod do problematiky

4.1.1 Pojem potravina a funkcie potravín

Ľudská **výživa** je súbor procesov, ktorými ľudský organizmus prijíma a zužitkúva v jedle obsiahnuté látky nevyhnutné na zabezpečenie nepretržitého energetického výdaja, na stavbu a obnovu telesných tkanív a na zabezpečovanie a reguláciu životne dôležitých procesov a svojich fyziologických funkcií. **Jedlo** je jednou zo základných životných potrieb živých organizmov. **Živiny** v jedle obsiahnuté poskytujú energiu, ktorú organizmus potrebuje na zabezpečenie funkčného stavu.

Potrava predstavuje všetky suroviny, ktoré slúžia na výživu obyvateľstva. Produkty poľnohospodárskej výroby, prírodné (nepestované) rastliny a voľne žijúce zvieratá, môžu slúžiť ako **potravinárske suroviny** a tým priamo alebo nepriamo ako potrava. Ak potrava slúži na výživu ľudí, hovoríme o **požívatinách**, pokiaľ slúži na výživu zvierat, označuje sa ako **krmivo**. Požívatiny delíme na potraviny, pochutiny a nápoje. **Potraviny** sú látky určené na výživu v nezmenenom, upravenom alebo spracovanom stave. **Pochutiny** obsahujú relatívne málo využiteľných živín, ale majú vysokú senzorickú hodnotu (korenie, byliny, soľ) alebo povzbudivé účinky (káva, kakao, čaj). **Nápoje** sú produkty obsahujúce viac ako 80 % vody a primárne uspokojujú organizmu fyziologickú potrebu vody.

Energia v potrave sa meria v jednotkách nazývaných kilo **kalórie** (Kcal), prípadne kilo **jouly** (KJ). Jedna Kcal predstavuje 4185 KJ a naopak, jeden joule je 0,239 kalórie. Obe jednotky vyjadrujú určité množstvo energie, pričom kalórie predstavujú historickú jednotku dnes nahradenou joulami. Potraviny rozdeľujeme na nízkokalorické (ovocie, zelenina, celozrnné pečivo a podobne) a vysokokalorické (potraviny s vysokým obsahom tukov, sladké pochutiny a podobne).

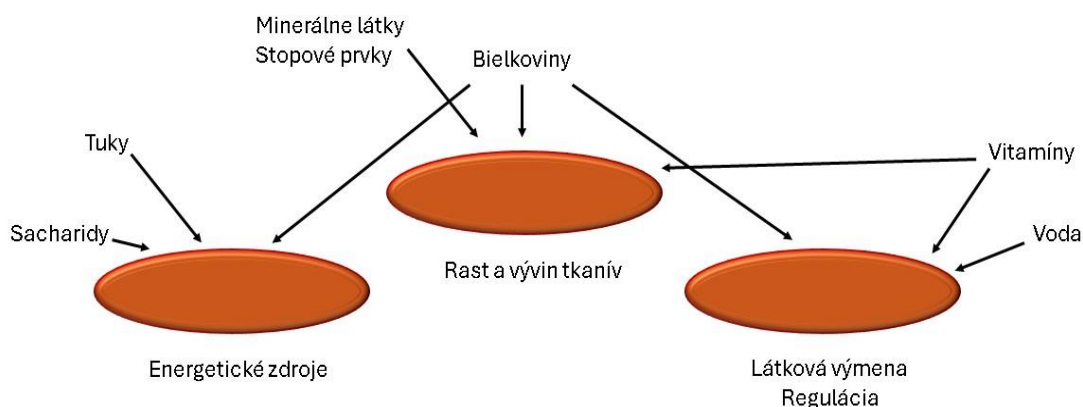
Vek, pohlavie, hmotnosť, výška a úroveň aktivity určujú počet kalórií, ktoré človek potrebuje každý deň. V závislosti od veku, pohlavia a úrovne aktivity sa odporúčaný denný príjem kalórií pre dieťa vo veku 11 až 14 rokov môže pohybovať od 1 600 do 2 600 kJ a pri dospelých od 1 800 do približne 3 000 kJ. Vo všeobecnosti najmenej kalórií potrebujú ženy so sedavým zamestnaním a najviac muži s fyzicky náročnou prácou (Tabuľka 4.1).

Tabuľka 4.1: Denný odporúčaný príjem kalórií v závislosti od veku, pohlavia a aktivity (Zdroj: autor).

Vek v rokoch	Pohlavie	Neaktívny	Stredne aktívny	Aktívny
2–3	Muž alebo žena	1000	1000	1000
4–8	Muž	1200–1400	1400–1600	1600–2000
	Žena	1200–1400	1400–1600	1400–1800
9–13	Muž	1600–2000	1800–2200	2000–2600
	Žena	1400–1600	1600–2000	1800–2200
14–18	Muž	2000–2400	2400–2800	2800–3200
	Žena	1800	2000	2400
19–30	Muž	2400–2600	2600–2800	3000
	Žena	2000	2000–2200	2400
31–50	Muž	2200–2400	2400–2600	2800–3000
	Žena	1800	2000	2200
51 a viac	Muž	2000–2200	2200–2400	2400–2800
	Žena	1600	1800	2000–2200

4.1.2 Makro- a mikroelementy vo výžive

Živiny rozdeľujeme do šiestich hlavných skupín: sacharidy, tuky, bielkoviny, minerály, vitamíny a voda. Väčšina potravín obsahuje všetky alebo väčšinu skupín živín v rôznych množstvách a všetky živiny majú svoj význam v ľudskom organizme (Obrázok 4.1).



Obrázok 4.1: Základné zložky výživy a ich základné funkcie v ľudskom organizme (Zdroj: autor).

Sacharidy (cukry) sú pre organizmus stavebným materiálom a zdrojom energie, pričom podstatná časť sacharidov pochádza z konzumácie rastlinnej stravy. Medzi sacharidy patria škroby nachádzajúce sa v obilných zrnách a rastlinách, ako sú zemiaky a kukurica. Ovocie, zelenina a mlieko a mliečne výrobky sú tiež zdrojom sacharidov. Cukrová repa a cukrová trstina sa pestujú špeciálne pre vysoký obsah sacharidov. Mnohé zo sacharidov, ktoré sú súčasťou ľudskej výživy, sú spracované na produkty, ako je múka a výrobky z nej (chlieb, cestoviny, koláče, keksíky a podobne) a kukuričný sirup.

Tuky (lipidy) poskytujú v priemere 2-krát viac energie ako sacharidy. Okrem výživovej hodnoty majú v organizme aj funkciu mechanickú, endokrinnú a ochrannú. Bežné tuky zahŕňajú rastlinné oleje, ako je repkový alebo slnečnicový, ale aj makový, tekvicový, olivový, mandľový a podobne. Používajú sa na tepelnú úpravu pokrmov, ale aj v surovom stave na dochutenie potravín. Medzi tuky, ktoré pochádzajú zo živočíšnych zdrojov, patrí maslo a masť. Vajcia, mlieko, syr, mäso, hydina a ryby tiež obsahujú vysoké množstvo tukov.

Bielkoviny (proteíny) sú hlavnými zložkami tkanív v organizme. Pomáhajú udržiavať zdravú kožu, kosti, svaly a obehový systém. Bielkoviny tiež pomáhajú regulovať telesné procesy, vrátane transportu kyslíka a živín do buniek a von, zrážanie krvi a tvorbu protilátok. Živočíšne produkty, ako je hovädzie mäso, ryby, hydina, vajcia a mliečne výrobky, majú vysoký obsah bielkovín. Obilniny, orechy a niektoré druhy strukovín patria medzi potraviny rastlinného pôvodu bohaté na bielkoviny.

Sacharidy, tuky a bielkoviny patria medzi **primárne metabolity**. Pre správne fungovanie organizmu sú veľmi dôležité, organizmus ich produkuje vo veľkých množstvách a vo veľkých množstvách ich aj potrebuje prijímať. Preto sa tieto zložky výživy nazývajú aj **makroživinami** (makroelementami).

Minerály a vitamíny sa označujú ako **mikroživiny** (mikroelementy), pretože sú potrebné vo veľmi malých množstvách v porovnaní so sacharidmi, tukmi a bielkovinami. Minerály poskytujú telu stavebné materiály a pomáhajú regulovať jeho činnosť, podobne ako bielkoviny. Napr. vápnik a fosfor sú zodpovedné za pevné kosti a zuby, železo prispieva k zdravej krvi, jód pomáha udržiavať štítnu žľazu v správnej činnosti a horčík je zodpovedný za správne fungovanie svalov a nervového systému.

Vitamíny pomáhajú telu plne využívať ostatné živiny tým, že sa podieľajú na priebehu chemických reakcií, vďaka ktorým tieto živiny v tele fungujú. Napríklad, vitamín B1 alebo tiamín pomáha regulovať uvoľňovanie energie zo sacharidov, podporuje zdravú chuť do jedla a napomáha fungovaniu nervového systému. Vitamín D pomáha pri raste a udržiavaní zdravých

kostí. Vitamín C je veľmi účinný antioxidant a zapája sa do tvorby hormónov v tele a znižovania hladiny cholesterolu v krvnom sére.

Medzi ďalšie nevyhnutné látky pre zdravie organizmu patrí **voda** a **kyslík**. Niektorí vedci zaraďujú vodu do zoznamu základných živín. Voda tvorí viac ako polovicu hmotnosti ľudského tela. Podieľa sa na väčšine telesných procesov, ako je regulácia teploty, transport živín do buniek a odstraňovanie odpadových látok z buniek. Kyslík nie je živina, pretože sa vdychuje a nekonzumuje ako iné potraviny, ale je nevyhnutný pre život. Umožňuje uvoľňovanie energie z potravy vo vnútri tela.

Zdravá strava obsahuje vyváženú zmes rôznych potravín, ktoré spolu poskytujú všetky základné živiny. **Podvýživa** je nedostatok vyvázenej stravy. Príliš málo živín, príliš veľa živín alebo nerovnováha živín (napríklad príliš veľa jednoduchých sacharidov a nedostatok ovocia a zeleniny v strave) môžu viesť k podvýžive. K podvýžive dochádza, keď telo nedostáva dostatok potravy na uspokojenie svojich výživových a energetických potrieb. Často sa podvýživa spája s hladom. Mnohé choroby a dokonca smrť sú spôsobené nedostatkom potravy. Smrť v dôsledku nedostatku potravy sa nazýva **hladovanie**.

Aby ľudia získali správne množstvo a kvalitu živín, musia si vyberať z rôznych druhov potravín: obilné zrná, ovocie a zelenina, strukoviny, mäso, hydina, ryby a vajcia, a mlieko a mliečne výrobky. **Potravinová pyramída** načrtáva navrhované množstvo týchto rôznych druhov potravín, ktoré by ľudia mali jesť každý deň (Obrázok 4.2).



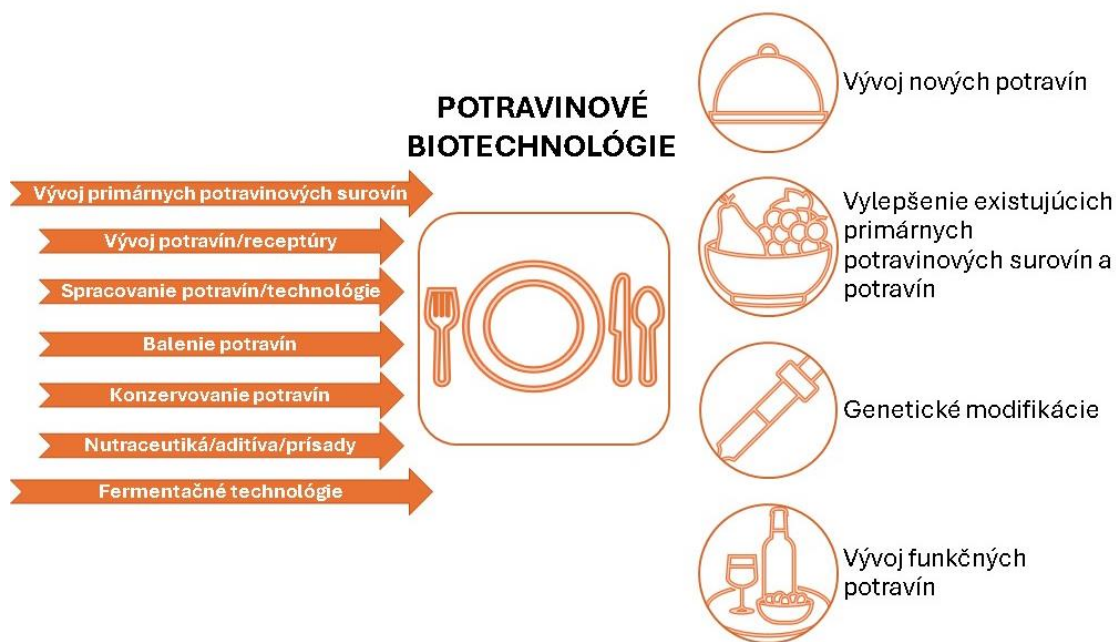
Obrázok 4.2: Potravinová pyramída prezentujúca približné rozloženie rôznych druhov potravín v dennom jedálničku zdravého človeka (Zdroj: autor).

4.1.3 Definovanie pojmu potravinové biotechnológie

Potravinové biotechnológie sa zaoberajú využitím biotechnologických princípov v produkcii potravín (napr. výroba kvasníc, mliečnych produktov, piva a podobne) a zastrešujú širokú škálu procesov využívania rôznych živých organizmov – rastliny, živočíchy, mikroorganizmy alebo akékoľvek ich časti – na vývoj nových alebo vylepšených potravinárskych produktov.

Potravinové biotechnológie nie sú v živote človeka novinkou. Už v dávnych časoch ľudia pozorovali, že ovocné šťavy sú schopné vykvasiť na víno, z mlieka vznikajú mliečne výrobky ako syry a jogurty a pivo sa dá vyrobiť fermentáciou sladu a chmeľu. K odhaleniu princípu, na ktorom sú fermentácie založené, prispel už v polovici 19. storočia francúzsky biológ a chemik Louis Pasteur, ktorý zistil, že pôvodcom kvasenia sú mikroorganizmy. Následne, začiatkom 20. storočia nemecký chemik Eduard Buchner objavil, že k procesu fermentácie stačia iba enzýmy daných mikroorganizmov, za čo v roku 1907 získal Nobelovu cenu za chémiu. Ďalším historickým medzníkom v rozvoji potravinových biotechnológií boli 60-te roky 19. storočia, kedy Johann Gregor Mendel objasnil genetické princípy prenosu vlastností z rodičov na svojich potomkov. Tieto princípy boli použité na šľachtenie hybridnej kukurice, pšenice a mnohých ďalších primárnych potravinových surovín s požadovanými vlastnosťami. Takéto šľachtiteľské prístupy priniesli počas 20. storočia vysoké zisky v produktivite plodín a viedli k rozvoju moderných poľnohospodárskych postupov.

Dnes je primárnym cieľom potravinových biotechnológií poskytnúť bohatšie, lacnejšie a výživnejšie zásoby potravín, aby sa uspokojili potreby rastúcej globálnej populácie. Potravinársky biotechnologický priemysel zahŕňa rôzne oblasti, od spracovania potravín až po komerčné balenie a konzerváciu potravín (Obrázok 4.3). Nástroje potravinových biotechnológií predstavujú **tradičné šľachtiteľské techniky**, ako je kríženie, ale aj modernejšie **metódy genetického inžinierstva** na úpravu génov primárnych potravinových surovín zo skupín rastlín, živočíchov a mikroorganizmov, ktoré získajú takto požadované nutričné, výrobné a marketingové vlastnosti. Potravinové biotechnológie znamenajú aj nutričnú genomiku a **vývoj funkčných potravín**. Aplikujú moderné biotechnologické techniky aj na výrobu a spracovanie potravinárskych prísad. Výber vhodných a vhodne upravených mikroorganizmov na použitie v priemyselných procesoch je tiež kľúčovou témou v potravinárskych biotechnológiách, pretože mikrobiálne fermentačné procesy sa využívajú na výrobu nielen inovatívnych potravín, ale aj enzýmov a prísad pre potravinársky priemysel.



Obrázok 4.3: Hlavné oblasti záujmu potravinových biotechnológií a hlavné ciele, ktoré v súvislosti s potravinami sledujú (Zdroj: autor).

Použitím biotechnologických prístupov môžu byť nejedlé a rýchlo sa kaziace potraviny pozmenené na bezpečné, chutné potraviny s predĺženou trvanlivosťou a s výrazne zlepšenou kvalitou (napr. lepšie nutričné hodnoty, sensorické a fyzikálno-chemické vlastnosti). Biotechnológie môžu tiež zlepšiť konzistenciu, požívateľnosť a trvanlivosť potravín inhibíciou rastu nežiaducich mikroorganizmov uvoľňujúcich toxíny, ktoré môžu kontaminovať potraviny, alebo sú v nich prirodzene prítomné, a produkovať antimikrobiálne látky proti nežiaducim hnilobným mikróbom. Okrem toho, **fermentačné procesy** zvyšujú nutričnú a energetickú hodnotu potravín biosyntézou potrebných aminokyselín, vitamínov, prísad, dochucovadiel potravín a konzervačných látok, ako aj zlepšením stráviteľnosti vlákniny a bielkovín.

Na základe použitých techník je rozdelenie potravinových biotechnológií na staré a nové. **Staršie techniky** zahŕňajú konvenčné kríženie týkajúce sa náhodnej rekombinácie génov, kedy prostredníctvom pohlavného rozmnožovania vzniká nový organizmus s vylepšenými vlastnosťami. V dôsledku náhodnosti prenosu génov trvá často aj 10 rokov, kým sa požadovaný znak prejaví a stabilizuje v populácii. Príkladmi takýchto vlastností sú zlepšená úroda plodín, estetické vlastnosti, zvýšená tolerancia voči stresovým faktorom, ako napr. nízka teplota, sucho, choroby, hmyz. **Nové, moderné techniky** potravinových biotechnológií zahŕňajú genetické inžinierstvo, kde dochádza k cieľnému prenosu konkrétnej, požadovanej genetickej informácie z jedného organizmu na iný. Tieto techniky sú oveľa presnejšie a nová vlastnosť sa prejaví

v generácii rýchlejšie. Príkladom je obohatenie ovocia alebo zeleniny o nejakú nutrične alebo funkčne hodnotnú látku (napr. odrody pšenice letnej pšenica neobsahujúce v zrnách lepok, hľuzy ľuľka zemiakového so zvýšeným obsahom bielkovín, šalát listový s vyšším obsahom železa a podobne).

4.2 Nutrične významné sacharidy

4.2.1 Potravinová vláknina

Jednou z príčin nepriaznivého zdravotného stavu ľudskej populácie je nesprávna výživa, ktorá sa 30 až 70 % podieľa na vzniku civilizačných ochorení. Preto je cieľom rôznych programov zlepšiť zdravotný stav obyvateľstva a prispieť k lepšej prevencii chorôb. Jednou z možností je v dostatočnej miere konzumovať potravinovú vlákninu. Okrem priaznivého vplyvu na ochorenia tráviaceho ústrojenstva, akými sú rakovina hrubého čreva a konečníka, zápal slepého čreva, žlčníkové problémy, poukazujú mnohé svetové štúdie na klady vyššieho príjmu vlákniny do organizmu aj pri obmedzení výskytu rôznych srdcovo-cievnych ochorení, zápalových stavov, chronickej zápchy, metabolických ochorení ako cukrovka a podobne. Vlákninu v rastlinách však sprevádza množstvo látok priaznivých pre ľudské zdravie (napr. antioxidanty) a ich účinok je niekedy neľahké oddeliť od účinku vlákniny. Na druhej strane, vláknina môže mať pre organizmus aj negatívne dopady, kedy nadmerná konzumácia (vo všeobecnosti viac ako 60 g.deň⁻¹) zhoršuje trávenie a sťažuje vstrebávanie tukov, cholesterolu, lipofilných vitamínov a niektorých minerálnych prvkov. Denný príjem vlákniny dospelého človeka by sa mal pohybovať v rozmedzí 20–40 g a vhodná je konzumácia strukovín, ovocia, zeleniny, obilnín a celozrnných výrobkov, orechov a semien.

4.2.1.1 Rozpustná a nerozpustná potravinová vláknina – definícia, vlastnosti, zdroje

Pojem vláknina má svoju dlhú a bohatú históriu. Prvýkrát bola diétna vláknina označená ako súbor nestráviteľných zložiek izolovaných z bunkových stien rastlín v roku 1953. V súčasnosti je **potravinová vláknina** definovaná ako jedlý rastlinný a živočíšny materiál, ktorý nie je hydrolyzovaný endogénnymi enzýmami ľudskeho tráviaceho systému a je stanovovaný

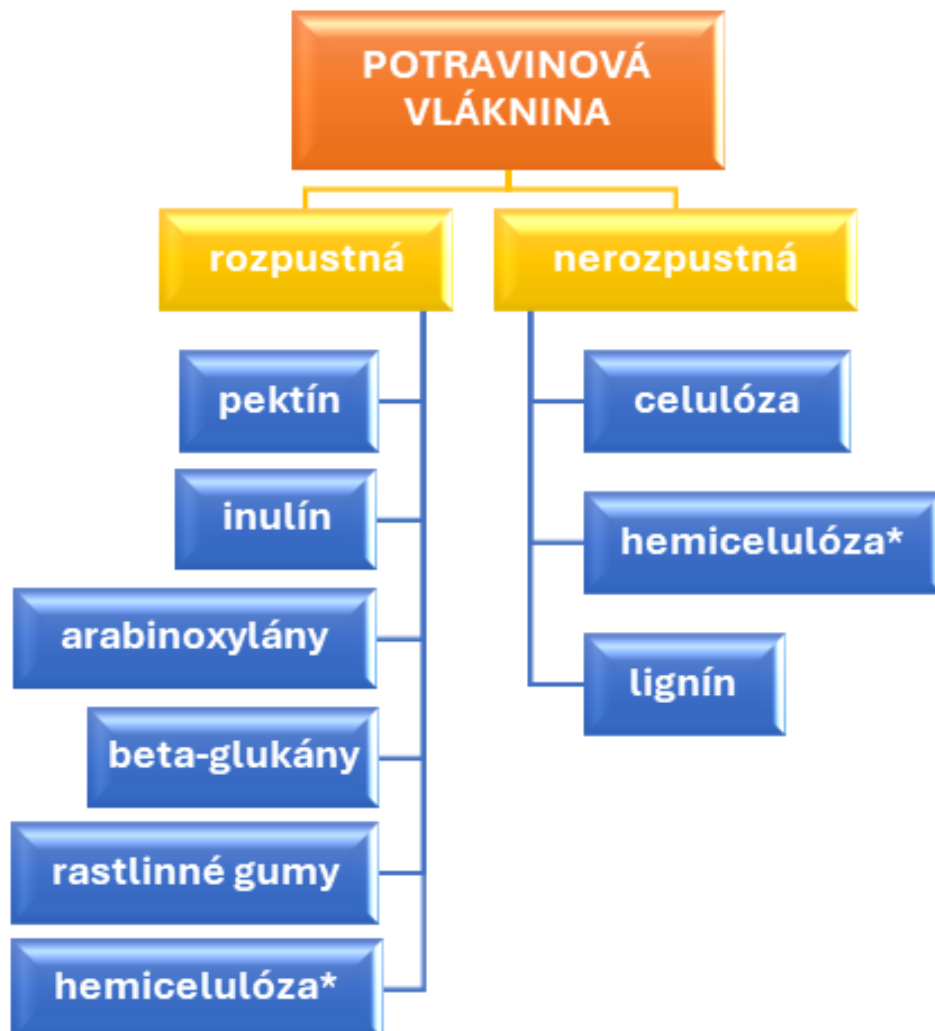
akceptovateľnými metódami. Potravinová vláknina sa skladá zo sacharidových polymérov so stupňom polymerizácie 3 a viac. Rovnako môže obsahovať frakcie lignínu a iné zložky (fenoly, fytáty, vosky, saponíny, fytosteroly, kutín a pod.), ak sú naviazané na polysacharidy rastlinných bunkových stien a ak sú schopné stanovenia vyhovujúcou analytickou metódou pre potravinovú vlákninu. V definícii sú zahrnuté sacharidové polyméry detekovateľné (fyzikálnymi, enzymatickými, príp. chemickými metódami) alebo syntetické (fruktooligosacharidy, polyfruktóza, oligofruktóza a ďalšie získané výskumom). Okrem toho, potravinová vláknina nie je schopná trávenia a absorpcie v tenkom čreve a má najmenej jednu z nasledujúcich vlastností: i) zvyšuje tvorbu stolice, ii) stimuluje fermentáciu v hrubom čreve, iii) redukuje hladinu cholesterolu a iv) redukuje hladinu krvného cukru a hladinu inzulínu. Potravinová vláknina patrí medzi sacharidy, v závislosti od štruktúry poskytuje veľmi malé množstvo energie (cca 2 kcal g⁻¹, t. j. 8 kJ.g⁻¹) a v ľudskom organizme má nasledovné funkcie: i) zdroj energie a preto sa zaraďuje k základným živinám, ii) základné stavebné jednotky mnohých buniek, chránia bunky pred pôsobením vonkajších vplyvov a iii) biologicky aktívne látky alebo zložky biologicky aktívnych látok.

Podľa rozpustnosti vo vode delíme vlákninu na rozpustnú a nerozpustnú (Obrázok 4.4). **Rozpustná forma**, ktorú tvoria β-D-glukány, pektín, inulín, arabinoxylány a rastlinné gummy, je fermentovaná mikroorganizmami hrubého čreva. Napučiava, teda viaže vodu. Pozitívne ovplyvňuje hladinu glukózy v krvi tým, že v tenkom čreve spomaľuje jej vstrebávanie. Vláknina sa v čreve viaže so žľočou, následne je vylučovaná stolicou a pečeň úbytok žlče nahrádza tvorbou žľočových kyselín z cholesterolu. To znamená, že na metabolizmus tukov vplýva vláknina znížením hladiny krvného tuku, najmä cholesterolu. Vhodnými zdrojmi rozpustnej vlákniny sú strukoviny, ovos, jačmeň, jablká, hrušky, citrusové ovocie, banány, zemiaky, mrkva a kapusta.

Nerozpustná forma vlákniny je reprezentovaná celulórou, hemicelulórou, rezistentným škrobom a lignínom. Má schopnosť viazať vodu, čím zmäkčuje stolicu, zvyšuje jej objem a urýchľuje vyprázdňovanie nestráviteľných látok z tela. Prechádza hrubým črevom takmer bez zmeny. Má nízku výživovú hodnotu, ale pre mikroorganizmy, ktoré sa v čreve nachádzajú, je dobrou živnou pôdou. Tie z nej uvoľňujú kyselinu mliečnu, voľné mastné kyseliny (MK) s krátkym reťazcom a plyny, čo pozitívne pôsobí na pohyblivosť čreva a zadržiavanie vody. Význam tejto vlákniny je predovšetkým v prevencii rakoviny hrubého čreva a konečníka. Vhodnými zdrojmi nerozpustnej vlákniny sú pšeničné a kukuričné otruby, hnedá ryža, ovocie a zelenina so šupkou, oriešky a ľanové semená.

Jednou z najdôležitejších fyzikálnych charakteristík vlákniny je **viskozita**. Polysacharidy a ich schopnosť viskozity, príp. tvorba gélu, sú spájané so schopnosťou zmiernovať intoleranciu organizmu na glukózu a cholesterol. Na druhej strane, zvýšenie črevnej viskozity spôsobené rozpustnou vlákninou znižuje aktivitu niektorých tráviacich enzýmov, napr. proteáz a lipáz.

Vláknina je považovaná za **prebiotikum**, teda zložku potravín, ktorá nie je hydrolyzovaná enzýmami tráviaceho traktu človeka. Priaznivý vplyv na zdravie majú prebiotiká tým, že selektívne stimulujú rast a/alebo aktivitu probiotických mikroorganizmov v hrubom čreve a ďalších mikroorganizmov prirodzene sa vyskytujúcich v tráviacom trakte. Oligosacharidy rafinózovej rady, oligofruktóza a inulín, majú významný podporný účinok na počet bifidobaktérií, ktoré sú považované za zdraviu prospešné baktérie v ľudskom organizme.



Obrázok 4.4: Rozdelenie potravinovej vlákniny. *Hemicelulózy sú necelulóзовé polysacharidy a nachádzajú sa v zdrojoch v rozpustnej a nerozpustnej forme (Zdroj: autor).

4.2.1.2 Funkčné vlastnosti zložiek potravinovej vlákniny, aplikácie v potravinách

Okrem uvedených fyziologických vlastností má potravinová vláknina aj vysoko cenený **technologický význam**. Priaznivo ovplyvňuje vzhľad a konzistenciu potravín. Významné sú jej vlastnosti želatinujúce, zahusťujúce a emulgačné. Je dokázané, že prídavok vlákniny do chlebového cesta zlepšuje jeho nutričné hodnoty a súčasne kladne ovplyvňuje reologické vlastnosti cesta. V chlebovom ceste so zvýšeným prídavkom vlákniny dochádza k zvýšenej absorpcii vody, zlepšeniu miešania a zníženiu lepivosti a rozpínavosti. Prídavok vlákniny tiež predlžuje trvanlivosť výrobku. V konečnom dôsledku zlepšuje kvalitatívne a senzorické vlastnosti chleba.

V súčasnosti nastupuje vo svete nový trend – zvýšiť produkciu novej generácie zdravších potravín, ktoré budú mať zároveň dokonalé senzorické vlastnosti. To predstavuje prípravu tzv. funkčných potravín. **Funkčná potravina** je definovaná ako potravina, prirodzená alebo spracovaná, ktorá obsahuje, ako doplnok k jej nutričným komponentom, zložky prospešné dobrému zdraviu, fyzickej schopnosti a duševnej pohody človeka. Takýto druh potravy môže byť obohatený fyziologicky funkčnými prísadami ako napr. vlákninou, príp. jej zložkami, ktoré predstavujú β -D-glukány, inulín, pektín atď. Prídavok vlákniny do výrobkov je dôležitý a dnes má dve príčiny: zvýšiť príjem vlákniny do organizmu a znížiť kalorické zaťaženie pekárenských produktov.

Na technologické vlastnosti potravinovej vlákniny vplyvajú spôsoby spracovania vstupnej suroviny. Napr. mechanické spracovanie, ako je lúpanie a mletie obilnín na výrobu múky, narúša štruktúru bunkovej steny a mení veľkosť častíc. Napr. pšeničné otruby sú tvorené oplodím a aleurónovou vrstvou, tvoria približne 10 % celkovej hmotnosti pšenice pomletej na múku a vyznačujú sa vysokým obsahom nerozpustnej lignifikovanej vlákniny. Tepelným spracovaním (pečenie, opekanie, praženie a podobne) sa mení chemická štruktúra niektorých zložiek potravinovej vlákniny a menia sa ich fyzikálne a chemické vlastnosti. Tepelným pôsobením napr. dochádza v rastlinných zdrojoch vlákniny k separácii buniek, rozkladu strednej lamely, rozkladu pektínov a tvorbe interakcií medzi zložkami a celkovo sa znižuje obsah nerozpustnej vlákniny a zvyšuje podiel rozpustnej vlákniny.

Medzi významné potravinárske prísady s vysokým obsahom potravinovej vlákniny patria kukuričné otruby. Pridávajú sa do cereálnych raňajkových zmesí, pečiva, chrumiek a iných výrobkov. Podobne aj ovsené otruby, sójové otruby zo šupiek sójových bôbov a vláknina

získaná zo strukovín (najmä hrachová a šošovicová) sú vhodnými surovinami pre potravinársky priemysel. Na zvýšenie podielu vlákniny sa využívajú celozrnné múky, najmä pšeničné, ale aj ovos a jačmeň. Technologický výskum sa zaoberá možnosťou aplikácie vlákninových preparátov nielen v pekárenských produktoch, ale aj v mäsových a hydinových výrobkoch, hlavne za účelom zníženia obsahu tuku. Na vlákninové preparáty možno výhodne využiť aj vedľajšie produkty pri spracovaní ovocia a zeleniny, napr. šupky z jablák a hrušiek, sušenú pomarančovú dreň a iné.

Komerčne sú dostupné viaceré preparáty nerozpustnej vlákniny na báze celulózy, predovšetkým prášková a mikrokryštalická celulóza. Iné celulózové deriváty, napr. metylcelulóza, slúžia ako zdroj rozpustnej vlákniny. Na trhu sú prítomné i výživové doplnky z hl'úz slnečnice hl'uznatej (*Helianthus tuberosus* L.) alebo koreňa čakanky obyčajnej (*Cichorium intybus* L.), ktoré slúžia ako zdroj inulínu.

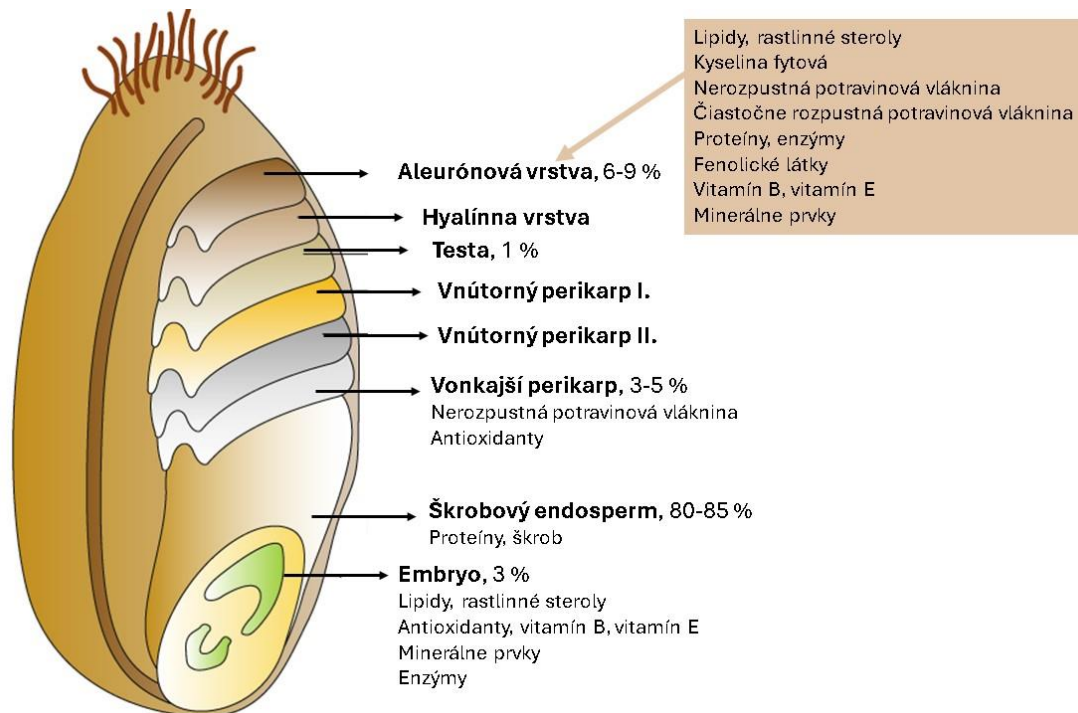
Predmetom záujmu sa v ostatnej dobe stávajú aj **nutraceutiká** (viac v Kapitole 4.6). Často sú to potraviny s prídavkom prebiotických kultúr a vláknina (hlavne rozpustná – inulín, fruktózové oligosacharidy), v nich obsiahnutá, funguje ako prebiotikum, pretože tvorí časť živnej pôdy pre probioticky pôsobiace mikroorganizmy s priaznivým účinkom na zdravie. Inulín sa používa aj ako náhrada tuku v niektorých výrobkoch s jeho vysokým obsahom, ako sú margaríny, syry s vysokým podielom tukov a jogurty z plnotučného mlieka.

Strava niektorých starších ľudí, zvlášť tých, ktorí majú problémy s hryzením, býva chudobná na vlákninu. Potravinárski odborníci stoja pred úlohou vyvinúť sortiment ľahko žuvacích výrobkov obohatených o vlákninu. Vo výrobkoch určených starším ľuďom sa môže veľmi pozitívne uplatniť predovšetkým pektín, ktorý má dobrú vstrebateľnosť a stráviteľnosť v organizme a znižuje koncentráciu cholesterolu v krvi.

Prínos biotechnológií pri potravinovej vláknine je v manipulácii so zložkami, ktoré ju tvoria v obilninách. **Obilniny** predstavujú dôležitý zdroj prospešných látok pre ľudské zdravie, ako sú makro- a mikroživiny, vitamíny a bioaktívne molekuly (Obrázok 4.5). Práve konzumácia celozrnných produktov je spojená s významnými zdravotnými výhodami v dôsledku zvýšeného prísunu vlákniny do organizmu.

Spotreba celozrnných potravín je však v porovnaní s rafinovanejšími výrobkami stále podstatne nižšia. Preto sú snahy zvýšiť zložky potravinovej vlákniny vo vnútornej časti obilného zrna, v endosperme, ktorý predstavuje hlavnú časť zo zrna získanej múky. Hlavnými zložkami obilnej vlákniny sú **arabinoxylány**, **β-D-glukány** a **rezistentný škrob**. Tieto tri zložky sú v zrnách rôzne lokalizované, avšak v endosperme sú zastúpené všetky. Arabinoxylány a glukány patria medzi neškrobové polysacharidy a sú v bunkových stenách. Rezistentný škrob

je škrobová frakcia v endosperme. Keďže chemická štruktúra zložiek vlákniny ovplyvňuje ich fyzikálno-chemické vlastnosti a následne funkčné a biologické účinky, identifikácia kľúčových prvkov zapojených do ich metabolizmu môže viesť k zlepšeniu ich funkcie v potravine a aj ľudskom zdraví. V nasledujúcich kapitolách venovaných jednotlivým sacharidom budú tieto tri nutrične významné zložky vlákniny rozobrané bližšie.



Obrázok 4.5: Zloženie zrna pšenice s približným zastúpením jednotlivých zložiek makro a mikroživín (Zdroj: autor).

V súčasnej ére úpravy genómu novými genómovými technikami ponúkajú biotechnológie účinné zásahy do genómov a teda nové vlastnosti potravín bez vnášania cudzej DNA. Potenciál tohto prístupu je takmer neobmedzený a existujú už aj úspešné dôkazy. Pôvodné zacielenie biotechnológií na jeden gén bolo rýchlo prekonané manipuláciou s viacerými lokusmi prostredníctvom polycistronickej mRNA, čo umožňuje spojiť viacero znakov naraz. V súčasnosti je možné gény upraviť zacielením na konkrétnu aminokyselinu alebo celú proteínovú sekvenciu. CRISPR/Cas9 je nová prevratná metóda molekulárnej biológie a genetiky, pomocou ktorej možno veľmi presne „opravovať“ genetickú informáciu zapísanú v molekule DNA alebo RNA. Aj keď má táto metóda revolučné perspektívy, jej rozvoju a úspešnej aplikácii v poslednom desaťročí výrazne napomáhajú technológie vysokovýkonného sekvenovania (napr. NGS). V rastlinách ide väčšinou o komplexné

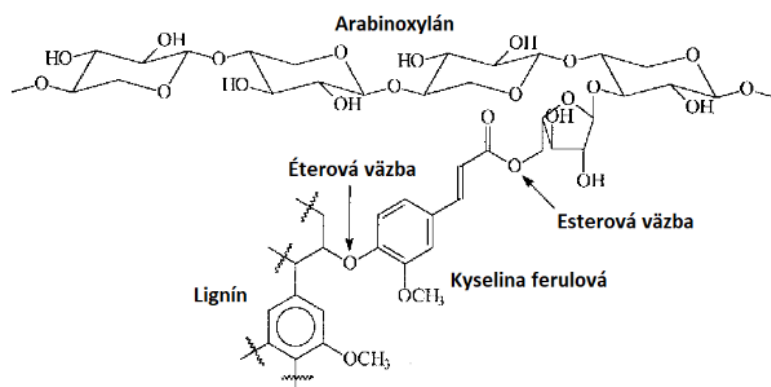
kvantitatívne znaky, ktoré sa fenotypovo prejavujú, a založené sú na spolupráci viacerých lokusov v genóme. Viac o využití týchto techník v získavaní rastlín s požadovanými vlastnosťami, o mapovacom krížení zameranom na identifikáciu kvantitatívnych lokusov (QTL), indukovanej mutagenéze, markermi podporenej selekcii a podobne je popísané v časti venovanej rastlinným biotechnológiám.

4.2.2 Arabinoxylány

4.2.2.1 Základná charakteristika

Arabinoxylány predstavujú hlavné neškrobové polysacharidy prítomné v obilninách. V endosperme obilnín (pšenica, jačmeň, ryža, ovos) tvoria približne 1,2 až 1,8 %, pričom endosperm raži ich obsahuje 3,5 až 4,25 %. V otrubách je ich obsah vyšší a pohybuje sa v rozmedzí 5,2 % (ovos) až 16,47 % (pšenica). V kukurici tvoria arabinoxylány až 26 %.

Z hľadiska chemickej štruktúry patria arabinoxylány k heteropolysacharidom, pričom základom je lineárny reťazec β -(1-4)-D-xylopyranózových jednotiek, ktoré môžu byť substituované α -L-arabinofuranózou v jednej z monosubstitúcií O-2 alebo O-3 alebo v disubstitúcii. Menšie zložky arabinoxylánov sú hydroxyškoricové kyseliny, najmä kyseliny ferulová alebo kumarová, ktoré sú viazané vo forme esteru na O-5 polohe arabinózy (Obrázok 4.6). Tieto kyseliny sú najrozšírenejšie fenolové kyseliny v obilninách a majú kľúčovú úlohu pri regulácii vlastností bunkovej steny, ako sú bunkové interakcie a rigidita. Ich prítomnosť podporuje zosieťovanie s inými esterami MK alebo lignínom a vplyva na štruktúru rastlinnej bunkovej steny a následné využitie v nej obsiahnutých zložiek.



Obrázok 4.6: Chemická štruktúra arabinoxylánu s lokalizáciou väzieb na lignín a kyselinu ferulovú (Zdroj: autor).

Na základe rozpustnosti a extrahovateľnosti môžeme arabinoxylány a glukuronoarabinoxylány rozdeliť na vo vode extrahovateľné a neextrahovateľné, ktoré sa extrahujú alkalicky alebo enzýmovou degradáciou. Rôzne extrahovateľné arabinoxylány majú aj rôzne fyzikálno-chemické vlastnosti. V čiastočne zdrevnatených pletivách (napr. v pšeničných otrubách) sa nachádzajú vodou neextrahovateľné arabinoxylány zložené predovšetkým z arabinózy, xylózy a metylovanej kyseliny glukurónovej (glukuronoarabinoxylány, tzv. arabská guma). V endosperme pletív sú prítomné vodou extrahovateľné a vodou neextrahovateľné arabinoxylány. V pšeničnom endosperme predstavujú percentuálny podiel 25–30 % vo vode extrahovateľné arabinoxylány a zvyšok tvorí forma vodou neextrahovateľná. Celkový obsah arabinoxylánov, podiel vodou extrahovateľných a neextrahovateľných arabinoxylánov a ich molekulová hmotnosť (Mw), ako aj štruktúra arabinoxylánov vykazujú vysokú vnútro- a medzidruhovú variabilitu a rozdiely sú aj medzi rôznymi vrstvami zrna. Najmä arabinoxylány vonkajších vrstiev zrna, perikarpu a aleurónu, kde materiál bunkovej steny tvorí až 40–60 % suchej hmotnosti, vykazujú zložitejšiu štruktúru s viacerými substituentami. Estericky viazaná kyselina kumarová sa nezistila v čistom škrobovom pletive endospermu pšeničného zrna.

Arabinoxylány sa ako zložky potravinovej vlákniny vyznačujú zdraviu-prospešnými účinkami (Obrázok 4.7), slúžia ako **prevencia proti chronickým ochoreniam** typu diabetes, rakovina, srdcovo-cievne ochorenia, ochorenia tráviaceho traktu a iné. **Fyziologické účinky** sú dokázané v zmysle stimulácie lepšej priechodnosti čriev, čím sa zlepšuje aj účinok črevnej mikrobioty, zlepšuje sa adsorpcia mutagénov v potravinách, redukuje sa hladina sacharidov v krvi, pozitívne sa ovplyvňuje reguláciu inzulínu, zabraňuje sa zvyšovaniu hladiny cholesterolu v krvnom sére a pečeni.

Arabinoxylány zo pšeničných otrúb preukazujú silné účinky na vrodené a získané imunitné odpovede organizmu a štúdie potvrdili, že **imunomodulačná aktivita arabinoxylánov** je úzko spätá so zvyšovaním akčného potenciálu T- a B-buniek a protirakovinovou aktivitou. Arabinoxylány stimulujú protilátky, ktoré sprostredkujú imunitnú odpoveď, medzi ktoré patria fagocyty (monocyty, neutrofilné granulocyty) a interleukíny. V pšeničných arabinoxylánoch vykazujú prítomné zvyšky kyseliny hydroxyškoricovej, ktorých obsah predstavuje približne 0,4 až 0,7 % celkového obsahu kyseliny škoricovej, chemoprotektívnu a antioxidačnú aktivitu. Arabinoxylány zo pšeničných otrúb pomáhajú ako fermentovateľný substrát v raste fakultatívne anaeróbnym, G+ baktériám vo fermentovaní kyseliny mliečnej a tvorení peroxidu vodíka, pričom sa tak potláča rast

črevných patogénov, zlepšuje sa trávenie a využitie živín. Dokázaná bola aj antimikrobiálna aktivita arabinoxylánov.



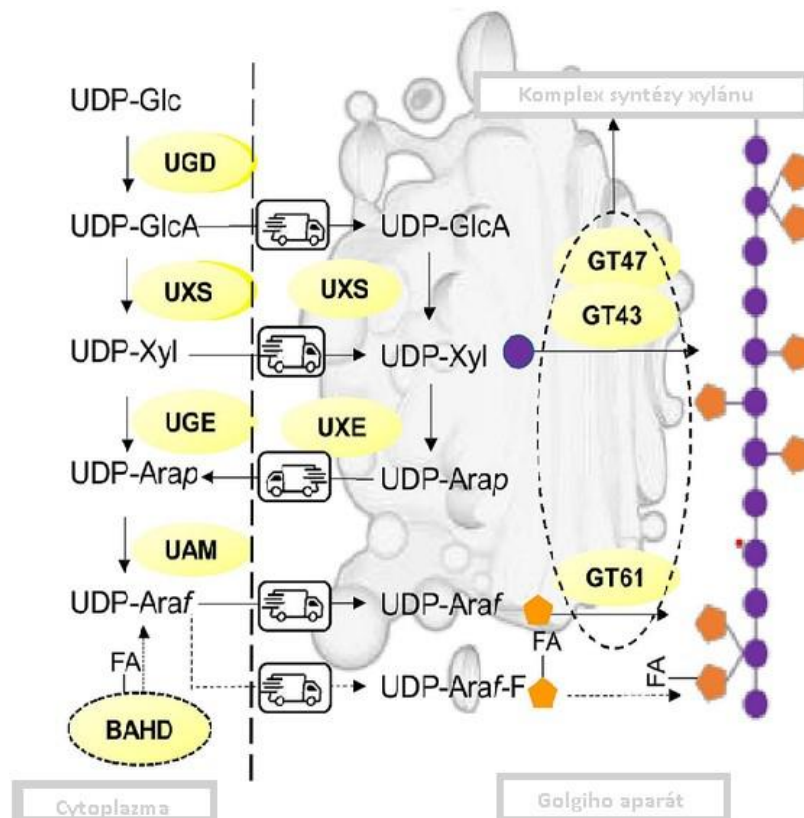
Obrázok 4.7: Arabinoxylány a ich hlavné pôsobenie na zdravie ľudského organizmu (Zdroj: Mendis a Simcek, 2014, upravené).

4.2.2.2 Biosyntetická dráha

Vytvorenie kostry arabinoxylánu nastáva v Golgiho aparáte s veľmi výrazným prepojením na cytosól cez membránové kanály tvorené (UDP)-sacharidovými transportérmi. Z dôvodu prítomnosti viacerých izoformiem syntetických enzýmov sú monoméry polysacharidu, xylózy a arabinózy syntetizované v cytoplazme a aj v Golgiho aparáte. Väčšina výskumov zameraných na biosyntézu arabinoxylánov je zameraná na **krok konštrukcie glukánového reťazca**, avšak poznanie mechanizmu syntézy xylózy a arabinózy môže z biotechnologického hľadiska otvoriť cesty pre modifikáciu jemnej štruktúry arabinoxylánu v obilninách (Obrázok 4.8).

Syntéza všetkých xylánov začína od ich prekursorov, UDP-cukrov, ktoré sa syntetizujú v cytosóle a Golgiho aparáte. UDP-D-xylóza (UDP-Xyl), monomér xylánového hlavného reťazca, sa syntetizuje UDP-xylsyntázou (UXS), ktorej izoformy sú lokalizované v cytosóle aj Golgiho aparáte prostredníctvom dekarboxylácie kyseliny UDP-D-glukurónovej (UDP-GlcA). Reverzné genetické prístupy zamerané na gény kódujúce transportéry UDP-Xyl (UXT) preukázali, že pre syntézu xylánových reťazcov sú nevyhnutné cytosólické izoformy UXS a nie

tie, ktoré sa nachádzajú v Golgiho aparáte. Arabinóza, hlavný substituent xylánového reťazca, sa získava konverziou (UDP)-xylózy na (UDP)-arabinopyranózu (Arap) pomocou UDP arabinóza epimerázy (UXE). V ryži sú známe dve a v jačmeni tri izoformy tohto enzýmu. Funkčnosť Golgi-UXS je nevyhnutná na udržanie normálneho obsahu arabinózy v bunkovej stene. Po syntéze v Golgiho aparáte je Arap transportovaný späť do cytosólu, kde komplex UAM (UDP-arabinopyranózamutáza) mení UDP-Arap na UDP-arabinóza furanózu (Araf). Následne sa Araf vracia späť do Golgiho aparátu, kde dochádza k jeho začleneniu do štruktúry arabinoxylánu. Rozkladom polysacharidov v cytosóle bunky dochádza k produkcii ďalších vstupných materiálov pre syntézu arabinózy, ktorých konverzia je realizovaná s pomocou bifunkčného enzýmu UGE1 (UXE/UDP-glukóza 4-epimeráza).



Obrázok 4.8: Biosyntetická dráha arabinoxylánov, jej lokalizácia v bunke a kľúčové enzýmy zapojené do ich produkcie. Nukleotidové cukry: UDP – uridíndifosfát; Glc – glukóza; GlcA – kyselina glukurónová; Xyl – Xylóza; Arap – L-arabinopyranóza; Araf – L-arabinofuranóza; FA – kyselina ferulová; UGD – UDP-Glc 6-dehydrogenáza; UXS – UDP-Xylsyntáza; UGE – UDP-glukóza 4-epimeráza; UAM – UDP-Ara mutáza; BAHD – acyltransferáza; UXE – UDP-Xyl-4-epimeráza. Glykozytransferázy GT47, GT43, GT61 (Zdroj: Botticella a kol., 2021, upravené).

Arabinoxylány obsahujú vo svojej molekule **deriváty kyseliny hydroxyškoricovej**, napr. kyseliny ferulová, dehydrodiferulová, p-kumarová a sinapová. Množstvo týchto substituentov je určujúce pre rozpustnosť arabinoxylánov. Ferulové substituenty tvoria oxidatívne viazané diméry a oligoméry s polymérmi bunkovej steny, čo vedie ku kovalentne viazanej sieti v bunkovej stene. **Členovia superrodiny acyltransferáz (BAHD)** sa podieľajú na esterifikácii xylánu v bunkových stenách jednoklíčnolistových rastlín. BAHD acyltransferázy pravdepodobne prenášajú kyselinu ferulovú na medziprodukt ako UDP-Araf, ktorý je potom transportovaný do Golgiho aparátu a prenášaný na xylánový reťazec zatiaľ neznámymi proteínmi.

Za výslednú štruktúru arabinoxylánu sú zodpovedné enzýmy patriace do dvoch hlavných rodín: **glykozyltransferázy (GT)** a **glykozylhydrolázy (GH)**. Existuje niekoľko podrodín GT a ich špecifické úlohy v biosyntéze xylánových reťazcov nie sú zatiaľ úplne objasnené. Tiež nie je zatiaľ jasné, či biosyntéza arabinoxylánov v obilninách zahŕňa koncový oligosacharid na redukujúcom konci, ktorý by mohol pôsobiť ako primér alebo terminátor. GT prenášajú cukrom aktivované prekursor (NDP-cukry) na špecifický akceptor, ktorý katalyzuje tvorbu glykozidických väzieb. Model navrhnutý pre syntézu arabinoxylánov počíta s existenciou multienzymového komplexu, komplexu xylánsyntázy, ktorý je zložený z najmenej troch členov dvoch rôznych GT klastrov. Proteíny kódované tromi génmi *IRX9*, *IRX10 (GT43)* a *IRX14 (GT47)* spolupracujú na syntéze xylánových reťazcov v Golgiho aparáte. *IRX9* má pravdepodobne štruktúrnu úlohu, pretože nemá aminokyselinový motív nevyhnutný pre syntetickú aktivitu. Tiež sa predpokladá o zapojení zatiaľ neidentifikovaných členov rodiny GT2 do biosyntézy (1,4)- β -xylánov, aby mohla byť syntéza molekuly arabinoxylánu úspešná.

Enzýmy podieľajúce sa na dekorácii kostry arabinoxylánu arabinozyllovými a xylozyllovými bočnými reťazcami sú členmi rodiny GT61. Dve xylánarabinozyltransferázy (XAT) v pšenici (*TaXAT1*, *TaXAT2*) a ryži (*OsXAT2*, *OsXAT3*) boli charakterizované natívne aj v heterológnych systémoch. Iní členovia GT61 môžu prenášať xylozyllové bočné reťazce na xylánový hlavný reťazec: v ryži xylozyl-arabinozyl substitúcia xylan-xylosyltransferázou (*OsXAX1*) sprostredkuje pridanie xylózy k arabinózovým jednotkám, zatiaľ čo xylan-xylozyltransferáza 1 (*OsXYXT1*) v ryži pridáva xylózové bočné reťazce na xylánovú kosť (*Xylp-1,2-b-Xylp*). Xylán-špecifické arabinozyl-transferázové aktivity enzýmov GT61 v trávach sú novými vhodnými cieľmi pre modifikáciu štruktúry xylánu. Členovia glykozylhydroláz sa často spájajú so syntézou arabinoxylánov a predpokladá sa, že majú úlohu pri modelovaní jemnej štruktúry tejto polymérnej molekuly.

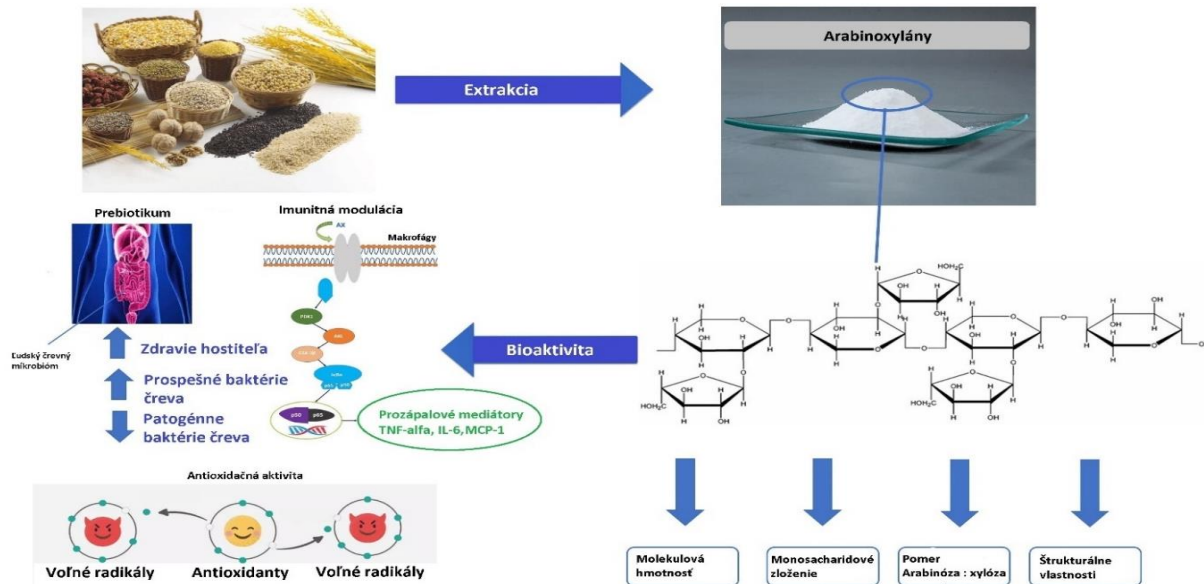
Spomedzi obilnín sú arabinoxylány najlepšie preštudované v pšenici. Široká sieť metabolických dráh zapojených do biosyntézy tohto metabolitu sťažuje zacielenie na kľúčové enzýmy, ich štruktúru a zvýšenie aktivity. Najviac využívanými v súčasnosti sú princípy prirodzenej variability v obsahu arabinoxylánov v natívnych zdrojoch a identifikácii súvisiacich QTL (lokusy, úseky DNA, ktoré ovplyvňujú kvantitatívne, hlavne úžitkové znaky), prípadne „meta-QTL“ zameraných na tri lokusy na chromozómoch 1BL, 3D a 6B. Väčšina QTL však zodpovedá za relatívne malé rozdiely v obsahu arabinoxylánov (menej ako 15,2 %) a identifikované boli hlavne na chromozóme 1BL. Objav kľúčových génov pre manipuláciu s arabinoxylánmi v obilninách je náročný aj z dôvodu prítomnosti viacerých izoformiem biosynteticky aktívnych enzýmov. Pri štúdiách funkcie génu je potrebné zvážiť pleiotropné účinky necielených izoformiem a práve omické štúdie prebiehajúce na genomickej aj transkriptomickej úrovni môžu pomôcť objasniť úlohu jednotlivých izoenzýmov.

4.2.2.3 Význam arabinoxylánov v inovatívnych potravinách

Extrakciu arabinoxylánov z obilných zdrojov možno vykonávať pomocou rôznych techník z rôznych častí zrna. Najbežnejším zdrojom sú obilniny a hlavne **obilné otruby**. Extrakciu je možné vykonať pomocou vody, mechanicou úpravou, enzymatickou cestou, chemickými modifikáciami alebo kombinovaním viacerých techník. Vďaka svojim biologickým účinkom nachádzajú arabinoxylány využitie vo vývoji funkčných potravín, pričom molekulová hmotnosť, zloženie arabinoxylánov a štruktúrne vlastnosti molekuly sú dôležité pre pozitívne účinky tejto zložky potravinovej vlákniny v ľudskom tele (Obrázok 4.9).

Extrakcia vo vodnom prostredí pri teplote 40–90 °C je najjednoduchšia a najmenej agresívna metóda extrakcie, pri ktorej sa zachováva natívna štruktúra molekuly. Ako bolo spomínané vyššie, na rozpustnosť molekuly však vplýva viacej faktorov, medzi ktoré patrí štruktúra polysacharidu, charakter ďalších polymérov tvoriacich, rastlinný druh, prípadne stupeň klíčivosti zrna. **Mechanická extrakcia** zlepšuje výtťažok extrakcie tým, že robí arabinoxylány dostupnejšie v matrici. Medzi prídavné metódy mechanickej extrakcie patrí frézovanie a extrúzia, pôsobenie ultrazvuku, pôsobenie mikrovln alebo tlak pary. **Chemická extrakcia** arabinoxylánov sa môže uskutočniť použitím alkalického alebo kyslého roztoku za špecifických podmienok a veľmi často sa kombinuje s niektorou z mechanickej metód extrakcie. **Enzymatická extrakcia** využíva endoxylanázy a celulózy a v porovnaní s chemickou extrakciou má výhodu, že je šetrnejšia k životnému prostrediu a degradácia

arabinoxylánov môže byť lepšie kontrolovaná. Kombinované použitie endoxylanázy a celulózy, prípadne prídavok ďalších enzýmov a/alebo extrakčných metód poskytuje vyššie výťažky extrakcie.



Obrázok 4.9: Schéma aplikácie arabinoxylánov vo vývoji inovatívnych potravín s dôrazom na pozitívne účinky v ľudskom organizme. AX = arabinoxylány, TNF-alfa = tumor nekrotizujúci faktor alfa, IL-6 = interleukín 6, MCP-1 = monocytový chemoatraktantový proteín 1 (Zdroj: Pang a kol., 2023, upravené).

Rozpustnosť, viskozita a emulgačná kapacita sú tri hlavné charakteristiky arabinoxylánov, ktoré determinujú ich využitie v modernom potravinárstve. Štúdií, ktoré sa zameriavajú na začlenenie arabinoxylánov do potravinových matic, nie je veľa. V cestovinách sa pridávajú vo vode rozpustné arabinoxylány za účelom zvýšenia absorpcie vody a zároveň zníženia ich tvrdosti. Počas pečenia však dochádza k dramatickému poklesu ich koncentrácie. V sušienkach arabinoxylány s nízkou Mw možno použiť ako náhradu cukrov, zvyšujú plasticitu cesta a skracujú čas pečenia. V chlebe majú arabinoxylány s vysokou Mw negatívny vplyv. Napr. spolu s kyselinou ferulovou zvyšujú rozťažnosť cesta, avšak prídavok arabinoxylánov spolu s enzýmami môže viesť k zvýšeniu špecifického objemu bochníka. Arabinoxylány tiež vplývajú na želatinizáciu škrobu a spomaľujú jeho retrogradáciu v chlebe, vplývajú na štruktúru zosieťovaných lepkových bielkovín, inhibujú rast ľadových kryštálov a hlavne vo vode rozpustné predlžujú trvanlivosť výrobku.

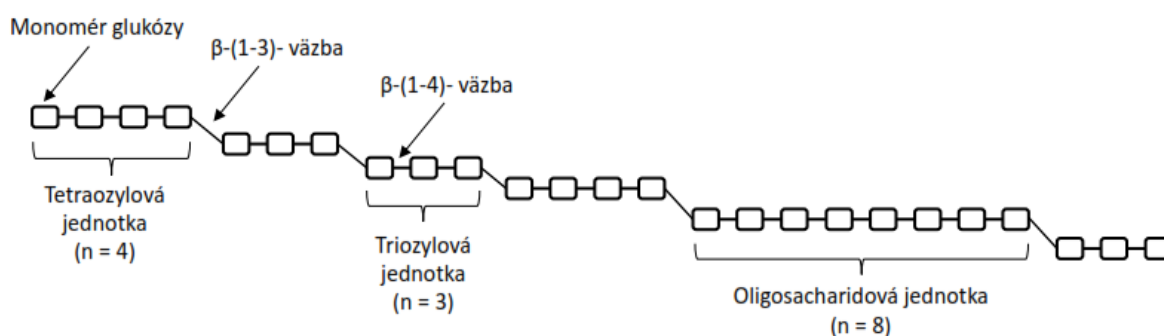
Arabinoxylány získavané z nesladového jačmeňa, raže alebo ovsu zlepšujú viskozitu, plnosť a chuť piva s nízkym podielom alkoholu a tiež podporujú stabilitu peny v pšeničnom

pive. V koláčoch prídavok arabinoxylánov aj spolu s β -D-glukánmi zvyšuje konzistenciu cesta a hustotu buniek a spôsobuje vytvorenie jednotnej striedky znížením pohybu vlhkosti od striedky po kôrku. Arabinoxylány sa pridávajú aj do instantných mliečnych nápojov pre dojčatá za účelom zvýšenia nutričnej a biologickej hodnoty. V nealkoholických nápojoch zvyšujú kvalitu nízkokalorických nápojov zvyšovaním sladkej chuti v ústach pri konzumácii, tiež zlepšujú lahodnosť nápojov na báze ovsá, znižujú glykemické reakcie pri konzumácii instantného čaju a biologickú aktivitu nápoja na báze pšenice.

4.2.3 β -D-glukány

4.2.3.1 Základná charakteristika β -D-glukánov

(1,3-1,4)- β -D-glukány (skrátene **β -D-glukány**) sú nesubstituované, nerozvetvené homopolysacharidy obsahujúce β -D-glukopyranozylové jednotky polymerizované prostredníctvom β -(1,3)- a β -(1,4)-glykozidových väzieb vo variabilnom pomere, pričom β -(1,4)-väzby sú obvykle v polysacharide častejšie zastúpené ako β -(1,3)-väzby (Obrázok 4.10). Väzby spôsobujú tzv. „stair like“ štruktúru, štruktúru podobnú schodisku a vzhľadom k striedaniu glykozidových väzieb β -(1,4) a β -(1,3) sa obilninový β -D-glukán označuje aj za zmiešaný väzbový glukán (z anglického mixed-linkage glucan, MLG).



Obrázok 4.10: Chemická štruktúra obilninového β -D-glukánu so zastúpením glykozidických väzieb β -(1,3) a β -(1,4) a usporiadaním do tzv. „stairs like“ štruktúry (Zdroj: autor).

Pomer β -(1,4) väzieb k β -(1,3) väzbám je zodpovedný spolu s M_w za funkčné vlastnosti polysacharidu. Pomer (1,4)- β -D-glukopyranozylových zvyškov k (1,3)- β -D-glukopyranozylovým zvyškom sa označuje ako **stupeň polymerizácie (DP)** a v obilninách sa zvyčajne pohybuje v rozmedzí 2,2–2,6:1, pričom v bunkových stenách škrobového endospermu

pšenice je pomer 3,0–4,5:1 a v ovse sa pohybuje v rozmedzí 1,8–2,3:1. Vo všeobecnosti platí, že pomer **DP3:DP4** je vyšší pre nerozpustné a nižší pre rozpustné β -D-glukány. Väzby β -(1,3) lokalizované v molekule nepravidelne spôsobujú, že sa v polysacharide vytvárajú nepravidelne rozmiestnené molekulárne zlomy, ktoré nielen bránia rozsiahlemu medzimolekulovému usporiadaniu reťazcov do dobre štruktúrovaných mikrovlákien, ale vedú tiež ku vzniku polysacharidov, ktoré sú schopné tvoriť gélovitú maticu a sú, napriek svojej relatívne veľkej Mw, rozpustné vo vodnom prostredí. Naopak, bloky susedných β -(1,4) väzieb vykazujú tendenciu k agregácii prostredníctvom silných vodíkových väzieb pozdĺž celulóзовých segmentov, čo vedie k nižšej rozpustnosti. Väzby β -(1,3) rozdeľujú pravidelnosť β -(1,4)-väzbovej sekvencie, čím sa polysacharid stáva flexibilnejší a rozpustnejší.

Gélovitá štruktúra umožňuje polysacharidu poskytovať štruktúrnu oporu pre bunkovú stenu, ale zároveň zostáva flexibilná, pružná a dostatočne porézna pre transport vody, živín a ďalších malých molekúl cez bunkovú stenu počas vývinu rastlinných pletív. Prináša to priaznivé funkčné a biologické účinky polysacharidu nielen vo fyziológii rastlín, ale aj aplikačný potenciál v potravinárskom a farmaceutickom priemysle. **Viskózný charakter β -D-glukánov** je však na druhej strane zodpovedný za nežiaduce účinky polysacharidu ako krmiva pre hospodárske zvieratá a v pivovarníctve.

β -D-glukány sú relatívne malé zložky bunkových stien vegetatívnych pletív rastlín čeľade *Poaceae*. Zrná ovsa siateho (*Avena sativa* L.), jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.), prípadne raže siatej (*Secale cereale* L.) sú prirodzenými zdrojmi β -D-glukánov. Na obsah tohto polysacharidu majú vplyv nielen faktory genetické, ale aj faktory prostredia. Vyšší obsah bol pozorovaný napr. v otrubách nahých genotypov ovsa siateho a jačmeňa siateho, prípadne vo waxy variantoch (tzv. voskové zrná, v ktorých je pozmenené zloženie škrobu v prospech vysokých koncentrácií amylopektínu a redukcie amylózy). Z faktorov prostredia je to napr. množstvo zrážok predovšetkým vo fáze plnenia zrna, teplota, kvalita a zloženie pôdy, hnojenie alebo agrotechnické prístupy, ktoré ovplyvňujú obsah daného metabolitu v rastline.

Význam β -D-glukánov v obilninových zdrojoch je potvrdený nielen pre samotného konzumenta, ale je dokázané, že tieto polysacharidy majú dôležité úlohy aj v samotnej rastline. Gélovitá matica tvorená v bunkovej stene vláknami β -D-glukánov poskytuje bunke **flexibilitu a istú mechanickú oporu** pre zachovanie funkčných vlastností bunkovej steny. Bunkové steny hlavne vyvíjajúcich sa pletív sú takto dostatočne porézne pre transport molekúl vody, živín a hormónov s nízkou Mw medzi bunkami a jednotlivými pletivami. V špecializovaných vodivých pletivách potrebných na diaľkový transport molekúl vody a živín cez rastlinu sú steny zase

dostatočne nepriepustné a vo väčšine rastlinných pletív sú bunkové steny dôležité taktiež pre medzibunkovú adhéziu.

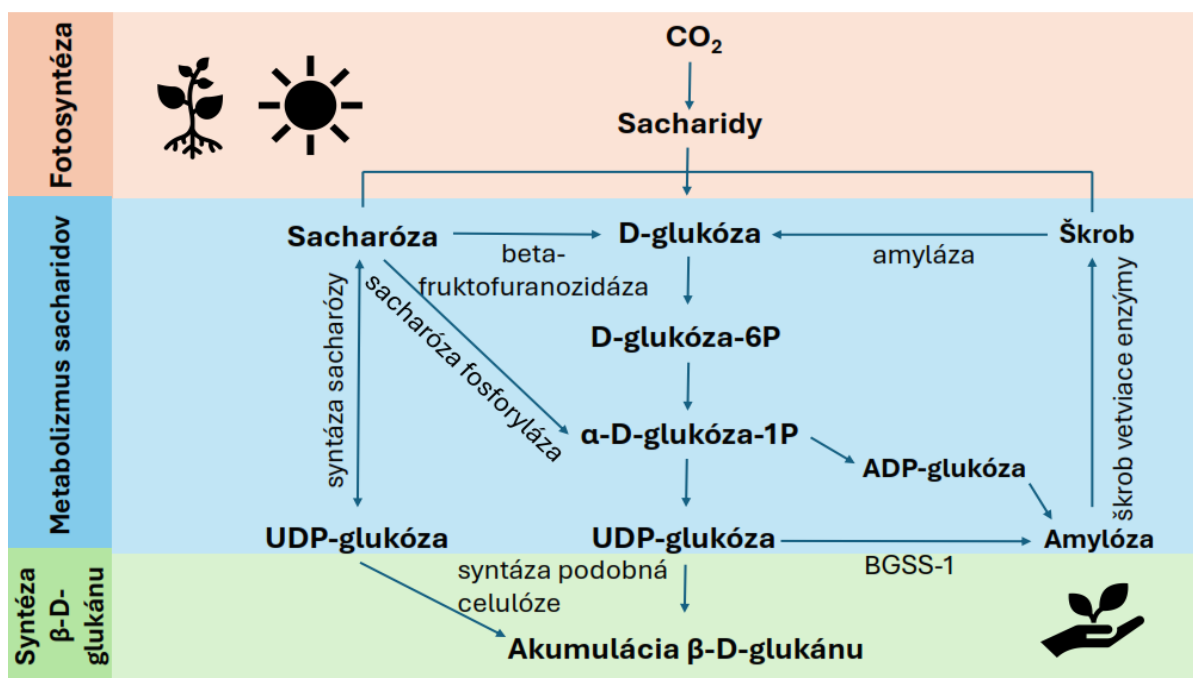
Gélovitá vrstva bunkovej steny tvorená β -D-glukánmi môže tiež pôsobiť ako **obranná stena**, ktorá chráni bunku pred inváziou cudzorodých organizmov a zároveň pôsobí ako potenciálny signálny systém indukujúci nebezpečenstvo. V prípade, že patogénne huby napádajú rastlinné bunky, uvoľňujú sa β -glukanázy určené na rozklad ochrannej gélovej vrstvy obklopujúcej bunku, dochádza k rozkladu ochrannej vrstvy β -D-glukánov a obnažovaniu samotnej cytoplazmatickej membrány. Štúdia na mutantoch ryže, kde inaktivovali gény podieľajúce sa na biosyntéze β -D-glukánov ukázala, že β -D-glukány fungujú ako represor signálnej kaskády zameranej na programovanú bunkovú smrť a pri nízkych koncentráciách β -D-glukánov v bunkovej stene bola pozorovaná vyššia krehkosť rastlinných pletív.

β -D-glukány fungujú taktiež ako **zdroj energie** v predlžujúcich sa rastlinných bunkách a v semenách. Rozklad β -D-glukánov na monoméne glukózové jednotky je pomerne jednoduchý a zahŕňa iba dva enzymatické kroky, čo umožňuje rýchlu mobilizáciu glukózových jednotiek v porovnaní s dlhším procesom hydrolyzy škrobu. V prospech zásobnej funkcie β -D-glukánov je aj skutočnosť, že tento polysacharid je lokalizovaný v škrobovej vrstve endospermu a v aleurónovej vrstve semena, v blízkosti vyvíjajúceho sa klíčka.

4.2.3.2 Biosyntetická dráha β -D-glukánov

Východiskovým bodom pre molekulovo-genetické prístupy štúdia bunkových stien bolo sekvenovanie genómu ryže a následná identifikácia **superrodiny génov celulózovej syntázy** (Cellulose Synthase A, *CesA*), pričom tieto gény sú zodpovedné za syntézu kostry hexózových polysacharidov, aj samotnej celulózy (Obrázok 4.11). Postupne boli objavené **gény podobné celulózovej syntáze** (Cellulose Synthase Like genes, *Csl*). Táto rodina sa ďalej delí do osem podtried: *CslA*, *CslB*, *CslC*, *CslD*, *CslE*, *CslF*, *CslG* a *CslH* a každá z nich obsahuje viacero génov. Neskôr bola superrodina *Csl* doplnená o rodinu *CslJ*. Všeobecne platí, že gény *CesA* kódujú enzýmy syntetizujúce celulózu a gény *Csl* sú zodpovedné za biosyntézu hemicelulózových polysacharidov. Skupina génov *CslC* kóduje enzým, ktorý riadi syntézu hlavného reťazca xyloglukánov, zatiaľ čo gény z podrodiny *CslF* a *CslH* sprostredkujú syntézu β -D-glukánov v *Poaceae*, pričom podrodina ***CslF*** je kľúčová. Podrodina *CslJ* sa taktiež podieľa na biosyntéze β -D-glukánov, ale jej fylogenetický význam je zatiaľ nejasný. Nie všetky podrodiny *Csl* sú zastúpené vo vyšších rastlinách. Podrodiny *CslB* a *CslG* sa nachádzajú iba

v dvojkľíčoliových rastlinách a gymnospermoch a *CsIF* a *CsIH* sa vyskytujú iba v jednokľíčoliových organizmoch, pričom vetva *CsIF* sa oddelila od podrodiny *CsID*, ktorá sa vyvinula diverzifikáciou *CsID* a *CesA*. Biosyntézu β -D-glukánov kódujú tri skupiny *Csl* génov, konkrétne *CsIF*, *CsIH* a *CsIJ*, pričom výskumy dokázali, že selekčný tlak na gény podrodiny *CsIF* súvisí s pomerom DP3:DP4 v polysacharide. Zapojenie podrodiny *CsIH* bolo dokázané genetickou transformáciou arábkovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana* L.), do ktorej boli vložené gény *CsIH* z ryže a rastlina produkovala β -D-glukány. Podobný výskum bol realizovaný aj s podrodinou *CsIF*. Rovnako výskumy naznačujú, že podrodina *CsIJ* kóduje v jačmeni syntézu β -D-glukánov, pričom táto podrodina bola pozorovaná v jačmeni, pšenici, ciroku a kukurici, ale nie v ryži. Všetky gény z podrodín *CsIF*, *CsIH* a *CsIJ* sprostredkujú syntézu β -D-glukánov v heterológnych expresných systémoch, hoci nie je jasné, či každý gén v týchto skupinách riadi syntézu β -D-glukánov *in vivo*.

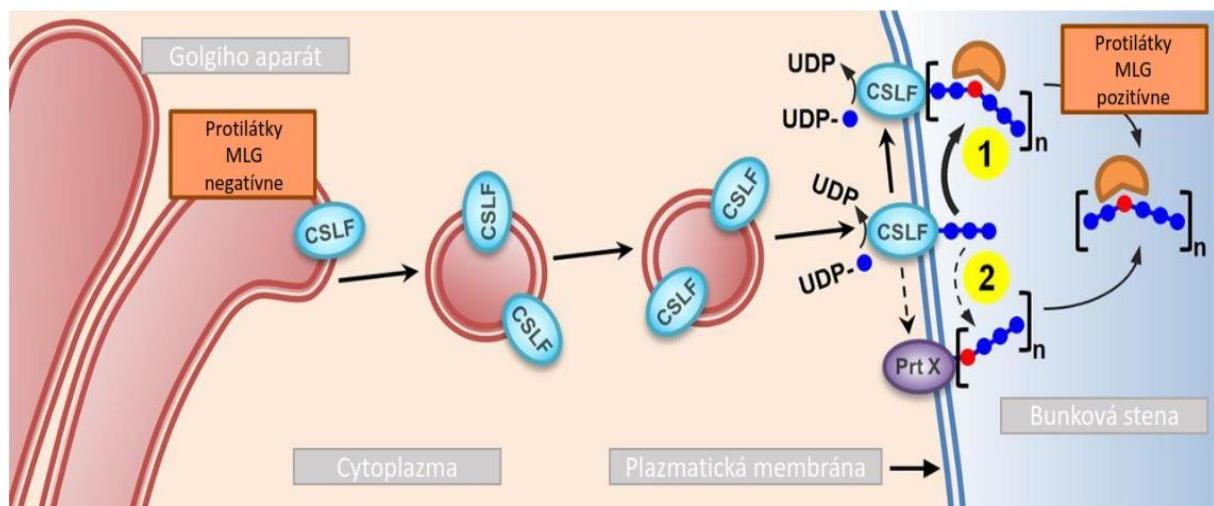


Obrázok 4.11: Navrhovaný biologický proces syntézy β -D-glukánu počas vývinu zrna jačmeňa siateho. Model ukazuje niektoré kľúčové enzýmy podieľajúce sa na biosyntéze β -D-glukánu počas vývoja zrna (Zdroj: Geng a kol., 2022, upravené).

V pletivách jačmeňa siateho je vzhľadom k obsahu β -D-glukánu najviac transkribovaný gén *CsIF6* (Obrázok 4.12), pričom rovnakú funkciu spĺňa aj v pšenici, ovse a ryži. Vyradenie génu *CsIF6* z funkcie v rastlinách ryže spôsobilo nielen výrazné zníženie obsahu β -D-glukánov

v koleoptile, ale aj zvýšenú aktiváciu mechanizmov súvisiacich s ochranou rastlín voči bakteriálnym infekciám.

Hladiny expresie génov podrodiny *CsIF* intenzívne študované v rôznych pletivách jačmeňa a v rôznych vývinových štádiách zrna ukázali značné rozdiely v expresii medzi vzorkami. Gén *HvCsIF6* je exprimovaný takmer vo všetkých pletivách a počas celého vývinu zrna, ale napr. gén *HvCsIF3* sa exprimuje prevažne v koleoptile a v koreňových vláskoch, *HvCsIF9* v koleoptile, koreňoch a vyvíjajúcom sa semene 8–10 dní po opelení, prípadne *HvCsIF7* v stonke a stopke. Na základe týchto výsledkov je možné konštatovať, že expresia *CsIF* génov je regulovaná pletivovo špecifickými faktormi. Prísna regulácia expresie génov *CsIF* je obzvlášť viditeľná v priebehu vývinu semena, kde najmenej štyri gény sú exprimované v špecifických fázach. Tieto závery naznačujú viacstupňový proces biosyntézy β -D-glukánov, pričom najskôr sa exprimujú gény na začiatku biosyntetickej dráhy a potom nasledujú ďalší členovia.



Obrázok 4.12: Predpokladaný model syntézy β -D-glukánov v obilninách so zastúpením génu *CsIF6*. CSLF6 je hlavným proteínom syntézy β -D-glukánov (MLG – mixed-linkage glucans) a pôsobí podobne ako CesAs, syntetizuje reťazce polysacharidu de novo, ktoré sú rozpoznávané MLG-špecifickými protilátkami na povrchu bunky (1). Menej pravdepodobnou, ale možnou alternatívou je, že CSLF6 katalizuje produkciu celo-dextrínov (zobrazené modrou farbou), ktoré sú spojené na plazmatickej membráne zatiaľ neidentifikovaným proteínom (Prt X) prostredníctvom jedinej β -(1,3)-glykozidovej väzby (zobrazené červenou farbou), čím dochádza k tvorbe reťazcov β -D-glukánov, ktoré sú následne rozpoznávané MLG-špecifickou protilátkou (2) (Zdroj: Wiliams a kol., 2015, upravené).

4.2.3.3 Zdraviu prospešné vlastnosti β -D-glukánov

Zrná obilnín majú dokázané nielen nutričné, ale aj zdraviu-prospešné účinky na konzumenta. Obsah a kvalita bielkovín a škrobu sú rozhodujúce pre využitie obilných zŕn v potravinovom priemysle. Celková potravinová vláknina a predovšetkým jej rozpustná zložka tvorená β -D-glukánmi prináša predovšetkým pre obilné zrná ovsa siateho istú **pridanú hodnotu** a zvyšuje možnosti využitia zrna ovsa ako primárnej potravinovej suroviny pre prípravu tzv. funkčných potravín. Ovsené β -D-glukány majú dokázané pozitívne **zdraviu-prospešné účinky**, hlavne v zmysle pozitívneho vplyvu na fyziológiu trávenia, ale aj dokázanej antihypercholesterolemickkej, hypoglykemickej, antibakteriálnej, protirakovinovej a imunomodulačnej aktivity a ďalších. Svojimi **funkčnými vlastnosťami** (želatínujúce, stabilizujúce, zvyšujúce trvanlivosť výrobku, znižujúce drobivosť cesta a ďalšie) sa zvyšuje potenciál β -D-glukánov ako funkčnej zložky v potravinárskom, kozmetickom a farmaceutickom priemysle.

4.2.3.4 Funkčné vlastnosti a modifikácie

Molekulárne a štrukturálne vlastnosti β -D-glukánov priťahujú veľký záujem výskumníkov, pretože určujú ich **fyzikálne vlastnosti**, ako je rozpustnosť vo vode a reologické vlastnosti, ale aj **funkčné a biologické účinky** v potravinových a farmaceutických produktoch.

β -D-glukány sa vo veľkej miere používajú v potravinárskom priemysle pre svoju schopnosť **vytvárať gél a zvyšovať viskozitu vodných roztokov**. Využívajú sa na **vylepšenie textúry a vzhľadu** šalátových dresingov, omáčok a zmrzlín. Používajú sa tiež ako **mimetikum** (náhrada) tukov na vývoj potravinových výrobkov so zníženým kalorickým zaťažením. Avšak, tokové a želírovacie vlastnosti polysacharidu spôsobujú pre potravinársky priemysel niekoľko technických problémov, ako je pomalá filtrácia roztokov alebo kalov, nízky výtťažok a tvorba zrazenín, napr. v sladovníctve a pivovarníctve počas skladovania piva. Znížená je aj schopnosť hospodárskych zvierat tráviť polysacharid, preto je limitujúce jeho využitie a využitie jeho prirodzených zdrojov v krmivách. Aplikácie glukánov v potravinárskom, kozmetickom a farmaceutickom priemysle sú mierne obmedzené kvôli vysokej Mw a viskozite polysacharidu. Použitie chemických, enzymatických a fyzikálnych metód na zmenu molekulárnej štruktúry β -D-glukánov má značný vplyv na jeho rozpustnosť, viskozitu a ďalšie reologické parametre.

Molekulárne a štrukturálne charakteristiky β -D-glukánov sú rozhodujúcimi parametrami, ktoré určujú fyzikálne vlastnosti a funkčné účinky týchto polysacharidov v potravinových výrobkoch. **Fyzikálno-chemické vlastnosti** sú reprezentované kapacitou viazania žľčových kyselín a rozpustnosťou β -D-glukánov.

4.2.3.5 Kapacita viazania žľčových kyselín

Žľčové kyseliny sú produkované pečeňou z cholesterolu. **Viazanie β -D-glukánov na žľčové kyseliny** a ich vylučovanie stolicou spôsobuje znižovanie hladiny cholesterolu v tele. Mw ovplyvňuje túto schopnosť β -D-glukánov. Výsledky štúdií ukázali, že kapacita viazania žľčových kyselín je závislá od Mw a od štrukturálnych a fyzikálno-chemických vlastností β -D-glukánov. Polysacharidy s nízkou Mw ($1,56 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹) extrahované z ovsia viazali viac žľčovej kyseliny v porovnaní s β -D-glukánmi s vysokou Mw ($6,87 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹) a tiež β -D-glukány s Mw v rozmedzí od 2,42 do $1,61 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹ viazali maximum množstva žľčovej kyseliny.

Sulfatácia a acetylácia predstavujú chemické modifikácie β -D-glukánov, pričom ide o zmenu základnej štruktúry a medzimolekulových síl β -D-glukánov, ktoré spôsobujú konformačnú transformáciu a zmeny funkčných vlastností. Sulfatácia znižuje Mw ovsených β -D-glukánov. Výsledkom acetylácie β -D-glukánov z ovsia je kompaktná mikroštruktúra bez otvorov so zvýšenou schopnosťou viazať žľčové kyseliny. **Gama ožarovanie** tiež vedie k významnému zníženiu priemernej Mw β -D-glukánov a zvyšovaniu kapacity ich väzby na žľčové kyseliny.

4.2.3.6 Rozpustnosť β -D-glukánov

β -D-glukány majú **silnú afinitu k molekulám vody** vďaka tomu, že obsahujú množstvo –OH skupín. Rozpustnosť predstavuje najdôležitejší parameter funkčných vlastností týchto polysacharidov, kam patrí stabilita, emulzifikácia, transport liečiv a formovanie membrán. Napr. ovsené β -D-glukány s Mw 2,42 až $1,61 \cdot 10^5$ g.mol⁻¹ majú spomedzi obilninových β -D-glukánov najväčšiu rozpustnosť (83,4 až 87,3 %). Zvýšenie Mw vedie k poklesu rozpustnosti.

Chemická modifikácia β -D-glukánov, konkrétne **sulfatácia**, inkorporuje iónové skupiny a tiež zvyšuje množstvo malých fragmentov polysacharidu a vedie k zníženiu Mw zo 130 000 na 68 000 g.mol⁻¹ a k zvýšeniu rozpustnosti z 20,3 % na 42,3 %. Zvýšenie rozpustnosti spôsobuje aj opracovanie molekuly polysacharidu **gama žiarením**. **Ultrazvuk** je ďalší

fyzikálny spôsob ošetrenia β -D-glukánov, vedie k produkcii homologických polysacharidov s nižšou Mw a významnému zvýšeniu rozpustnosti s veľkým potenciálom pre inovatívne potraviny a farmaceutický priemysel.

Reologické správanie β -D-glukánov má význam pre pochopenie ich štruktúrno-funkčných vzťahov vo vodnom prostredí. Reologické a želírovacie vlastnosti sú závislé od **Mw** a **koncentrácie β -D-glukánov** vo vodnom prostredí. β -D-glukány s nízkou Mw vykazujú vlastnosti podobné gélu samospájaním prostredníctvom sekvencií podobných celulóze.

Purifikované jačmenné vo vode rozpustné β -D-glukány s vyššou Mw vykazovali vyššie medze klzu (pevnosti) a nižší modul kompresie hodnoty a hodnota modulu dynamického ukladania sa znižovala so zvyšovaním Mw. Tiež zvýšenie pomerov DP3:DP4 a Mw β -D-glukánov znížili krehkosť a naopak, zvýšili pevnosť β -D-glukánových gélov. Veľké deformačné mechanické skúšky (režim kompresie) ukázali, že zvýšenie Mw a zníženie DP3 je spojené so zvýšením pevnosti kryogélov. Čerstvo pripravené nízko-Mw a vysoko-Mw gély vykazovali podobné reologické charakteristiky náhodného typu cievky. Zvýšenie gélovitosti štruktúry súvisí s poklesom Mw. Je dokázané, že β -D-glukány izolované z rôznych druhov obilnín a aj rôznych odrôd majú rôzne Mw a tým aj rôzne visko-elastické vlastnosti.

4.2.3.7 Gélové vlastnosti β -D-glukánov

Stupeň gélovitosti závisí od Mw β -D-glukánov. Dynamická reometria ukázala, že rôzne odrody ovsa obsahujú β -D-glukány s rôznymi Mw, pričom tie s nižšou Mw majú vyššie úrovne gélovitosti a nižší čas na vytvorenie gélu. Vysoká mobilita a vysoká pravidelnosť štruktúry nízko-Mw β -D-glukánov vedú k ľahkému vytváraniu spojovacích zón a silnejšej trojrozmernej sieti, ktorá zvyšuje rýchlosť jej gélovatenia. Tiež vyššia mobilita kratších vlákien a menej priestorových prekážok spôsobujú vyššiu gélovitosť β -D-glukánov s nižšou Mw. Pomer vysoko-Mw a nízko-Mw má vplyv na gélovatenie. Mix 50 % vysoko-Mw a 50 % nízko-Mw β -D-glukánov v ovse spôsobuje produkciu pevného, ale elastického gélu. Kompaktná mikroštruktúra ovsených β -D-glukánov bez medzier, vzniknutá acetyláciou, spôsobuje nedostatok lepidlosti, nižšej tvrdosti, zvýšenej súdržnosti, pružnosti a gumivosti, čo sa využíva v potravinárskych aplikáciách. Čiastočne hydrolyzované β -D-glukány z ovsa spolu s vláknami celulózy obsahovali vyšší podiel 1-4-D-glukopyranozylových jednotiek, mali nižšiu Mw a gél bol elastickejší so silnejšími spojeniami. Agregácia β -D-glukánov vo vodných roztokoch má isté limity na základe difúzie. Nárast Mw z 103 500 na 2 076 000 g.mol⁻¹ vedie k zníženému

stupňu agregácie pripisovanému nižšej rýchlosti difúzie veľkých molekúl. β -D-glukány s pevnejšou konformáciou (vyšší pomer DP3:DP4) tiež vykazujú nižšie stupne agregácie.

4.2.3.8 Viskozita

Obilninové β -D-glukány prispievajú k viskozite roztoku. Vnútorná viskozita roztoku sa tiež považuje za charakteristickú vlastnosť roztoku polysacharidu. **Viskozita** je závislá na M_w polysacharidov, ich koncentrácii v roztoku a schopnosti vytvárať agregáty a je jednou z charakteristík biologických účinkov polysacharidu. β -D-glukány zvyšujú viskozitu gastrointestinálneho traktu, oddávajú vyprázdňovanie žalúdka a absorpciu polysacharidov v čreve, čo vedie k redukcii postprandiálnej hyperglykémii a absorpcii a reabsorpcii cholesterolu a žlčových kyselín.

Acetylácia ovsených β -D-glukánov spôsobuje tvorbu kompaktnej pórovitej mikroštruktúry a vedie k zníženej viskozite polysacharidu. Ošetrovanie polysacharidu **gama žiarením, ultrazvukové ošetrovanie a acetylácia** β -D-glukánov sa môžu použiť ako účinné metódy na úpravu fyzikálnych vlastností, ktoré následne ovplyvnia využívanie v potravinárskom a farmaceutickom priemysle kvôli vysokej viskozite a nízkej rozpustnosti β -D-glukánov. Vysoko- M_w β -D-glukány stabilizujú emulzie zosilnením viskozity kontinuálnej, spojitej fázy. Avšak, stabilita emulzie spôsobená nízko- M_w β -D-glukánov sa pripisuje hlavne vytváraniu sietí v spojitej fáze. Naparovanie ovseného zrna vedie k zmenám v konformácii natívnych β -D-glukánov narušením intramolekulárneho zosieťovania na konfiguráciu lineárneho reťazca, čo generuje vyššiu viskozitu a viac pseudoplastické vlastnosti polysacharidu.

4.2.3.9 Texturálne vlastnosti

Fortifikácia potravinových produktov na báze obilnín ilustruje potenciál β -D-glukánov **manipulovať štruktúru potraviny**, textúru a celkovú prijateľnosť, taktiež zvyšovať biologické a funkčné vlastnosti potraviny.

4.2.3.10 Aplikácie v potravinách

Fyzikálne vlastnosti ako je rozpustnosť vo vode, viskozita a schopnosť tvoriť gély otvárajú β -D-glukánom uplatnenie v potravinárskom, kozmetickom a farmaceutickom priemysle (Obrázok 4.13).

Za účelom prípravy **funkčných potravín** s pridanou hodnotou sa obohacuje pšeničná múka o prirodzené zdroje obilninových β -D-glukánov (napr. ovsené otruby, ovsené vločky, celozrnná múka z ovsu alebo jačmeňa), izolované β -D-glukány v práškovej forme alebo β -D-glukánové hydrogély. β -D-glukány sa pridávajú tiež do cesta na prípravu muffinov a sušienok a mäsových výrobkov, ako mäsové guľky alebo salámy. Kysnutie sa zlepšuje s prídavkom β -D-glukánov z ovsu v acetylovanej forme alebo vystaveného miernemu oxidatívne mu pôsobeniu. Oxidované β -D-glukány nemajú efekt na ťažnosť cesta. Gél z oxidovaných β -D-glukánov znižuje tuhosť, lepivosť a gumovitosť. Acetylácia redukuje tuhosť, zvyšuje súdržnosť, pružnosť, gumivosť a nespôsobuje lepivosť. Zvýšenie pevnosti a zníženie krehkosti cesta je pozorované so zvyšovaním M_w ovsených β -D-glukánov.



Obrázok 4.13: Vlastnosti determinujúce využitie obilninového β -D-glukánu a hlavné smery využitia s dôrazom na potravinársky priemysel (Zdroj: autor).

Hydrogély pripravené z izolovaných β -D-glukánov zo zreých zŕn pšenice, raže (*Secale cereale* L.), jačmeňa a ovsu boli mikrobiologicky testované a v rôznych množstvách pridávané do chlebového cesta, kečupu a kombuchovej limonády. Hydrogély nepreukázali žiadne negatívne vplyvy na senzorické parametre finálneho chleba a naopak, glukánové hydrogély

izolované z raže a ovsu zvýšili celkovú chuť a trvácnosť v porovnaní s kontrolou. Kvalita kečupov priamo po vyrobení a taktiež po 180 dňoch skladovania nebola negatívne ovplyvnená prídavkom β -D-glukánových hydrogélom a pozitívne ovplyvnila celkovú jemnosť a kyslosť výsledného produktu v porovnaní s kontrolou.

Tyčinky (sneky) s prídavkom β -D-glukánov zlepšujú glykemickú odpoveď organizmu. Nápoje ochutené sacharózou s prídavkom 3 g β -D-glukánov z jačmeňa kontrolujú denný príjem potravín a redukujú príjem energie. β -D-glukány a/alebo rezistentný škrob sú vhodným doplnkom pri vývoji prebiotických nápojov. Do mlieka, za účelom vzniku nízkokalorických mliečnych produktov, sa pridávajú vysoko-Mw β -D-glukány a dokázateľne redukujú u konzumenta hladinu cholesterolu v krvnom sére. Jogurty obohatené o β -D-glukány sa vyznačujú vyšším podielom aminokyselín, majú rýchlejšiu proteosyntézu a nižšie uvoľňovanie veľkých peptidov v porovnaní s jogurtami obohatenými o škrob.

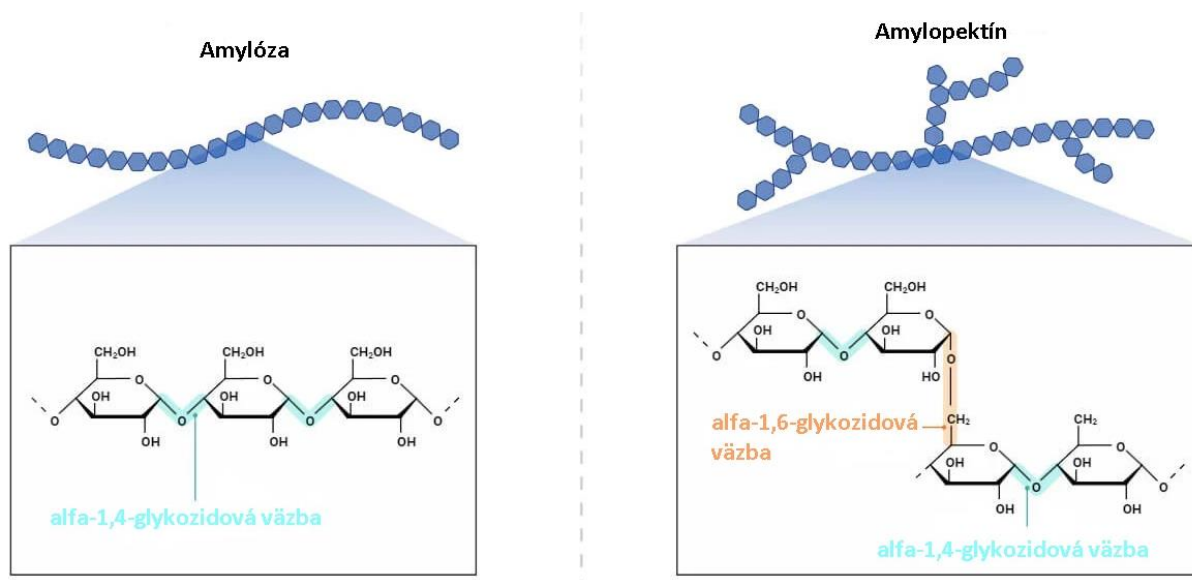
4.2.4 Škrob

4.2.4.1 Základná charakteristika škrobu

Škrob je syntetizovaný v amyloplastoch vyšších rastlín ako zásobná látka a zdroj energie. Na základe biologickej funkcie ho delíme na **prechodný a zásobný**. Vo fotosyntetizujúcich pletivách rastlín sa prechodný škrob akumuluje počas dňa v chloroplastoch a počas noci je následne transportovaný a hydrolyzovaný za účelom získania energie a substrátu pre rast a metabolizmus rastliny. V nefotosyntetizujúcich pletivách (endosperm zrna, hľuzy, rizómy) je zásobný škrob uchovávaný po rôzne dlhú dobu v špecializovaných plastidoch nazývaných amyloplasty. Škrob sa skladá z dvoch typov D-glukózových homopolymérov, amyulózy a amylopektínu (Obrázok 4.14).

Amylóza je tvorená dlhými nerozvetvenými reťazcami, v ktorých sú α -D-glukopyranózové jednotky pospájané α -(1-4) glykozidovými väzbami a 1 % väzieb pripadá na α -(1-6) väzby. Mw amylózy je približne 10^5 – 10^6 kDa a DP 324 až 4920. Vo vodnej disperzii sú dve susediace amyλόzové vlákna schopné vytvoriť dvojité helikálne kryštalické štruktúry a flexibilnú konformáciu náhodnej slučky. Amylóza je tiež schopná vytvárať jednoduché helikálne komplexy s mnohými chemickými látkami, ktoré obsahujú hydrofóbnu časť, ako napríklad alkoholy a MK. **Amylopektín** má rozvetvenú štruktúru tvorenú α -(1-4) a α -(1-6) väzbami. V molekule je približne 95 % α -(1-4) väzieb, vlákna sú kratšie ako vlákna amylózy a

obsahujú v priemere 25–30 glukózových jednotiek. Zvyšok tvoria α -(1-6) väzby. Mw amylopektínu je 10^7 – 10^9 kDa a DP je v rozmedzí 9600–15900. Vonkajšie vlákna zhlukov tvoria kryštalickú lamelu v škrobových granulách a vnútorné formujú amorfnú lamelu, čo spôsobuje, že škrob je semikryštalický.

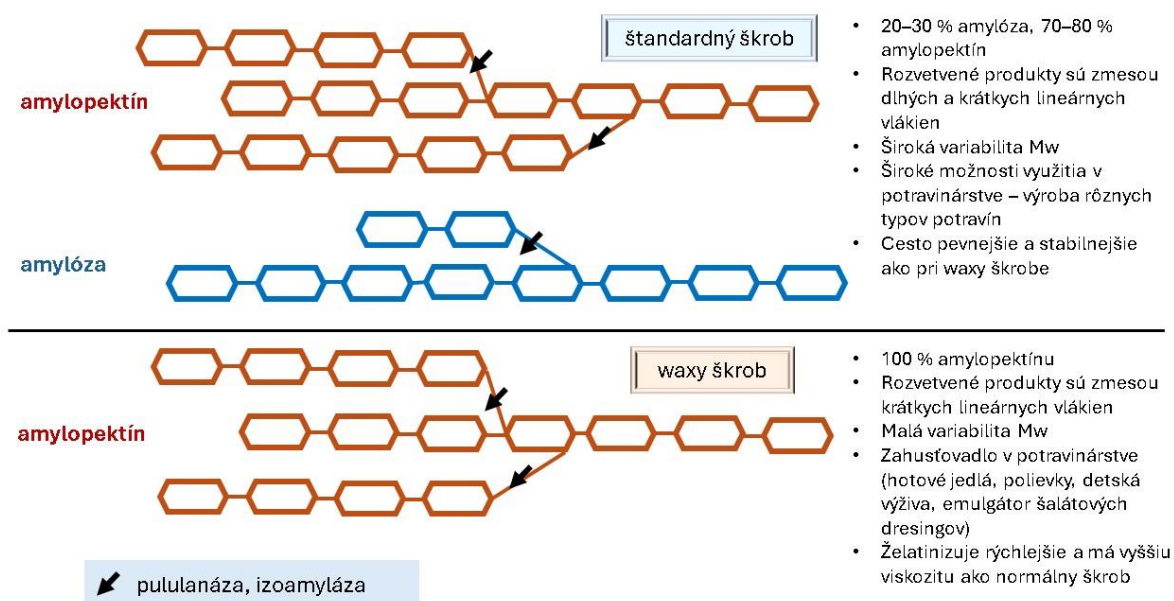


Obrázok 4.14: Chemická štruktúra škrobu s charakterom dvoch základných typov homopolymérov, amyulózy a amylopektínu (Zdroj: Shrestha, 2023, upravené).

Väčšina škrobov izolovaných z obilninových zŕn obsahuje aj lipidy vo forme fosfolipidov, ktoré sa nachádzajú na povrchu granúl (predovšetkým triglyceridy, menej voľné MK, glykolipidy a fosfolipidy) a aj v ich vnútri (monoacyl glyceroly) a vplývajú na špecifické vlastnosti škrobu. Obsah lipidov v škrobe a zloženie škrobových granúl sa mení v závislosti od rastlinného druhu a výrazne súvisí s obsahom amyulózy. Čím je vyšší obsah amyulózy, tým vyšší je obsah lipidov. Amylóza a amylopektín tvoria 98–99 % suchej hmotnosti granúl a zvyšok pozostáva z lipidov a minerálnych látok, kde je dominantný fosfor vo forme fosfátov esterifikovaných na glukózové hydroxyly.

Medzi hlavné zdroje škrobu v humánnej výžive patria obilniny a ľuľok zemiakový (zemiak, *Solanum tuberosum* L.). V niektorých krajinách je to maniok jedlý (*Manihot esculenta* L.). Obsah škrobu v zrelom zrne pšenice letnej sa pohybuje v rozmedzí 60–70 % a v zemiaku tvorí škrob 12–17 %. Štandardný škrob obsahuje v priemere 70–80 % amylopektínu a 20–30 % amyulózy. Tzv. **waxy** alebo **voskové škroby** sú tvorené predovšetkým amylopektínom a len 0 až 8 % predstavuje amylóza (Obrázok 4.15). Na druhej strane, **vysoko amyložové škroby** obsahujú až 40–90 % amyulózy a amylopektín tvorí zvyšok.

ROZVETVENÝ ŠTANDARDNÝ ŠKROB / WAXY ŠKROB



Obrázok 4.15: Porovnanie štandardného škrobu a waxy škrobu z hľadiska chemickej štruktúry a vybraných vlastností a aplikácií (Zdroj: autor).

Obsah amyulózy v škrebe vplýva na textúru cestovín. Prídavok škrobu z voskovej pšenice zvyšuje viskozitu škrobu a znižuje amylografický teplotný pík. Retenčná kapacita vody je v škrebe z voskovej pšenice približne 80 % v porovnaní so škrobom normálnej pšenice, kde je 55–62 %. Ak sa v zmesnej múke zvýši podiel škrobu z voskovej pšenice, zvýši sa súdržnosť a zníži sa pevnosť cesta, ale pružnosť sa nemení. Obsah amyulózy 11–20 % pozitívne koreluje s pevnosťou a negatívne s viskozitou, súdržnosťou a s číslom poklesu. Farinografické údaje z voskovej múky a z múky s vysokým obsahom amyulózy preukazujú oproti normálnej vyššiu väznosť vody a horšiu kvalitu múky. Chleby z nich sú menej kvalitné. Múka s vyšším podielom amyulózy má viac proteínov a lipidov. Cesto z nej je ťažké a viac viskózne, upečené bochníky majú podstatne menší objem. Škrob v tomto ceste želatinizuje pri nižšej teplote. Amylografické údaje ukazujú, že voskový škrob želatinizuje rýchlejšie a má vyššiu viskozitu ako normálny škrob. Cesto je menej pevné i stabilné v porovnaní s cestom z bežnej múky. Upečené bochníky sú však dlhšie mäkké. Zmenou pomeru amyulózy a amylopektínu v škrebe možno meniť aj textúru cesta. Amylopektín zväčšuje objem produktu a jeho krehkosť. Amylóza podporuje zachovanie tvaru a pevnosti cesta a chrumkavosť produktu.

In vitro štúdie dokázali, že niektoré škroby v potravinách nie sú v tenkom čreve stráviteľné v dôsledku rôznych faktorov, ako je štruktúra škrobových granúl, fyzikálne vlastnosti potravín, prítomnosť iných živín a antinutričných zložiek a spôsob spracovania.

Škrob v potravinách možno klasifikovať na základe tráviteľnosti ako pomaly stráviteľný škrob, rýchlo stráviteľný škrob alebo rezistentný škrob. **Rýchlo stráviteľný škrob** je množstvo škrobu stráveného enzýmami a absorbovaného do krvného obehu do 20 min po *in vitro* trávení. **Pomaly stráviteľný škrob** je množstvo škrobu, ktoré môže byť úplne stráviteľné v priebehu 20 až 120 min. Tretia skupina, definovaná ako **rezistentný škrob**, označuje škrob, ktorý nie je možné stráviť do 120 min v tenkom čreve a v čiastočne alebo úplne sa fermentuje v hrubom čreve.

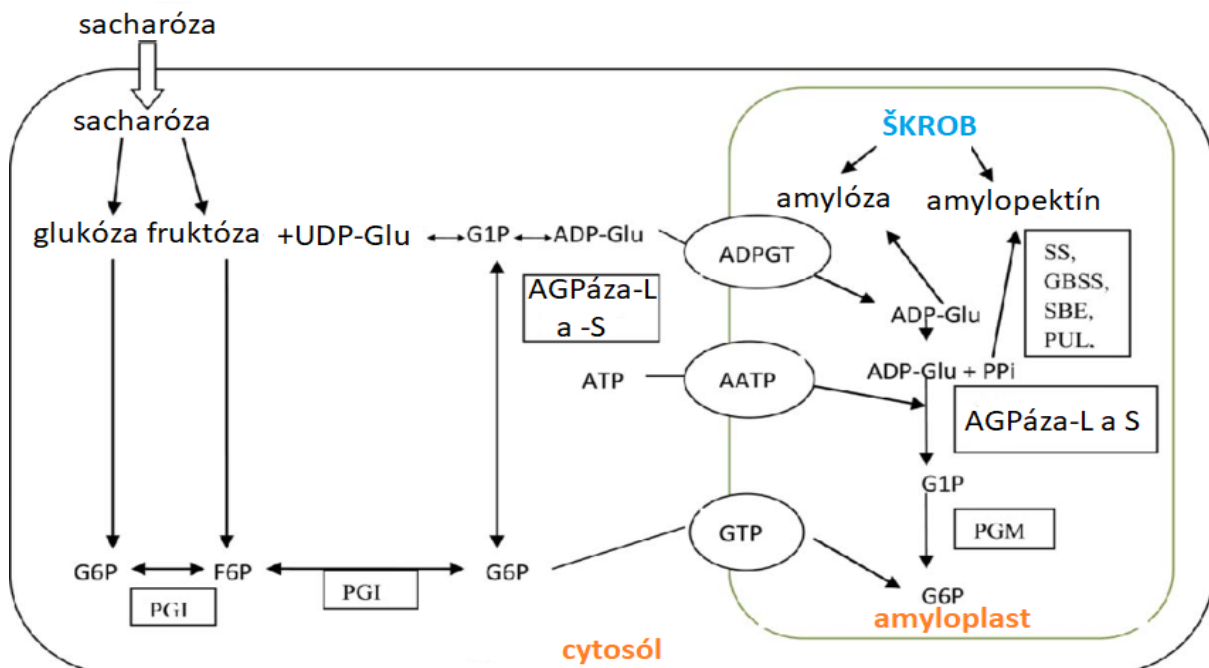
4.2.4.2 Biosyntetická dráha škrobu

Biosyntéza škrobu je proces komplexný a presne regulovaný a vyžaduje koordináciu viacerých enzýmov (Obrázok 4.16). **Syntéza škrobu *per se*** zahŕňa aktivitu predovšetkým štyroch kľúčových z nich: adenožín-difosfát glukózo-pyrofosforyláza (AGPáza), skupina enzýmov nazvaná súborne syntetáza škrobu (SS), enzýmy vetviace (SBE) a devetviace (DBE), kam sa zaraďujú aj disproporcionačné enzýmy.

AGPáza (E.C.2.7.7.27) ako úvodný enzým v biosyntetickej dráhe škrobu katalyzuje v amyloplastoch konverziu glukóza-1-fosfátu a ATP na ADP-glukózu a anorganický pyrofosfát. Táto reakcia je stimulovaná kyselinou 3-fosfoglycerovou a inhibovaná anorganickým fosfátom. **SS** (E.C.2.4.1.21) predlžuje polymér glukózy formovaním α -(1-4) väzieb a škrobová syntetáza viazaná na granule (GBSS) je enzým zodpovedný za syntézu amylózy a veľmi dlhých vlákien amylopektínu. GBSSI kóduje *waxy* lokus v obilninách a je kľúčovým enzýmom pre biosyntézu amylózy, pričom v zásobnom škrobe katalyzuje predlžovanie molekuly. GBSSII sa zapája do biosyntézy amylózy v listoch a v iných pletivách, a tento škrob nemá zásobnú funkciu.

Rozpustná škrobová syntetáza (SSS, označovaná ako SSSI, SSSII, SSSIII a SSSIV) je zodpovedná predovšetkým za syntézu amylopektínu a jeho distribúciu v plastide a varíruje v rôznych rastlinných druhoch. SBE (E.C.2.4.1.18) patrí do skupiny α -amylázových enzýmov, ktorých vetviaca aktivita je regulovaná Q-enzýmom, ktorý štiepi α -(1-4) glukánový reťazec a pripája ho znovu k prijímaciemu reťazcu pomocou α -(1-6) väzieb, čím vzniká vetvená klastrová štruktúra. DBE (E.C.3.2.1.41, E.C.3.2.1.68) predstavuje skupinu ďalších glukán-modifikujúcich enzýmov, ktoré sa vyskytujú ako typ izoamyláza (ISA) a pululanáza (PUL). ISA je aktívna predovšetkým pri veľkých molekulách fyto glykogénu a amylopektínu, kde hydrolyzuje α -(1-6) väzby v prípade potrebnej modifikácie nadmerne rozvetveného vlákna v klastrovej štruktúre a pravdepodobne taktiež poskytuje vetvené vlákna pre amylózu. PUL

zvyčajne štiepi α -(1-6) väzby molekuly na pululan a v menšej miere na amylopektín a nevykazuje takmer žiadnu aktivitu voči fytyglykogénu. Úlohou **disproporcionálnych enzýmov** je štiepiť krátke malto-oligosacharidy a produkovať glukózové jednotky, ktoré môžu byť použité na syntézu ADP-glukózy alebo ako zdroj energie v metabolizme rastliny.



Obrázok 4.16: Biosyntetická dráha škrobu v amyloplastoch obilninového endospermu so zobrazením kľúčových enzýmov. UDP-Glu = UDP glukóza, G1P = glukóza-1-fosfát, APD-Glu = APD glukóza, AGPáza-L a -S = adenosín-difosfát glukózo-pyrofosforyláza - veľká a malá podjednotka, G6P = glukóza-6-fosfát, F6P = fruktóza-6-fosfát, PGI = fosfoglucoizomeráza, SS = syntetáza škrobu, SBE = enzýmy vetviace molekulu škrobu, DBE = enzýmy devetviace škrob, GBSS = škrobová syntetáza viazaná na granule, PUL = pululanáza, ISA = izoamyláza, PHO = fosforyláza škrobu, PGM = fosfoglukomutáza, PPi = anorganický pyrofosfát (Zdroj: Fiaz a kol., 2019 a Huang a kol., 2021, upravené).

Všetky enzýmy zapojené do biosyntetickej dráhy škrobu sa vyskytujú vo viacerých izoformách a majú rôzne fyzikálno-chemické a imunologické vlastnosti a rôznu enzýmovú aktivitu. Gény zapojené do biosyntézy škrobu majú funkčné oblasti a/alebo miesta kontrolujúce syntézu škrobu relatívne vysoko konzervované. Génové, prípadne genómové duplikácie sú zodpovedné za rozdielnosť v počte izoformiem a štruktúrne analýzy týchto proteínov naznačujú, že delécie, prípadne mutácie aminokyselín na niektorých aktívnych miestach nesmerovali iba

do rozdielov v štruktúre, ale viedli tiež k zníženej funkčnosti, prípadne vzniku novej funkcie príslušnej izoformy.

Biosyntetická dráha škrobu v zelených rastlinách je pod kontrolou génov usporiadaných do komplexnej siete veľkých superrodín. **Tri hlavné stratégie produkcie rastlín** s požadovanými vlastnosťami zahŕňajú: i) zmenu expresie génov determinujúcich požadované znaky transgénnymi prístupmi, ii) klasické kríženie s využitím donorov požadovaných vlastností a iii) izolácia mutáciami získaných línií. Kvôli hexaploidnej štruktúre genómu pšenice letnej nie je izolácia mutantov so špecifickým fenotypovým prejavom jednoduchá a známych je iba niekoľko mutantov s cennými vlastnosťami. Pojem „**waxy**“, známy od roku 1994, označuje mutantu kukurice satej s nulovým podielom amylozy v škrobe a s prítomnosťou génu *AE* na dlhom ramene chromozómu 5, ktorého mutáciou dochádza k strate aktivity vetviaceho izoenzýmu SBEIIb a zvýšeniu obsahu amylozy v škrobe na 70 %. V ryži satej je obsah amylozy pod genetickou kontrolou prevažne lokusu *Wx* lokalizovaného na chromozóme 6 a tvoreného 14 exónmi a 13 intrónmi. Ryža siata divorastúceho typu s aktívnym GBSS obsahuje v škrobe okolo 25 % (*indica*) alebo 15 % (*japonica*) amylozy. Rozdiel v obsahu je spôsobený rozdielmi v alelických formách GBSS, pričom alela *Wx^a* (*indica*) vedie k vyššej hladine voskového proteínu a vyššej hladine amylozy v porovnaní s *Wx^b* (*japonica*). *Wx^a* obsahuje G (sekvencia AGGTATA) na 5'konci intrónu 1, čo vedie k vyššej akumulácii mRNA, vyššej produkcii GBSS, čím sa obsah amylozy v endosperme zvyšuje. Variabilita v obsahu amylozy v endosperme ryže satej môže byť spôsobená aj polymorfizmom dusíkatých báz G a T, pričom genotypy s nízkym obsahom amylozy obsahovali sekvenciu AGTTATA a vysokoamylozové AGGTATA. Ďalším faktorom súvisiacim s obsahom amylozy je polymorfizmus v exónoch 6 a 10 génu *Wx*.

V jačmeni siatom sú koncentrácie amylozy aj amylopektínu pod kontrolou predovšetkým lokusov *am1* (amyloza) a *waxy* na chromozóme 1HS (5S) a 7HS (1S), pričom v prípade amylopektínu je *waxy* epistatický voči *am1* a jeho mutácia ovplyvňuje aktivitu GBSS. Za obsah amylozy je zodpovedný tiež lokus *sex6* na 7H. *PWD*, jeden z najnovšie objavených génov identifikovaných pre amylopektín, fosforyluje C-3 pozíciu v škrobe, čím sa rozbaľuje štruktúra molekuly, ktorá sa stáva prístupnejšia pre degradačné enzýmy. Viaceré gény patriace do *GT* rodiny boli identifikované ako gény súvisiace s obsahom amylozy a amylopektínu, pričom tieto gény sú zodpovedné aj za akumuláciu rezistentného škrobu v jačmeni.

V pšenici satej je GBSS kódovaný tromi *waxy* lokusmi lokalizovanými na krátkom ramene chromozómov 7A (*Wx-A1* lokus), 7D (*Wx-D1* lokus) a na dlhom ramene chromozómu 4A (*Wx-B1*), pričom gény majú rôzny vplyv na obsah amylozy v škrobe. Nulová alela *Wx-B1b*

je spojená s najvyšším „waxy“ efektom, ktorý sa pozitívne odzrkadľuje na kvalite cestovín. Napríklad, waxy mutanty pšenice a línie bez SSIIa boli použité na vytvorenie dvojitej mutantnej línie s označením „sladká pšenica“, pričom tá akumulovala vo vyvíjajúcom sa endosperme sacharidy vo vysokých koncentráciách v dôsledku narušenia štandardnej biosyntézy škrobu.

4.2.4.3 Biotechnologické prístupy k produkcii modifikovaného škrobu

Škrob môže byť modifikovaný na rôzne produkty využiteľné v potravinárskom a nepotravinárskom priemysle (Obrázok 4.17). Špecifické fyzikálno-chemické vlastnosti molekuly škrobu predurčujú jeho aplikácie nielen v potravinárstvom priemysle pri príprave potravín a procese varenia, ale aj ako prísada pri výrobe liekov vo farmaceutickom priemysle, surovina potrebná pri výrobe priemyselných lepidiel, papiera, v textilom priemysle alebo výrobe etanolu.

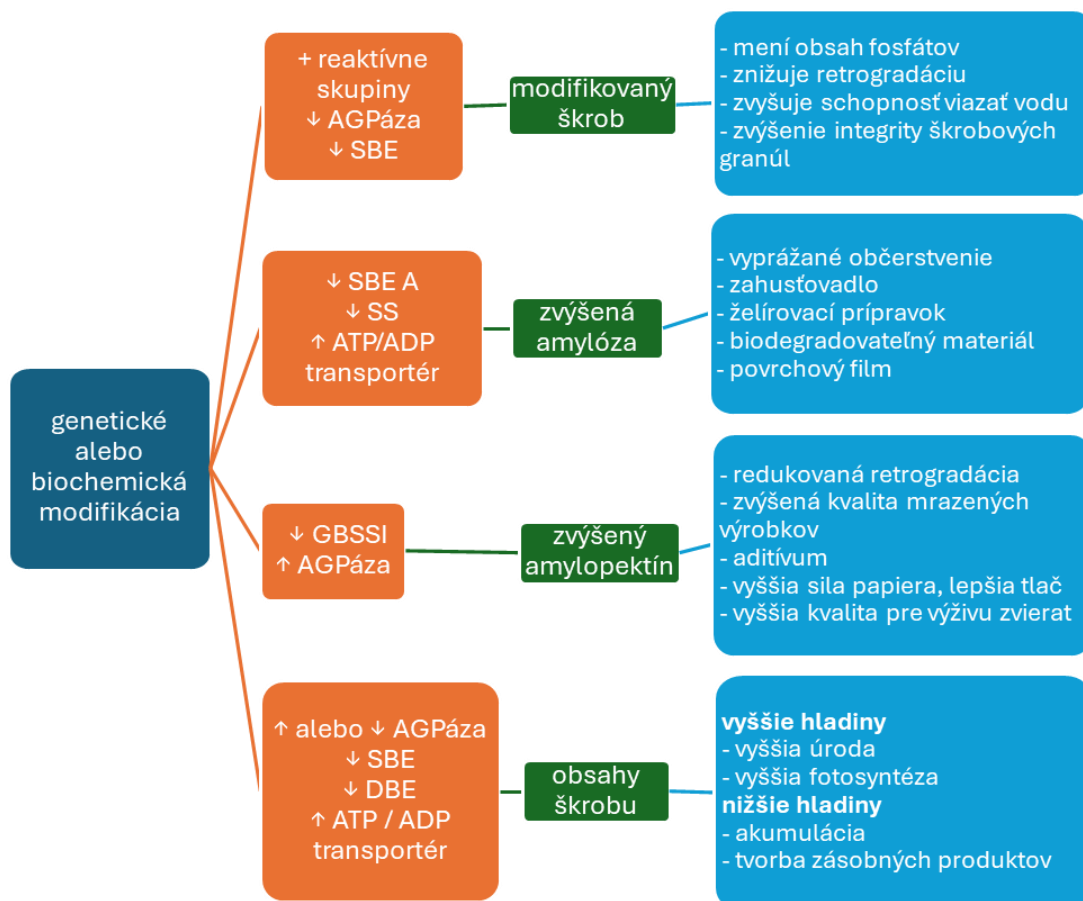


Obrázok 4.17: Priemyselné aplikácie a fyzikálno-chemické vlastnosti obilninového škrobu (Zdroj: Huang a kol., 2021, upravené).

Zloženie a z neho vyplývajúce vlastnosti predurčujú aj využitie zdrojov škrobu vo výžive zvierat. Priame využitie celej suroviny (ako zdroj škrobu – semená obilnín, hľuzy – zemiak, batáty, maniok) nevyžaduje predchádzajúcu izoláciu škrobu a predstavuje historicky najstaršie

postupy, ktoré sú základom takých samostatných odvetví potravinárstva ako pekárstvo, cestovinárstvo a liehovarníctvo. Izolovaný škrob nachádza v závislosti od typu vstupnej suroviny svoje uplatnenie v potravinárstve taktiež, ale aj v biotechnológiách a ako surovina pre chemický priemysel.

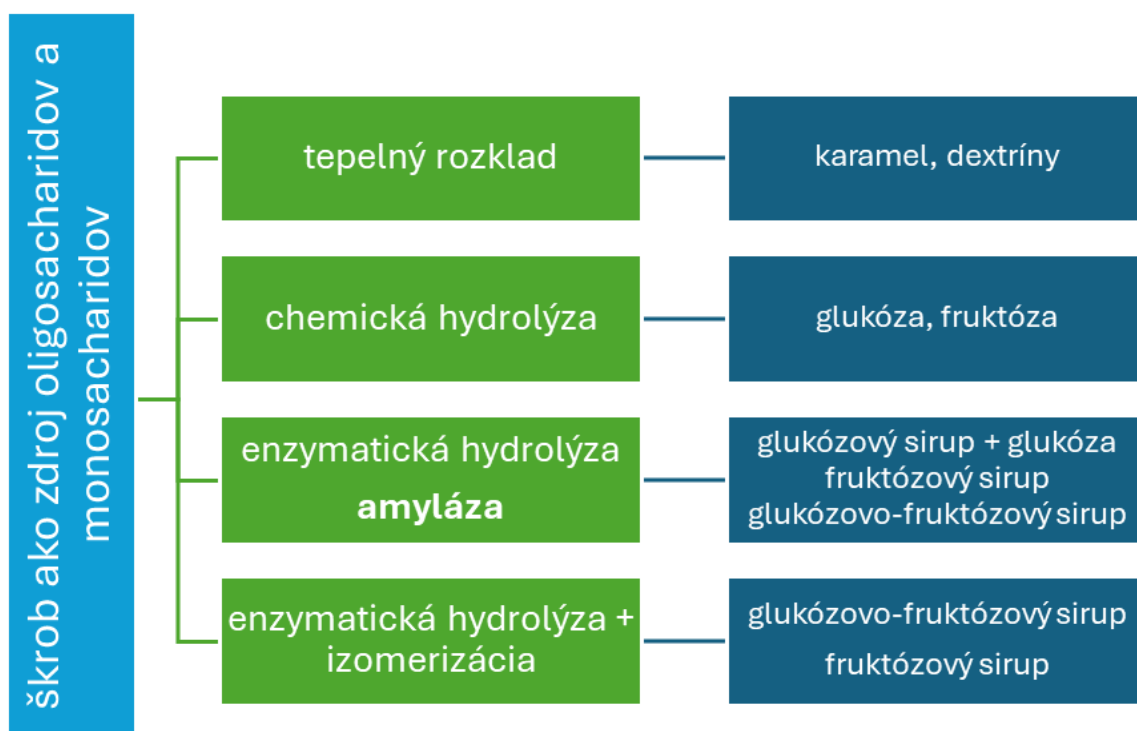
Poznaním biosyntetických a degradačných dráh škrobu sa *in planta* získali **škroby s novými vlastnosťami a funkciami**. Spôsoby modifikácie škrobu môžu byť okrem genetických ciest aj chemickými (degradácia, substitúcia, prestúpenie väzieb), fyzikálnymi (prežlatinizácia) a enzymatickými (degradácia) cestami. Cieľom týchto prístupov je zmeniť zloženie škrobu a tým zabezpečiť jeho požadované vlastnosti pre rôzne druhy konkrétnych aplikácií v rôznych odvetviac priemyslu. Ďalšími možnosťami, ako upraviť zloženie škrobu a tým zmeniť aj jeho fyzikálne a chemické vlastnosti, sú genetické a biochemické modifikácie (Obrázok 4.18). Biotechnologické prístupy sú do budúcnosti perspektívne vďaka širokému rozsahu aplikácií modifikovaných škrobov, relatívne jednoduchému mechanizmu ich získania a nízkemu negatívne mu dopadu na životné prostredie.



Obrázok 4.18: Pokrok v modifikácii škrobu pomocou genetických a biochemických postupov (Zdroj: autor).

Z hľadiska prístupov môžeme **biotechnologické mechanizmy úpravy škrobov** rozdeliť nasledovne: (1) syntéza nového škrobu manipuláciou endogénnych génov zapojených do biosyntézy a degradácie škrobu, (2) expresia heterologických génov kódujúcich biosyntetickú dráhu škrobu alebo modifikácia enzýmov na výrobu škrobov s novými vlastnosťami a funkciami a (3) priemyselná aplikácia vylepšených škrobov vytvorených biotechnologickou modifikáciou. Štruktúra škrobu výrazne ovplyvňuje jeho fyzikálno-chemické vlastnosti, akými sú stráviteľnosť, rozpustnosť, napučívanie, želatinizácia a retrogradácia a určuje jeho konečné využitie v rôznych priemyselných aplikáciách. Hlavnou snahou výskumu je hľadať spôsoby, ako ovplyvniť v škrabe zastúpenie amylózy a amylopektínu.

V biotechnológiách má veľký význam využitie škrobu ako zdroja oligosacharidov a monosacharidov. Tepelným rozkladom, chemickou hydrolyzou, enzymatickou hydrolyzou a enzymatickou hydrolyzou spojenou s izomerizáciou je možné získať produkty rôznej chemickej štruktúry a fyzikálno-chemických vlastností s rôznymi smermi využitia v potravinárskom priemysle (Obrázok 4.19).



Obrázok 4.19: Využitie škrobu a jeho produktov v biotechnológiách (Zdroj: autor).

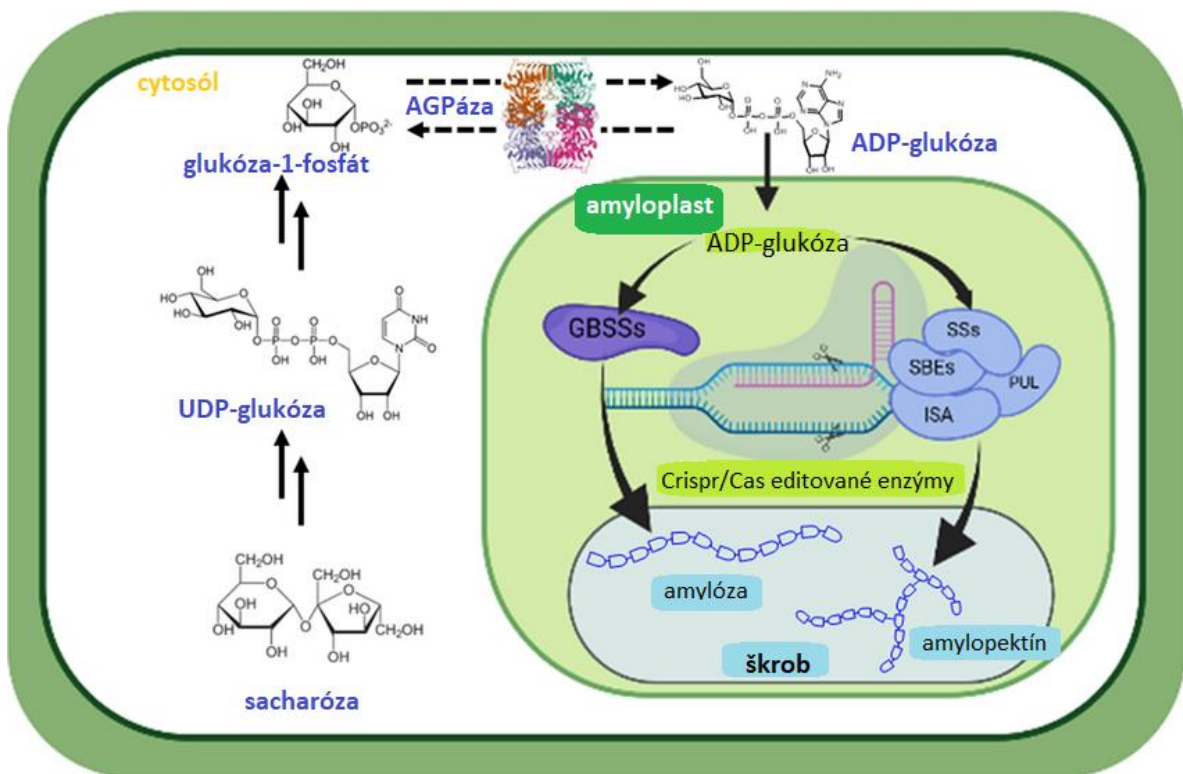
Škrub v hľuzách zemiakov je cieľom viacerých typov genetických modifikácií na rôzne účely. Skoršie modifikácie boli zamerané na úpravu vlastností škrobu na priame priemyselné využitie a nedávne modifikácie sú, na druhej strane, nasmerované na zmenu vlastností škrobu, aby sa znížili potenciálne škodlivé účinky konzumácie škrobu na jedincov náchylných na

obezitu a súvisiace stavy vrátane *diabetes mellitus* typu II. Zemiakový škrob je varením želatinizovaný a vysoko stráviteľný. Rýchla hydrolýza želatinovaného škrobu v hornej časti tráviaceho traktu spôsobuje výrazné zvýšenie hladiny glukózy v krvnom sére, čo môže viesť, v kombinácii s inými faktormi, k nevhodnej inzulínovej kontrole hladín cukru v krvi a obezite. Preto konzumácia zemiakov s obsahom menej stráviteľného škrobu (tzv. rezistentný škrob – bližšie popísané v kapitole 4.2.5) zlepši tieto účinky a prinesie aj zdravotné výhody tým, že poskytne vhodný substrát pre mikrobióm v nižších častiach tráviaceho traktu. Táto mikrobiálna fermentácia produkuje MK s krátkym reťazcom s priaznivými zdravotnými účinkami vrátane udržiavania optimálnej funkcie pankreatických beta-buniek, ktoré produkujú inzulín.

Pokusy **vytvoriť rezistentné škroby v rastlinách** sú zamerané aj na zvýšenie obsahu amylozy v škrebe. Amylopektín, hlavná zložka tvoriaca približne 70 % škrobu, je (1→4)-O-(α -D-glukopyranozidový) polymér, v ktorom približne na každých 25 glukózových jednotiek pripadá jedno rozvetvenie vytvorené (1→6)- α -glykozidovou väzbou, amyloza je (1→4)-O-(α -D-glukopyranozidový) polymér tvorený glukózovými jednotkami navzájom spojenými (1→4)- α -glykozidovou väzbou do lineárneho reťazca. Obsah amylozy v škrebe výrazne ovplyvňuje jeho funkčné vlastnosti. Počas želatinizácie a chladenia tvoria dlhé lineárne reťazce dvojité špirály, ktoré sa zhromažďujú do špecifických kryštálov. Tie sú odolné voči pôsobeniu α -amyláz v hornej časti tráviaceho traktu. Škroby s vysokým obsahom amylozy (a/alebo dlhých nerozvetvených reťazcov amylopektínu) sú vo všeobecnosti odolnejšie voči tráveniu v porovnaní so škrobmi s nízkym obsahom amylozy a inými dlhými lineárnymi reťazcami. Z tohto dôvodu je hlavným prístupom k zvýšeniu obsahu amylozy v škrebe zníženie aktivity SBE, ktoré zavádzajú α -1,6-väzby do škrobu. Prírodzene sa vyskytujúci škrob s vysokým obsahom amylozy, odolný voči tráveniu v kukurici vzniká v dôsledku mutácie (amylóza-extender alebo ae), ktorá eliminuje hlavnú formu SBE v endosperme. Tento fenotyp bol reprodukován v pšenici a ryži transgénnymi a konvenčnými prostriedkami, prípadne prostredníctvom mutagenézy sprostredkovanej CRISPR/Cas9 (Obrázok 4.20).

Výrazné zníženie aktivity SBE v hľuzách zemiakov má za následok produkciu škrobu s vysokým podielom amylozy a s výrazne zmenenými vlastnosťami a zníženou stráviteľnosťou. Takmer identické výsledky sa dosiahli rôznymi spôsobmi (pomocou antisense RNA, RNAi a expresiou jednodoménovej SBE so špecifickými protilátkami) zníženia expresie oboch izoforiem SBE (SBEI a SBEII), nakoľko eliminácia iba SBEI má slabý vplyv na štruktúru škrobu a eliminácia iba SBEII má za následok relatívne malé zvýšenie obsahu amylozy. Takto získaný škrob mal v úspešne transformovaných líniiach výrazne zvýšený obsah amylozy (viac ako 50 % v porovnaní s približne 30 % v hľuzách divorastúceho typu). Na druhej strane,

škrobové granule mali výrazne narušenú štruktúru, boli výrazne popraskané a rozpučané a ani pri varení nedokázali úplne želatinizovať, pričom normálna teplota želatinizácie je ~ 60 °C. Transformované rastliny sa tiež líšili od rastlín divorastúceho typu veľkosťou a tvarom hľúz, obsahom škrobu, vody a sacharidov v hľuzách, čo ovplyvnilo správanie škrobu pri varení. Rozdiely boli tiež v životaschopnosti rastliny a hospodárení s dusíkom. Transgénne hľuzy s vysokým obsahom amylózy znížili výrazne životaschopnosť rastliny, ale aj jej využitie vo výžive. V pšenici speje strata izoforiem SBE k zníženému objemu bochníka.



Obrázok 4.20: Ilustrácia krokov v biosynthetickej dráhe škrobu upravená pomocou CRISPR/Cas9. Zmeny viedli k zvýšenému obsahu škrobu v základných potravinách, ktoré sú populárne v rozvojových krajinách. Glukóza 1-fosfát sa premieňa na ADP-glukózu, substrát pre syntézu škrobu. Škrobová syntetáza viazaná na granule (GBSS), rozpustná syntetáza škrobu (SS), škrobový vetviaci enzým (SBE) a vetviaci enzým (ISA) sú kľúčové enzýmy, ktoré boli upravené. GBSS je zodpovedná hlavne za syntézu amylózy a bola upravená v ryži, zemiakoch a manioku. SBE bol upravený v manioku, zemiakoch a ryži. ISA1 je izoamylázový enzým dôležitý pri syntéze amylopektínu a bol upravený v ryži pomocou CRISPR (Zdroj: Adeyinka a kol., 2023, upravené).

Technológia CRISPR/Cas9 sa stáva v súčasnej dobe najefektívnejšou metódou na úpravu genómu mnohých druhov rastlín, vrátane dôležitých priemyselných plodín ako zemiaky. Touto cestou je možné generovať rastliny s mutáciami v génoch SBE a tak upraviť pomer amylózy a amylopektínu.

Moduláciou endogénnej génovej expzie sa dokáže zmeniť štruktúra amylopektínu v rôznych rastlinných druhoch. Napríklad, súčasná **downregulácia dvoch SS** (SSII a SSIII) v ľuľku zemiakovom (*Solanum tuberosum* L.) viedla k obohateniu kratších reťazcov a vyčerpaniu dlhších reťazcov amylopektínu, čo v konečnom dôsledku ovplyvňuje teplotu želatizácie škrobu a viskozitu. **Downregulácia troch SS** (GBSSI, SSII a SSIII) vytvorila škrob bez amylózy s amylopektínom s krátkym reťazcom, ktorý vykazoval vysokú stabilitu zmrazovania a rozmrazovania.

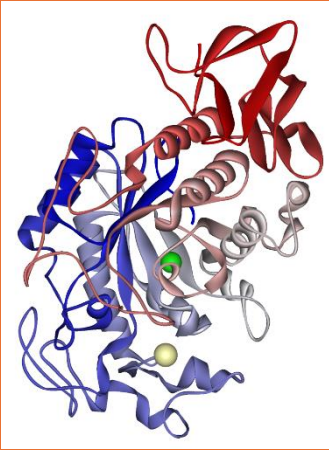
Za účelom získania škrobu s novou morfológickou štruktúrou škrobových granúl bol vnesený **enzým 4,6- α -glukanotransferáza (GTFB)** z *Lactobacillus reuteri* do ľuľka zemiakového. Línia bez amylózy (mutant amf) vykazovala významné zvýšenie veľkosti granúl a aj zvýšený obsah na škrob viazaného fosforu v porovnaní s kontrolou, zatiaľ čo škroby normálnej línie boli bez morfológických zmien a bez zmien v obsahu fosforu, ale vyznačovali sa vyššou stráviteľnosťou. Analýza transkriptómu odhalila existenciu mechanizmu na obnovenie pravidelného balenia dvojitych helixov v škrobových granulách, čo pravdepodobne viedlo k odstráneniu nových glukózových reťazcov potenciálne zavedených vnesenou GTFB. Tento enzým dokáže konvertovať škrob alebo škrobové hydrolyzáty na izomalto/maltopolysacharidy (IMMP) a prenesením neredukujúceho glukózového zvyšku α -1,4 glukánového reťazca na neredukujúci koniec iného α -glukánu vytvára prostredníctvom α -1,6 väzieb lineárny reťazec s α -1,6 väzbami. Enzým vetvenia glykogénu z *Escherichia coli* vnesený do mutantu zemiaka bez amylózy mal zase za následok o 25 % vyšší stupeň vetvenia amylopektínu.

Technologická kvalita pšenice sa určuje na základe množstva a kvality zásobných proteínov, škrobu a stavu sacharid-amylózového komplexu. Na druhej strane, obsah a kvalita škrobu vplýva na sladovnícku kvalitu jačmeňa. Nutričná hodnota škrobu súvisí so štruktúrou molekuly a s modifikáciami určujúcimi jej biologickú dostupnosť. Fyzikálno-chemické vlastnosti a štruktúra škrobových zŕn závisia od jeho zloženia. Snahou výskumu je hľadať možnosti ako ovplyvniť zastúpenie amylózy a amylopektínu v škrobe. Tvorba nových typov obilnín akumulujúcich vyššie koncentrácie škrobu v endosperme a produkujúcich škroby s novými polymérnymi vlastnosťami by mohla pomôcť riešiť na jednej strane zabezpečenie

potrieb pre udržanie rastu ľudskej populácie a zároveň na druhej strane minimalizovať škodlivé dopady ľudskej činnosti na životné prostredie.

So škrobom, najmä s jeho využitím ako priemyselnej suroviny, sú spojené aj enzýmy degradujúce škrob na jednoduché sacharidy. Technologicky mimoriadne využívanou je **α -amyláza** (Tabuľka 4.2). Enzým je využívaný v procese výroby piva a je všeobecne citlivá na vyššie teploty. Pri sušení sladiny dochádza k deaktivácii α -amylázy a asi 60 % z jej aktivity je eliminovaných v procese výroby sladu, čo obmedzuje využitie vstupného materiálu v procese kvasenia. Perspektívnym je prenos génov kódujúcich α -amylázu z termofilných baktérií do obilnín, hlavne jačmeňa siateho. Úspešná genetická transformácia génu pre α -amylázu z hydrotermálneho rodu *Thermococcus* aktívneho pri teplote až 85 °C do genómu jačmeňa so sladovníckou kvalitou je vhodným nástrojom na zvýšenie efektívnosti využitia jačmeňa siateho v pivovarníctve a prináša až 4-násobné zvýšenie aktivity α -amylázy pri teplote 75 °C v porovnaní s kontrolou.

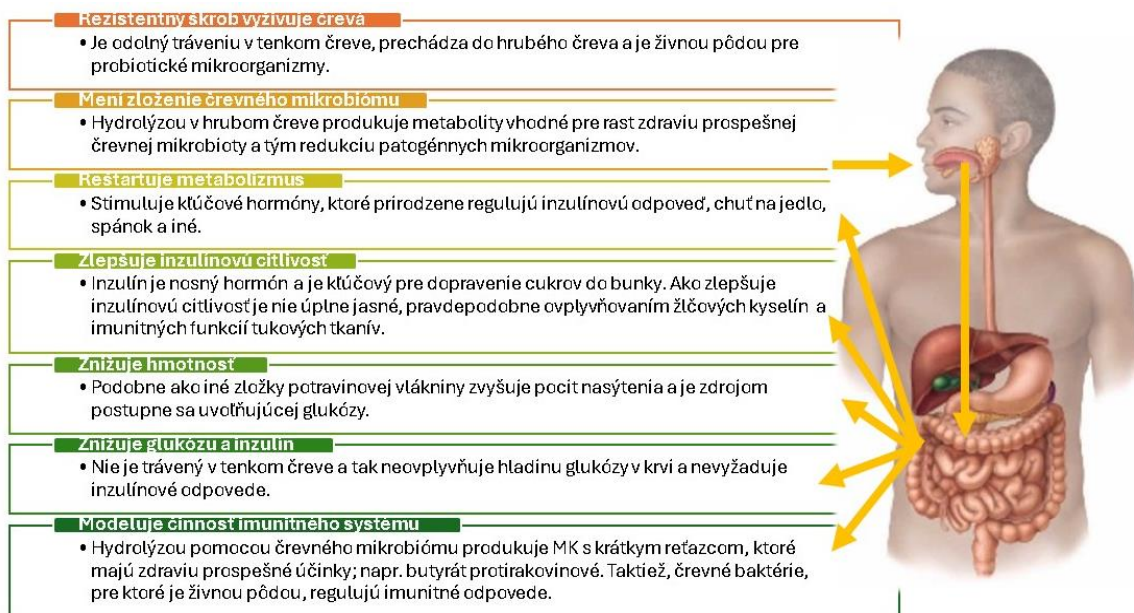
Tabuľka 4.2: Vybrané charakteristické vlastnosti α -amylázy, ako jedného z technologicky najvyužívanejších enzýmov (Zdroj: autor; 3-D-štruktúra enzýmu: wikipedia).

	<p>Katalýza hydrolýzy interných α-1,4-glykozidických väzieb škrobu na produkty glukóza a maltóza</p>
	<p>Prvýkrát objavená a izolovaná v roku 1833 A. Prayenom</p>
	<p>Najrozšírenejší extracelulárny enzým</p>
	<p>EC číslo: 3.2.1.1</p>
	<p>Mw = 51 až 55,4 kDa</p>
	<p>Produkovaná rastlinami, živočíchmi, mikroorganizmami</p>
	<p>Tráviaci enzým produkovaný pankreasom a slinnými žľazami (ptyalín)</p>
	<p>Iné názvy: glykogenáza, endoamyláza, 1,4-α-D-glukán glukanohydroláza</p>
	<p>V slade rozkladá obilninový škrob na dextríny a jednoduchšie cukry, hlavne maltózu</p>
	<p>Diastatická mohutnosť je ukazovateľom aktivity enzýmu</p>

4.2.5 Rezistentný škrob

4.2.5.1 Základná charakteristika rezistentného škrobu - definícia, vlastnosti, zdroje

Pojem **rezistentný škrob** bol zavedený koncom 20. storočia a definovaný je ako „škrob a jeho degradačné produkty, ktoré nie sú hydrolyzovateľné amylázami a pululanázami *in vitro* a v potrave ich zdravý človek nie je schopný absorbovať v tenkom čreve“. Rezistentnú časť škrobu tvoria lineárne molekuly amylozy, pretože majú schopnosť po tepelnom spracovaní retrogradovať do ťažko rozpustných útvarov. Rezistentný škrob zvyšuje nutričnú hodnotu potravín a má veľký význam pre zdravie človeka (Obrázok 4.21).



Obrázok 4.21: Dokázané zdraviu prospešné účinky rezistentného škrobu v ľudskom tele (Zdroj: autor).

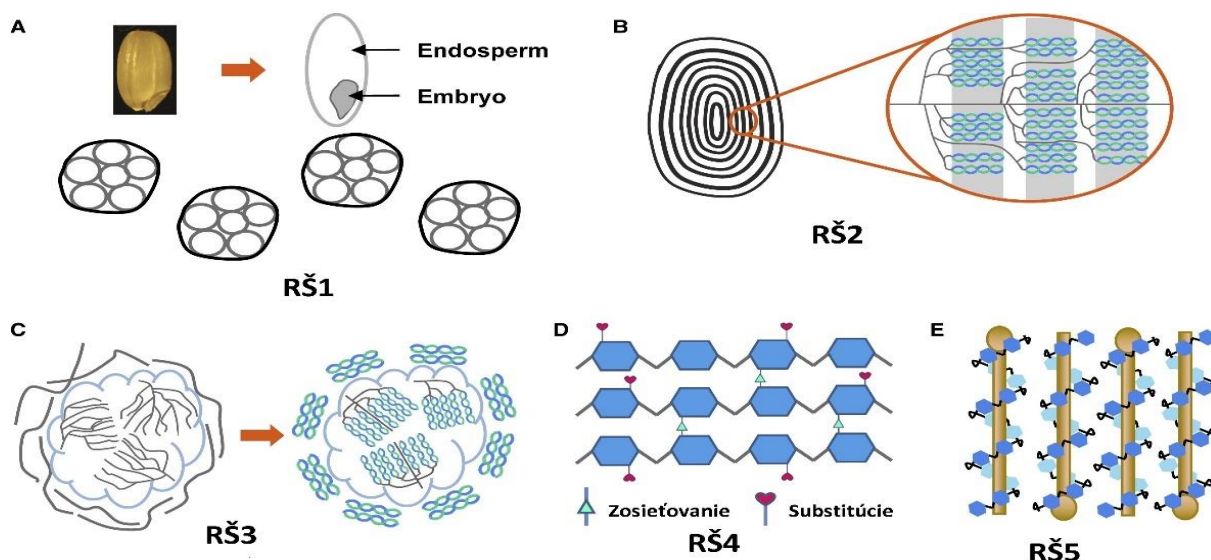
Na základe svojich vlastností a účinkov patrí rezistentný škrob medzi zložky potravinovej vlákniny. Je **vysoko odolný voči pôsobeniu tráviacich enzýmov v hornej časti tráviaceho traktu** a v čreve tvorí, vďaka svojim fyzikálno-chemickým vlastnostiam, akúsi bariéru s ochrannou funkciou. Črevná sliznica sa pri človeku propiónová a maslová), ktoré sú potrebné na normálnu fyziologickú funkciu čreva a sú vhodným substrátom pre probiotické mikroorganizmy. Napríklad, butyrát je pre kolonocyty významným zdrojom energie a zároveň

podporuje proliferáciu buniek v čreve a je vhodným substrátom pre fermentáciu črevnou mikrobiotou, najmä pre druhy *Fusobacterium* spp. a *Clostridium* spp.

Rezistentný škrob pomáha predchádzať zápalu čreva, dokonca sa opisuje jeho protektívny účinok pre vznik kolorektálneho karcinómu. Potraviny bohaté na rezistentný škrob majú nízky glykemický index (GI), preto sú vhodné pre diabetikov. Majú schopnosť v krvnom sére udržiavať v medziach normy hladinu glukózy, inzulínu, cholesterolu a triglyceridov a majú prebiotické účinky. Dlhodobé podávanie diéty s nízkym GI zdravým osobám má protektívny účinok pre vznik *diabetes mellitus* II. typu (nezávislý od inzulínu), kontrolu hmotnosti hlavne pri liečbe obezity a pre vznik kardiovaskulárnych chorôb.

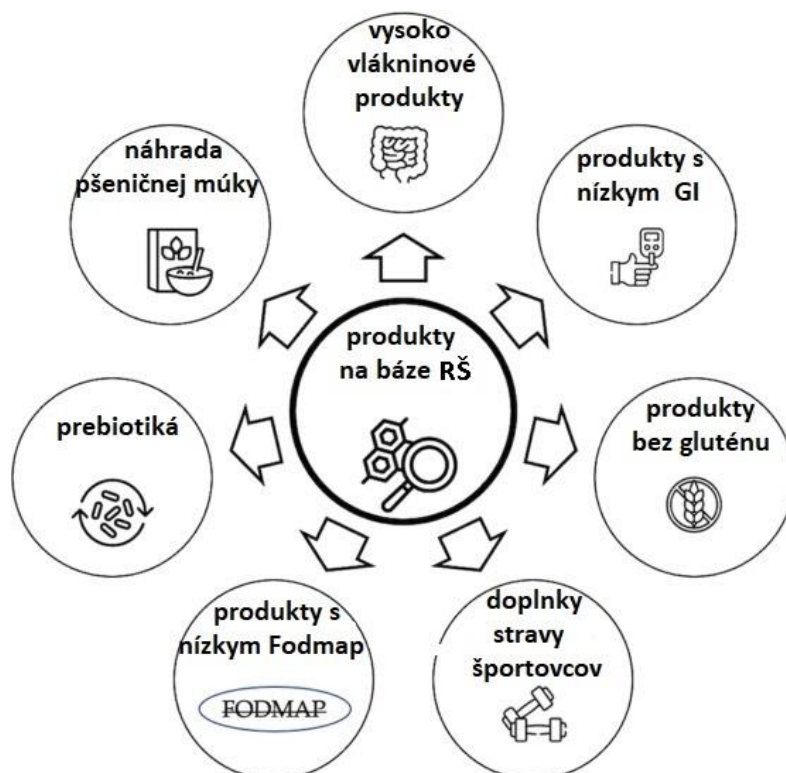
Rozlišujeme **päť druhov rezistentného škrobu** (Obrázok 4.22):

- **Typ I:** Fyzicky je nedostupný pre degradáciu amylolytickými enzýmami tráviaceho traktu a nachádza sa v plevách a šupkách celých zŕn, semien a strukovín.
- **Typ II:** Jeho primárna štruktúra a konformácia spôsobujú jeho prirodzenú odolnosť voči degradácii a má vysokú teplotu želatinizácie. Tento typ rezistentného škrobu sa nachádza v surových zemiakoch, zelených banánoch a kukuričnom škrobe s vysokým obsahom amylózy.
- **Typ III:** Má najväčší význam, je termostabilný, retrogradovaný alebo kryštalický škrob. Vzniká pri varení a pečení a následnom ochladení škrobových potravín procesom retrogradácie škrobu. Dlhé rozvetvené reťazce amylopektínu tvoria dvojité špirály, ktoré nemôžu byť hydrolyzované tráviacimi enzýmami Jeho zdroje sú napr. ryža, zemiaky, cestoviny a ovsené vločky.
- **Typ IV:** Je to typ škrobu, ktorý odoláva enzymatickej hydrolýze modifikáciou svojej pôvodnej molekulárnej štruktúry a pridaním určitých funkčných skupín chemickou modifikáciou (napr. esterifikácia, priečne väzby). Zdrojom takéhoto rezistentného škrobu sú potraviny s chemicky upravenými škrobmi (napríklad niektoré komerčne vyrábané chleby a pečivo).
- **Typ V:** Kombinácia dlhých a nerozvetvených škrobových reťazcov s voľnými MK tvoriaca ťažko stráviteľnú špirálovitú štruktúru, napr. rezistentný maltodextrín. Zdrojom tohto typu rezistentného škrobu sú potraviny obsahujúce prirodzene sa vyskytujúce komplexy amyulóza-lipid (napríklad chlieb s obsahom tuku ako prísady), potraviny, ktoré obsahuje umelo vyrobené komplexy amyulóza-lipid a tiež nový, neviskózný typ vlákniny, vyrobený zámerným preskupením molekúl škrobu - rezistentný maltodextrín.



Obrázok 4.22: Schematický náčrt rôznych typov rezistentného škrobu a ich štruktúr. A – predstavuje Typ I (RŠ1), B – Typ II (RŠ2), C – Typ III (RŠ3), D – Typ IV (RŠ4) a E – Typ V (RŠ5) (Zdroj: Shen a kol., 2022, upravené).

Aplikácie rôznych typov rezistentného škrobu sú vďaka jeho biologickým / zdraviu prospešným vlastnostiam, prípadne funkčným vlastnostiam v potravinárskom priemysle rôzne (Obrázok 4.23).



Obrázok 4.23: Možnosti aplikácie produktov na báze rezistentného škrobu v potravinárskej technológii (Zdroj: Bojarczuk a kol., 2022, upravené).

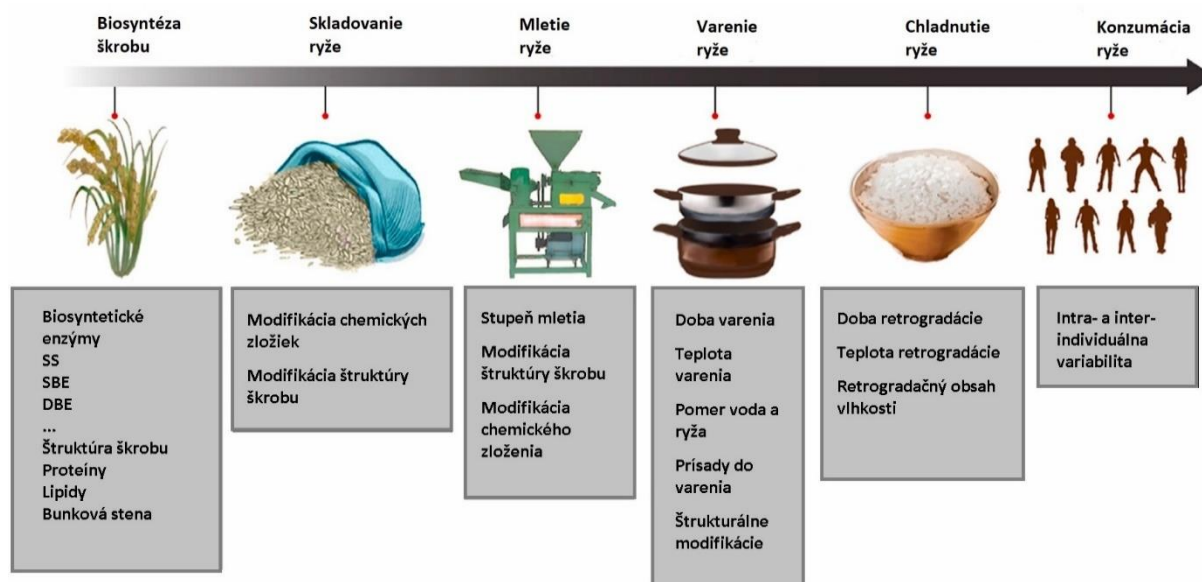
Skratka FODMAP napr. predstavuje skratku pre fermentovateľné oligosacharidy, disacharidy, monosacharidy a polyoly (sacharidy s krátkym reťazcom), ktoré sa vôbec alebo veľmi málo absorbujú v tenkom čreve a sú fermentované v hrubom čreve vďaka pôsobeniu črevnej mikrobioty. Tieto typy sacharidov sa nachádzajú v rôznych potravinách a medzi bežné zdroje FODMAP patrí pšenica, raž, strukoviny, rôzne druhy ovocia a zeleniny, mlieko, jogurty, med a podobne. Potraviny s vysokým podielom FODMAP môžu byť horšie trávené a spôsobovať tráviace problémy ľuďom trpiacim syndrómom dráždivého čreva (IBS), gastroezofageálnou refluxnou chorobou a intoleranciou na laktózu.

4.2.5.2 Fyzikálno-chemické vlastnosti, technologický vývoj a nové výhody rezistentného škrobu

Známych je niekoľko faktorov zodpovedných za zvýšenú odolnosť škrobu voči tráveniu, vrátane formy skladovaného škrobu a škrobových zŕn, typu škrobových granúl a ich veľkosti a korelácií medzi škrobom a inými látkami (napr. cukry, bielkoviny, rastlinné bioaktívne zložky, ktoré môžu inhibovať aktivitu α -amylázy). Medzi ďalšie faktory, ktoré ovplyvňujú obsah rezistentného škrobu v potravine, patria metódy spracovania potravín, ako je varenie, žíhanie (fyzikálna modifikácia škrobu vo vode pri teplotách nižších ako je želatinizácia), mletie, vysokotlakové spracovanie, autoklávovanie, extrúzia, ale aj podmienky a doba skladovania (Obrázok 4.24).

Neustále sa vyvíjajú tradičné metódy modifikácie škrobu, ako spôsob na zvýšenie obsahu rezistentného škrobu, ako aj nové technologické metódy na zlepšenie priemyselnej výroby rezistentného škrobu. Na zvýšenie obsahu rezistentného škrobu v potravinárskych výrobkoch sa najčastejšie používajú chemické a enzymatické metódy. **Enzymatické modifikácie** spôsobujú hydrolýzu škrobu, teda jeho rozklad na zlúčeniny s nižšou Mw. Je to primárny typ spracovania škrobu, ktorého výsledkom sú napríklad maltodextríny a sirupy. **Chemické modifikácie** sú zamerané na nahrádzanie hydroxylových skupín ($-OH$) v reťazcoch škrobu inými chemickými substituentmi. Škrob sa modifikuje procesmi oxidácie, esterifikácie a éterifikácie. Mení sa štruktúra makromolekúl škrobu, čo výrazne ovplyvňuje fyzikálno-chemické vlastnosti škrobu. Tieto chemické prístupy majú však isté nevýhody spojené s dlhými výrobnými časmi, možnými zmenami v kvalite produktu, nízkou reakčnou rýchlosťou a znečistením životného prostredia. Dôležitá je aj otázka bezpečnosti produktu, obzvlášť ak sa chemicky modifikovaný škrob následne využíva v potravinárskom priemysle. Na zvýšenie

obsahu rezistentného škrobu sa využívajú aj **fyzikálne metódy**. Nemajú škodlivé účinky na životné prostredie a sú ekonomicky výhodné. Ide hlavne o úpravu molekuly škrobu teplom a vlhkosťou, autoklávovanie a žihanie. Moderné fyzikálne metódy zahŕňajú vysoký hydrostatický tlak, mikrovlny, extrúziu a sonikáciu a môžu úspešne nahradiť vysokoenergetické a časovo náročné tepelné metódy modifikácie škrobu.



Obrázok 4.24: Faktory vplývajúce na obsah rezistentného škrobu v primárnej potravinovej surovine a procese jej spracovania. Ryža siata je uvedená ako príklad (Zdroj: Yi a Li, 2022, upravené).

Medzi novodobé metódy modifikácie škrobu patria aj **techniky genetického inžinierstva**, ktoré vychádzajú z poznania a pochopenia mechanizmov molekulárnej regulácie štruktúry škrobu. Na funkčné vlastnosti škrobu vplýva hlavne lineárna amylóza, preto je mnoho výskumov zameraných práve na genomické metódy výroby škrobu s vysokou hladinou amylózy a zvýšeným podielom rezistentného škrobu. Proces obmedzenia aktivity SBE v endosperme obilnín vedie k tvorbe heteromorfných granúl prostredníctvom tvorby antiparalelných amylózových dvojitéch helixov, ktoré prechádzajú následne do blízkych škrobových subgranúl v amyloplaste. V rastlinách ako pšenica, kukurica, fazuľa, jačmeň a waxy jačmeň koreluje obsah amylózy pozitívne s vývinom endospermu a štúdie pozorovali zvýšenie obsahu amylózy z 25 % na 75 %. Potrebné je však súčasne blokovať aktivitu dvoch izoforiem SBE.

Kalorická hodnota rezistentného škrobu v potravinách je v rozmedzí 2,4–2,9 kcal.g⁻¹ a je nižšia ako hodnota úplne stráviteľného škrobu (cca 4,2 kcal.g⁻¹). V porovnaní s inými zložkami potravinovej vlákniny má rezistentný škrob mnoho jedinečných fyzikálno-chemických

vlastností, ako napr. bez chuti a bez zápachu, biela farba a nižšia schopnosť zadržiavať vodu, vďaka čomu je použiteľný v rôznych potravinových výrobkoch ako funkčná zložka (Obrázok 4.25). Vďaka svojim neutrálnym sensorickým vlastnostiam môže byť rezistentný škrob súčasťou širokej škály potravinárskych výrobkov (napr. chlieb a pečivo), bez toho, aby to ovplyvnilo vlastnosti spracovania, chuť a vzhľad výrobkov.

Oficiálne odporúčania pre príjem rezistentného škrobu neexistujú. Množstvo prijímaného rezistentného škrobu s priaznivým vplyvom na zdravie definujú rôzni autori rôzne, napr. minimálne 14 % celkového škrobu, 6 g na porciu alebo 20 g denne. Niektoré štúdie preukázali, že príjem 6–12 g rezistentného škrobu v jedle by mohol byť prospešný pre hladinu postprandiálnej glukózy a inzulínu, prípadne 15–20 g v priebehu dňa je nevyhnutný pre zdravé trávenie a zvýšený objem stolice.

Rezistentný škrob sa komerčne prvýkrát vyrobil v roku 1993 v Austrálii z hybridu kukurice, ktorý obsahoval viac ako 80 % amylozy. Neskôr bol v USA patentovaný technologický postup na jeho výrobu. V dnešnej dobe je na trhu dostupných množstvo funkčných potravín na báze rezistentného škrobu. Produkty obsahujúce rezistentný škrob typu IV. sú napr. široko komercializované globálnymi spoločnosťami, ktoré ho vyrábajú zo zemiakov, pšenice, kukurice alebo tapiokov. Medzi výrobcov takýchto potravín patrí Ingredion vyrábajúci RS4 s názvom Versafibe 2470 z kukuričného škrobu s vysokým obsahom amylozy a Versafibe 1490 zo zemiakového škrobu. Roquette vyrába modifikované škroby nazývané CLEARGUM, ktoré sú využívané ako emulgátor a solubilizátor a spoločnosť Cargill produkuje škroby fosforylované, hydroxypropylované a iné formy rezistentných škrobov.



Obrázok 4.25: Fyziologické účinky rezistentného škrobu a jeho aplikácie v potravinárskom priemysle pri vývoji potravín (Zdroj: autor).

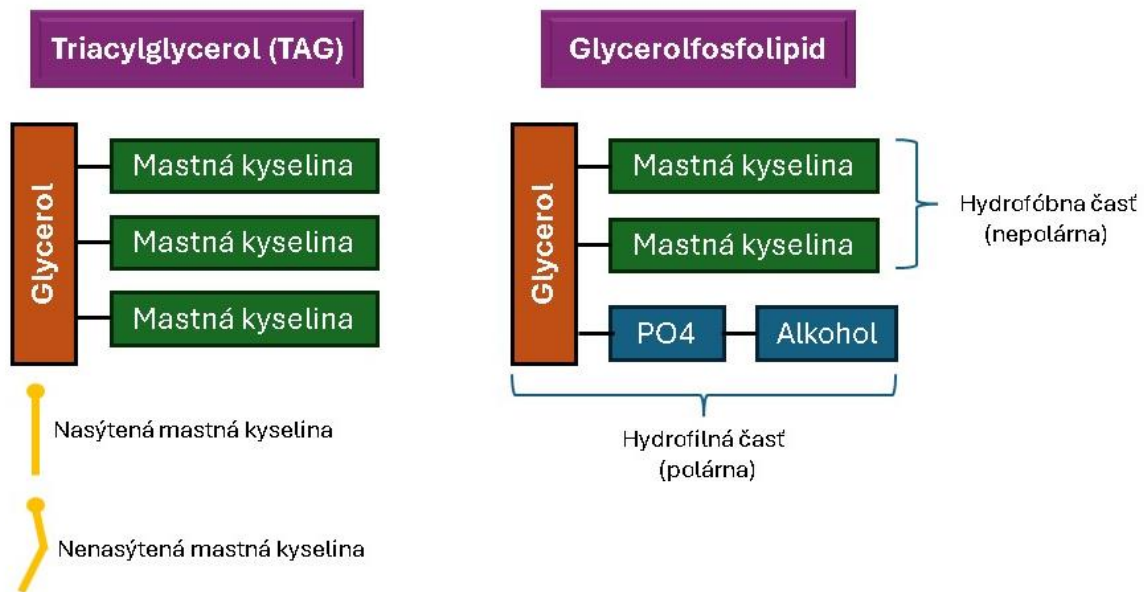
Modifikované rezistentné škroby sú komerčne dostupné na ľudskú spotrebu. Majú rôzne fyzikálno-chemické vlastnosti a rôzne typy aplikácií, napr. špeciálne potraviny pre športovcov, potravinové doplnky pre ľudí s glykemickými poruchami ako alternatíva k rafinovaným múkam (napr. skorocelový škrob), produkty s vysokým obsahom vlákniny (napr. NOVELOSE® 3490 dostupný na americkom trhu a zlepšujúci nutričný profil každodenných potravín ako biely chlieb, sušienky a cestoviny). Komerčné prípravky na báze rezistentného škrobu sú tiež vhodnou zložkou na zvýšenie podielu potravinovej vlákniny v bezpečných potravinách. Okrem pridávania do múky pri pečení chlebov a iných pekárskych výrobkov alebo cestovín, sa tieto prípravky pridávajú aj do nutričných tyčínok, raňajkových obilnín, nápojov, jogurtov, instantných polievok, omáčok a podobne. Obdobne ako aj iné zložky potravinovej vlákniny, znižujú kalorické zaťaženie potraviny a zvyšujú jej funkčnú a nutričnú hodnotu.

Nielen škrob, prípadne pomer amylózy a amylopektínu v škrobe, ale aj iné kvalitatívne parametre zrna pšenice letnej sú určujúce pre jej využitie v potravinovom priemysle a na pekárske účely. S cieľom zvýšiť nutričnú, prípadne funkčnú hodnotu výsledného chleba sa stále častejšie pripravujú tzv. **funkčné múky**, prípadne **kompozitné zmesi múk**. Pri ich príprave sa môže klasická pšeničná múka v istom pomere nahradiť múkou z iného natívneho zdroja (napr. ovos, jačmeň, pseudoobilniny), prípadne sa do múky pridávajú izolované zložky ako napr. β -D-glukán, inulín alebo škrob. Prídavky ako vysoko amylózový škrob a rezistentné škroby typu RS₂ a RS₃ boli pridávané k pšeničnej múke s pekárskou kvalitou v množstve 5 až 20 %. Do množstva 15 % (w/w) kompozitné zmesi múk spĺňali požiadavky na pekársku kvalitu a výrazne negatívne neovplyvnili výslednú senzorickú kvalitu bochníka, avšak vyššie prídavky redukovali kvalitu lepku, sedimentačný index a číslo poklesu. Všetky prídavky zvyšovali príjem vody cestom a redukovali stabilitu cesta a zároveň štatisticky preukazne zvyšovali hmotnosť a znižovali objem bochníka. Prídavok RS₃ spôsobil najvyšší obsah rezistentného škrobu vo finálnom výsledku.

4.3 Oleje a tuky

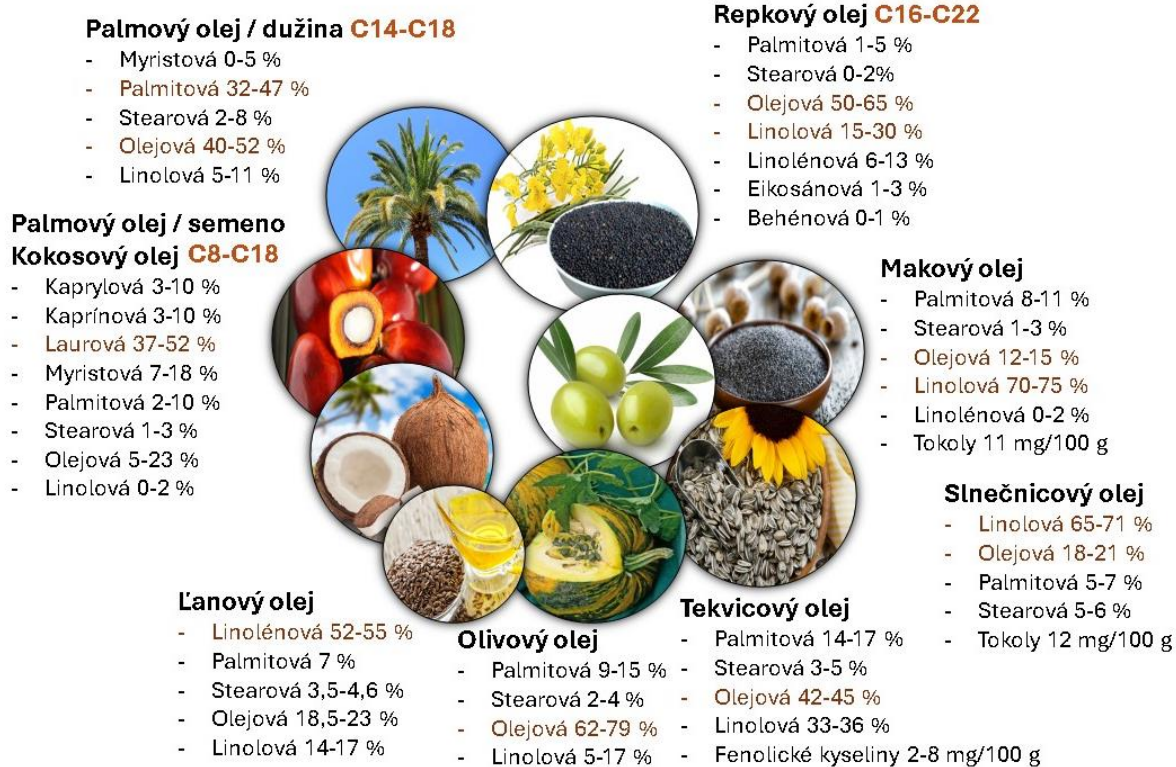
Lipidy sú estery vyšších karboxylových (nerozvetvených) kyselín (nasýtených alebo nenasýtených) a alkoholov, resp. ich derivátov. Alkoholovou zložkou je najčastejšie glycerol (1,2,3-propántriol), sfingozín (nenasýtený aminoalkohol odvodený od oktadekánu), inozitol, vysokomolekulové jednoduché alkoholy s nerozvetveným reťazcom, steroly. Molekuly lipidov

sú pomerne chudobné na kyslík (Obrázok 4.26). Patria do skupiny nepolárnych molekúl biogénneho pôvodu a do skupiny primárnych metabolitov.



Obrázok 4.26: Základná chemická štruktúra molekuly lipidov s rozdelením na triacylglyceroly a glycerolphospholipidy (Zdroj: autor).

Lipidy rastlinného pôvodu predstavujú takmer 90 % celkovej produkcie lipidov a sú nielen zdrojom esenciálnych MK v humánnej výžive (Obrázok 4.27), ale využívajú sa aj v produkcii biopalív a ako vstupná surovina chemického priemyslu. V živom organizme majú lipidy množstvo funkcií, napr. ako hlavná zložka bunkových membrán, ochranná bariéra voči biotickým a abiotickým vplyvom prostredia, zapájajú sa do signalizačných funkcií, v rastline sú zdrojom energie pre vyvíjajúci sa klíček, prípadne napomáhajú rozptyľovaniu semien. V živočíšnom organizme chránia pred stratou tepla ako aj pred mechanickým poškodením, zúčastňujú sa na stavbe nervových buniek a obaľujú nervové vlákna, vytvárajú prostredie pre látky nerozpustné vo vode (niektoré vitamíny, hormóny, liečivá, farbivá).

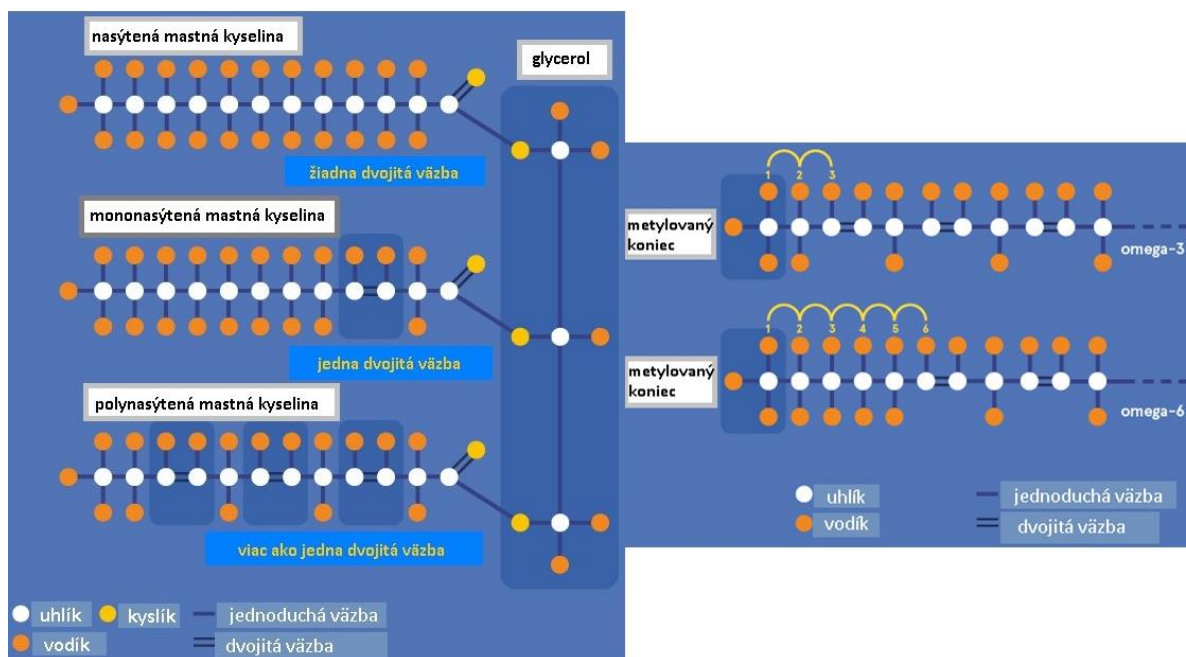


Obrázok 4.27: Vybrané rastlinné zdroje, ktoré reprezentujú príklady primárnych potravinových surovín bohatých na lipidy s hlavným obsahom derivátov lipidov ako sú MK a celkové tokoly (Zdroj: autor).

4.3.1 Nutrične významné mastné kyseliny a ich deriváty

Nutričná hodnota lipidov vyplýva zo zastúpenia mono- a polynenasýtených MK, ktorých potenciálom je zdraviu prospešný vplyv, ak je ich príjem v potrave zvýšený. Na druhej strane, nasýtené MK a cholesterol sú najviac uznávaný rizikový faktor v ľudskej strave a ich konzumácia by mala byť regulovaná.

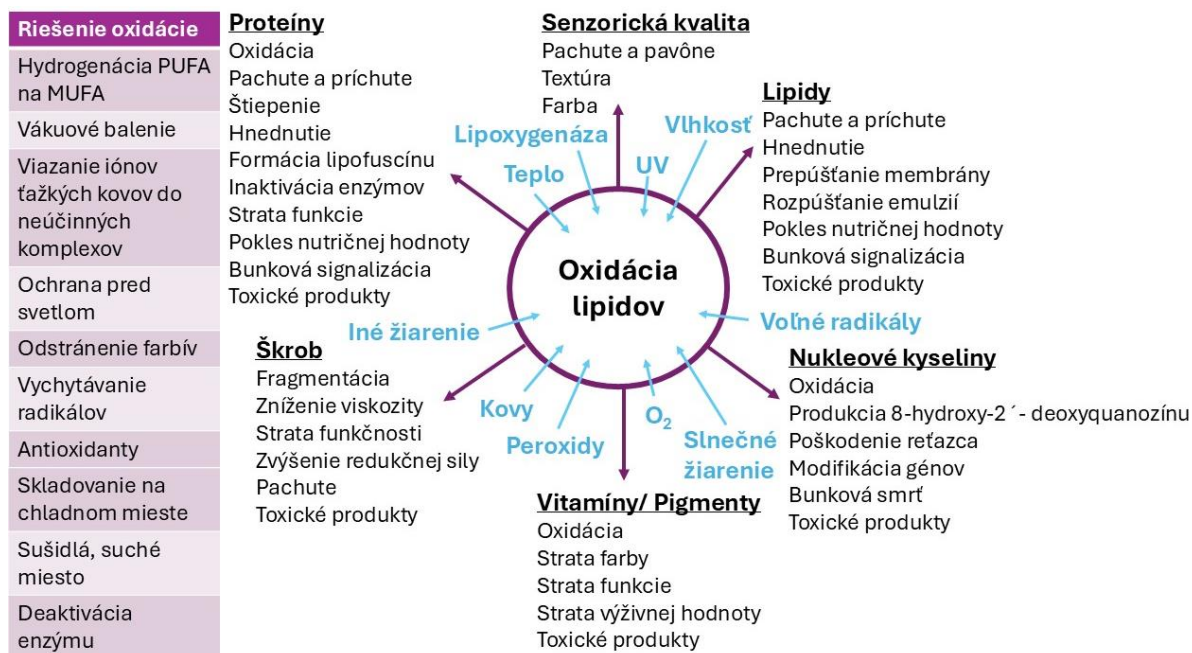
MK predstavujú 30–35 % celkového energetického príjmu a medzi ich najvýznamnejšie zdroje patria rastlinné oleje, rybí olej, mliečne a mäsové výrobky. V súčasnosti je známych viac ako tisíc MK, ale iba približne dvadsať z nich sa vyskytuje vo významnejšom množstve v tukoch a olejoch. Z hľadiska štruktúry sú MK uhlíkové reťazce s metylovou skupinou na jednom konci molekuly (ω) a karboxylovou skupinou na druhom konci. Vo všeobecnosti poznáme **tri hlavné skupiny MK**, nasýtené, mononenasýtené a polynenasýtené (Obrázok 4.28).



Obrázok 4.28: Klasifikácia mastných kyselín na základe výskytu a rozloženia dvojitej väzby (Zdroj: www.eufic.org).

Pomer nasýtených a nenasýtených MK je veľmi dôležitý z hľadiska výživy. V prípade nenasýtených MK existujú ω -9, ω -6 a ω -3 MK. **Esenciálne MK (ω -3 a 6)** človek nedokáže syntetizovať a preto ich musí prijať v potrave. Príkladom takýchto esenciálnych MK sú kyseliny linolová (ω -6) a alfa-linolénová (ω -3), ktorých vhodnými zdrojmi sú napr. rastlinné oleje, orešky a morské živočíchy. Nevyvážený pomer ω -3 a ω -6 môže viesť k rôznym zdravotným komplikáciám. Pre optimálny rast a vývoj organizmu sú veľmi dôležité ω -3 MK. Účinné sú v prevencii a liečbe ischemickej choroby srdca, vysokého krvného tlaku, cukrovky, rôznych autoimunitných a zápalových ochorení, taktiež v prevencii rakoviny a zodpovedné sú aj za poruchy správania. Pre správnu funkciu srdca a mozgu sú veľmi dôležité ω -6 MK.

Vysoké koncentrácie nasýtených MK sú nutrične nevýhodné, na druhej strane sú žiaduce pre stabilitu oleja. Čím má olej viac nenasýtených MK, tým ľahšie podlieha oxidácii. **Oxidácia lipidov** je proces oxidácie dvojitých väzieb nenasýtených MK vzdušným kyslíkom. Výsledkom tohto procesu sú nežiaduce produkty, hlavne peroxidy, aldehydy a ketóny, ktoré negatívne vplyvajú na organizmus a výrazne menia sensorický prejav, chuť a vôňu potravín, čím dochádza k ich znehodnoteniu (Obrázok 4.29). Tekuté oleje s vysokým podielom nenasýtených MK sú k oxidácii náchylnejšie ako tuhé tuky. Oxidácia môže vzniknúť pôsobením svetla, ultrafialového žiarenia, tepla, enzýmov a poškodením semena počas zberu. Dôležitú úlohu pri jej zabránení alebo oddialení zohrávajú antioxidanty, napríklad vitamíny skupiny E (tzv. tokoferoly), ktoré sa prirodzene vyskytujú v semenách rastlín v rôznych koncentráciách.



Obrázok 4.29: Dôsledky oxidácie lipidov na senzorické vlastnosti a chemické vlastnosti potravín, hlavné faktory spôsobujúce oxidáciu MK a spôsoby riešenia. PUFA = polynenasýtená MK, MUFA = mononenasýtená MK (Zdroj: autor).

Okrem MK sa v rastlinných olejoch nachádzajú aj iné minoritné látky so zdravotným benefitom, známe ako fytosteroly a fytostanoly. Zatiaľ čo cholesterol je hlavným sterolom v živočíšnych tukoch, fytosteroly a fytostanoly sú veľkou skupinou zlúčenín nachádzajúcich sa výlučne v rastlinách. Od cholesterolu sa líšia štruktúrou bočného reťazca. Komerčne sa **fytosteroly** izolujú z rastlinných olejov, ako je napríklad sójový, repkový, slnečnicový alebo kukuričný alebo z tzv. „surového talového oleja“, vedľajšieho produktu pri výrobe drevnej buničiny. Steroly sa môžu hydrogenovať, čím získame **fytostanoly**. Oba typy, fytosteroly a stanoly môžu byť esterifikované MK prítomnými v rastlinných olejoch. Najbežnejšími fytosterolmi a fytostanolmi sú sitosterol, sitostanol, kampesterol, kampestanol, stigmasterol, a brassicasterol. Príjem fytosterolov v potrave sa pohybuje v rozmedzí od 150 do 400 mg/deň v typickej západnej strave. Vo voľnej alebo esterifikovanej forme sa pridávajú do potravín, aby sa znížila absorpcia cholesterolu v čreve a tým aj jeho hladina v krvi. Denné dávky optimálne na účely zníženia hladiny cholesterolu v krvi sú 2–3 g fytostanolov a fytosterolov. Okrem toho sú známe ich protizápalové a antioxidantné účinky. Estery fytosterolov sa pridávajú do potravín cielene za účelom nielen zdraviu-prospešným, ale aj ochrany pred oxidáciou a na zvýšenie doby skladovania. Zvyšujú tak kvalitu rastlinných olejov, pridávajú sa tiež do mlieka, fermentovaného mlieka a výrobkov s bifidokultúrou (jogurty a jogurtové nápoje). Informácie o

obsahu sterolov v rastlinných olejoch majú taktiež využitie pri zisťovaní falšovania „panenských“ olejov a obsah vybraných sterolov je všeobecne akceptovaný ako jeden z najdôležitejších markerov na detekciu falšovania olivového oleja.

Adícia lipidov vodíkom (katalytická hydrogenácia karboxylových kyselín v lipidoch) na dvojitú väzbu slúži na prípravu stužených tukov z olejov. Hydrogenáciou sa nenasýtené karboxylové kyseliny menia z nenasýtených na nasýtené. V priemyselnej výrobe sa reakcia, ktorou pripravíme stužený tuk, volá stužovanie tukov a táto reakcia prebieha pri zvýšenom tlaku a za pôsobenia katalyzátora niklu alebo platiny.

Hydrolyzou acylglycerolov sa štiepi esterová väzba, pričom sa uvoľňujú molekuly karboxylových kyselín a glycerol. **Kyslá hydrolyza** vzniká pôsobením silných minerálnych kyselín. **Alkalická hydrolyza** je spôsobená hydroxidmi, pričom vznikajú sodné alebo draselné soli MK, ktoré sa nazývajú mydlá (preto sa reakcia nazýva zmydelnenie, saponifikácia). Enzymatická hydrolyza prebieha pomocou enzýmov označovaných ako **lipázy** alebo **esterázy**.

4.3.1.1 Biosyntéza lipidov

Metabolická dráha lipidov v olejninách je relatívne dobre preštudovaná. Rastliny efektívne využívajú reťazce centrálného metabolizmu na produkciu energie a substrátov metabolických dráh a tak znižujú vlastné zaťaženie pre biosyntézu lipidov, dokonca niektoré metabolické dráhy centrálného a lipidického metabolizmu sú v niektorých organelách zduplikované. Väčšina enzýmov katalyzujúcich tie isté alebo podobné reakcie sa preto vyskytuje vo viacerých izoformách a ich aktivita je často špecifická pre konkrétne miesto a vývinové štádium.

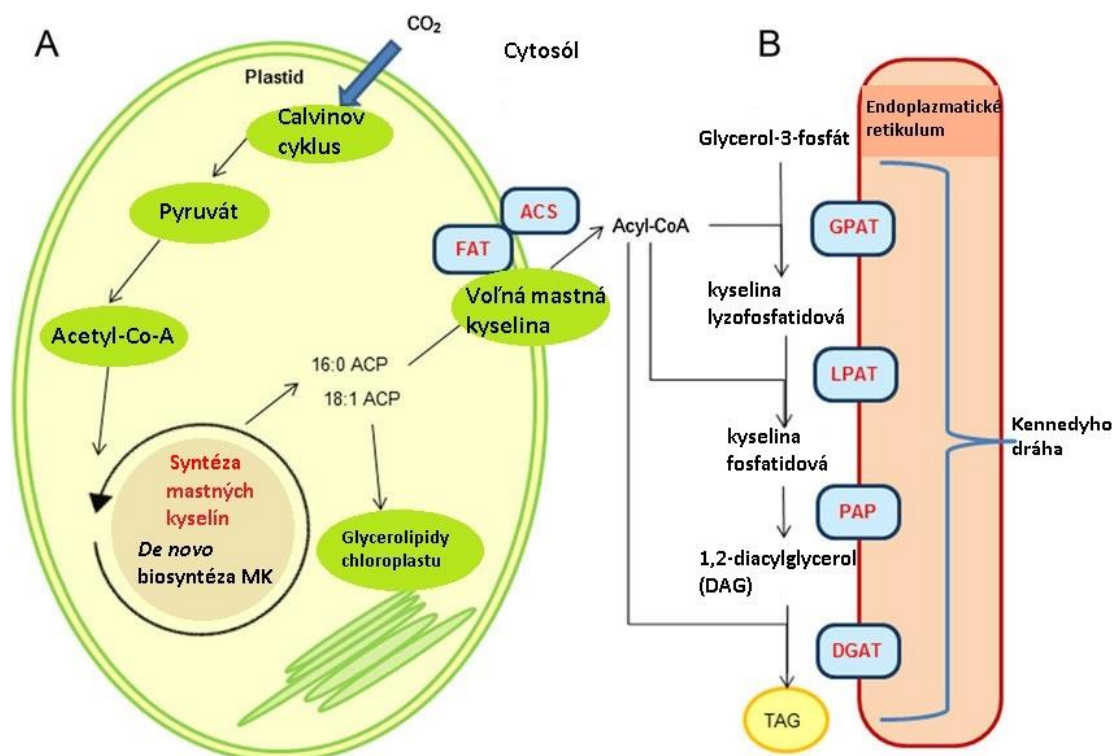
V semenách olejnatých rastlín dochádza počas reprodukčného rastu k premene fotoasimilátov na zásobné látky. Počas klíčenia fungujú lipidy ako substrát metabolických dráh zásobujúcich embryo energiou a uhlíkom nevyhnutnými pre rast klíčku. Hlavnou formou, v akej sú lipidy akumulované v semenách, sú **triacylglyceroly (TAGs)**. Ich biosyntéza v rastlinnom organizme môže byť sumarizovaná do troch nasledujúcich krokov: i) biosyntéza prekursorov MK, ii) biosyntéza MK v plastidoch a iii) zhromaždenie MK do glycerolového reťazca za účelom formovania TAGs, čo sa uskutočňuje predovšetkým v endoplazmatickom retikule.

Biosyntéza TAGs sa neuskutočňuje priamou lineárnou dráhou, ale vyžaduje komplexnú metabolickú sieť pri zapojení viacerých subcelulárnych kompartmentov, paralelných dráh a cyklov (napr. pyruvátový, malátový, oxaloacetátový) smerujúcich k produkcii

membránových lipidov a TAGs. Acetyl-koenzým A (acetyl-CoA) je intermediálnym prekursorom biosyntézy MK, pričom koncentrácia tohto metabolitu v plastidoch je približne 30–50 μmol , čo je dostačujúce pre syntézu MK len na veľmi krátky čas. Zásoby tohto prekursora sú však relatívne konštantné v svetlej i tmavej fáze fotosyntézy a rastlina dokáže veľmi rýchlo tvoriť acetyl-CoA v plastidoch. Väčšina acetyl-CoA je odvodená od glukóza-6-fosfátu a pyruvátu (resp. fosfopenolpyruvátu), ktoré sú transportované z cytoplazmy do plastidov. Tvorba ATP nevyhnutného na biosyntézu MK súvisí s typom pletiva, pričom fotosyntetizujúce bunky získavajú energiu okrem glykolýzy a pentózového cyklu aj z aktivity svetelného žiarenia.

De novo biosyntéza MK sa uskutočňuje v olejninách v stróme plastidov a na biosyntézu 16 a 18-C MK je potrebných približne 30 enzymatických reakcií. Prokaryotická dráha predstavuje integráciu frakcie acetylového reťazca do glycerolipidov produkovaných v plastidoch, prípadne môžu byť reťazce exportované do endoplazmatického retikula a využité na ďalšie reakcie ako predlžovanie reťazca, acylácia a uskladnenie (eukaryotická dráha). Včlenenie MK do glycerolových väzieb (Kennedyho dráha) sa uskutočňuje za prítomnosti rôznych enzýmov katalyzujúcich acyláciu na jednotlivých pozíciách acetyl-CoA, pričom záverečná acylácia na sn-3 pozícii je katalyzovaná diacylglycerol acetyltransferázou (DGAT) za tvorby TAG (Obrázok 4.30).

Prvý krok biosyntézy predstavuje tvorbu malonyl-CoA z acetyl-CoA a CO_2 za prítomnosti enzýmu acetyl-CoA karboxyláza, pričom reakcia prebieha v dvoch krokoch a biotín, kovalentne naviazaný k lyzínovému zvyškom enzýmu, funguje ako nosič CO_2 . Aktivovaný CO_2 je následne transportovaný na acetyl-CoA a dochádza k syntéze malonyl-CoA. Do biosyntetickej dráhy vstupuje acetyl-CoA nielen ako substrát pre acetyl-CoA karboxylázu, ale aj ako iniciátor kondenzačnej reakcie. Prenos malonylu z CoA pri tvorbe malonyl-ACP, ktorý predstavuje donora uhlíkov pre všetky následné elongačné reakcie, je katalyzovaný malonyl-CoA: ACP (acyl carrier protein, proteín prenášajúci acyly) transacetylázou. Po každej kondenzácii, kedy sa tvorí 3-ketoacyl-ACP, nasleduje redukcia, dehydratácia a opäť redukcia za tvorby 3-ketoacyl-ACP reductázy, 3-hydroxyacyl-ACP dehydratázy a enoyl-ACP reductázy. Po ďalších šiestich otáčkach v cykle vzniká primárny produkt dráhy katalyzovanej syntetázou, palmitát. Palmitát je prekursorom nasýtených i nenasýtených MK. Predlžovanie reťazca MK končí, keď je ACP oddelený od acylovej skupiny. Kombináciou elongačných a desaturačných reakcií vznikajú rôzne dlhé, nasýtené i nenasýtené MK. Pre tvorbu modifikovaných MK cez medziprodukt fosfatidylcholín sú opísané tri mechanizmy.



Obrázok 4.30: Zjednodušená schéma biosyntézy triacylglycerolov (TAG) vo vyšších rastlinných bunkách. (A) *De novo* biosyntéza MK je lokalizovaná v chloroplastoch, kde hlavné produkty syntézy MK sú 16:0-proteín prenášajúci acyly (ACP) a 18:1-ACP. Časť zostáva v chloroplaste pre syntézu glycerolipidov, napríklad pre lipidy tylakoidnej membrány, zatiaľ čo zvyšok sa exportuje do cytosólu pôsobením tioesterázy MK (FAT) na odstránenie ACP, následne syntézou acyl-CoA acyl-CoA syntetáza (ACS), oba enzýmy spojené s membránou. (B) Biosyntéza TAG prebieha v endoplazmatickom retikule prostredníctvom takzvanej Kennedyho dráhy. GPAT: glycerol 3-fosfát acyltransferáza; LPAT: acyltransferáza kyseliny lyzofosfatidovej; PAP: fosfatáza kyseliny fosfatidovej; DGAT: diacylglycerolacyltransferáza. (Zdroj: Radakovits a kol., 2010, upravené).

Vyprodukované TAGs sú akumulované v cytoplazme buniek zrelých semien vo forme **tukových kvapôčok**, pričom ich tvorba v rastlinných bunkách je menej preštudovaná v porovnaní s tvorbou v kvasinkách alebo v živočíšnych bunkách. Je však známe, že TAGs sa akumulujú medzi dvoma vrstvami membrány endoplazmatického retikula, kde oleozíny podporujú tvorbu vydutín. Obalová membrána kvapôčok je pravdepodobne formovaná jednou vrstvou fosfolipidov z membrány retikula a obalovým proteínom z oleozínov a následne uvoľnená do cytoplazmy. Veľkosť týchto sférických štruktúr je približne 0,2–2,0 μm .

Regulácia biosyntetickej dráhy lipidov a ich degradácia nie sú v rastlinách úplne objasnené. V olejninách sú tieto dráhy súčasťou procesu dozrievania semena, kedy dochádza k výraznej akumulácii zásobných látok. Je známe, že počas dozrievania sú dráhy biosyntézy MK a TAGs regulované na úrovni transkripcie. **Transkripčné faktory** sú aktívne iba počas dozrievania semena a sú neaktívne vo fáze vegetatívneho rastu rastliny. V rastlinách modelovej arábkovky Thálovej tieto transkripčné faktory zahŕňajú *LEC1*, *ABI3*, *FUS3* a *LEC2*, ktoré vytvárajú transkripčnú regulačnú sieť nazvanú LAFL, riadenú hormonálnou a metabolickou signalizáciou. Aktivácia LAFL je zabezpečená viacerými rôznorodými faktormi v skorých štádiách vývinu semena a závislá je aj od činnosti génov zapojených do biosyntézy alebo degradácie giberelínov. *MYB115* a *MYB118* sú ďalšie komplexy regulačných faktorov v endosperme vyvíjajúceho sa semena a indukované sú pomocou LAFL. Inými transkripčnými faktormi tlmiacimi LAFL s cieľom zabezpečiť vývoj klíčka sú VAL, transkripčný represor ASIL1, chromatín modifikované komplexy PRC1, PRC2, PRC3, CHD3 a SWI/SNF rodiny chromatín remodelujúcich faktorov kódovaných génmi *PKL*, *PKR2* a *BRM*. Indukcia *LEC2* vedie k rapídному zvýšeniu expresie génov zapojených do dozrievania semena a akumulácii zásobných látok a spolu s *ABI3* a *FUS3* sa *LEC* zapája do regulácie fázy dozrievania semena. *LEC2* a *ABI3* vykazujú synergické efekty na aktiváciu dozrievania indukovaním génu *OLE1*, ktorý kóduje proteín zapojený do akumulácie TAGs. Transkripčný faktor *WR11* je aktivovaný pomocou *LEC1* a kontroluje expresiu viacerých enzýmov zapojených do glykolýzy a biosyntézy MK.

Zloženie lipidických látok v rastlinných zdrojoch, ako aj celkový obsah lipidov sú závislé nielen od genotypu, ale ovplyvnené sú aj viacerými faktormi vonkajšieho prostredia. Svetlo pozitívne vplýva na akumuláciu lipidov, predovšetkým v súvislosti s fotosyntetickou aktivitou rastlinných pletív a schopnosťou produkovať uhlík, ale aj vďaka aktivácii viacerých enzýmov zapojených do biosyntetickej dráhy MK. Okrem toho, dostatok slnečnej energie počas rastu rastliny vedie aj k dostatočnému generovaniu kyslíka, pričom ten je nevyhnutný pre realizáciu metabolických aktivít vyvíjajúcich sa štruktúr v rastline. Teplota je ďalší faktor vonkajšieho prostredia ovplyvňujúci obsah lipidov a profil MK v rastline, napr. reguláciou aktivity desaturáz na transkripčnej a posttranskripčnej úrovni. Mnohé výskumy potvrdili, že rastliny v dôsledku teplotného stresu akumulujú polynenasýtené MK a zvýšenie koncentrácie triénov je v pozitívnej korelácii s toleranciou rastlín na chlad. Tolerancia rastlín na sucho a s tým súvisiace zasolenie sú vo vysokej miere závislé od nenasýtenosti MK a geneticky podmienenej schopnosti rastliny udržať si túto charakteristiku a regulovať ju. Na druhej strane, nedostatok

vody spôsobuje inhibíciu biosyntetickej dráhy MK, dochádza k stimulácii lipolytickej a peroxidatívnej aktivity a celkovému poklesu obsahu lipidov v membránach.

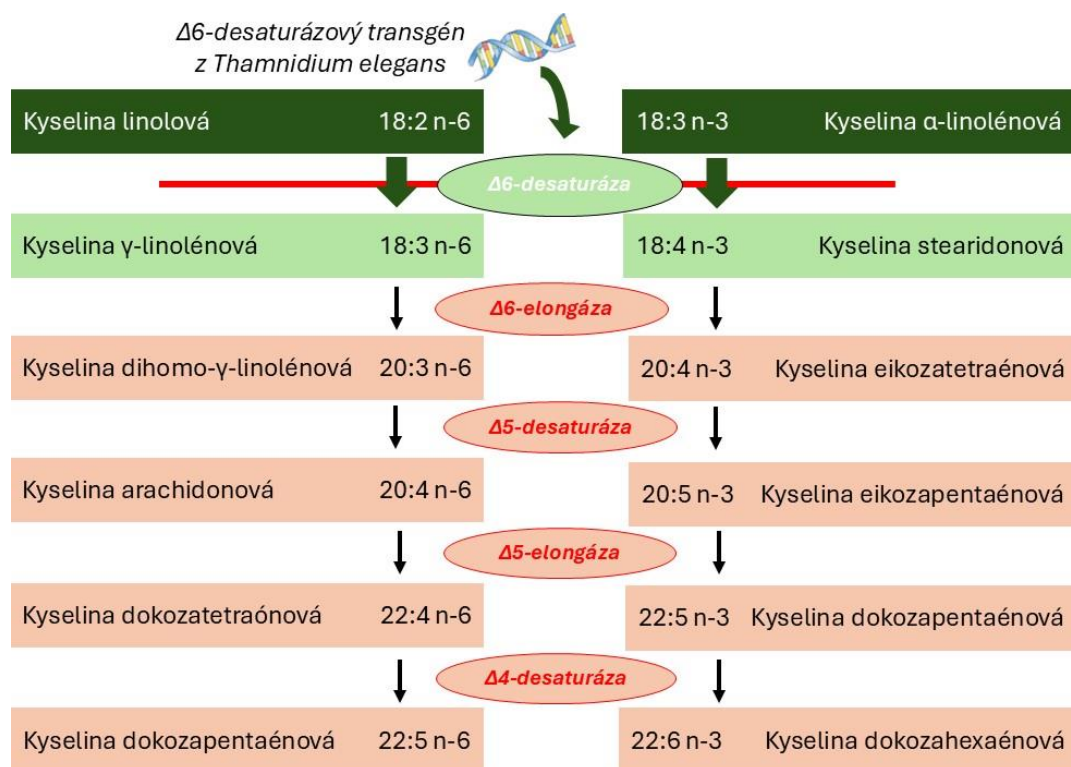
4.3.1.2 Genetická modifikácia rastlinných olejov pre potravinárske aplikácie

Vzhľadom na neustále rastúcu ľudskú populáciu a čoraz obmedzenejšie prírodné zdroje je jednou z hlavných výziev dnešnej doby zabezpečiť pre ľudí dostatok potravín. Takmer miliarda ľudí na celom svete stále trpí hladom alebo podvýživou a práve lipidy sú veľkou skupinou makroživín v strave, ktoré poskytujú energiu a zabezpečujú rôzne fyziologické funkcie v našom tele. Nedostatočný príjem lipidov môže viesť k nedostatku esenciálnych mastných kyselín a vitamínov rozpustných v tukoch, čo je spojené s rôznymi ľudskými patológiami a poruchami, vrátane imunitnej nedostatočnosti, srdcovo-cievnych ochorení, problémov so zrakom a rôznymi zápalovými reakciami. Rastliny a zvieratá sú tradičnými zdrojmi potravinových lipidov, ale vzhľadom k narastajúcej konkurencii o pôdu, vodu a iné zdroje existuje pri zachovaní bezpečnosti a výživy potreba vyvinúť alternatívne zdroje lipidov v strave.

V rastlinách viac ako 60 % olejov pochádza zo semien, zatiaľ čo iné pletivá (napr. vegetatívne) oleje bežne neakumulujú. Vzhľadom na ich vysokú biomasu existuje veľký záujem o zvýšenie produkcie oleja v nich. Okrem rastlín aj **olejnaté mikroorganizmy** sú schopné akumulovať veľké množstvo lipidov (20–90 % suchej hmotnosti buniek) a zostaviť požadované MK do lipidových molekúl. Komerčne žiaduce lipidy, bohaté na polynenasýtené MK, sú v nich často prítomné v nízkych hladinách a vo všeobecnosti sa miešajú s lipidmi malého komerčného záujmu, preto sa v rastlinách, mikroriasach a iných mikroorganizmoch využívajú rôzne stratégie **metabolického genetického inžinierstva** na zlepšenie produkcie oleja a výrobu olejov s požadovanou hodnotou pre potravinárske účely. Ďalším extrémom je, že svet čelí rastúcej epidémii obezity a s ňou súvisiacim poruchám. Príčinou je vysoká spotreba TAG s nízkou nutričnou hodnotou. Výskumy ukazujú, že **funkčné lipidy** ako diacylglyceroly (DAG), štruktúrované TAG (ST) a štruktúrované fosfolipidy (SPL) sa vyznačujú lepšou nutričnou a preventívno-terapeutickou hodnotou. Napriek tomu sú tieto prospešné zložky v prírodných lipidoch prítomné v nízkych koncentráciách a bežne sa využívajú chemické a enzymatické metódy na ich produkciu. Chemické prístupy sú však menej akceptované spotrebiteľmi v porovnaní s enzymatickými a aj z dôvodu tvorby nadmerného množstva vedľajších produktov. Enzymatická úprava zloženia a/alebo polohy MK v lipidoch preto predstavuje efektívny prístup k splneniu špeciálnych nutričných a zdravotných požiadaviek.

Vďaka poznaniu biosyntetickej dráhy lipidov a génov kódujúcich ich obsah je dnes možné úspešne, a často aj s komerčným využitím, **manipulovať genetickou výbavou rastliny**. Arábkovka Thalova, kapusta repková pravá a ľaničnik siaty sú rastlinné druhy najčastejšie využívané na úpravu obsahu celkových lipidov, prípadne vybraných lipidických frakcií v listoch, semenách alebo semenáčikoch. Manipulácia s konkrétnymi génmi viedla úspešne ku zvyšovaniu obsahu kyselín olejovej, palmitovej, stearovej a MK so stredným reťazcom v semenách alebo k akumulácii nie bežne sa vyskytujúcich MK v rôznych častiach rastliny. V rámci obilnín je vďaka up-regulácii génov *ZmWRI1*, *ZmLEC1* a kombinácii génov *DGAT1* + *WRI1* + *OLE* publikovaná úspešná genetická úprava s cieľom zvýšiť obsah celkových lipidov v semene a listoch kukurice siatej. Sója fazuľová, slnečnica ročná a kapusta pravá repková sú plodiny komerčne využívané s geneticky upraveným vyšším obsahom kyselín laurovej a olejovej, prípadne ω -3 a ω -9 MK. Trendom biotechnologických prístupov je taktiež **zvyšovať v rastlinných zdrojoch podiel esenciálnych MK** nevyhnutných v humánnej výžive s funkciou prevencie mnohých ochorení, nakoľko terestriálne zdroje sú prístupné limitovane. Vďaka poznaniu biosyntetickej dráhy MK je možné genetickou transformáciou do nej vstupovať a pomocou génov kódujúcich ω -3 desaturázu, D6-desaturázu, elongázy a acetyl-transferázy **zvyšovať zastúpenie polynenasýtených MK** v zrnách obilnín. Za ostatných 25 rokov sa podarilo zvýšiť obsah kyselín eikozapentaénovej, dokozaheptaénovej, alfa-linolénovej a gama-linolénovej v zrnách ryže siatej, jačmeňa siateho, pšenice letnej, prípadne kukurice siatej, čo je sľubný prístup pre produkciu inovatívnych potravín s vyššou nutričnou a preventívno-terapeutickou hodnotou, ale zároveň prínos pre zvyšovanie tolerancie obilnín na chlad. Prvou bariérou, ktorú treba prekonať na ceste k syntéze esenciálnych polynenasýtených MK v obilninách, je absentujúca **D6-desaturáza** (Obrázok 4.31). Vloženie génu kódujúceho D6-desaturázu umožní urobiť „bypass“ v dráhe smerujúcej od kyseliny linolovej a α -linolénovej k 18C kyselinám γ -linolénovej a stearidonovej a následne aj k ďalším 20C a 22C polynenasýteným MK. Táto stratégia sa ukázala ako funkčná pri jačmeni aj pšenici.

Inou možnosťou je zásah do biosyntetickej dráhy MK **tvorbou geneticky modifikovaných rastlín produkujúcich acetylované TAGs**. Takto upravené rastliny môžu nájsť uplatnenie jednak v humánnej výžive vďaka zvýšenej nutričnej hodnote rastlinných olejov, ale aj v produkcii biopaliva s vylepšenými vlastnosťami. Za úspechom genetickej transformácie rastlín stojí výber vhodných promótorov, ale hlavne génov z donorového organizmu a ich úspešné inkorporovanie do genómu upravovanej rastliny.



Obrázok 4.31: Biosyntetická dráha vedúca k syntéze esenciálnych polynenasýtených MK a kľúčová úloha $\Delta 6$ -desaturázy (Zdroj: Kraic a kol., 2018, upravené).

Nie bežnou schopnosťou rastlín čeľade *Celastraceae* (bršlenovité) je produkcia 3-acetyl-1,2-diacyl-*sn*-glycerolov (acetylTAGs) v množstve viac ako 90 % zo všetkých TAGs. Práve prítomnosť acetylovaných skupín mení vlastnosti lipidov (redukuje sa viskozita, mrznutie pri nižších teplotách, esterifikácia), ktoré sa stávajú vhodné pre produkciu biopalív, emulzifikátorov, lubrikantov. Ak sa použijú v humánnej výžive, znižujú kalorické zaťaženie potravy a pozitívne vplyvajú na črevnú mikrobiotu. Dominantná MK v druhoch *Euonymus europaeus* L. (bršlen európsky) je kyselina olejová (C18:1), čo robí olej z tohto rastlinného zdroja extrémne vhodný pre produkciu biopalív. Expresia génu *EeDacT* kontrolovaného semeno-špecifickým promótorom zvyšuje produkciu acetylTAGs, čo sa úspešne podarilo v našej práci vložением tohto génu, prostredníctvom *Agrobacterium tumefaciens*, do rastlín tabaku. Pomer acetylTAGs a TAGs s dlhým reťazcom (lcTAGs) v nezrelých semenách rastlín tabaku, geneticky modifikovaných upraveným génom *EeDacT*, ukázal silný vplyv transgénu. Transgénné rastliny T3, T4 a T5 syntetizovali, na rozdiel od netransformovaných rastlín tabaku, acetylTAGs, pričom kyselina olejová bola dominantnou MK acetylTAGs vo všetkých analyzovaných transgénných rastlinách.

4.4 Aminokyseliny a oligopeptidy

V posledných rokoch zvyšujúci sa dopyt spotrebiteľov po prírodných zdravých potravinách s vedecky dokázanou účinnosťou zintenzívil hľadanie živín v alternatívnych potravinových zdrojoch. Nesprávna výživa spôsobená konzumáciou nezdravých potravín, mastných jedál alebo vysoko spracovaných potravín viedla k rozšíreniu chorôb ako je obezita, rakovina, srdcovo-cievne a zápalové ochorenia (Obrázok 4.32).

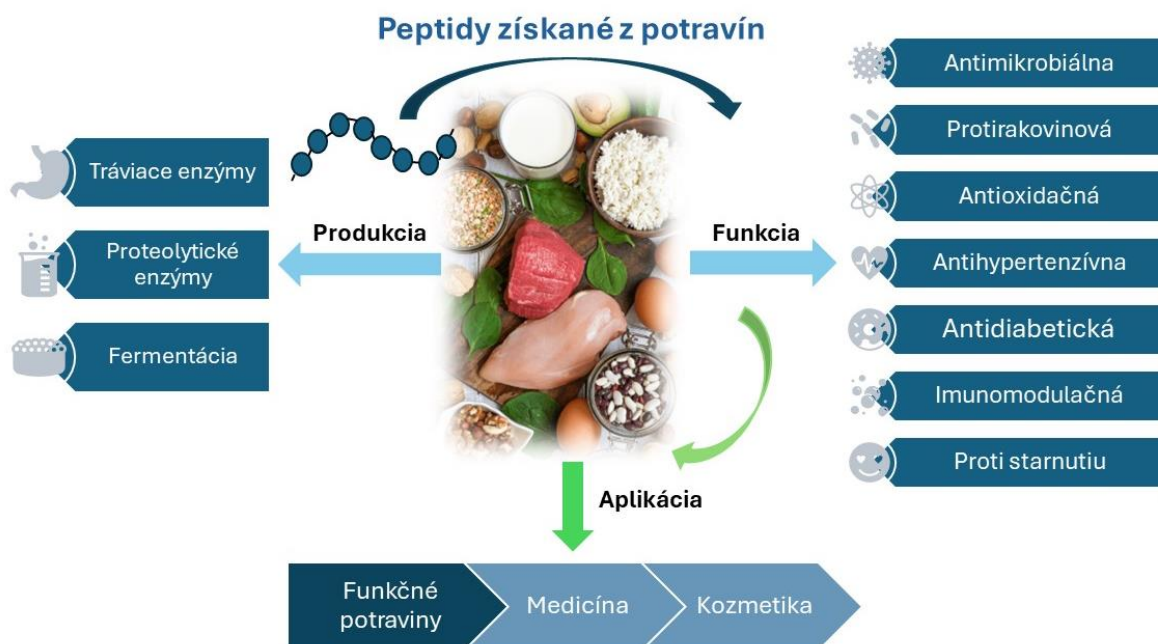


Obrázok 4.32: Niektoré z parametrov nesprávnej výživy a ochorenia, ktoré konzumácia nezdravej stravy spôsobuje (Zdroj: autor).

Moderný konzument preto začal v zmysle hesla „ste to, čo jete“ vyhľadávať potraviny s potenciálom chrániť zdravie a pôsobiť preventívne voči vzniku ochorení. Potravinársky priemysel sa začal orientovať na vývoj **funkčných potravín** obsahujúcich prírodné látky poskytujúce zdravotné výhody, ako sú napríklad antioxidačné alebo protizápalové vlastnosti.

Okrem využívania tradičných potravinárskych prísad ako vitamíny, zložky potravinovej vlákniny, polynenasýtené MK, prípadne baktérií mliečneho kvasenia, sú vhodnou témou výskumu aj bioaktívne peptidy. **Bioaktívne peptidy** je všeobecný termín pre lineárne alebo cyklické peptidy zložené z prírodných aminokyselín s rôznym zložením a usporiadaním, ktoré zvyčajne pozostávajú z 2–20 aminokyselinových zvyškov, prípadne 5–30 aminokyselín. Ich bioaktivita je daná fyzikálno-chemickými charakteristikami a ich sekundárnou štruktúrou a zasahuje do širokého spektra rôznych funkcií ako antimikrobiálne, antibakteriálne a

antioxidačné, imunomodulačné, protizápalové a protirakovinové, antiopioidné alebo antihypertenzívne účinky (Obrázok 4.33).



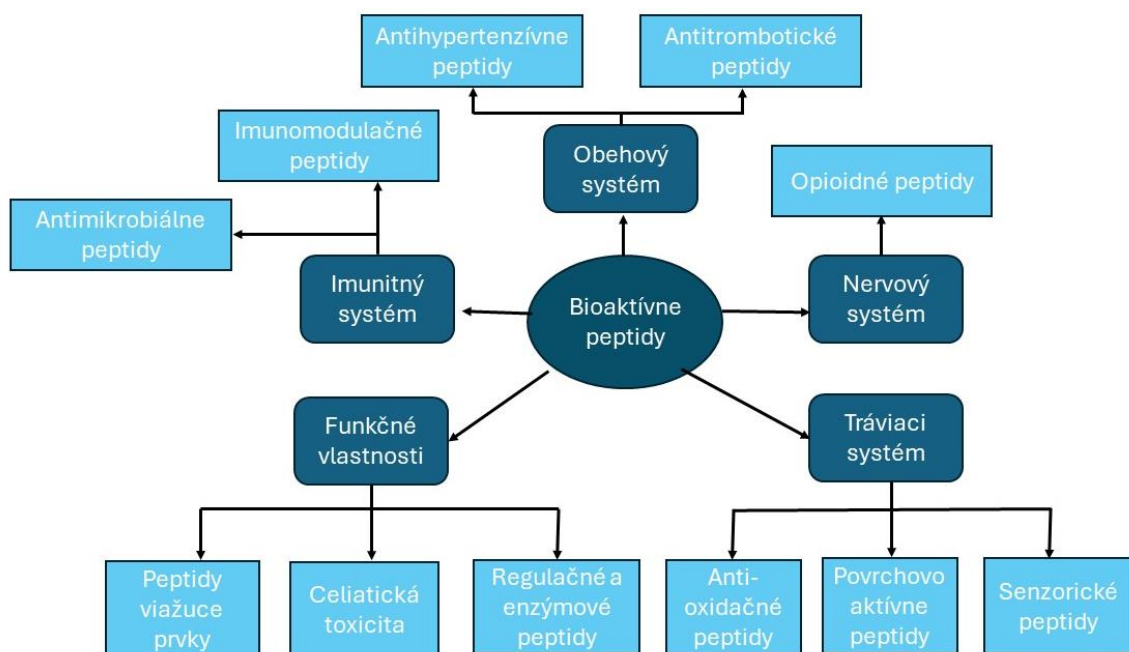
Obrázok 4.33: Spôsoby získania bioaktívnych peptidov z potravinových zdrojov, spôsoby ich aplikácie a funkcie na základe ich biologických aktivít (Zdroj: autor).

Tieto biologické aktivity bioaktívnych peptidov nemusia byť porovnateľné s účinkami syntetických liečiv, v ľudskom tele sa však hromadia bez vedľajších účinkov. V ľudskom organizme sú nestabilné a ľahko podliehajú degradácii proteázami, čo má za následok zníženie ich biologickej aktivity. Na druhej strane, pre organizmus sú bezpečné a netoxické. Za účelom zvýšenia ich stability a zachovania fyziologických účinkov sa vyvíjajú rôzne prístupy ako napr. chemická modifikácia a enkapsulácia. Biologická aktivita peptidov je ovplyvnené mnohými faktormi a aspektmi, ako je proces enzymatickej hydrolýzy, proces separácie a čistenia, zloženie aminokyselín, Mw a elektrický náboj.

Na biologickej aktivite bioaktívnych peptidov sa významne podieľajú tri aminokyseliny valín, leucín a izoleucín, jednotne označované ako **BCAA**. Aminokyseliny patria k proteínogénnym esenciálnym aminokyselinám, preto musia byť dodané do organizmu stravou. Odporúčané denné dávky sú 40 mg na 1 kg hmotnosti a deň pre leucín, 20 mg na 1 kg hmotnosti a deň pre valín a 19 mg na 1 kg hmotnosti na deň pre izoleucín. Okrem toho, že sú nevyhnutné pre syntézu proteínov v bunke, majú aj rôzne regulačné funkcie v metabolizme. Ako nutričné signály interagujú so špecifickými systémami citlivými na nutrienty ((GCN)-2

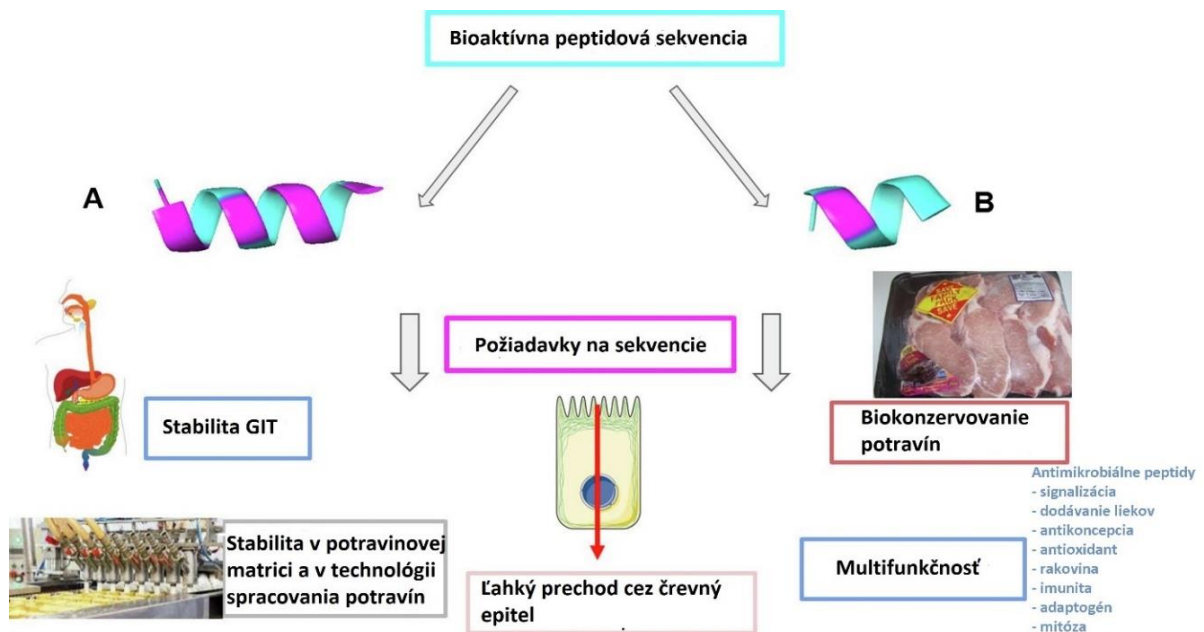
dráha, leucyl-tRNA syntetáza a Sestrin2), regulujú vylučovanie hormónov súvisiacich so živinami ako leptín alebo adiponektín a taktiež stimulujú mitochondriálnu biogénu. Katabolizmus BCAA sa obmedzuje hlavne na mitochondrie všetkých telesných tkanív okrem pečňových. Tam pôsobia ako donori dusíka pre syntézu neurotransmiterov, aminokyselín alanín a glutamát/glutamínového cyklu alebo energetický substrát pre trikarboxylový cyklus ATP generácie.

BCAA odvodené zo srvátkových bielkovín sa v súčasnosti bežne využívajú do doplnkov stravy pre športovcov a podieľajú sa na metabolických dráhach regulujúcich syntézu svalových bielkovín a svalovú hypertrofiu. Podieľajú sa aj na imunitných reakciách, pričom izoleucín sa zapája do produkcie β -defenzínov proti bakteriálnym infekciám, leucín reguluje aktiváciu a funkciu lymfocytov a valín riadi produkciu pro- a protizápalových cytokínov. Reguláciou proliferácie epitelových buniek a expresiou génov pre proteíny zodpovedné za transport a absorpciu glukózy a aminokyselín sa podieľajú na podpore zdravých čriev. Späté sú aj s homeostázou glukózy, pričom zvyšujú inzulínová odpoveď prostredníctvom uvoľňovania glukagónu podobného peptidu 1 (GLP-1) a tak nepriamo pôsobia proti cukrovke 2. typu. Medzi ďalšie zdravie prospešné vlastnosti BCAA patrí aj ich schopnosť zlepšovať kognitívne funkcie v dôsledku ich zvýšenej koncentrácie v mozgovom tkanive (Obrázok 4.34).



Obrázok 4.34: Príspevok biologicky aktívnych peptidov ku kvalite a pridanej hodnote potravín (Zdroj: Krunić a kol., 2018, upravené).

Obsahu bioaktívnych peptidov doteraz venovaná nedostatočná pozornosť z dôvodu ich možnej dvojitej funkcie vo vývoji funkčných potravín a nutraceutík. Vďaka antimikrobiálnym a antioxidačným aktivitám je takýto typ peptidov perspektívny vo forme prírodných potravinových prísad pri biokonzervácii a môže nahradiť umelé prísady a tak zlepšiť celkovú kvalitu potravín. Vo vývoji funkčných potravín sú zase sľubné biologické a funkčné vlastnosti bioaktívnych peptidov (Obrázok 4.35).



Obrázok 4.35: Klasifikácia BCAA obsahujúcich bioaktívne sekvencie. (A) Bioaktívne peptidy bohaté na BCAA (označené ružovou farbou): BCAA dodávajú peptidovej sekvencii hydrofóbny charakter. (B) Bioaktívne peptidy s BCAA v určenej polohe: funkcia BCAA spočíva v interakciách s enzýmami (Zdroj: Dullius a kol., 2020, upravené).

4.4.1 Funkcia bioaktívnych peptidov v potravinovej matrici a fyziológia

Fyziologická **aktivita biologicky aktívnych peptidov** úzko súvisí s ich štruktúrou. Závislá je hlavne od zloženia a sekvencie aminokyselín, Mw, typu aminokyseliny na N- a C-konci, hydrofóbnej, prípadne hydrofilnej vlastnosti reťazca aminokyselín a náboja aminokyseliny. BCAA predstavujú najviac hydrofóbne aminokyseliny z alifatických aminokyselín a vo vysokých koncentráciách sa nachádzajú popri fenylalaníne a metioníne v nevodnom prostredí vo vnútri globulárnych proteínov, transmembránových doménach membránových proteínov

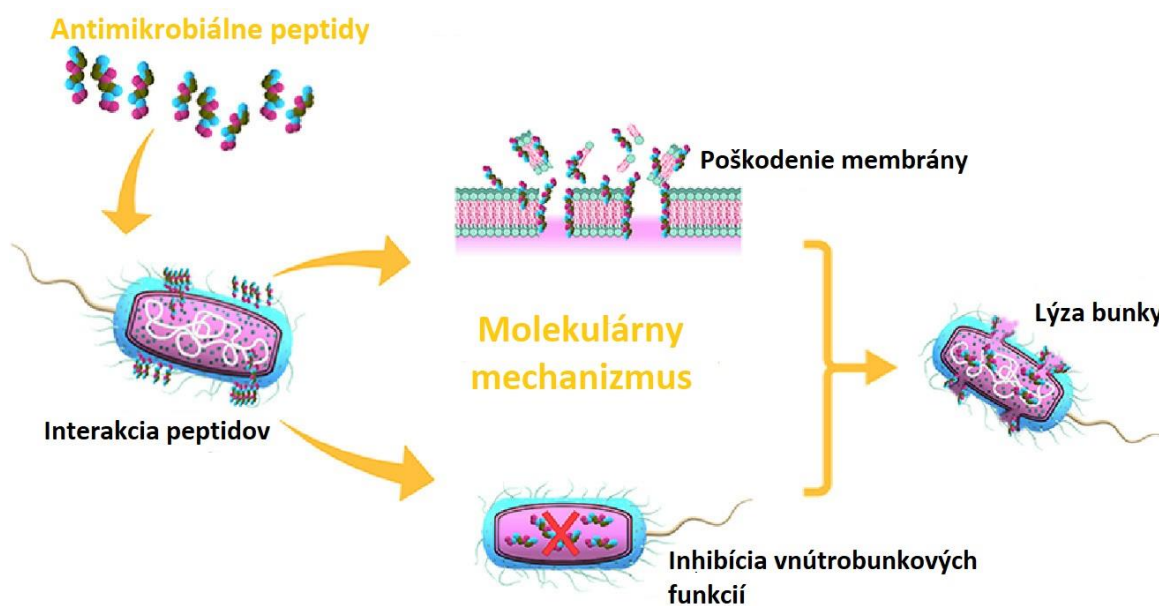
a primárných sekvenciách nerozpustných proteínov. Pri takejto lokalizácii sú ich najdôležitejšie funkcie pri skladaní proteínov, stabilite proteínov, väzbe na substrát alebo pri katalýze v enzýmoch a interakcii proteínov s fosfolipidmi biologickej membrány alebo DNA.

Aj keď je chemická štruktúra a hydrofóbnosť troch BCAA veľmi podobné, nahradenie jednej aminokyseliny inou vedie k zmene funkcie proteínu, čo naznačuje špecifický vzťah medzi vlastnosťami a funkciami sekvencií obsahujúcich BCAA. Svedčí o tom skutočnosť, že valín a izoleucín sa viac podieľajú na tvorbe β -listov, zatiaľ čo leucín sa nachádza v α -helixoch, najmä v stočených α -helixoch prítomných v proteínoch cytoskeletu, v motorických proteínoch alebo na pripojovacom receptore faktora citlivého na N-etylmaleimid (SNARE). Štrukturálne motívy bohaté na leucín sú leucínové zipovacie štruktúry typické pre proteíny viažuce sa na DNA.

Pretože sekvencie bohaté na BCAA sa nachádzajú hlavne vo vnútri globulárnych proteínov, takéto peptidy musia byť uvoľnené enzymatickou hydrolýzou. Zvyšuje sa tak dokonca pozitívny fyziologický vplyv bioaktívnych peptidov a sú efektívnejšie ako celý proteín alebo zmes aminokyselín. Hydrolýzou sa uvoľňujú dve skupiny peptidov obsahujúcich BCAA, pričom jedna zvyšuje hydrofóbnosť peptidu a druhá je multifunkčná vďaka rôznym väzbám na enzýmy (Obrázok 4.35).

4.4.1.1 Antimikrobiálne a protirakovinové aktivity peptidov

Antimikrobiálne peptidy získané hydrolýzou potravinových bielkovín sú krátke peptidy do 100 aminokyselín a môžu sa vyskytovať ako lineárne α -helixy, v štruktúre β -listov stabilizovaných disulfidovými mostíkmi a ako slučkové peptidy. Väčšinou majú **amfifilný charakter** s až 50 % dominanciou alifatických aminokyselín, ako je napr. BCAA. Takáto amfifilná povaha umožňuje peptidom viazať sa špecifickým spôsobom na nabitú membránu, čím sa zvyšuje ich schopnosť prenikať membránou alebo vytvárajú póry, ktoré spôsobujú smrť mikroorganizmov stratou vnútrobunkového priestoru (Obrázok 4.36). Okrem **membránovo-lytického mechanizmu** sú peptidy schopné narušiť intracelulárne bunkové funkcie ako biosyntéza nukleových kyselín, proteínov, peptidoglykánu, zmena génovej expresie alebo inhibícia fosforylácie.



Obrázok 4.36: Základný molekulárny mechanizmus antimikrobiálnej aktivity biologicky aktívnych peptidov zameraný na destabilizáciu bunkovej membrány (Zdroj: Corrêa a kol., 2019, upravené).

Nové stratégie a ciele sa hľadajú v štúdiu antibakteriálneho potenciálu peptidov v boji proti vzniku baktérií odolných voči antibiotikám. Mnohé typy peptidov môžu byť ľahko začlenené do bakteriálnej bunkovej steny. Peptidy obsahujúce BCAA sú však baktériami využívané na naviazanie proteínov k vláknam peptidoglykánu a tento mechanizmus môže byť využitý na **vývoj antibakteriálnych látok**. Väčšina peptidov získaných z potravín sú antimikrobiálne a protirakovinové peptidy, čo naznačuje, že potravinové bielkoviny sú sľubným zdrojom takýchto aktívnych sekvencií.

Vo všeobecnosti je veľkosť bioaktívneho peptidu 2–30 aminokyselín, pričom vyššia cytotoxicita sa pozorovala pri nižšej Mw peptidov s vyšším obsahom hydrofóbných aminokyselín. Protirakovinové peptidy sa podľa mechanizmu účinku delia na membránovo-lytické a nemembránovo-lytické. Presné mechanizmy účinku sú stále predmetom výskumov, avšak je zrejmé, že v živočíšnych rakovinových bunkách modelujú inhibíciu intracelulárnej signalizácie, imunitné reakcie, stimuláciu apoptózy, indukciu zastavenia bunkového cyklu alebo inhibíciu aktivity topoizomeráz.

4.4.1.2 Antioxidačná aktivita

Antioxidačné peptidy odvodené z potravinových proteínov sú krátke sekvencie s dĺžkou 2–20 aminokyselín so schopnosťou spomaľovať oxidačné procesy a produkciu reaktívnych foriem kyslíka (ROS) podieľajúcich sa na poškodení biologických štruktúr ako membránové lipidy, enzýmy a DNA. Mechanizmus účinku prírodných antioxidačných peptidov je vo vychytávaní voľných radikálov inhibíciou migrácie elektrónov a prenosu atómov vodíka alebo na prechodnej chelatácii kovových iónov. Rozhodujúcim pre tento účinok peptidov je obsah špecifických aminokyselín a ich správne umiestnenie, ako sú napr. vysoko aktívne sekvencie obsahujúce BCAA na N-konci nasledované v sekvencii aromatickými aminokyselinami ako prolín, histidín a tyrozín.

Prechod z konformácie α -helixu na β -list, β -zákrut a štruktúry náhodného zvitku smeruje k viac hydrofóbnemu zvyšku aminokyselín na povrchu peptidu ako ich reakcia na pH, termálne, močovínové, trifluóretanolové ošetrovanie alebo aplikácia pulzného elektrického poľa. Takáto zmena vedie k posunom vodíka v rámci peptidovej sekvencie a následne lepšej schopnosti vychytávať voľné radikály a zvyšovať antioxidačnú aktivitu peptidu.

4.4.1.3 Antihypertenzívna a antidiabetická aktivita peptidov

Liečba hypertenzie je založená na inhibícii enzýmu konvertujúceho angiotenzín (EC 3.4.15.1), ktorý má kľúčovú úlohu v regulácii arteriálneho tlaku prostredníctvom systému renín-angiotenzín-aldosterón. Ako odpoveď na zvýšený tlak sa uvoľňuje angiotenzinogén, čo znamená, že plazmatický objem zvyšuje produkciu dekaeptidu angiotenzínu I, po ktorom nasleduje štiepenie dipeptidu histidín-leucín prostredníctvom angiotenzínu a produkcia silného vazokonstriktora angiotenzínu II. V dnešnej dobe na trhu dostupné inhibítory angiotenzínu majú nežiaduce vedľajšie účinky, ako je zvýšená hladina draslíka v krvi, nízky krvný tlak, kožné vyrážky, bolesti hlavy, únava a podobne. Ako prirodzená alternatíva sú už dnes známe účinky peptidových sekvencií získaných z potravinových bielkovín živočíšneho alebo rastlinného pôvodu. Tieto peptidy obsahujú špecifické sekvencie a vo všeobecnosti sa viažu na C-koncovú oblasť katalytického miesta, ale iba hydrofóbne inhibítory môžu blokovat' ich N-koncovú oblasť, ako je to napr. pri BCAA hydrofóbných peptidoch.

4.4.1.4 Imunomodulačná aktivita

Okrem poskytovania aminokyselín ako materiálu na opravu a rast tkaniva sú proteíny aj zdrojmi peptidov, ktoré môžu spúšťať intracelulárne signály, prípadne špecifické zdravotné funkcie, čím pozitívne pôsobia na zdravotný stav. Je známe, že doplnenie stravy o imunomodulačné zložky je efektívna stratégia na udržanie dobrého zdravia, pri dietetickej liečbe sú však veľmi vhodné aj bioaktívne peptidy odvodené z potravinových proteínov. **Imunomodulačné peptidy** pôsobia hlavne ako aktivátory makrofágov, stimulujú fagocytózu, zvýšenie počtu leukocytov a indukujú zvýšenie koncentrácie cytokínov, oxidu dusnatého (NO) a imunoglobulínov v organizme. Stimulujú tiež aktivitu prirodzených zabíjačov (NK) buniek, skupiny CD4+/CD8+/CD11b+ a CD56+ buniek a aktivujú jadrový faktor „kappa-light-chain-enhancer“ aktivovaného faktora B-buniek (NF- κ B). Podieľajú sa tiež na stimulácii dráh závislých od mitogénom aktivovanej proteínkinázy (MAPK) a inhibícii prozápalových mediátorov. V súvislosti s týmito vlastnosťami sú kazeín a srvátkové proteíny najdôležitejšími študovanými proteínmi spomedzi imunomodulačných peptidov. Študované v tejto oblasti účinkov sú tiež zdroje bielkovín ako ryža, sója, vajcia, pšenica alebo bielkoviny pochádzajúce z morských zdrojov. Peptidy s imunomodulačnými vlastnosťami obsahujú aminokyselinové zvyšky, ktoré sú hydrofóbne a práve hydrofóbnosť je dôležitým faktorom ovplyvňujúcim transport bioaktívnych peptidov cez bunkovú membránu.

4.4.1.5 Bioaktívne peptidy účinné proti starnutiu

Starnutie je často sprevádzané geriatrickými syndrómami, ako je Alzheimerova choroba, srdcovo-cievne ochorenia, poruchy tráviaceho traktu alebo sarkopénia so stratou svalovej funkcie, ktorá vedie k funkčnej invalidite starších ľudí. Okrem vyváženej výživy je vhodným riešením týchto stavov doplnenie bielkovín, keďže sú vhodné ako zdroj stavebných látok a konkrétne pri sarkopénii pre budovanie a udržanie svalovej hmoty.

Je známe, že hmota kostrového svalstva je regulovaná rovnováhou syntézy a degradácie proteínov. Aby sme sa vyhli svalovej redukcii je potrebná stimulácia syntézy svalových bielkovín a súčasne represia ich degradácie. Dostupnosť aminokyselín v krvi je kľúčovým faktorom pre dosiahnutie pozitívnej rovnováhy vo svalovom metabolizme a je dokázané, že **BCAA a najmä leucín** majú ústrednú úlohu v tomto procese. Taktiež je dokázané, že BCAA okrem aktivácie syntézy svalových bielkovín majú schopnosť potláčať degradáciu svalových

proteínov. Strava bez bielkovín doplnená o leucín po dobu 7 dní spôsobila potlačenie degradácie svalových proteínov inhibíciou signálnej dráhy pre tvorbu autofagických lyzozómov. Taktiež viedlo doplnenie stravy o BCAA k zníženiu hladiny metabolitov, ktoré sú zodpovedné za degradáciu bielkovín v kostrovom svalstve závislú na ubiquitíne. Pozorovaná bola teda prevencia svalovej atrofie.

4.4.1.6 Biologická dostupnosť a fyziologická stabilita bioaktívnych peptidov

Stabilita peptidu v tráviacom trakte je kľúčovou charakteristikou zaručujúcou fyziologické zdravotné prínosy týchto molekúl. Peptidy s dlhým reťazcom sú viac ohrozené degradáciou enzýmami alebo mikróbmi prítomnými v trakte. Prirodzenou tvorbou cystínu sa však zvyšuje ich stabilita. Fosforylácia, glykozylácia, prítomnosť negatívnych nábojov, prolín alebo hydroxyprolín na C-konci sú tiež prirodzenými prostriedkami vyššej odolnosti bioaktívnych peptidov voči proteázam v tráviacom trakte.

Typ bielkovín v strave má významný vplyv na zloženie črevnej mikrobioty syntetizujúcej proteázy a ovplyvňujúcej syntézu bioaktívnych peptidov v tele. Expresia peptidového transportéra 1 (PePT1) alebo transportérov aminokyselín v čreve závisia od stravy a v tomto smere je prísun bielkovín živočíšneho pôvodu priaznivejší ako rastlinných. Avšak strava s vysokým obsahom ťažšie stráviteľných bielkovín môže zvyšovať riziko chorôb ako zápalové ochorenia čriev, srdcovo-cievne ochorenia, rakovina a cukrovka. Je napríklad dokázané, že pri konzumácii kozích srvátkových proteínov enzýmy tráviaceho traktu produkovali peptidy aktívne proti patogénnym mikroorganizmom, ale nie proti probiotickým.

Okrem požiadaviek na stabilitu je ďalšou prekážkou, ktorá ovplyvňuje spektrum účinnosti peptidov, **transport cez epitelové vrstvy tráviaceho traktu**. Náboj a hydrofóbnosť peptidov majú vplyv na túto schopnosť bioaktívnych peptidov. Za účelom zvýšenia transportnej sily peptidov sa v klinických štúdiách využíva necytotoxická technológia stredne dlhých reťazcov MK, ktorá pôsobí prostredníctvom reorganizácie proteínov a vytvárania tesných spojení, a zvyšuje fluidizačný účinok cez membránu. Taktiež N-metylácia peptidov zvyšuje ich lipofilitu a tým aj priepustnosť cez membránu. Výhodou pre lepší transport epitelialnými bunkami tráviaceho traktu je aj peptid vo forme α -helixu.

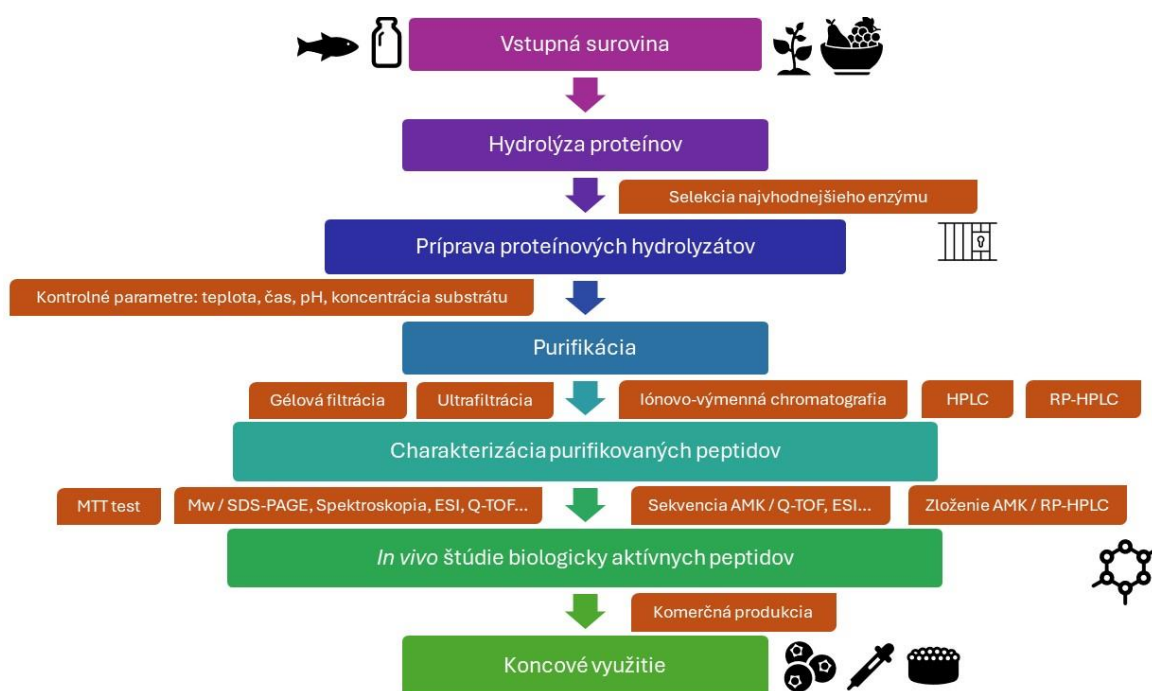
4.4.1.7 Produkcia bioaktívnych peptidov

Bioaktívne peptidy môžu byť na základe pôvodu rozdelené na rastlinné a živočíšne. Spôsoby ich produkcie môžeme rozdeliť na tradičné metódy a bioinformatické, pričom každá z nich má svoje výhody a nevýhody.

Medzi **tradičné prístupy** patrí: i) hydrolýza proteázami (pepsín, trypsín, alkalická proteáza, neutrálna proteáza), ii) mikrobiálna fermentácia, iii) kombinácia vyššie uvedených dvoch metód, iv) spracovanie potravín (tepelná úprava, vysoký tlak), v) izolácia bioaktívnych peptidov z proteínov reálne alebo *in vivo* štiepených enzýmami tráviaceho traktu a vi) chemická syntéza peptidov. V procese spracovania vstupnej suroviny však často môže dôjsť k porušeniu štruktúry prekursorov bioaktívnych peptidov alebo vznikajú toxické medziprodukty, prípadne mikrobiálnou fermentáciou nežiaduce uvoľnenie extracelulárnych polysacharidov. Najčastejšie používanou a najbezpečnejšou je enzymatická hydrolýza špecifickými alebo nešpecifickými proteázami. Tradičný spôsob zahŕňa nasledovné kroky: i) vstupný materiál (potravínové proteíny), ii) uvoľnenie bioaktívnych peptidov, iii) skrining cieľovej biologickej aktivity, iv) separácia a čistenie biopeptidov membránovou filtráciou (mikro-, ultra- a nanofiltrácia) a/alebo chromatografickou frakciáciou (chromatografia vysoko účinná kvapalinová a reverzná vysoko účinná kvapalinová, Sephadex gélová, iónovo-výmenná, vylučovacia podľa veľkosti), v) overenie aktivity cieľových peptidov, vi) identifikácia sekvencií cieľových peptidov pomocou hmotnostnej spektrometrie, vii) overenie aktivity peptidov *in vivo* a *in vitro* a viii) vývoj a aktualizácia databázy bioaktívnych peptidov. Hoci je táto tradičná metóda najbežnejšia, má mnoho obmedzení ako časová náročnosť, nízky výťažok v procese separácie a čistenia proteínov a spotreba veľkého množstva materiálu pri optimalizácii procesu enzymatickej hydrolýzy (Obrázok 4.37).

Bioinformatika, zahrňujúca predikciu a **analýzu *in silico***, je ucelený vedný odbor spájajúci poznatky z biológie, informatiky, informačného inžinierstva, matematiky a štatistiky. Jeho hlavným cieľom je zhromažďovať, spracovávať, uchovávať, analyzovať a interpretovať biologické údaje pomocou biologických algoritmov a súvisiacich softvérových nástrojov. Príprava bioaktívnych peptidov takýmto spôsobom má 8 hlavných krokov. Vstupným krokom pre bioinformatiku je využiť existujúce databázy (databázy bielkovín a polypeptidov) na štúdium frekvencie výskytu v potravinových bielkovinách sa vyskytujúcich peptidov s biologickou aktivitou. Po hydrolýze proteázami je úlohou získané peptidy porovnávať s databázami biologicky aktívnych peptidov na predpovedanie ich biologickej aktivity, pričom na určenie

bezpečnosti (napríklad alergénnosť, toxicita) a biologickej dostupnosti sú vhodné *in silico* prístupy, ktoré takto prekonávajú tradičné spôsoby produkcie bioaktívnych peptidov. Na druhej strane však tieto *in silico* prístupy majú isté obmedzenia, ako napr. výsledky hydrolýzy nemusia byť konzistentné s hydrolýzou *in vitro* alebo *in vivo*, pretože v *in silico* analýze je hydrolýza založená len na špecificite enzýmu determinovať štiepenie peptidových väzieb v proteínovej sekvencii. Ale v experimentálnych podmienkach je proces hydrolýzy bielkovín veľmi zložitý a závislý od mnohých podmienok, ako je pH, čas hydrolýzy, teplota hydrolýzy a interakcie medzi substrátmi, ktoré *in silico* analýza nezohľadňuje. Taktiež, *in silico* metódy sú založené na existujúcich proteínových databázach, ktoré sú aktualizované oneskorene.



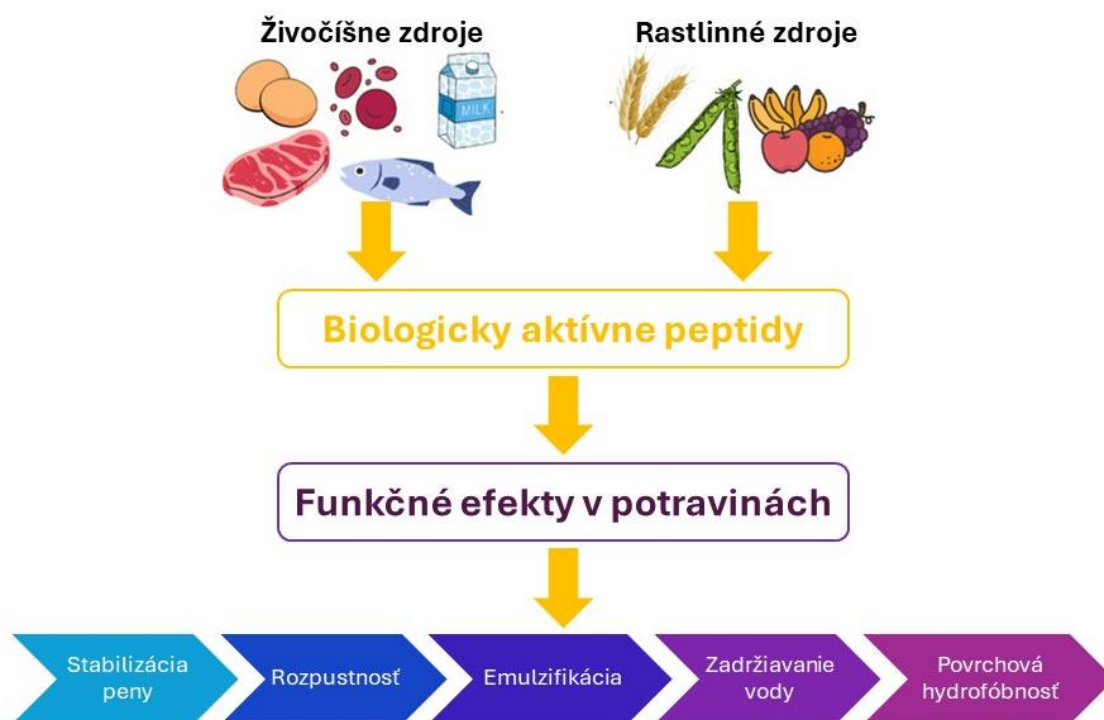
Obrázok 4.37: Schéma produkcie biologicky aktívnych peptidov zo vstupnej matrice. RP-HPLC = reverzná fáza HPLC, MTT test = kolorimetrický test na hodnotenie bunkovej metabolickej aktivity, ESI = elektrosprejová ionizácia, AMK = aminokyselina (Zdroj: autor).

4.4.1.8 Funkčné potraviny

Prekursorom bioaktívnych peptidov sú bielkoviny, ktoré patria medzi makroživiny nevyhnutné pre ľudský organizmus. Mnoho druhov bežne konzumovaných potravín je bohatých na bielkoviny a tieto zdroje sú ľahko dostupné a lacné. Z hľadiska živočíšnych zdrojov sú najviac študovanými a najdostupnejšími kravské mlieko, syry a mliečne výrobky, vajcia, mäso a ryby ako tuniak, sardinky a podobne. Medzi **zdroje rastlinných bielkovín** môžeme zaradiť obilniny

(pšenica, ryža), strukoviny a huby. Sľubným zdrojom bielkovín sú aj mikroriasy, v ktorých je obsah bielkovín vyšší ako v riasach. Avšak odroda, sezóna, svetlo a ďalšie faktory prostredia spôsobujú vysokú variabilitu v obsahu a kvalite bielkovín v týchto zdrojoch.

Antimikrobiálne, antibakteriálne a antioxidačné aktivity proteínov prírodného pôvodu môžu hrať dôležitú úlohu vo vývoji **funkčných potravín**, ktoré podporujú zdravie konzumenta podobne ako nutraceutiká. Medzi funkčné vlastnosti bioaktívnych peptidov, ktoré nachádzajú využitie pri vývoji inovatívnych potravín, patria reologické vlastnosti ako stabilizácia peny (napr. zmrzlina, kapučíno, krémy v zákusoch), rozpustnosť, schopnosť tvoriť emulzie, kapacita zadržiavania vody (napr. pri vývoji pekárenských výrobkov) a povrchová hydrofóbnosť (Obrázok 4.38).



Obrázok 4.38: Reologické vlastnosti bioaktívnych peptidov využívané pri vývoji inovatívnych potravín (Zdroj: autor).

Z hľadiska biologických aktivít peptidy, izolované zo srvátky ako prirodzené potravinárske prídavné látky v syre, môžu nahradiť komerčne dostupné **bakteriocíny**, vzhľadom na obavy, že účinnosť pridaných bakteriocínov je obmedzená, podobne ako difúzia bakteriálnych kmeňov produkujúcich bakteriocín v matrici syra. Limitujúca je taktiež genetická nestabilita syntézy bakteriocínu, inaktivácia prostredníctvom proteolytických enzýmov, väzba na zložky v potrave a podobne. Okrem toho, použitie umelých **antioxidačných činidiel** v

potravinárskom priemysle, ako je butylovaný hydroxytoluén (BHT), butylovaný hydroxyanizol (BHA), propylgalát (PG) a terc-butyhydrochinón (TBHQ) sú problematické z dôvodu toxických účinkov na ľudské enzýmy. Prírodné látky pri výrobe inovatívnych potravín a ich vyššia stabilita priťahujú väčšiu pozornosť, pretože sa vyznačujú nízkou toxicitou, vysokou aktivitou a ľahkou absorpciou.

Okrem dostatočnej účinnosti peptidov je kľúčovou požiadavkou aj **stabilita peptidu v rámci potravinovej matrice**, ktorá výrazne rozhoduje o trvanlivosti potravín. Je dobre známe, že funkčné vlastnosti sa líšia v závislosti od podmienok prostredia, vrátane pH, teploty, koncentrácie rozpúšťadla a rozpustenej látky, iónovej sily, dielektrickej konštanty a prítomnosti iných makromolekúl, ako sú lipidy a sacharidy. Preto fyzikálno-chemické charakteristiky takýchto molekúl nie sú závislé len od ich štruktúry, ale aj od vplyvov vonkajšieho prostredia. Aminokupiny, karboxylové a sulfhydrylové skupiny peptidov môžu reagovať s inými peptidmi alebo molekulami v potravinovej matrici, čo vedie ku kondenzácii peptidov, glykačným reakciám so sacharidmi, dehydratácii, prípadne oxidácii aromatických kruhov a finálne k tvorbe polyméru a zníženiu koncentrácie bioaktívnych peptidov.

Na prekonanie týchto javov už boli vyvinuté a testované rôzne metódy, v rámci ktorých je dobre preštudovanou **mikroenkapsulácia**. Okrem účinnosti zapuzdrenia sú taktiež predĺženie času uvoľňovania peptidov v potravinovej matrici a stabilita peptidu dôležitými a základnými kritériami pre charakterizáciu bioaktívnych peptidov a ich aplikáciu v potravinárskom priemysle.

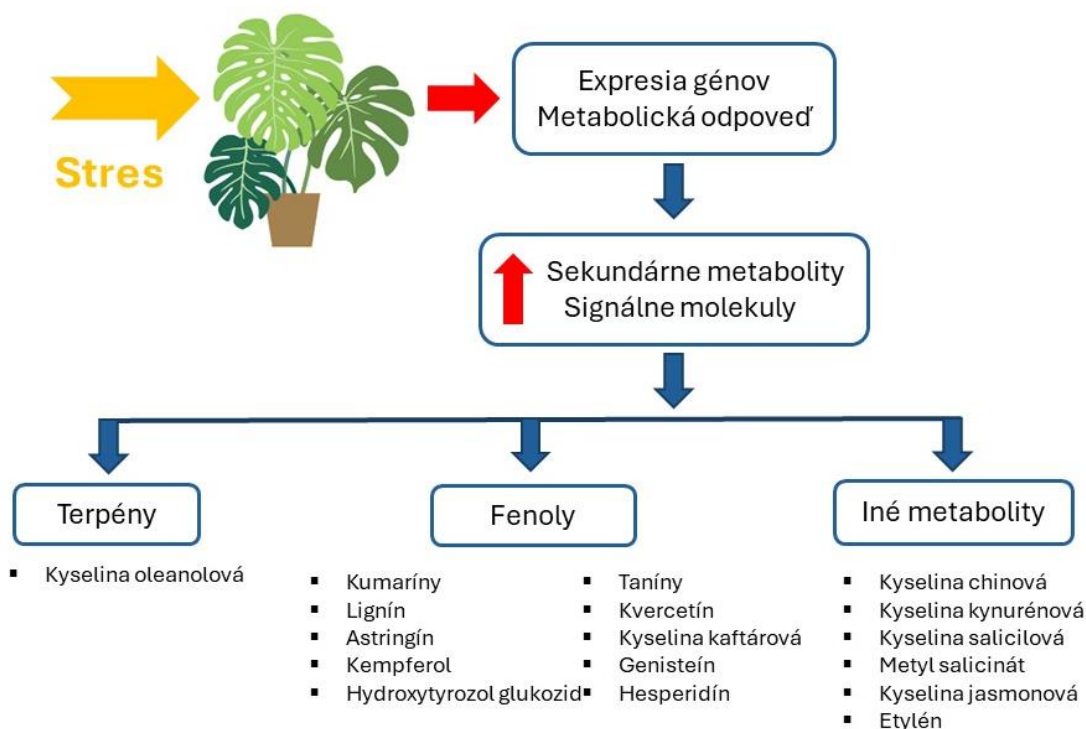
Z dôvodu lipofilných aj hydrofilných vlastností peptidových hydrolyzátov sa využívajú aj **nanolipozómy**, ktoré sú charakterizované lepšou antioxidačnou aktivitou v enkapsulovaných hydrolyzátach s vysokým stupňom hydrolyzy. Ďalšou perspektívnou cestou je produkcia nanočastíc, ktorá je už úspešne aplikovaná napr. na stabilizáciu nízínu a dokázané je, že kyselina pektínová je účinný a lacný východiskový materiál zachovávajúci biologickú aktivitu potravinárskej prídavnej látky. Taktiež poly(kyselina mliečno-ko-glykolová) v kombinácii s vláknami guarovej gummy je vhodná na zvýšenie stability a transportovateľnosti biologicky aktívnych peptidov. Dobré antioxidačné aktivity vykazuje aj sójový peptid opracovaný ultrazvukom formujúci veľké agregáty.

V dnešnej dobe sú na trhu produkty spoločností Calpis® a Evolus®, ktoré využívajú biologicky aktívne peptidy odvodené z mlieka a inhibítorové tripeptidy sú populárnym antihypertenzívnym liekom. Palmitoylové peptidy sa komerčne používajú v kozmetike.

4.5 Sekundárne metabolity

4.5.1 Polyfenolické látky rastlín

Sekundárnymi metabolitmi označujeme chemické látky s funkciou stavebnou, signálnych molekúl a látky určujúce farbu, vôňu a chuť (Obrázok 4.39). Produkcia sekundárnych metabolitov je charakteristická pre rastliny a iné sesilné organizmy a uskutočňuje sa v špecializovaných bunkách, ktoré nie sú priamo esenciálne pre metabolické dráhy fotosyntézy a dýchacieho reťazca, ale považované sú za potrebné pre prežitie organizmov v prostredí.



Obrázok 4.39: Sekundárne metabolity rastlín sú látky špecifické pre konkrétny druh, orgán, pletivo. Sú to látky často produkované ako výsledok reakcie rastliny na stres. Fungujú ako signálne molekuly (hormóny), pigmenty, stavebné molekuly, zabezpečujú interakciu s okolím a majú aj ochrannú funkciu v rastline (Zdroj: autor).

Sekundárne metabolity rastlín delíme podľa chemickej štruktúry na štyri základné skupiny: i) terpény (terpenoidy alebo izoprenoidy, ii) fenoly (arenoly), iii) metabolity obsahujúce dusík a iv) metabolity obsahujúce síru. Chemická štruktúra determinuje do istej miery aj funkcie a využitie jednotlivých skupín sekundárnych metabolitov (Tabuľka 4.3).

Tabuľka 4.3: Základné rozdelenie sekundárnych metabolitov rastlín z hľadiska chemickej štruktúry a vybrané charakteristiky.

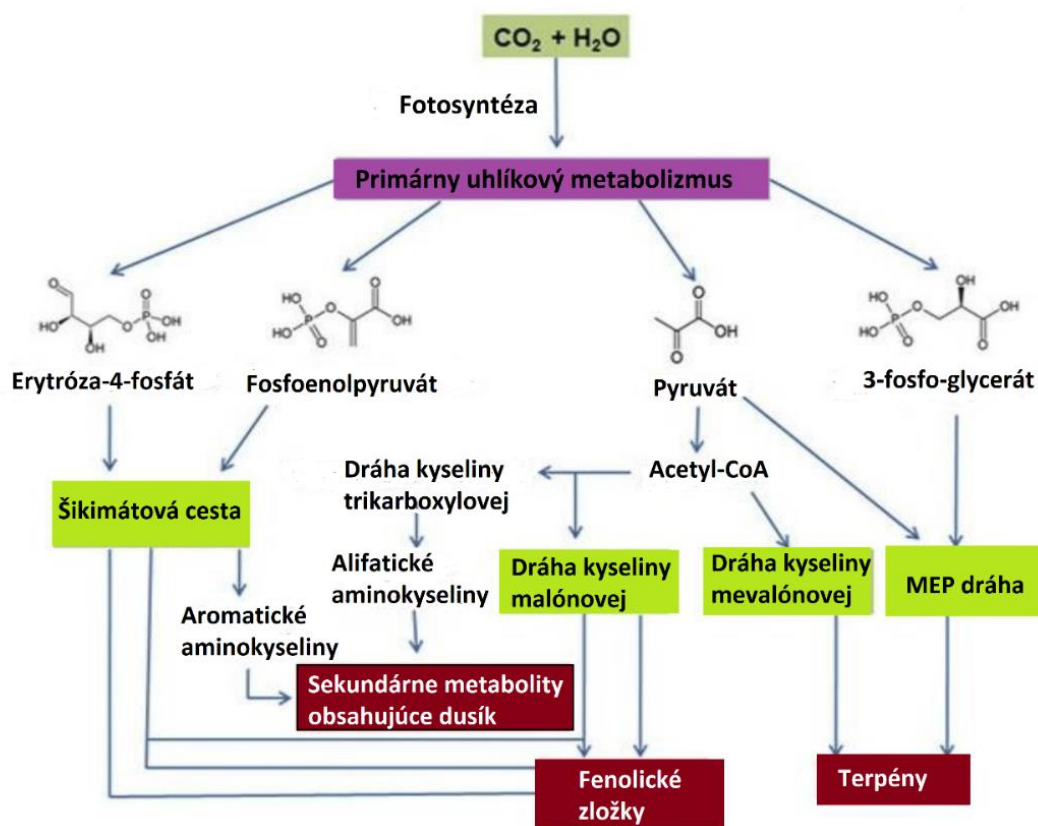
Por. číslo	Názov	Príklady	Základná charakteristika	Využitie
1.	Terpény	Monoterpény (geraniol), sesquiterpény, diterpény (karnozol, rozmanol...), triterpény, tetraterpény (karotenoidy, lycopén)...	Molekuly tvorené z dvoch alebo viacerých reťazovito spojených molekúl izoprénu (C ₅ H ₈)	V siliciach (éterických olejoch) - liečivé účinky, antioxidačné vlastnosti, protirakovinové účinky
2.	Fenoly	Taníny, fenyylpropanoidy, kondenzované taníny – koenzým Q10, resveratrol, kvercetín...	Organické zlúčeniny - obsahujú hydroxylovú skupinu -OH na aromatickom jadre, fenol so sumárnym vzorcom C ₆ H ₅ OH, odlišné vlastnosti ako alkoholy - silnejšie kyseliny	Antioxidanty, znižujú výskyt ICHS, zníženie krvného tlaku, obličkové ochorenia
3.	Metabolity obsahujúce dusík	Alkaloidy, kyanogénne glukozidy...	Rôznorodé účinky, liečivá, omamné látky, toxické dusíkaté organické makromolekuly, väčšinou deriváty aminokyselín väčšinou málo rozpustné vo vode, majú horkú chuť, najmä v pevnom skupenstve	Farmaceutický priemysel – rôzne liečivá, psychoaktívne látky
4.	Metabolity obsahujúce síru	Glukozinoláty, tiosulfínáty (alicín odvodený od cysteínsulfoxidov), reaktívne druhy síry (napr. H ₂ S a síran sodný) a antimikrobiálne peptidy (napr. defenzíny a tioníny)		Ochrana rastliny pred patogénom, antimikrobiálne účinky

Polyfenolické látky sú sekundárne metabolity najviac distribuované v rastlinnej ríši, pričom extrahované a študované sú estery, amidy a glykozidy hydroxyškoricových kyselín, glykozylované flavonoidy, hlavne flavóny a flavonoly a proantokyanidíny. Lignín, suberín

a sporopolenín v peľových zrnách sú polyfenolické látky na báze polymérov. V rastlinnom organizme sú polyfenolické látky súčasťou bunkových stien a ich význam je v ochrane pre UV žiarením a voľnými radikálmi, škodcami a patogénmi, súvisia s plodnosťou peľových zrn, signalizačnými dráhami v rámci organizmu a medzi organizmom a vonkajším prostredím, tiež regulujú vyplavovanie rastlinných hormónov zo skupiny auxínov. Zodpovedné sú za chuť, vôňu a pigmentáciu rastlinných pletív.

Je klinicky dokázané, že konzumácia potravín s vysokým zastúpením polyfenolických látok má množstvo zdraviu-prospešných a preventívno-terapeutických účinkov na konzumenta, vrátane optimalizácie srdcovo-cievneho systému, metabolického zdravia a v menšej miere má pozitívny vplyv na činnosť mozgu a nervového systému. Polyfenolické látky majú taktiež dokázaný pozitívny účinok na črevnú mikrobiotu, aj keď mechanizmus účinku nie je úplne objasnený.

Z chemického hľadiska sú polyfenolické látky **deriváty odvodené od fenolu**. Delia sa podľa funkcie, počtu fenolových kruhov a podľa toho, ako sa tieto kruhy na seba viažu. Najbežnejšia klasifikácia je na fenolické kyseliny, flavonoidy, stilbény, a lignany. Polyfenolické látky striktno označujú sekundárne prírodné metabolity vznikajúce biogeneticky šikimátovou/polyfenylpropanoidovou dráhou, pričom v rámci evolúcie sa vyvinuli viaceré vetvy vedúce k produkcii rôznych látok súhrnne spadajúcich do sekundárneho metabolizmu (Obrázok 4.40).

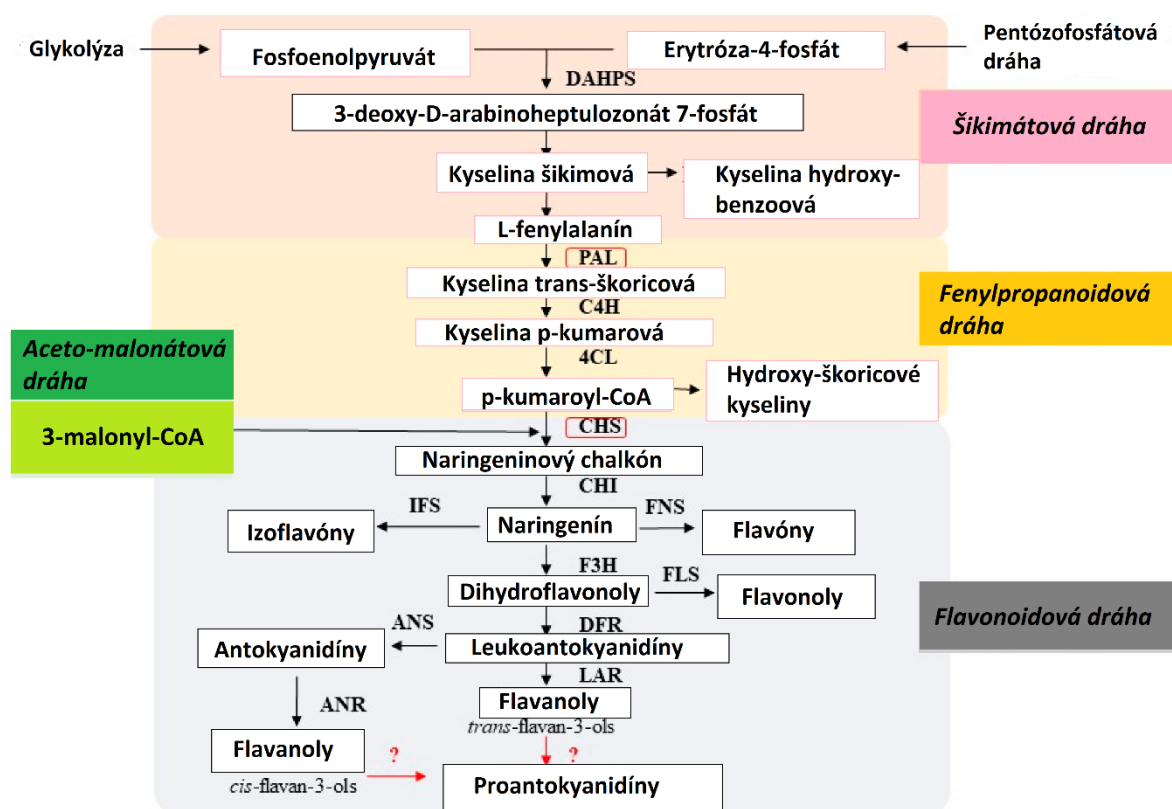


Obrázok 4.40: Schéma hlavných dráh biosyntézy sekundárnych metabolitov. MEP = Nemevalonátová dráha (nazývaná tiež metylerytritolfosfátová dráha alebo deoxy-D-xylulóza-5-fosfátová dráha) je alternatívna metabolická dráha na syntézu prekursorov izoprenoidov, izopentenylpyrofosfátu a dimetylalylpyrofosfátu (Zdroj: Twajj a Hasan, 2022, upravené).

4.5.1.1 Biosyntéza

V **biosyntetickej dráhe** polyfenolických látok vzniká z erytrózy-4-fosfát a fosfoenolpyruvátu dihydrošikimát za katalýzy 3-deoxy-D-arabino-heptulozonát 7-fosfát syntázy (DAHPS), 3-dehydroquinát syntázy (DQS) a 3-dehydroquinát dehydratázy (DHQD). Z kyseliny dihydrošikimovej sa môže odvodiť buď kyselina galová a z nej následne galotaníny a elagitaníny alebo inou vetvou môže vzniknúť kyselina šikimová a fenylalanín, pričom reakcie prebiehajú za prítomnosti šikimát dehydrogenázy (SD), šikimát kinázy (SK), 3-fosfošikimát-1-karboxyvinyltransferázy (ESPS), chorizmát syntázy (CS), chorizmát mutázy (CM), prefenát aminotransferázy (PAT) a arogenát dehydrogenázy (ADT). Z fenylalanínu vzniká za katalýzy fenylalanín amoniak lyázy (PAL) kyselina škoricová. Z kyseliny škoricovej ďalej vzniká *p*-kumarát pomocou enzýmu cinamát-4-hydroxyláza (C4H). *P*-kumarát môže viesť ku vzniku kyseliny kávovej za účasti *p*-kumarát-3-hydroxylázy (C3H) a z nej následne vzniká kyselina

ferulová za katalýzy kafeát-*O*-metyltransferázy (COMT). Kyselina ferulová je prekuzorom lignanov. Z *p*-kumarátu môže vzniknúť za katalýzy 4-kumarát:CoA-ligázy (4CL) *p*-kumaroyl-CoA, pričom tento produkt biosyntetickej dráhy je centrálnym metabolitom pre vznik stilbénov a flavonoidov (Obrázok 4.41).



Obrázok 4.41: Vybrané kroky biosyntetickej dráhy polyfenolických látok vychádzajúc z erytrózy-4-fosfátu až k produkcii izoflavónov, flavónov, antokyanidínov, flavonolov a flavanolov cez naringeninový chalkón. DAHPS = 3-deoxy-D-arabino-heptulozónát 7-fosfát syntáza, PAL = fenylalanín-amónium lyáza, C4H = cinamát-4-hydroxyláza, 4CL = 4-kumarát:CoA-ligáza, CHS = chalkón syntáza, CHI = chalkón izomeráza, IFS = izoflavón syntáza, FNS = flavón syntáza, F3H = flavanón-3-hydroxyláza, FLS = flavolon syntáza, ANS = antokyanidín syntáza, DFR = dihydroflavonol reduktáza, LAR = leukoantokyanidín reduktáza, ANR = antokyanidín reduktáza. (Zdroj: Zagorskina a kol., 2023, upravené).

Resveratrol je ďalší dôležitý prekuzor biosyntetickej dráhy polyfenolických látok, ktorý vzniká reakciou *p*-kumaroyl-CoA s tromi molekulami malonyl-CoA za katalýzy stilbén syntázy (STS). Pinostilbén a pterostilbén vznikajú metyláciou resveratrolu, piceid jeho glykozyláciou. Pôsobením chalkón syntázy (CHS), chalkón reduktázy (CHR) a chalkón izomerázy (CHI) na

p-kumaroyl-CoA vzniká naringenín, ktorý je prekurzorom izoflavónov a z ktorého vznikajú ostatné flavanóny. Izoflavóny vznikajú katalýzou 2-hydroxyizoflavón syntázy (HIFS). Elimináciou vznikajú z flavanónov flavóny, pričom ich 3-hydroxylácia dáva vznik flavonolom.

Väčšina polyfenolických látok je nestabilná. Existujú minimálne **štyri možné mechanizmy ich stabilizácie**: i) samoasociovanie molekúl; ii) intermolekulárna ko-pigmentácia s inými nekovalentne viazanými bezfarebnými látkami, ako sú napr. antokyanín + flavonoidy, alkaloidy, nukleové kyseliny a aminokyseliny; iii) intramolekulárna ko-pigmentácia s aromatickými acylovými skupinami (konkrétne hydroxyškoricové kyseliny) a iv) tvorba kovového komplexu. Z biosyntetického hľadiska patria okrem metylácie katalyzovanej *O*-metyltransferázami tiež acylácia a glykozylácia sekundárnych metabolitov k základným chemickým modifikáciám, ktoré menia chemické, fyzikálne a zároveň aj biologické vlastnosti týchto molekúl. Ich významom je však okrem vyššej schopnosti interakcie s inými zlúčeninami aj vyššia stabilita molekuly.

Modifikácie prírodných zlúčenín glykozylovými a acylovými jednotkami sú katalyzované acetyltransferázami a glykozyltransferázami. Oba kroky sa zvyčajne vyskytujú v región-špecifickej reakcii po dokončení biosyntézy príslušného aglykónu. Enzymatická acylácia (najčastejšie *N*- alebo *O*-acylácia) pridáva alifatické a/alebo aromatické acylované zložky na nukleofilné časti molekúl akceptora esterovými alebo amidovými väzbami, čo vedie k stabilizácii molekuly, v prípade antokyanínov k zintenzívneniu zafarbenia, vyššej rozpustnosti vo vode a lepšej ochrane molekúl polyfenolických látok pred degradačnými enzýmami.

Glykozyltransferázy sú veľmi rozšírenou skupinou enzýmov katalyzujúcich prenos sacharidovej jednotky z molekuly darcu na molekulu príjemcu, čím vznikajú poly-glykozidy s veľkým spektrom biologických aktivít v organizme. V rastlinách sú najrozšírenejšou skupinou UDP glykozyltransferázy využívajúce UDP-aktivované cukry (glukózu, galaktózu, arabinózu) ako donorové molekuly a nesúce tzv. PSPG motív (z anglického Plant Secondary Product Glycosyltransferase), čo je zhodná karboxyl-terminálna sekvencia 44 aminokyselinových zvyškov reprezentujúca väzbové miesto enzýmu. Aktuálne je klonovaných a funkčne charakterizovaných *in vitro* a/alebo *in vivo* približne 100 génov UDP glykozyltransferáz, aj keď percento funkčne charakterizovaných proteínov je relatívne malé.

Vzhľadom k funkčnosti polyfenolických látok je kontrola ich produkcie regulovaná viacerými a prekrývajúcimi sa **regulačnými signálmi**, ktoré súvisia s vývinom rastlinného organizmu, ako napr. lignifikácia počas tvorby nových rastlinných pletív a produkcia antokyanínov počas tvorby kvetov a dozrievania plodov, prípadne signály vonkajšieho prostredia za účelom ochrany rastliny voči biotickým a abiotickým stresovým faktorom. V princípe je

regulácia produkcie rôznych skupín polyfenolických látok daná zmenami úrovne transkripcie transkripčných faktorov. Tieto faktory sú jednak všeobecné pre jedno- i dvojkľúčolistové rastliny, ale aj špecifické pre jednotlivé rastlinné druhy. Centrálnym pre priamu reguláciu génov biosyntetickej dráhy antokyanínov a proantokyanidínov sú regulačné komplexy označované ako MBW (MYB-bHLH-WD40), ktoré sú dnes už dostatočne preštudované v rôznych rastlinných druhoch a aj ich proteínová štruktúra a funkcie v rastlinnom organizme sú známe. MBW pozostávajú zo špecifických členov R2R3MYB a základných helix-loop-helix (bHLH) rodín transkripčných faktorov v spojení s WD-opakujúcim sa proteínom (WDR, dipeptid tryptofán-kyselina asparágová opakovanie). Regulačné komplexy MBW sú tvorené rôznymi MYB a bHLH zložkami a majú rôzne cieľové gény s rôznymi aktivačnými alebo represívnymi účinkami. WDR proteín je charakteristický pre všetky typy komplexov MBW. Zložka bHLH môže byť tiež charakteristická pre všetky typy MBW zacielené na rôzne biosyntetické dráhy.

Transkripčné faktory R2R3MYB sa podieľajú na regulácii produkcie niektorých typov flavonoidov, ako sú napr. antokyaníny a proantokyanidíny, a tiež deoxyflavonoidy a flavonoly. Sú pomerne dobre preštudované vo viacerých rastlinných druhoch a napr. R2R3MYB podskupina 6 je kódovaná malými génovými rodinami zodpovednými za modely pigmentácie v rastlinách. MYB85 a R2R3MYB podskupina 3 sa priamo zapájajú do biosyntézy lignínu pod kontrolou upstream MYB a rodiny transkripčných faktorov NAC. R2R3MYB podskupina 4 potláča biosyntézu prekursorov fenylypropanoidovej dráhy vedúcej k lignínu a iným zložkám sekundárnych metabolitov. R2R3MYB podskupina 2 je spojená s produkciou izoflavonoidov a zaradená je medzi kandidátske gény regulujúce biosyntézu polyfenolických látok.

Proantokyanidíny sú poľnohospodársky veľmi významné sekundárne metabolity, pretože sa podieľajú na tráviteľnosti proteínov v prežúvavcoch. Preto bolo identifikovaných viacero R2R3MYB regulujúcich ich biosyntetickú dráhu, napr. z druhov rodu *Arabidopsis*, *Lotus* alebo *Medicago*, a následne úspešne geneticky vložených do kŕmnych plodín za účelom zvýšenia obsahu proantokyanidínov a zvýšenia nutričnej hodnoty kŕmnej suroviny (Tabuľka 4.4).

Na druhej strane ,opísané sú transkripčné faktory podieľajúce sa na opačnom procese a vykazujúce tlmiace účinky na biosyntézu polyfenolických látok. Napr. transkripčný faktor typ R3MYB je v porovnaní s R2R3MYB oveľa menší. Obsahuje R3 región MYB DNA-väzbovej domény a aminokyselinový motív nevyhnutný na naviazanie bHLH rodín. Dokázaný je jeho význam v negatívnej regulácii biosyntetickej dráhy antokyanínov, pričom šesť R3MYBs bolo identifikovaných pre *Arabidopsis thaliana* a homológ MYBX s dokázanou primárnou úlohou v potláčaní biosyntézy antokyanínov v druhoch rodu *Petunia*. EAR doména, rastlino-špecifická

so základnou sekvenciou LxLxL alebo DLNxxP, sa vyskytuje v množstve rodín transkripčných faktorov ako doplnok R2R3MYBs a dokázané sú jej tlmiace účinky na biosyntézu flavonoidov. Usporiadanie potvrdených a kandidátskych R2R3MYB-EAR represorov vo viacerých rastlinných druhoch ukazuje niekoľko konzervovaných oblastí, pričom najvýraznejšia je (P/L)DLNL(E/D)L sekvencia, ktorou je EAR doména, ktorá je okrem TLLFR zodpovedná za aktívnu represiu. Vyskytuje sa síce menej často ako EAR, je však veľmi konzervatívna v rámci R2R3MYB represorov.

Tabuľka 4.4: Vybrané charakteristiky proantokyanidínov (Zdroj: autor).

Proantokyanidíny	
Chemická charakteristika	<ul style="list-style-type: none"> Fenolické látky často označované ako kondenzované taníny Vznikajú z katechínov a epikatechínov Proantokyanidíny vznikajú spájaním a polymerizáciou základných zložiek
Biosyntetická dráha	Oligomérne a polymérne konečné produkty produkované biosyntetickou cestou flavonoidov
Organoleptické vlastnosti	Horkosť, trpkosť, sladkosť, farba, vôňa
Biologické účinky	Antioxidačné, protizápalové, neuroprotektívne, protirakovinové, vazodilatačné, antibakteriálne, antivírusové
Zdroje	Plody, kôra, listy a semená mnohých rastlín – hlavne purpurovo, fialovo, červeno sfarbené ovocie a zelenina (hrozno, čučoriedky, brusnice, arónia, červená kapusta...)
Vybrané druhy proantokyanidínov	Kyanidín, pelargonidín, petunidín, peonidín, delfinidín

Akumulácia polyfenolických zlúčenín v rastlinných pletivách je, vychádzajúc z funkcií týchto látok, charakteristický prejav stresovej reakcie rastliny. Táto akumulácia je sprevádzaná zvýšenou enzýmovou aktivitou fenylalanín amoniak-lyázy (PAL), chalkón syntázy (CHS) a ďalších enzýmov, čo spolu so zvýšenou aktivitou fosfoenolpyruvát (PEP)-karboxylázy naznačuje posun od produkcie sacharidov k procesom zameraným na obranné a opravné mechanizmy rastliny. Práve prechod od primárneho metabolizmu k sekundárnemu je charakteristika stresovej situácie pre rastlinu a s ňou súvisiaca akumulácia polyfenolických látok. V takýchto podmienkach bola pozorovaná silná expresia mRNA kódujúca glukóza-6-fosfát dehydrogenázu (metabolická dráha pre produkciu substrátov pre šikimátovú dráhu) a 3-deoxyarabinoheptulosonát 7-fosfát syntázu (šikimátová dráha produkujúca fenylalanín).

4.5.1.2 Poľnohospodárske rastliny ako zdroje polyfenolických látok

V poľnohospodárskych plodinách boli identifikované stovky polyfenolických kyselín. Vysoký obsah týchto sekundárnych metabolitov v humánnej výžive môže mať **efekt vychytávania voľných radikálov** a tým redukovať riziko výskytu takých chorôb ako sú onkologické, srdcovo-cievne, zápalové a iné civilizačné ochorenia. Preto je odborníkmi na výživu konzumácia primárnych potravinových surovín v čo najprirodzenejšom stave s vysokým nutričným potenciálom preferovaná a odporúčaný denný príjem takýchto surovín má dokázané zdravie-prospešné a preventívno-terapeutické účinky na konzumenta.

Zrelé zrná raže siatej, ovsu siateho, jačmeňa jarného alebo maku siateho (*Papaver somniferum* L.) patria medzi **primárne potravinové suroviny** preferované v humánnej výžive v našich zemepisných pásmach a dokonca sa vyznačujú prítomnosťou polyfenolických látok s dokázanou antioxidantnou aktivitou a inhibičnou aktivitou na vybrané proteínázy (trypsin, trombín, kolagenáza, urokináza a cyklooxygenáza), pričom medzi koncentráciou celkových polyfenolických látok, flavonoidov, fenolických kyselín, celkových biogénnych tiolov a amínov a biologickými aktivitami bola sledovaná štatisticky preukazne pozitívna korelácia. Vybrané genotypy/odrody rastlín s vysokým obsahom polyfenolických látok preto môžu byť vhodným prirodzeným donorom génov pre prístupy molekulovej biológie a tvorbu nových rastlinných druhov s vylepšenými a želanými vlastnosťami, či už klasickou cestou šľachtenia alebo prístupov genetického inžinierstva. Inou možnosťou zvýšenej produkcie sekundárnych metabolitov je prístup *in vitro* a/alebo elicitácie s využitím vybraných genotypov rastlinných druhov ako donorov vysokej koncentrácie polyfenolických látok.

Klinickým štúdiám predchádzajú experimenty na laboratórnych zvieratách. Zrná pšenice s netradičnou farbou vďaka prítomnosti antokyánov sú šľachtiteľmi vytvárané už viac ako 50 rokov. Dôvodom je zvýšenie nutričných, funkčných a biologických parametrov pšeničného zrna, ktoré patrí medzi základné potraviny v ľudskej výžive. **Antokyány** ako polyfenolické látky sa preukazne vyznačujú protizápalovými a kardioprotektívnymi účinkami a inhibujú oxidatívny stres vychytávaním voľných radikálov. Preto na laboratórnych zvieratách bolo snahou sledovať vplyv diéty s vysokým podielom antokyánov vo forme pšeničných zŕn s netradičnou farbou na chemicky indukované zápalové procesy u myší, prípadne oxidačný stav a správanie laboratórnych potkanov. Potrava s vysokým podielom antokyánov mala pozitívny efekt na koncentráciu antioxidantov v krvnom sére a oxidáciu proteínov v obličkách, ale na druhej strane pozorované bolo zvýšenie peroxidácie lipidov v obličkách a zmeny v správaní

smerom k zvýšenému strachu a stresovým reakciám. Molekulárne mechanizmy smerujúce k objasneniu týchto záverov sú stále predmetom štúdií.

4.6 Nutraceutiká

4.6.1 Základná charakteristika nutraceutík

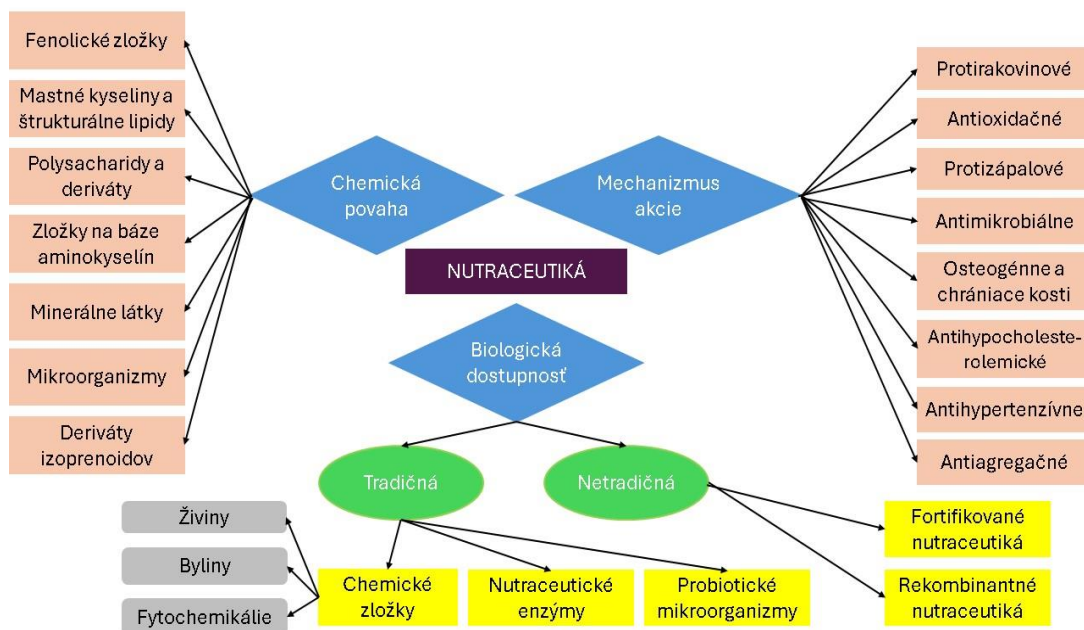
Obsah biologicky aktívnych látok v rastlinách a moderný životný štýl spôsobujúci, v dôsledku zvýšenej industrializácie, zvýšenej úrovne znečistenia a nesprávnej výživy, tzv. civilizačné ochorenia v ľudskej populácii, prispel k vývoju **nutraceutík**. Globálny trh s nutraceutikami zabezpečuje z 90 % Európa, USA a Japonsko (Obrázok 4.42) a nutraceutický priemysel zarába dnes viac ako 336 miliárd dolárov ročne (rok 2023). V spojení s potravinárskym priemyslom sa v dnešnej dobe trh s nutraceutikami zaoberá vývojom nových účinných produktov, ktoré nielen zodpovedajú potrebám spotrebiteľov, ale majú aj pozitívne účinky na zdravie konzumenta.



Obrázok 4.42: Veľkosť globálneho trhu s nutraceutikami, podiel, príležitosti na rast, analýza trendov a výhľadová správa na rok 2030. (Zdroj: Zion Market Research, máj 2023, upravené).

Pojem „nutraceutiká“ vznikol v roku 1989 spojením slov výživa (z anglického slova nutrition) a farmaceutiká – látky s liečivými účinkami. Prvá definícia bola navrhnutá v roku 1995 v zmysle: „Nutraceutiká sú potraviny alebo zložky potravín podporujúce zdravie a/alebo znižujúce riziko niektorých ochorení“. Iná definícia hovorí o tom, že nutraceutiká sú „akékoľvek netoxické zložky potravy, ktoré majú vedecky dokázané zdravotné výhody, vrátane liečby a prevencie“. Veterinárne nutraceutikum je definované ako „látka, ktorá sa vyrába v čistej alebo extrahovanej forme, podáva sa do organizmu perorálne a poskytuje prostriedky potrebné pre normálnu stavbu tela a funkcie s úmyslom zlepšiť zdravie a pohodu zvierat“. Zohľadniac všetky tieto definície by sme mohli nutraceutiká charakterizovať ako látky, ktoré sa pestujú/vyrábajú/extrahujú, resp. syntetizujú za optimálnych a reprodukovateľných podmienok a pri perorálnom podávaní poskytujú živiny na zlepšenie štruktúry a funkcie organizmu v zmysle zdravia a pohody.

Nutraceutiká sú kategorizované ako **bioaktívne zlúčeniny**, živiny a doplnky stravy získané z rastlinných zdrojov s funkciou zlepšiť pohodu človeka, pôsobiť preventívne a liečiť choroby a podporovať optimálne fungovanie organizmu. Medzi nutraceutiká zaraďujeme zložky potravinovej vlákniny, probiotiká, prebiotiká, polynenasýtené MK, vitamíny s antioxidačnou aktivitou, polyfenoly a koreniny. Patria sem izolované výživné látky, doplnky stravy rastlinného pôvodu v tekutej forme alebo vo forme kapsúl a tabletiiek, sušené liečivé rastliny, čínska prírodná medicína, bylinkové čaje, nápoje pre športovcov a geneticky modifikované potraviny (Obrázok 4.43).



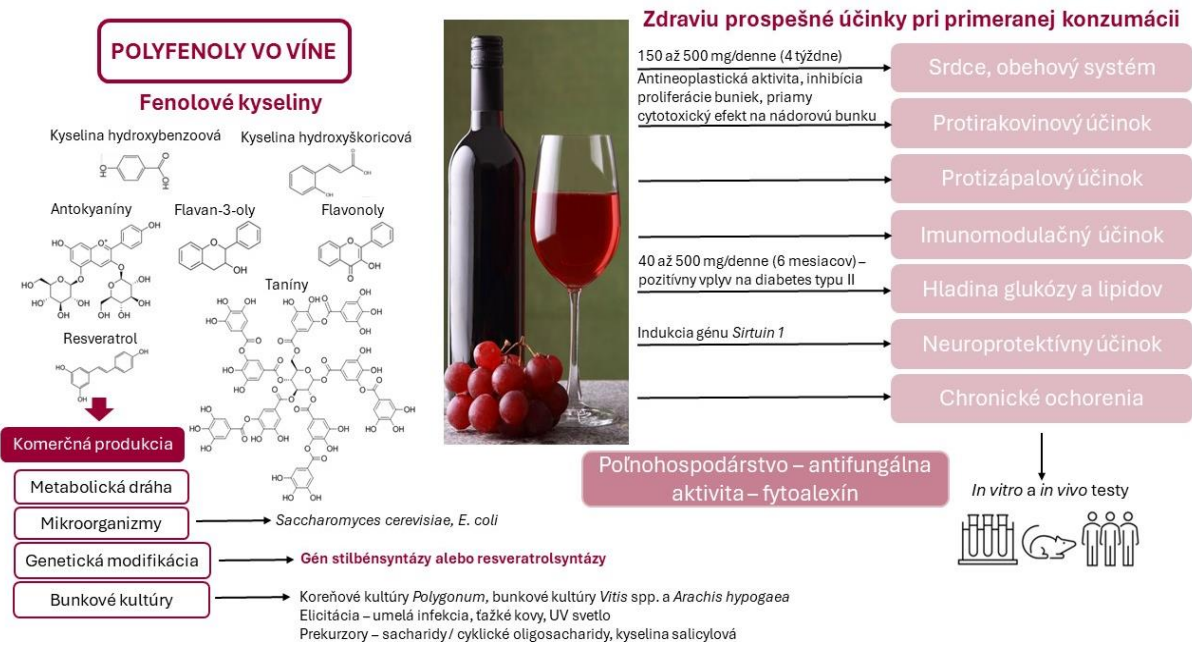
Obrázok 4.43: Rozdelenie nutraceutík na základe chemickej povahy, biologických účinkov a biologickej dostupnosti v potrave (Zdroj: autor).

Veľa produktov sa považuje za nutraceutiká, preto je prijatie všeobecnej legislatívy, ktorá by zahŕňala všetky produkty, takmer nemožné. Na zvýšenie produkcie a nutričných hodnôt biologicky aktívnych látok v rastlinách slúžia biotechnologické metódy ako genetické inžinierstvo a práve objav genetického inžinierstva pripravil základ pre výrobu nutraceutík.

4.6.2 Nutraceutiká a choroby

Nutraceutiká zahŕňajú rôzne skupiny biologicky aktívnych metabolitov rastlín s mnohými preventívnymi a terapeutickými účinkami. Množstvo publikovaných vedeckých prác odkazuje na túto problematiku. Medzi nutraceutiká patria **látky s dokázaným biologickým účinkom** ako je antioxidačný, protizápalový, imunomodulačný, adaptogénny a protirakovinový a využívajú sa na prevenciu a liečbu chronických ochorení tráviaceho systému, srdcovo-cievnych ochorení, zápalových ochorení, ochorení dýchacieho systému, centrálného nervového systému, rakoviny a celkovo na podporu imunitného systému. Nutraceutiká poskytujú svoje výhody v širokom spektre terapeutických oblastí, ako je napr. kašeľ a nádcha, zápalové ochorenia kĺbov, poruchy trávenia a spánku, liečba rakoviny, depresia a metabolomické ochorenia ako je cukrovka, zvýšená hladina cholesterolu a krvného tlaku. Nutraceutiká sú tiež účinné ako lieky proti bolesti. Pre farmaceutický priemysel sú však nevyhnutné vedecké postupy zamerané na štandardizáciu biologicky aktívnych zložiek, zodpovedný vývoj protokolov a klinické štúdie. Každopádne v dnešnej dobe pozorujeme obrovský nárast povedomia o nutraceutikách ako o účinných terapeutických doplnkoch a „nutraceutická medicína“ je akceptovaná ako súčasť komplementárnej a alternatívnej medicíny.

Z hľadiska prevencie a liečby srdcovo-cievnych ochorení štúdie dokázali, že napr. **polyfenolické látky v hrozne** pôsobia preventívne pri arteriálnych ochoreniach (Obrázok 4.44), flavonoidy v cibuli, hrozne, červenom víne, jablkách alebo čerešniach blokujú angiotenzín konvertujúci enzým a posilňujú drobné kapiláry prenášajúce kyslík a esenciálne živiny a zložky potravinovej vlákniny v ryžových a ovsených otrubách znižujú hladinu cholesterolu v krvnom sére. **Alacín a aliín v cesnaku** majú antihyperlipidemický účinok, znižujú zvýšenú hladinu cholesterolu v krvi a tak pozitívne pôsobia proti ischemickej chorobe srdca, ateroskleróze a podobne. Podobné účinky boli dokázané aj pri **izoflavonoidoch v sóji alebo fytosteroloch v rastlinných olejoch**, orieškoch a celozrnných obilných produktoch.

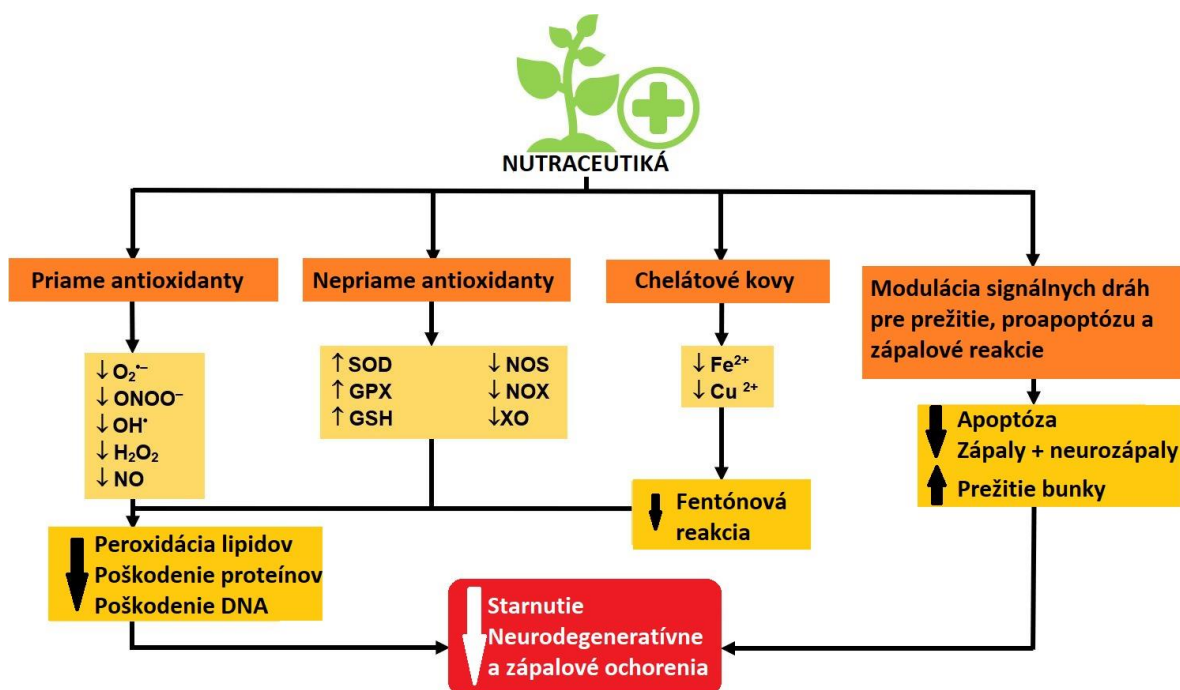


Obrázok 4.44: Zastúpenie najvýznamnejších polyfenolických látok v červenom víne a ich biologické aktivity. Je dokázané, že genetickou modifikáciou génov pre stilbénsyntázu alebo resveratrolsyntázu (STS) je produkovaný trans-resveratrol prejavujúci sa lepším zdravotným stavom rastliny a pri nadexpresii STS sa pri rastlinách prejavuje zvýšená odolnosť voči rôznym plesňovým infekciám. (Zdroj: autor).

Nutraceutiká ako terapeutické prostriedky odvodené od rastlín sa úspešne využívajú na prevenciu onkologických ochorení a na zníženie vedľajších účinkov rádioterapie a chemoterapie a zvýšenie úspešnosti liečby. Účinnými sú v tomto zmysle pri karcinóme konečníka fenolové zlúčeniny ako antokyány, fenolové kyseliny a flavonoidy v hroznových výliskoch. Kurkumín z kurkumy je úspešný na potlačenie angiogenézy, metastázovania a proliferácie rakovinových buniek pri rakovine pankreasu, konečníka, prostaty, žalúdka a pečene. Podobne je zázvor účinný vďaka antimutagénym, antioxidantným a protizápalovým účinkom, izoflavonoid genisteín izolovaný zo sóje blokujúci metyláciu DNA alebo silibinin nachádzajúci sa v rastline ostropestrec mariánsky.

Antioxidačná aktivita metabolitov rastlinného pôvodu je v dnešnej dobe výrazne študovaná, pretože je dokázaný vzťah medzi fytonutrientami a procesmi oxidačno-redukčných reakcií. Antioxidačná aktivita ovplyvňuje priaznivé účinky potravín nielen na kvalitu a trvácnosť potraviny, ale aj na zdravie človeka. Rastlinné primárne potravinové suroviny obsahujú viac ako päť tisíc druhov **fytonutrientov** (prípadne označenie fytonutrienty ako faktory s mimonutričnou aktivitou), ktoré ovplyvňujú biochemické pochody v organizme. Ich funkciou je spomaľovať alebo rušiť nežiaduce oxidačné reakcie už na

intracelulárnej úrovni. Dokážu odstraňovať reaktívne formy kyslíka a iné voľné radikály, redukovať medziprodukty reťazových oxidačných zmien a tlmieť aktivitu endogénnych antioxidantných enzýmov. Fytonutrióny majú vysoký oxidačno-redukčný potenciál a preto sú často súčasťou nutraceutík so zdraviu-prospešným efektom (Obrázok 4.45).



Obrázok 4.45: Hlavné mechanizmy účinku nutraceutík ako antioxidantov. SOD = superoxiddismutáza, GPX= glutatión peroxidáza, GSH = redukovaný glutatión, NOS = syntáza oxidu dusnatého, NOX = NADPH oxidáza , XO = antioxidant. (Zdroj: Ramli a kol., 2020, upravené).

Koža je najväčším orgánom tela s ochrannou funkciou. Pôsobením mikroorganizmov a rôznych abiotických faktorov prostredia môže dôjsť k jej poškodeniu a tým aj zníženej ochrannej funkcii organizmu. **Zmierniť starnutie kože a zníženie jej funkčnosti** pomáhajú nutraceutiká ako bioaktívne peptidy, bioaktívne polysacharidy, rastlinné extrakty, karotenoidy a podobne, ktoré majú protizápalové a antioxidantné účinky. Peptidy používané na kozmetické účely sú zvyčajne odvodené od kolagénu z dôvodu zvýšenia ich biologickej dostupnosti a rozpustnosti. Vhodné sú taktiež glykozaminoglykány tvorené nerozvetvenou disacharidovou opakujúcou sa jednotkou aminocukru N-acetylglukóзамín alebo N-acetylgalaktóзамín a kyseliny glukurónovej alebo idurónovej alebo glukonát zinočnatý a vitamín C. Z rastlinných extraktov sa komerčne využíva napr. Pycnogenol® bohatý na katechíny, flavonoidy, prokyanidíny a kyseliny kávovú a asferulickú. Fotoprotektívnym charakterom sa vyznačujú aj

karotenoidy, rastlinné pigmenty lineárnej tetraterpenoidnej štruktúry, ktoré sú produkované riasami, fotosynteticky aktívnymi baktériami a rastlinami. Okrem α - a β -karoténu, luteínu, zeaxantínu, lycopénu a β -kryptoxantínu majú ochranný účinok na kožu aj vitamíny C a E.

4.6.3 Výzvy

V celosvetovej tradičnej medicíne majú dôležitá úloha, v rozvojových krajinách dokonca až 80 % primárnej zdravotnej starostlivosti, nutraceutikám. Dôvodom je, že sú preukazne účinné v prevencii a liečbe rôznych ochorení, sú bezpečné a v porovnaní s modernými syntetickými liečivami často aj nákladovo efektívnejšie. V porovnaní s čistými syntetickými liečivami je však farmakologické a toxikologické hodnotenie fytochemikálií zložitá z viacerých dôvodov. **Klimatické podmienky, kvalita a vlastnosti pôdy**, na ktorých sú rastliny pestované, prípadne **sezónnosť** počas roka spôsobujú výraznú variabilitu v rastlinách a ich fytochemických zložkách, čo ovplyvňuje aj používanie hnojív a pesticídov. **Stresové podmienky** ako nedostatok alebo nadbytok vody, škodcovia, ale aj **denné kolísanie obsahu látok**, ktoré sú predmetom záujmu, sú taktiež nevýhodou. Veľká variabilita v účinnosti produktu od šarže k šarži a od jednej spoločnosti k druhej je daná aj skutočnosťou, že rastliny obsahujú viac ako jednu aktívnu zložku a je preto potrebné **vyvinúť vhodné extrakčné postupy**, ktoré vplyvajú na identitu, čistotu, kvalitu, množstvo, zloženie, biologickú aktivitu a bezpečnosť aktívnej zložky rastliny. Okrem toho je v nutraceutikách problémom aj **prítomnosť nepravých produktov** s falošným alebo nedefinovaným zložením. Vzhľadom na to, že nutraceutiká sú rastlinného pôvodu a izolované sú z rastlín často rastúcich v prirodzených podmienkach, v procese produkcie nutraceutík hrozí riziko, že pri zvýšení koncentrácie účinných látok dochádza k zvýšeniu koncentrácie aj látok neúčinných až škodlivých, ako napr. rezíduá pesticídov, mykotoxíny a iné toxické látky vyskytujúce sa v nutraceutiku v detekovateľných množstvách. Nutraceutiká a sušené rastliny zvyčajne predstavujú veľmi zložitú maticu pre stanovenie rezíduí pesticídov, čo spôsobuje problém pri vývoji analytických metód a vyžaduje citlivejšiu instrumentáciu pre detekciu nízkych koncentračných hladín rizikových látok. Pred samotnou chromatografickou analýzou je preto potrebné zvoliť účinné kroky predúpravy.

V dnešnej dobe rýchlo sa rozvíjajúci **nutraceutický priemysel čelí výzvam** ako napríklad i) nedostatočná autenticita účinnej látky; ii) nepochopenie molekulárnych interakcií medzi bioaktívnymi fytochemikáliami v rámci tej istej rastliny; iii) variabilita pôvodu suroviny (napr. čínsky verzus americký ženšen); iv) variabilita spracovania surovín; v) nedostatočná

štandardizácia extrakčných procesov; vi) nedostatočnosť a nejednotnosť noriem kontroly kvality; vii) nedostatok informácií o bezpečnosti a toxicite látok a viii) nedostatok overených klinických štúdií. Okrem toho nežiadúce a nepriaznivé účinky nutraceutík na konzumenta môžu byť spôsobené falšovaním nutraceutík inými fytochemikáliami ako sú pyrolizidínové alkaloidy, prítomnosťou nežiaducich látok ako sú toxické kovy (arzén, olovo a kadmium), mykotoxíny (aflatoxíny, ochratoxíny a pod.), pesticídy (insekticídy, herbicídy, fungicídy a pod.) a farmaceutické liečivá a zneužívaním nutraceutík v dôsledku nedostatočnosti národných a medzinárodných predpisov.

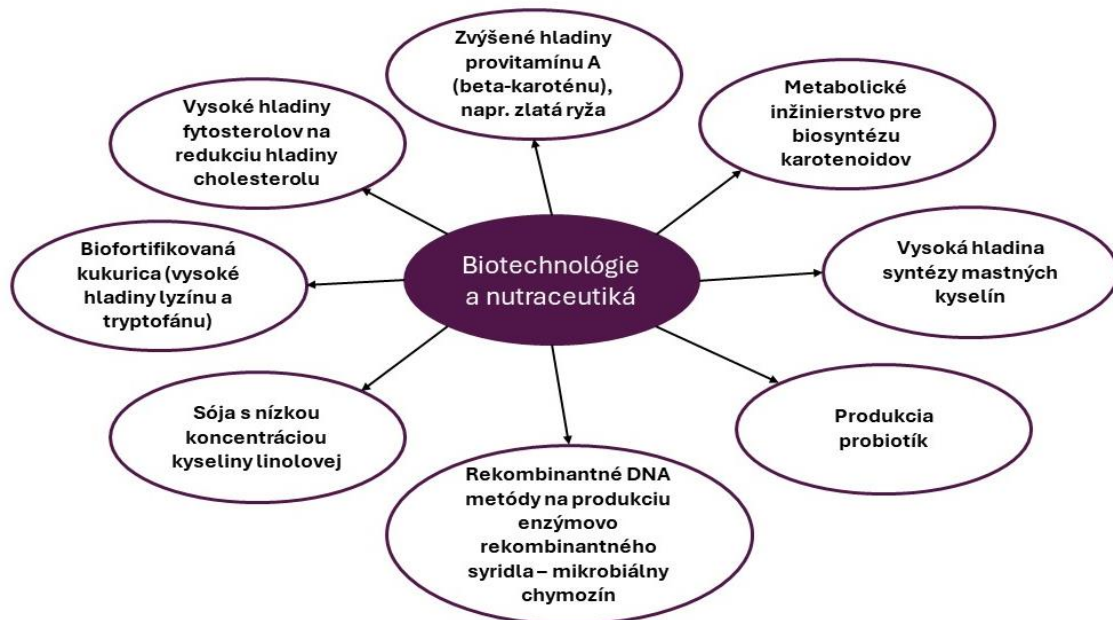
Veľmi dôležité pre účinné využívanie nutraceutík sú ich interakcie s liekmi, prípadne inými rastlinnými preparátmi, **aby sa zamedzilo vedľajším účinkom** od zanedbateľných až po také, ako je zlyhanie obličiek alebo pečene, prípadne letálne účinky. Preto sú systematicky študované farmakokinetické a farmakodynamické mechanizmy využívajúce integračné prístupy, vrátane testov *in vitro* a *in vivo* s použitím zvieracích modelov a ľudských tkanivových, prípadne bunkových línií, ako aj klinické štúdie na ľuďoch. To všetko pomôže lepšie porozumieť biologickej dostupnosti, metabolizmu, spôsobom dávkovania a farmakologickým a toxikologickým účinkom nutraceutík. Okrem toho prebieha vývin citlivých a spoľahlivých biomarkerov na overenie toxicity a bezpečnosti.

Výzvy, ktorým čelí nutraceutický priemysel v 21. storočí sú zamerané na dodržiavanie prísnej kontroly kvality, farmakologické a toxikologické testovanie, zodpovedne navrhnuté klinické štúdie, reprodukovateľnosť výsledkov a posúdenie bezpečnosti. Z hľadiska toxikologického testovania je osobitá pozornosť venovaná niektorým toxicitám, ktoré sa nezistia konvenčným neklinickým testovaním, ako akútne a chronická expozícia, genotoxicita, karcinogenita, reprodukčná a vývojová toxicita a farmakovigilancia. Súčasná paradigma toxikologického testovania navyše využíva moderné nástroje na predikčnú toxikológiu, metódy molekulárnej biológie, systémovú biológiu, vysokovýkonné porovnávacie metódy, výpočtovú toxikológiu a bioinformatiku.

4.6.3.1 Biotechnologické metódy ako nástroj na zvýšenie produkcie nutraceutík

Biotechnologické prístupy sa využívajú v nutraceutickom priemysle za účelom zvýšenia produkcie a nutričnej kvality rôznych plodín produkujúcich nutraceutiká (Obrázok 4.46). **Metabolomika** pomáha pri získavaní najrelevantnejších funkčných informácií o látkach

s biologickou aktivitou, využíva sa na identifikáciu zlúčenín a metabolitov. **Okrem prístupov genetického inžinierstva aj správna poľnohospodárska prax** a postupy zberu, správne laboratórne prístupy, výrobné procesy a vhodné klinické skúšky napomáhajú k tomu, aby boli nutraceutiká účinné, bezpečné a vysoko kvalitné, spĺňajúce medzinárodné normy a akceptáciu na globálnom trhu.



Obrázok 4.46: Niektoré príklady využitia biotechnologických prístupov v produkcii nutraceutík (Zdroj: autor).

Biotechnológia má v tomto novom odvetví kľúčovú úlohu. Tradične sa aplikácia biotechnologických techník v potravinárskom priemysle zameriavala na hlavné potraviny ako zdroj energie pre konzumenta, chlieb, alkohol, fermentovaný škrob, jogurt, syr, ocot a podobne. Postupne sa však predmetom záujmu biotechnológií stávajú aj biologicky aktívne nevyživové zložky vyskytujúce sa v prírodných surovinách a potravinách.

Biotechnologické spoločnosti zapojené do skúmania a vývoja nutraceutických produktov patria najmä do potravinárskeho (55 %) a farmaceutického (35 %) priemyslu a medzi farmaceutickými a potravinárskymi spoločnosťami existujú strategické partnerstvá.

Jednou z možností, kde sa aktívne zapájajú biotechnológie do produkcie nutraceutík, je ich **produkcia z biomasy mikrorias**, ktorá je bohatá na karotenoidy, MK a ďalšie makro- a mikrozložky buniek. Biotechnológie zahŕňajú v tejto produkcii metódy *in vitro* kultivácie rastlinných pletív a/alebo orgánov, priamu a nepriamu organogenézu, somatickú embryogenézu, produkciu syntetických semien alebo kryoprezerváciu spolu so zásahmi genetického inžinierstva a nanotechnológií. **Bunkové suspenzné kultúry** s aplikáciou

elicitácie a **kultivácia protoplastov** sú spôsoby účinné na zvýšenie produkcie sekundárnych metabolitov a s využitím genetickej transformácie vedú k dosiahnutiu požadovanej kvality, množstvu a vlastností rastlinných metabolitov, ktoré nachádzajú následne uplatnenie pri vývoji nutraceutických prostriedkov.

Ďalším príkladom biotechnologických prístupov pri produkcii nutraceutík je embilika lekárska alebo amalaki (*Emblica officinalis* L.). Je to tropický, opadavý strom plodiaci drobné veľmi kyslé a trpké plody s vysokým obsahom vitamínu C a tanínov. Prirodzená frekvencia jeho rozšírenia je pomerne malá a stromy sú veľmi náchylné na rôznych škodcov a patogénov. Úspešne sa rastlina množí v *in vitro* podmienkach, prípadne sa uskutočňuje v týchto podmienkach jej ozdravovanie a produkcia zdravých mladých rastlín a aplikáciou metód molekulárnej biológie analýza genotypov, hľadanie vhodných génov a ich následná genetická modifikácia. Pôvodne to boli RAPD markery, dnes aj markermi podporované šľachtenie (MAS), lokusy kvantitatívnych znakov (QTL), funkčná genomika, RNA interferencie a proteomika zabezpečujú kvalitný biotechnologický prístup k produkcii vstupného materiálu s vysokým obsahom nutraceutík. Nanotechnologické nástroje taktiež pomáhajú riešiť niektoré dôležité prístupy v danej problematike.

4.7 Zoznam použitej literatúry

ABEUOVA, L. – KALI, B. – TUSSIPKAN, D. – AKHMETOLLAYEVA, A. – RAMANKULOV, Y. – MANABAYEVA, S. (2023). CRISPR/Cas9-mediated multiple guide RNA-targeted mutagenesis in the potato. *Transgenic Research* <https://doi.org/10.1007/s11248-023-00356-8>

ACQUAAH, G. (2012). *Principles of Plant Genetics and Breeding*. <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0470664762.html>.

ADEYINKA, O.S. – TABASSUM, B. – KOLOKO, B.L. – OGUNGBE, I.V. (2023). Enhancing the quality of staple food crops through CRISPR/Cas-mediated site-directed mutagenesis. *Planta* 257: 78. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04110-6>.

AI, Y. – JANE, J.-L. (2018). Understanding starch structure and functionality. *Starch in Food* : 151– 178.

AKOH, C.C. (2017). *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, Fourth Edition. CRC Press.

https://books.google.sk/books?hl=sk&lr=&id=0G9dDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=food+biotechnology+lipids&ots=gJz9d4SDbF&sig=PWvBIL1ryEbfZJrcSj3WXS46UWU&redir_esc=y#v=onepage&q=food%20biotechnology%20lipids&f=false

BATES, P.D. – STYMNE, S. – OHLROGGE, J. (2013). Biochemical pathways in seed oil synthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16: 358–364.

BECKLES, D.M. – THITISAKSAKUL, M. (2014). Use of Biotechnology to Engineer Starch in Cereals. *Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food*.

BLAŽEKOVÁ, L. – BIELEČKOVÁ, S. – HORVÁTHOVÁ, V. (2015). Izolácia a chemická charakterizácia pšeničných arabinoxylánov. *Chemické Listy*, 109(9), 666–672. <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/310>

BOJARCZUK, A. – SKĄPSKA, S. – MOUSAVI KHANEGHAH, A. – MARSZAŁEK, K. (2022). Health benefits of resistant starch: A review of the literature. *Journal of Functional Foods*, 93, 105094, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105094>.

BOTTICELLA, E.S. – VALENTIN, D. – FRANCESCO, S. (2021). The Triple Jags of Dietary Fibers in Cereals: How Biotechnology Is Longing for High Fiber Grains. *Frontiers in Plant Science*, 12, DOI: 10.3389/fpls.2021.745579.

BURTON, R.A. – FINCHER, G.B. (2014). Plant cell wall engineering: applications in biofuel production and improved human health. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26: 79–84.

CORRÊA, J.A.F. – EVANGELISTA, A.G. – DE MELO NAZARETH, T. – LUCIANO, F.B. (2019). Fundamentals on the molecular mechanism of action of antimicrobial peptides. *Materialia* 8: 100494. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2019.100494>.

CORREA, S.M. – FERNIE, A.R. – NIKOLOSKI, Z. – BROTMAN, Y. (2020). Towards model-drive characterization and manipulation of plant lipid metabolism. *Progress Lipid Res.* 80: 101051.

DIXON, R.A. – LIU, C. – JUN, J.H. (2013). Metabolic engineering of anthocyanins and condensed tannins in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24: 329–335.

DROZDÍKOVÁ, E. – OBERNAUEROVÁ, M. (2015). Lipidy, funkčné a štrukturálne komponenty eukaryotických buniek. *Chem. Listy* 109: 600–605.

DULLIUS, A. – FASSINA, P. – GIROLDI, M. – GOETTERT, M.I. – VOLKEN DE SOUZA, C.F. (2020). A biotechnological approach for the production of branched chain amino acid containing bioactive peptides to improve human health: A review. *Food Research International*, 131: 109002. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109002>.

FARROKHI, N. – BURTON, R.A. – BROWNFIELD, L. – HRMOVA, M. (2006). Plant cell wall biosynthesis: genetic, biochemical and functional genomics approaches to the identification of key genes. *Plant Biotechnol. J.* 4: 145–167.

FASAHAT, P. – WICKNESWARI, R. – RAHMAN, S. (2014). Genetic controls on starch amylose content in wheat and rice grains. *Journal of Genetics* 93(1): 279–292.

FIAZ, S. – AHMAD, S. – NOOR, M.A. – WANG, X. – YOUNAS, A. – RIAZ, A. – RIAZ, A. – ALI, F. (2019). Applications of the CRISPR/Cas9 System for Rice Grain Quality Improvement: Perspectives and Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences* 20(4):888. <https://doi.org/10.3390/ijms20040888>

FINCHER, G.B. – STONE, B.A. (2004). Chemistry of nonstarch polysaccharides. in *Encyclopedia of Grain Science* (eds. Wrigley, C., Corke, H. & Walker, C.E.) 206–223 (Elsevier, Oxford, UK, 2004).

FRAGA, C.G. – CROFT, K.D. – KENNEDY, D.O. – TOMÁS-BARBERÁN, F.A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct.* 10: 514–528.

GANTAIT, S. – MAHANTA, M. – BERA, S. – KUMAR VERMA, S. (2021). Advances in biotechnology of *Embllica officinalis* Gaertn. syn. *Phyllanthus emblica* L.: a nutraceuticals-rich fruit tree with multifaceted ethnomedicinal uses. *3 Biotech* 11: 62. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02615-5>.

GAVURNÍKOVÁ, S. – HAVRLETOVÁ, M. – KRAIC, J. (2014). Effects of starchy and β -glucan additives on flour, dough, and bread parameters. *Acta Alimentaria* 43(2): 210–217.

GENG, L. – HE, X. – YE, L. – ZHANG, G. (2022): Identification of the genes associated with β -glucan synthesis and accumulation during grain development in barley. *Food Chemistry: Molecular Sciences* 5: 100136. DOI: 10.1016/j.fochms.2022.100136.

GUPTA, R.C. (2016). *Nutraceuticals - efficacy, safety and toxicity*, Academic Press of Elsevier. ISBN: 978-0-12-802147-7. 1042 strán.

HAVRLETOVÁ, M. – ANTALÍKOVÁ, G. – HOZLÁR, P. – ČIČOVÁ, I. – DVONČOVÁ, D. – KRAIC, J. (2005). Vlákna: definícia, význam, metódy stanovenia a vybrané primárne zdroje. *Biologické listy* 74(4), 2005, s. 271-284.

HAVRLETOVÁ, M. – DVOŘÁČEK, V. – JURKANINOVÁ, L. – GREGUSOVÁ, V. (2023): Unraveling the Potential of β -D-Glucans in Poales: From Characterization to Biosynthesis and Factors Affecting the Content. *Life* 2023, 13: 1387. DOI: 10.3390/life13061387.

HAVRLETOVÁ, M. – KRAIC, J. (2006). Content of beta-D-glucan in cereal grains. *J. Food Nutr. Res.* 45(3): 97–103.

HAVRLETOVÁ, M. – PETRULÁKOVÁ, Z. – BURGÁROVÁ, A. – GAGO, F. – HLINKOVÁ, A. – ŠTURDÍK, E. (2011). Cereal beta-glucans and their significance for the preparation of functional foods – A review. *Czech J. Food Sci.* 29(1): 1–14.

HAVRLETOVÁ, M. – PETRULÁKOVÁ, Z. – BURGÁROVÁ, A. – GAVURNÍKOVÁ, S. – ČERVENÁ, V. – ŠTURDÍK, E. – KRAIC, J. – ŽOFAJOVÁ, A. (2013). Properties of cereal β -D-glucan hydrocolloids and their effect on bread and ketchup parameters. *Polish J. Food Nutr.* 63(2): 79–86.

HAVRLETOVA, M. – PŠENÁKOVÁ, I. – ŽOFAJOVÁ, A. – RŮCKSCHLOSS, L. – KRAIC, J. (2014). Anthocyanins in wheat seed – A mini review. *Nova Biotechnol. Chim.* 13(1): 1-12.

HUANG, L. – TAN, H. – ZHANG, CH. – LI, Q. – LIU, Q. (2021). Starch biosynthesis in cereal endosperms: An updated review over the last decade. *Plant Communications* 2(5): 100237. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100237>.

CHAPMAN, K.D. – AZIZ, M. – DYER, J.M. – MULLEN, R.T. (2019). Mechanisms of lipid droplet biogenesis. *Biochem. J.* 476: 1929–1942.

CHEYNIER, V. – COMTE, G. – DAVIES, K.M. – LATTANZIO, V. – MARTENS, S. (2013). Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol. Biochem.* 72: 1–20.

JANŠÁKOVÁ, K. – BÁBÍČKOVÁ, J. – FILOVÁ, B. – LENGYELOVÁ, E. – HAVRLETOVÁ, M. – KRAIC, J. – CELEC, P. – TÓTHOVÁ, L. (2015). Anthocyanin-rich diet in chemically induced colitis in mice. *Folia Biol.* 61(3): 104–109.

JANŠÁKOVÁ, K. – BÁBÍČKOVÁ, J. – HAVRLETOVÁ, M. – HODOSY, J. – KRAIC, J. – CELEC, P. – TÓTHOVÁ, L. (2016). The effects of anthocyanin-rich wheat diet on the oxidative status and behavior of rats. *Croatian Med. J.* 57(2): 119–130.

KABERA, J.N. – SEMANA, E. – MUSSA, A.R. – HE, X. (2014). Plant secondary metabolites: Biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 2: 377–392.

KRAIC, J. – MIHÁLIK, D. – KLČOVÁ, L. – GUBIŠOVÁ, M. – KLEMPOVÁ, T. – HUDCOVICOVÁ, M. – ONDREIČKOVÁ, K. – MRKVOVÁ, M. – HAVRLETOVÁ, M. – GUBIŠ, J. – ČERTÍK, M. (2018). Progress in the genetic engineering of cereals to produce essential polyunsaturated fatty acids. *J. Biotechnol.* 284: 115–122.

KRUNIC, T. – RAKIN, M. – BULATOVIC, M. – ZARIC, D. (2018). Chapter 9 - The Contribution of Bioactive Peptides of Whey to Quality of Food Products. Editor(s): Alexandru Mihai Grumezescu, Alina Maria Holban. In *Handbook of Food Bioengineering, Food Processing for Increased Quality and Consumption*. Academic Press, Pages 251-285, ISBN 9780128114476. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811447-6.00009-6>.

MIELKE T. (2019). World Markets for Vegetable Oils: Status and Prospects. In: Kaltschmitt M. (eds) *Energy from Organic Materials (Biomass)*. Encyclopedia of Sustainability Science and Technology Series. Springer, New York, NY.

MIHÁLIK, D. – GUBIŠOVÁ, M. – KRAIC, J. – HUDCOVICOVÁ, M. – HAVRLETOVÁ, M. – MORAVČÍKOVÁ, J. – GLASA, M. – MATUŠÍKOVÁ, I. (2017). Introduction of a synthetic *Thermococcus*-derived alfa-amylase gene into barley genome for increased enzyme thermostability in grains. *El. J. Biotechnol.* 30: 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.08.002>

MIHÁLIK, D. – LANČARIČOVÁ, A. – MRKVOVÁ, M. – KAŇUKOVÁ, Š. – MORAVČÍKOVÁ, J. – GLASA, M. – ŠUBR, Z. – PREDAJŇA, L. – HANČIINSKÝ, R. – GREŠÍKOVÁ, S. – HAVRLETOVÁ, M. – HAUPTVOGEL, P. – KRAIC, J. (2020). Diacylglycerol acetyltransferase gene isolated from *Euonymus europaeus* L. altered lipid metabolism in transgenic plant towards the production of acetylated triacylglycerols. *Life* 10(205): 1–16. DOI: 10.3390/life10090205.

MENDIS, S. – SIMCEK, S. (2014). Arabinoxylans and human health. *Food Hydrocolloids* 42(2): 239–243. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2013.07.022.

PANG, J. – ZHANG, Y. – TONG, X. – ZHONG, Y. – KONG, F. – LI, D. – LIU, X. – QIAO, Y. (2023): Recent Developments in Molecular Characterization, Bioactivity, and Application of Arabinoxylans from Different Sources. *Polymers* 15: 225. DOI: 10.3390/polym15010225.

PÁLENIKOVÁ, A. – HROUZKOVÁ, S. (2016): Súčasný stav a trendy extrakcie rezíduí pesticídov z nutraceutík. *Chemické listy* 110: 630-640.

PURI, V. – NAGPAL, M – SINGH, I. – SINGH, M. – DHINGRA, G.A. – HUANBUTTA, K. – DHEER, D. – SHARMA, A. – SANGNIM, T.A. (2022): Comprehensive Review on Nutraceuticals: Therapy Support and Formulation Challenges. *Nutrients* 14(21): 4637. doi: 10.3390/nu14214637.

RADAKOVITS, R., – JINKERSON, R.E. – DARZINS, A. – POSEWITZ, M.C. (2010): Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production. *Eukaryot Cell* 9(4): 486-501. Doi: <https://doi.org/10.1128/ec.00364-09>

RAJAK, N. – TIWARI, A. – KUMAR, P. – GARG, N. (2023). Chapter 7 - Overview on nutraceuticals and biotechnology, Editor(s): Inamuddin, Tariq Altalhi, Jorddy Neves Cruz, Nutraceuticals, Academic Press, pages 175-191, ISBN 9780443191930, <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19193-0.00002-2>.

RAMLI, N.Z. – YAHAYA, M.F. – TOOYAMA, I. – DAMANHURI, H.A. (2020). A Mechanistic Evaluation of Antioxidant Nutraceuticals on Their Potential against Age-Associated Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants* 9: 1019. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox9101019>.

RANGARAJ, S. – SASIKANTH, V. – AMMASHI, S. – RATHINAVEL, T. (2023). Chapter 4 - Nutraceuticals and cosmeceuticals: An overview, Editor(s): Inamuddin, Tariq Altalhi, Jorddy Neves Cruz, Nutraceuticals, Academic Press, pages 99-125, ISBN 9780443191930, <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19193-0.00004-6>.

SHEN, L. – LI, J. – Li, Y. (2022). Resistant starch formation in rice: Genetic regulation and beyond. *Plant Communications* 3(3): 100329. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100329>.

SHRESTHA, P. (2023). Starch: Structure, Composition, Properties, Uses, Types. Dostupné online: <https://microbenotes.com/starch/>.

SHU, X. – RASMUSSEN, S.K. (2014). Quantification of amylose, amylopectin, and β -glucan in search for genes controlling the three major quality traits in barley by genome-wide association studies. *Frontiers in Plant Science*, 5, 197: 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00197>.

SLAVIN, L. – TUCKER, M. – HARRYNMAN, C. – JONNALAGADDA, S.S. (2013). Whole grains: Definition, dietary recommendations, and health benefits. *Cereal Food World* 58: 191–198.

TUNCEL, A. – CORBIN, K.R. – AHN-JARVIS, J. – HARRIS, S. – HAWKINS, E. – SMEDLEY, M.A. – HARWOOD, W. – WARREN, F.J. – PATRON, N.J. – SMITH, A.M. (2019). Cas9-mediated mutagenesis of potato starch-branching enzymes generates a range of tuber starch phenotypes. *Plant Biotechnology Journal* 17, 12: 2259-2271. <https://doi.org/10.1111/pbi.13137>.

TWAIJ, B.M. – HASAN, M.N. (2022). Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. *Int. J. Plant Biol.* 13: 4-14. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijpb13010003>.

THAKUR, M. – BHATTACHARYA, S. – KUMAR KHOSLA, P. – PURI, S. (2019). Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *J. Appl. Res. Medicinal Aromatic Plants* 12: 1–12.

VERMA, G. – KUMAR MISHRA M. (2016). A review on nutraceuticals: classification and its role in various diseases. *International Journal of Pharmacy & Therapeutics*, 7(4): 152-160.

WANG, J. – YANG, Y. – YAN, Y. (2018). Bioproduction of resveratrol. *Biotechnol. Natural Products* 62-79.

WILDMAN, R. E. C. (2007). *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. 2nd Edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, USA. ISBN 0-8493-6409-4, 562 strán.

WILLIAMS, B.A. – MIKKELSEN, D. – FLANAGAN, B.M. – Gidley, M.J. (2019). Dietary fibre: moving beyond the “soluble/insoluble” classification for monogastric nutrition, with an emphasis on humans and pigs. *J Animal Sci Biotechnol* 10, 45. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0350-9>.

WILSON, S.M. – HO, Y.Y. – LAMPUGNANI, E.R. – VAN DE MEENE, A.M.L. – BAIN, M.P. – BACIC, A. – DOBLIN, M.S. (2015): Determining the Subcellular Location of Synthesis and Assembly of the Cell Wall Polysaccharide (1,3; 1,4)- β -d-Glucan in Grasses, *Plant Cell* 27(3): 754–771. DOI: 10.1105/tpc.114.135970.

QU, J. – XU, S. – ZHANG, Z. – CHEN, G. – ZHONG, Y. – LIU, L. – ZHANG, R. – XUE, J. – GUO, D. (2018). Evolutionary, structural and expression analysis of core genes involved in starch synthesis. *Scientific Reports*: 8: 12736: 1–16.

QUIDEAU, S. – DEFFIEUX, D. – DOUAT-CASASSUS, C. – POUYSÉGU, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Chem. Int.* 50: 586–621.

- XU, X. – DECHESNE, A. – VISSER, R.G.F. – TRINDADE, L.M. (2016). Expression of an (Engineered) 4,6- α -Glucanotransferase in Potato Results in Changes in Starch Characteristics. *PLoS ONE* 11(12): e0166981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166981>.
- XU, X. – VISSER, R.G.F. – TRINDADE, L.M. (2014). Chapter 4 - Starch Modification by Biotechnology: State of Art and Perspectives, Editor(s): Peter J. Halley, Luc Avérous, *Starch Polymers*, Elsevier, pages 79-102, ISBN 9780444537300, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53730-0.00021-X>.
- https://sk.wikipedia.org/wiki/Amyl%C3%A1za#/media/S%C3%BAbor:Salivary_alpha-amylase_1SMD.png.
- XU, Q. – TANG, Q. – XU, Y. – WU, J. – MAO, X. – LI, F. – WANG, S. – WANG, Y. (2023). Biotechnology in Future Food Lipids: Opportunities and Challenges. *Annual Review of Food Science and Technology* 14: 225–246. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-060721-024353>.
- YE, H. – TAO, X. – ZHANG, W. – CHEN, Y. – YU, Q. – XIE, J. (2022). Food-derived bioactive peptides: production, biological activities, opportunities and challenges. *Journal of Future Foods*, 2(4): 294-306. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.08.002>.
- YI, X. – LI, CH. (2022). Main controllers for improving the resistant starch content in cooked white rice. *Food Hydrocolloids* 122: 107083. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107083>.
- YOSHIDA, K. – OYAMA, K.I. – KONDO, T. (2012). Chemistry of flavonoids in color development. In: V. Cheynier, P. Sarni-Manchado, S. Quideau (Eds.), *Recent Advances in Polyphenols Research*, vol. 3, Wiley-Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2012, s. 99–129.
- ZAGOSKINA, N.V. – ZUBOVA, M.Y. – NECHAEVA, T.L. – KAZANTSEVA, V.V. – GONCHARUK, E.A. – KATANSKAYA, V.M. – BARANOVA, E.N. – AKSENOVA, M.A. (2023). Polyphenols in Plants: Structure, Biosynthesis, Abiotic Stress Regulation, and Practical Applications (Review). *International Journal of Molecular Science* 24: 13874. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms241813874>
- ZEEMAN, S.C. – KOSSMANN, J. – SMITH, A.M. (2010). Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 61. 209–234.

Časť 5. Regulácia a biologická bezpečnosť biotechnológií

doc. Ing. Jana Moravčíková, PhD.

Biotechnológia je vedný odbor, ktorý spája biológiu a technológiu s cieľom zlepšiť kvalitu života ľudí. S tradičnými biotechnológiami ako je výroba chleba, vína alebo piva sa ľudstvo stretáva po stáročia, avšak zlom nastal objavom štruktúry DNA a poznatkom, že pomocou genetického inžinierstva je s DNA možné manipulovať. Moderné biotechnológie významne prispievajú k pokroku v medicíne, v priemyselnej a poľnohospodárskej produkcii alebo prinášajú environmentálne výhody. Napriek prínosom existujú aj obavy o ich možné negatívne dopady. Moderné biotechnológie môžu ovplyvniť biodiverzitu, zdravie ľudí, zvierat alebo ekosystémy. Práve z tohto dôvodu bol v roku 1993 prijatý Kartagénsky protokol o biologickej bezpečnosti, ktorý je súčasťou Dohovoru o biologickej diverzite s cieľom zabezpečiť primeranú ochranu pred rizikami spojenými s prenosom, manipuláciou a používaním geneticky modifikovaných organizmov. Reguláciou a kontrolou moderných biotechnológií môžeme využívať ich potenciál a zároveň minimalizovať riziká, ktoré predstavujú pre životné prostredie.

Časť „Regulácia a biologická bezpečnosť biotechnológií“ sa venuje biotechnológiám a ich potenciálnemu riziku, ktoré by mohli predstavovať. Prináša informácie o biologickej diverzite, príčinách jej ohrozenia a o biodiverzite z hľadiska jej potrieb pre človeka. Zameriava sa na geneticky modifikované organizmy a biologické riziko, ktoré predstavujú pri nekontrolovanej manipulácii. Podrobnejšie popisuje regulačný systém, ktorý sa uplatňuje v Európskej únii a vo svete v súvislosti s geneticky modifikovanými organizmami a s novými technikami šľachtenia.

5 Regulácia a biologická bezpečnosť biotechnológií

5.1 Biologická diverzita

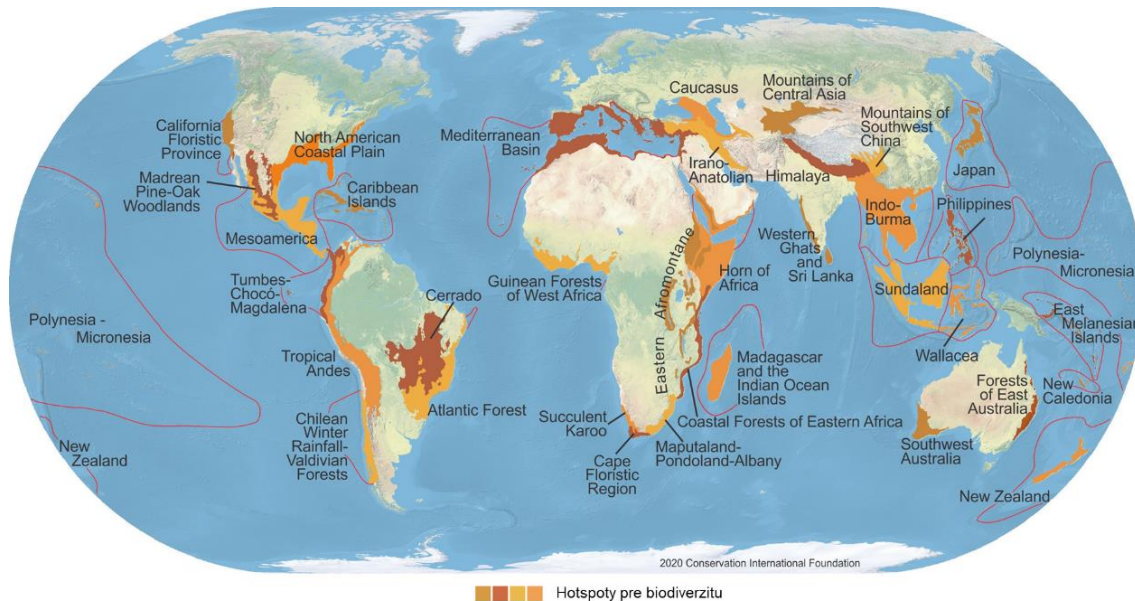
Termín **biologická diverzita** alebo biodiverzita sa používa na vyjadrenie rozmanitosti živých druhov na Zemi vrátane rastlín, zvierat, baktérií a húb, nevynímajúc ľudí. Predpokladá sa, že existuje približne 8,7 milióna druhov rastlín a živočíchov. Doteraz však bolo identifikovaných a opísaných len asi 1,2 milióna druhov, z ktorých väčšinu tvorí hmyz. To znamená, že milióny ďalších organizmov zostávajú stále neidentifikované. Avšak, v dôsledku ľudskej činnosti mnohým druhom hrozí vyhynutie, čo ohrozuje biodiverzitu. Odhaduje sa, že polovica všetkých druhov na Zemi bude vyhubená v priebehu budúceho storočia. Niektoré časti sveta, ako napríklad oblasti Mexika, Južnej Afriky, Brazílie, juhozápadu USA a Madagaskaru, majú väčšiu biodiverzitu ako iné. Termín biodiverzita bol prvýkrát vyslovený v roku 1986 etmológom E.O. Wilsonom: *„Biodiverzita je súhrn všetkej dedičnej rozmanitosti v životných formách na Zemi, z ktorých my sme jedným druhom. Skúmame ju a chránime pre náš veľký prospech. Ignorujeme a degradujeme ju na naše veľké nebezpečenstvo“*.

Termínom „**hotspot**“ sa nazývajú oblasti s najrozmanitejšou biodiverzitou na svete, pri ktorých však rýchlo klesá biodiverzita. Tento termín zaviedol v roku 1988 environmentalista Norman Myers, ktorým chcel zdefinovať oblasti s najrozmanitejšou biodiverzitou na svete, ktoré však upadajú, aby mohli byť chránené. Navrhol dve kritériá podľa ktorých by sa oblasť mohla nazývať „hotspot“ biodiverzity:

- i) V regióne musí byť najmenej 1 500 druhov cievnatých rastlín, ktoré sa nenachádzajú nikde inde na Zemi (tzv. endemické druhy).
- ii) Región musel stratit' aspoň 70 percent svojej pôvodnej zaznamenatej plochy.

Zatiaľ čo Norman Myers v roku 1988 identifikoval 10 „hotspotov“ biodiverzity, v roku 2024 to už bolo 36 oficiálnych „hotspotov“ biodiverzity (Obrázok 5.1). V súčasnosti „hotspoty“ tvoria približne 2,5 percenta pôdy a sú domovom takmer 43 percent známych endemických druhov cicavcov, plazov a vtákov na Zemi, ako aj viac ako polovice endemických druhov rastlín na svete. „Hotspoty“ biodiverzity sú tiež domovom pre približne dve miliardy ľudí, z ktorých mnohí potrebujú zdravé ekosystémy pre svoje prežitie. Predpokladá sa, že strata biodiverzity súvisí skôr s nadmerným rozvojom poľnohospodárstva alebo s nadmerným lovom a obchodom

s voľne žijúcimi zvieratami ako s hustotou obyvateľstva. Biodiverzitu môžeme tradične vyjadriť ako diverzitu genetickú, druhovú a ekosystémovú.



Obrázok 5.1: „Hotspoty“ pre biodiverzitu vo svete. Farby priradené k „hotspotom“ sa používajú iba na rozlíšenie susedných „hotspotov“ a nemajú žiadny iný význam. (Zdroj: <https://zenodo.org/record/4311850#.Y-DU6ISZMaF> , upravené).

5.1.1 Genetická diverzita

Genetická diverzita zahŕňa diverzitu génov, ktoré sú základnou jednotkou biologickej informácie. Medzi rôznymi druhmi a aj v rámci nich existuje genetická variabilita, ktorá prispieva k rôznorodosti foriem života, fyzikálnych a biologických vlastností v závislosti od interakcie s prostredím. Prispieva aj k fenotypovej rôznorodosti. Genetická diverzita je dôležitá, pretože zvyšuje pravdepodobnosť, že niektoré skupiny jednotlivcov, druhov alebo populácií sa budú môcť prispôbiť environmentálnym zmenám, a tým lepšie odolávať novým chorobám a epidémiám. Ďalšie generácie tak budú vo výhode, pretože môžu zdediť genofond, ktorý im umožní tolerovať určité podmienky a pomôže udržať prežitie ich druhu. Schopnosť druhov prispôbiť sa zmene podmienok prostredia určuje ich dlhodobé prežitie. Naopak, nízka genetická diverzita z dlhodobého hľadiska zvyšuje riziko vyhynutia určitého druhu a to z dôvodu vyššej náchylnosti voči chorobám a slabšej adaptabilite na meniace sa prostredie. Genetická diverzita nám poskytuje informácie o evolučnom procese.

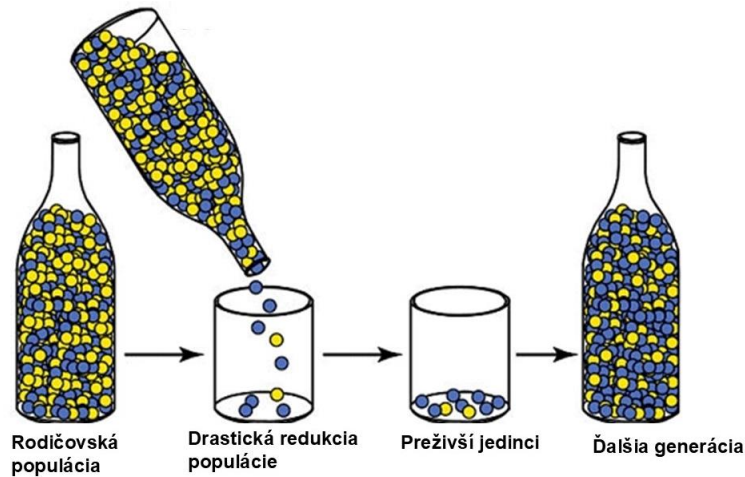
Tok génov zahŕňa prenos genetického materiálu z jednej populácie na druhú. Napríklad, prenos peľu do novej oblasti alebo presun ľudí do nových miest alebo krajín. Ak sa genetické varianty prenesú do populácie, kde predtým neexistovali, tok génov môže byť dôležitým zdrojom genetickej diverzity.

Prirodzený výber je proces, pri ktorom sa mení genofond populácie v dôsledku rozmnožovania jedincov, ktorí dokážu odolávať zmenám prostredia. Je to dôležitá metóda adaptácie populácie na podmienky prostredia počas evolúcie. Jednotlivci môžu krátkodobo odolávať environmentálnym faktorom. Dlhodobá rezistencia však vyžaduje zmenu genetického zloženia populácie, aby prežila.

Genetická diverzita v malých populáciách je dôležitá, pretože vplyvom genetického „driftu“ môžu časom ľahko stratiť svoju diverzitu. **Genetický „drift“** je evolučný proces, pri ktorom sa frekvencie alel v populácii menia náhodne z generácie na generáciu, v dôsledku náhody, nie prirodzeného výberu. Napríklad: V nejakej oblasti žijú modrí a zelení vtáci, pričom modrá farba je spôsobená dominantnou alelou a zelená recesívnou alelou. Napríklad, v dôsledku náhodnej udalosti zelení vtáci vyhynú. Následne sa budú množiť len modrí vtáci a zelená farba sa stratí, nakoľko alela pre zelenú farbu postupne vymizne.

Zvláštnym prípadom genetického „driftu“ môže byť tiež efekt hrdla fľaše (tzv. „Flat-neck effect“) (Obrázok 5.2), ktorý sa vyskytuje pri populácii ktorá prešla silným znížením počtu, ale prežila a neskôr sa jej počet opäť zvýšil. Jej genetická variabilita však bola týmto procesom znížená.

Genetická diverzita je okrem toho ovplyvnená aj mutáciami, tokom génov a prirodzeným výberom. Mutácie predstavujú zmeny v nukleotidovej sekvencii DNA. Spontánne mutácie sú zriedkavé, majú zanedbateľný vplyv a to v krátkych obdobiach. Mutácie síce nekontrolujú evolúciu, avšak v kombinácii s ďalšími adaptačnými mechanizmami môžu byť zdrojom genetickej diverzity v populácii. V mnohobunkových organizmoch sa mutácie môžu vyskytovať buď v somatickej alebo v gametofytickej bunke. Mutácie v somatických bunkách môžu narušiť proces mitózy, avšak neprenášajú sa do ďalších generácií. Mutácie v gametofytických bunkách sú dedičné mutácie a ovplyvňujú genetickú diverzitu z dlhodobého hľadiska.

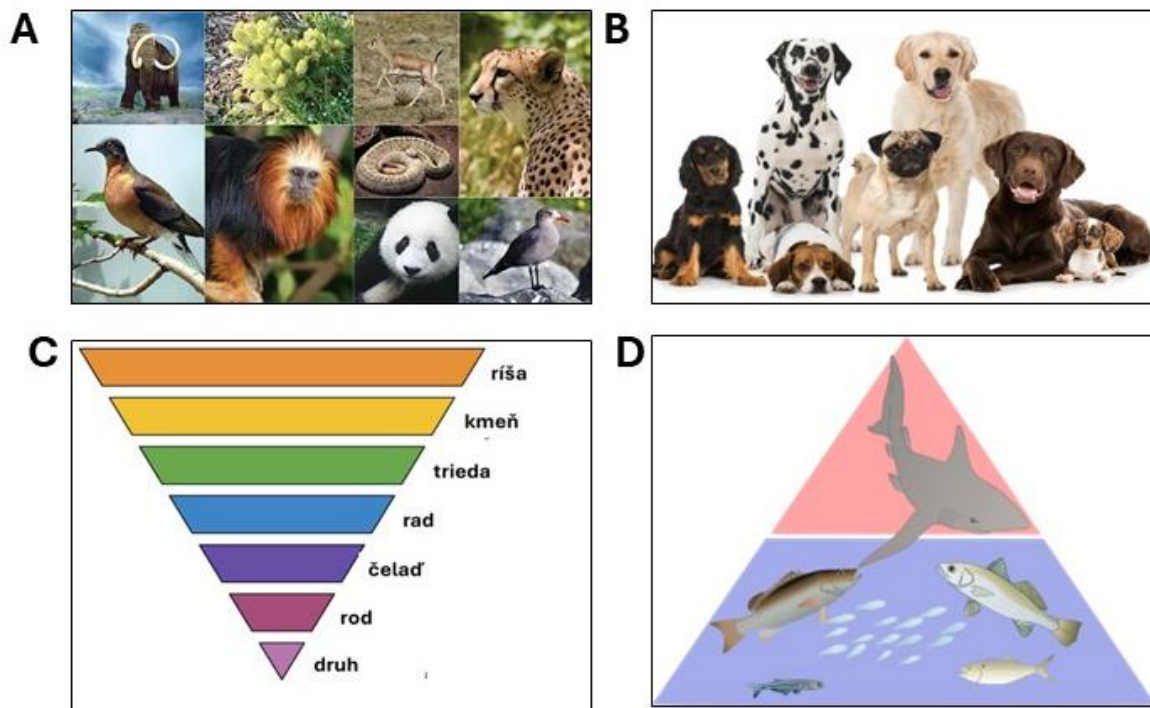


Obrázok 5.2: Mechanizmus efektu hrdla fľaše. V pôvodnej, rodičovskej populácii sú jedinci nesúci určitý znak označení žltou a modrou, zastúpení v rovnakom pomere. V dôsledku neočakávanej udalosti prežije náhodne niekoľko jedincov. V ďalšej generácii už pomer jedincov s určitými znakmi môže byť zmenený. (Zdroj: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2010/Z0005/18118868/index_book_2-5-2.html, upravené).

5.1.2 Druhovú diverzita

Druhovú diverzita (Obrázok 5.3A) alebo diverzita na úrovni druhov je definovaná ako počet živočíšnych a rastlinných druhov, ktoré žijú na určitom mieste. **Vnútrodruhovú diverzita** (Obrázok 5.3B) sa týka genetických variácií jedincov a populácií toho istého druhu (napr. ľudia s bielou alebo čiernou pokožkou, blond alebo hnedými vlasmi, modrými alebo zelenými očami). **Medzidruhovú diverzita** sa vzťahuje na rozmanitosť živých druhov medzi sebou podľa ich počtu, povahy a relatívneho významu (napr. ľudia ako druh so 7,7 miliardami jedincov, majú väčšiu diverzitu ako napríklad nízky počet afrických slonov, ktorým v súčasnosti hrozí vyhynutie). Druhovú diverzita sa dá vyjadriť ako **druhovú bohatosť** (celkový počet rôznych druhov žijúcich v regióne), **taxonomickú diverzita** (počet rôznych druhov žijúcich v regióne a ich vzájomné vzťahy) (Obrázok 5.3C) alebo **funkčnú diverzita** (počet rôznych druhov žijúcich v regióne, ich vzájomné vzťahy a ich funkcie v ekosystéme ako napr. potravinové vzťahy) (Obrázok 5.3D). Vedci doposiaľ identifikovali asi 1,75 milióna rôznych druhov. To zahŕňa 950 000 druhov hmyzu, 270 000 druhov rastlín, 19 000 druhov rýb, 9 000 druhov vtákov a 4 000 druhov cicavcov, čo je však len malá časť z celkového počtu druhov na Zemi. Existujú milióny ďalších druhov, ktoré ešte nebolo možné objaviť a pomenovať ich.

Každý druh má v ekosystéme svoju nezastupiteľnú úlohu. Napríklad, včely sú primárnymi opeľovačmi. Ich vyhynutie by spôsobilo nedostatok ovocia alebo zeleniny. Následne by mali problém živočíchy, ktoré sa nimi živia, pričom tento reťazec siaha až k ľuďom. Syndróm kolapsu včiel („Colony collapse disorder“, CCD) je jav, ku ktorému dochádza, keď väčšina včiel robotníc v kolónii zmizne a zanechá po sebe kráľovnú, veľa potravy a niekoľko včelích sestier, ktoré sa starajú o zostávajúce nezrelé včely a kráľovnú. Pôvodne sa predpokladalo, že CCD predstavuje veľkú dlhodobú hrozbu pre včely, avšak prípady CCD sa za posledných päť rokov podstatne znížili. Príčinou CCD môžu byť viaceré faktory ako sú pesticídy, urbanizácia, klimatické zmeny alebo choroby spôsobené patogénmi, ktoré prenášajú roztoče, čo robí včely citlivejšími na pesticídy.

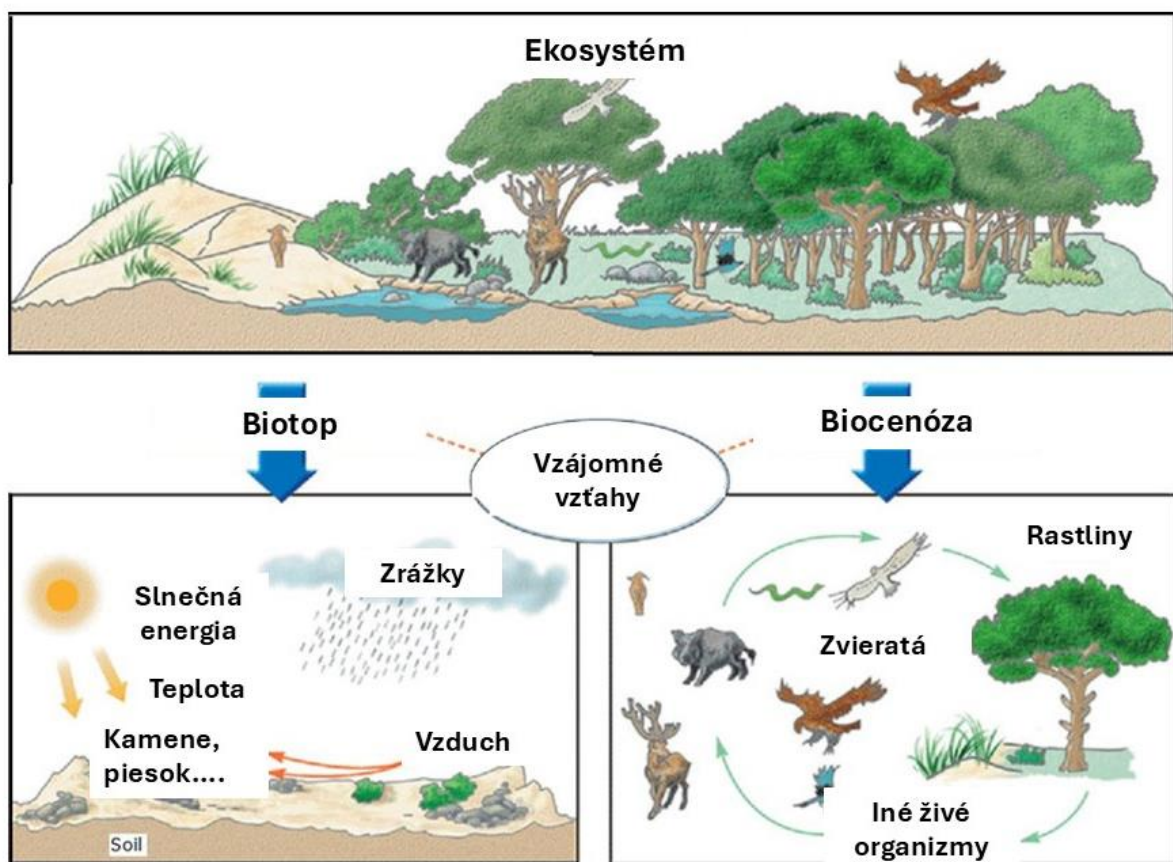


Obrázok 5.3: Ukážka druhovej diverzity živých organizmov (A), vnútrodruhej diverzity (B), taxonomickej diverzity (C), funkčnej diverzity (D).

(Zdroj: A: <https://collegedunia.com/exams/species-diversity-biology-articleid-7477>, B: <https://timesofmalta.com/article/man-and-dog-ancient-genetics-study-reveals-complex-history.828340>, C: autor, D: <https://acer.disl.org/news/2017/08/30/word-wednesday-functional-diversity/>).

5.1.3 Ekosystémová biodiverzita

Ekosystémová biodiverzita sa zaoberá štúdiom rôznych ekosystémov v určitej lokalite a ich celkovým vplyvom na človeka a životné prostredie ako celok. Je to vlastne variácia medzi rôznymi ekosystémami a má veľký vplyv na genetickú aj druhovú diverzitu. Ekosystém predstavuje ucelenú časť prírody, ktorá nie je uzavretá a komunikuje s ostatnými časťami prírody. Je to základná jednotka funkčného celku živej prírody Zeme. Ekosystém (**biogeocenóza**) pozostáva zo spoločenstva živých organizmov (biocenóza) a biotopu (Obrázok 5.4).

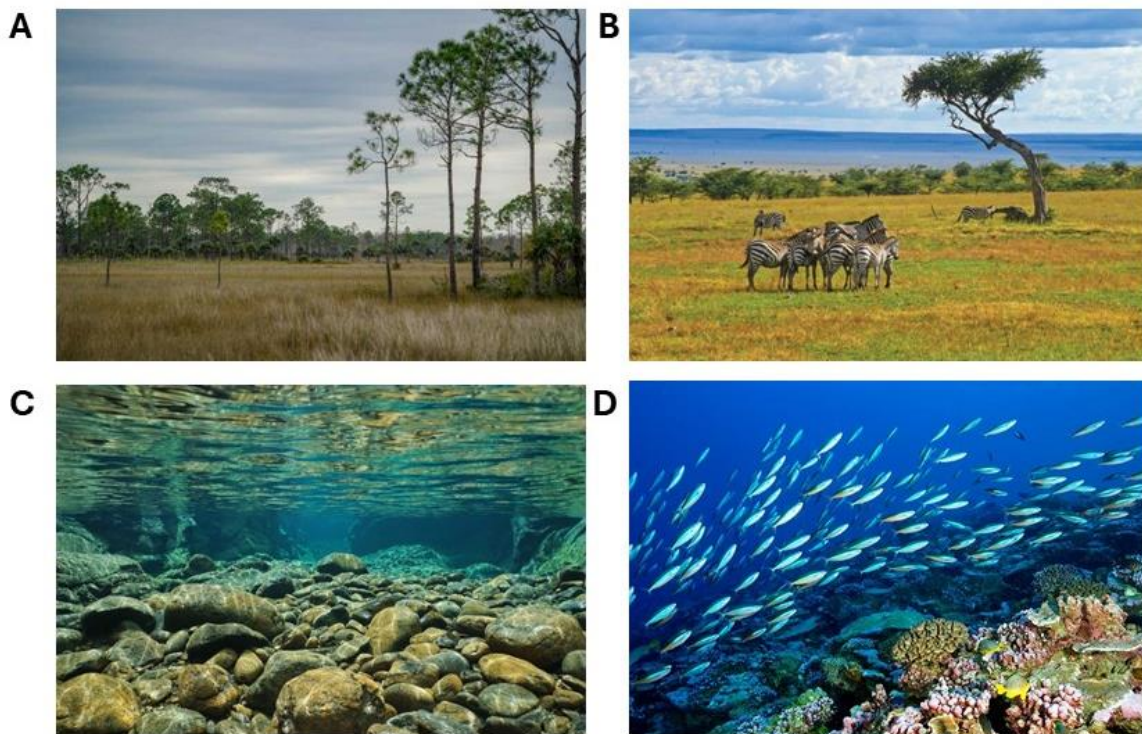


Obrázok 5.4: Ekosystém a jeho zložky (Zdroj: <https://image.jimcdn.com/app/cms/image/transf/dimension=800x10000:format=jpg/path/s37af0fcd02709117/image/i045827b90add495b/version/1385922151/image.jpg>,

Biotop je súbor všetkých činiteľov (živých aj neživých), ktoré vzájomným spolupôsobením vytvárajú životné prostredie daného jedinca, druhu, populácie alebo spoločenstva.

Biocenóza zahŕňa všetky organizmy (zvieratá, rastliny, mikroorganizmy, ľudí), ktoré osídľujú určité územie a sú spojené vzájomnými vzťahmi a vzťahmi s prostredím. Na Zemi existujú rôzne ekosystémy a každý má svoje špecifiká. Diverzita ekosystémov pozostáva zo suchozemského a vodného ekosystému, v rámci ktorých ešte existujú ďalšie typy. Všetky tieto ekosystémy prispievajú k vytvoreniu vyváženého prostredia.

Suchozemský ekosystém (Obrázok 5.5A, B) (tundry, prémie, púšte....) sa vzťahuje iba na ekosystém rôznych pôdnych foriem a zahŕňa rôzne typy ako je ekosystém lesa, púšte, dažďového pralesa, pasienkov, tundry, savany a horský ekosystém.



Obrázok 5.5: Ukážka suchozemského (A-B) a vodného ekosystému (C-D) (Zdroj: A: <https://climateadaptationexplorer.org/habitats/terrestrial>, B: <https://www.linkedin.com/pulse/how-design-can-foster-appreciation-terrestrial-ecosystems-mwema>, C: <https://facts.net/science/biology/11-fascinating-facts-about-freshwater-ecosystem/> D: <https://worldanimalfoundation.org/advocate/wild-earth/params/post/1286151/aquatic-habitats>).

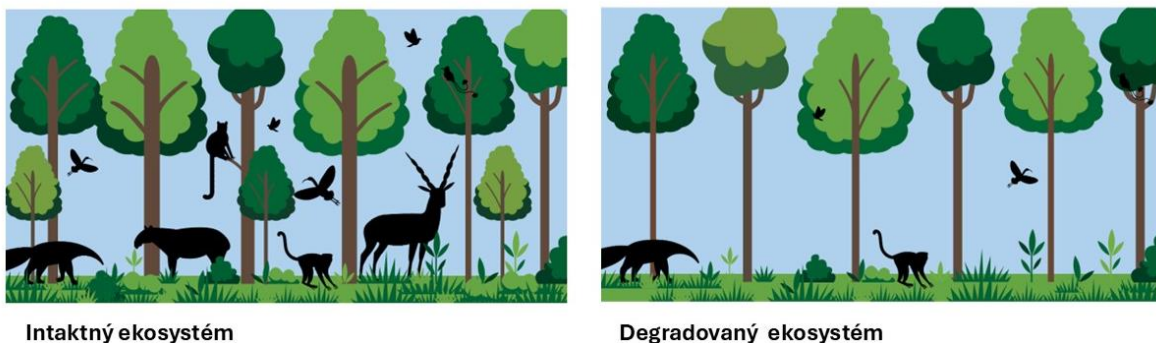
Vodný ekosystém (Obrázok 5.5C-D) je tvorený morskými a sladkovodnými ekosystémami (oceány, moria, rieky, potoky....). Morský ekosystém pokrýva takmer 70 % plochy zemského povrchu a je jedným z najväčších ekosystémov na Zemi. Sladkovodný

ekosystém pokrýva takmer 0,8 % zemského povrchu. Hlavnými druhmi sladkovodných ekosystémov sú lentické (stojaté vodné útvary, ako sú rybníky, jazerá), lotické (rýchlo tečúce vodné útvary, ako napríklad rieka) ekosystémy a mokrade (biotopy podmienené dostatkom vody ako prameniská, potoky, jazerá, rieky, slatiny, rašeliniská, lužné lesy, mokrad'ou sú aj umelé nádrže, kanále a rybníky).

Hranice medzi ekosystémami nemusia byť zreteľné. Na Zemi existujú rôzne ekosystémy (napríklad riečny ekosystém, lesný ekosystém, ekosystém rybníka, ekosystém obývanej časti...), z ktorých každý má svoje špecifiká, osobitosti a spôsoby fungovania.

Termín **ekosystémová integrita** (Obrázok 5.6) sa vo všeobecnosti používa na široké označenie úplnosti a funkčnosti ekosystému a jeho ekologických procesov, najmä vo vzťahu k jeho prirodzenému stavu. Ekologická integrita je definovaná ako schopnosť podporovať a udržiavať vyvážené, integrované adaptačné zhromaždenie organizmov s druhovým zložením, diverzitou a funkčnou organizáciou porovnateľnou s prirodzeným biotopom regiónu.

Ekologicky **intaktné ekosystémy** sú dlhodobo predmetom záujmu a ochrany, nakoľko prispievajú k prečisteniu vzduchu, filtrácii škodlivých substancií z vody, menia rozpadnuté látky na živiny, predchádzajú erózii a záplavám alebo určujú podnebie. Avšak, neexistuje presná definícia, čo presne znamená intaktnosť ekosystému. Mnohé definície intaktnosti ekosystému zahŕňajú myšlienku, že ekosystém sa samo organizuje alebo sa sám opravuje; a po narušení sa vráti do stavu celistvosti. Intaktnosť je preto možné považovať za spôsob merania integrity ekosystému.



Obrázok 5.6: Intaktný a degradovaný ekosystém (Zdroj: <https://www.single.earth/blog/introducing-ecosystem-integrity-index>, upravené).

Ekosystémovú diverzitu na Slovensku tvoria lesné ekosystémy (41%), nasledujú poľnohospodárske ekosystémy (29%), ktoré zahŕňujú ornú pôdu, pasienky, vinice, sady, záhrady) a ekosystémy trvalých trávnych porastov (18%). Biodiverzitu na Slovensku tvorí približne 11 323 druhov rastlín (vrátane rias), viac ako 28 800 druhov živočíchov (vrátane

bezstavovcov) a viac ako 1 000 druhov prvokov. Okrem toho existuje široká škála suchozemských a vodných biotopov. V dôsledku rozsiahleho využívania prírodných zdrojov niektoré rastlinné a živočíšne druhy vyhynuli a iné sa stali vzácnymi alebo ohrozenými. Z celkového počtu 3 124 druhov vyšších rastlín je 1 135 zapísaných v Národnom červenom zozname krytosemenných a nahosemenných rastlín (Convention of Biological Diversity, Slovakia profile, 2024).

5.1.4 Kultúrna diverzita

Kultúrna diverzita alebo rozmanitosť (Obrázok 5.7) sa vzťahuje na rôznorodosť kultúr, ktoré spolu existujú na mieste alebo v určitom prostredí. Kultúrna diverzita je spojená s kultúrnou identitou, kultúrnym dedičstvom a s existenciou kultúry. Patrí sem rozmanitosť jazykov, náboženstiev, zvykov, tradícií, spôsobov využívania krajiny, umenia, sociálnej štruktúry, stravovania atď. Niekedy môže byť kultúrna rozmanitosť označovaná aj ako **multikulturalizmus**, najmä vo väčších prostrediach. Mnohé krajiny sú v dôsledku migrácie kultúrne rôznorodé.



Obrázok 5.7: Kultúrna diverzita (Zdroj: <https://www.minervavirtual.com/es-es/blog/embracing-our-diversity-cultural-explosion-week-at-mva> a <https://nilservices.com/language-diversity-language-services/>)

Spoločnosť s rôznymi kultúrami môže využívať širokú škálu hovorených jazykov, pričom zvyčajne má jeden spoločný jazyk, ktorým všetci členovia hovoria. V multikultúrnej spoločnosti často existujú rôzne náboženstvá alebo duchovné presvedčenia, ako je kresťanstvo, islam, hinduizmus, budhizmus atď. Keď ľudia migrujú, prinášajú si so sebou svoje kulinárske praktiky, čo napomáha rozvíjať kultúru stravovania. Národy s veľkou kultúrnou rozmanitosťou

majú tendenciu oslavovať sviatky viacerých kultúr. Kultúrne rozmanité prostredie často akceptuje rôzne spôsoby obliekania ľudí. Rozmanitosť sa prejavuje aj v umení a architektúre. Hudba a tanec existujú vo všetkých kultúrach, ale štýly sa výrazne líšia. Keď sa kultúry spájajú, často dochádza k fúzii štýlov. V rôznych kultúrach existujú rôzne rodinné štruktúry s rôznou úlohou pre mužov a ženy. Všetky kultúry majú pravidlá správania, ktoré považujú za normálne alebo prijateľné.

5.2 Význam biodiverzity pre človeka

Biodiverzita má pre ľudskú populáciu obrovskú hodnotu, ktorú je ťažké kvantifikovať. Ľudia sú závislí od biodiverzity, vďaka nej si naplňajú svoje základné potreby zachovávajú si kultúru, blahobyt a hospodársky prosperujú. **Úloha biodiverzity** pri poskytovaní ekosystémových služieb je buď **priama**, keď sa biodiverzita využíva ako zdroj potravín, surovín, energie a iných extrahovateľných zdrojov alebo **nepriama** pri poskytovaní regulačných, sociálnych kultúrnych a podporných služieb. Napríklad, vegetačný pokryv chráni pôdu pred eróziou viazaním pôdných častíc a minimalizuje odtok vody. Opel'ujúci hmyz je zase dôležitý pri pestovaní plodín, nakoľko rôzne druhy rastlín nám poskytujú nielen potravu, ale prispievajú aj k čistej vode, dýchatelnému vzduchu, úrodnej pôde, stabilite klímy alebo k absorpcii znečistenia (napríklad ťažké kovy). Zachovanie biodiverzity je nevyhnutné aj pre **adaptáciu na zmenu klímy**. Klimatické zmeny majú celý rad významných vplyvov na ľudské zdravie, z ktorých mnohé sú priamo spojené s klimatickými vplyvmi na ekosystémy. Napríklad, zmeny v ekológii patogénov, alebo v populáciách resp. zmeny v distribúcii prenášačov chorôb môžu zvýšiť riziko prepuknutia chorôb.

Ekosystémové služby pomáhajú udržiavať ľudské potreby a ekonomické aktivity ako napr. opel'ovanie plodín, zakladanie a udržiavanie úrodnej pôdy, zadržiavanie zdrojov podzemnej vody prostredníctvom vegetácie a uvoľňovanie kyslíka, prispievajú k regulácii klímy a zmierňovaniu prírodných rizík. Lesy, mokrade a oceány zachytávajú oxid uhličitý, skleníkový plyn zodpovedný za zmenu klímy. Zdravý ekosystém s rôznymi druhmi často reguluje prenos chorôb. V niektorých prípadoch môže druhová diverzita oslabiť prenos určitých patogénov, čím sa zníži riziko prepuknutia chorôb. Strata ekosystémových služieb môže spôsobiť extrémne výkyvy počasia, sucha a neúrodu. Celkovo je biodiverzita nevyhnutná nielen pre naše prežitie, ale aj pre celú planétu, nakoľko poskytuje pre človeka ekosystémové služby, spotrebnú úžitkovú, produktívnu, estetickú, kultúrnu a duchovnú hodnotu.

Biodiverzita podporuje rôzne priemyselné odvetvia, ako je poľnohospodárstvo, rybárstvo, lesníctvo alebo biotechnológie, čím vytvára pracovné príležitosti a ekonomické výhody pre komunity a národy. Biodiverzita podporuje **potravinovú bezpečnosť**. Takmer všetky dnes komerčne pestované plodiny sa vytvorili pomocou klasického šľachtenia alebo modernými biotechnologickými prístupmi. Takéto prístupy umožňujú pripraviť nové, produktívnejšie odrody, ktoré sú odolnejšie voči environmentálnym stresom. Strata poľnohospodárskej biodiverzity preto môže ohroziť zdravie ľudí, udržateľnosť živobytia a v budúcnosti bezpečnosť potravín.

Biodiverzita poskytuje aj dôležité **zdroje pre lekárske výskum**. Štúdium anatómie, fyziológie a biochémie voľne žijúcich živočíchov má význam pre humánnu medicínu. Napríklad, štúdium žralokov môže prispieť k poznatkom ohľadom osmoregulácie a imunológie alebo štúdium veľrýb môže prispieť k poznatkom ohľadom dýchania a liečby potápačov trpiacich de-kompresnou chorobou. Biodiverzita slúži ako obrovský rezervoár potenciálnych liekov na rôzne choroby, vďaka čomu je rozhodujúca pre lekárske výskum a vývoj nových liekov. Mnohé moderné lieky vychádzajú z poznatkov týkajúcich sa voľne žijúcich druhov ako sú lieky proti bolesti (napr. liek Ziconotide odvodený z toxínu slimáka *Conus magus*, ktorý sa používa na zmiernenie silných chronických bolestí), lieky na choroby srdca (napr. Lanoxin odvodený z rastliny *Digitalis*), protirakovinové liečivá (napr. liek Taxol odvodený z dreveniny *Taxus* a liek Hycamtin z dreveniny *Camptotheca*) alebo lieky používané pri liečbe cukrovky (napr. Exanidit odvodený z jašterice *Heloderma*).

Biodiverzita zohráva úlohu aj pri **regulácii a kontrole infekčných chorôb**, nakoľko zmena ekosystému môže zvýšiť riziko vzniku alebo šírenia infekčných chorôb u zvierat, rastlín alebo ľudí.

Biodiverzita má aj **sociálny, kultúrny a duchovný význam**. Ľudské kultúry sa vyvíjajú spoločne s prostredím, v ktorom ľudia pôsobia. Jazyk je kľúčovým prostriedkom dorozumievania sa a je základom pre šírenie vedomostí. Rozmanitosť jazykov vyjadruje našu kultúrnu rozmanitosť, podporuje udržiavať znalosti o regiónoch a o interakcii medzi nimi, pochopiť našu históriu. Vďaka jazykovej diverzite dokážeme udržiavať a rozširovať informácie o ekosystémoch. Takisto je dôležitý pre udržiavanie nehmotného dedičstva. Diverzita v kultúrnych prejavoch prispieva k identite spoločenstiev a zohráva kľúčovú úlohu v ich živote.

Príroda poskytuje množstvo inšpiratívnych, estetických, duchovných a vzdelávacích zážitkov. Zmena ekosystému môže viesť k obmedzeniu prístupu ľudskej populácie k prírode, čo môže mať negatívne dôsledky na ich fyzické a duševné zdravie. To vedie k zvýšenému výskytu tzv. civilizačných chorôb (cukrovka, obezita, kardio-pulmonálne choroby) a tiež aj k

psychickým poruchám. Ochrana biologickej diverzity má aj etické výhody. Povedomie o environmentálnych hodnotách a rešpekt k iným živým organizmom prispieva k zníženiu anti-sociálneho správania u detí a mladých ľudí.

Biologická diverzita **zvyšuje kvalitu života**. Príroda bola a je zdrojom inšpirácie pre nespočetné množstvo ľudských vynálezov a inovácií. Štúdium biodiverzity a jej adaptácií viedlo k novým technológiám, dizajnom a riešeniam v rôznych oblastiach. Biodiverzita je hlboko prepojená s ľudskou kultúrou, tradíciami a spiritualitou. Mnohé domorodé a miestne komunity sa spoliehajú na biodiverzitu pre svoje kultúrne zvyklosti, tradičné znalosti a duchovné presvedčenie. Biologicky rozmanité ekosystémy ponúkajú možnosti rekreácie a priťahujú cestovný ruch, čím výrazne prispievajú k miestnemu a národnému hospodárstvu.

5.3 Príčiny ohrozenia biodiverzity

Veľká časť biodiverzity je ohrozená v dôsledku ľudskej spotreby a činností, ktoré narúšajú a dokonca ničia ekosystémy. Medzi hlavné príčiny straty biodiverzity patrí deštrukcia, fragmentácia biotopov a zjednodušenie ekosystému, zmena klímy, nadmerné využívanie prírodných zdrojov, introdukcia inváznych druhov, znečistenie pôdy a vody v dôsledku ľudskej činnosti, okysľovanie oceánov, genetické znečistenie alebo šírenie infekčných chorôb. To má dopad na genetickú, druhovú a ekosystémovú diverzitu.

5.3.1 Deštrukcia a fragmentácia biotopov

K deštrukcii a fragmentácii biotopov dochádza v dôsledku premeny prirodzených biotopov na poľnohospodársku pôdu, mestské oblasti a rozvoj infraštruktúry. Činnosti ako odlesňovanie, urbanizácia, rozširovanie poľnohospodárstva a ťažba znižujú priestor pre pôvodné druhy na život, prežitie a rozmnožovanie a tiež narúšajú spojenia medzi rôznymi ekosystémami, čo vedie k strate a degradácii ekosystémov, vytlačaniu a ohrozeniu mnohých druhov. V dôsledku urbanizácie dochádza aj k zjednodušeniu rôznorodých ekosystémov ich premenou na monokultúry alebo mestské oblasti.

Vážnym problémom je **odlesňovanie najväčšieho dažďového pralesa** na Zemi v Amazónii (Obrázok 5.8). Odhady uvádzajú súčasnú úroveň odlesňovania Amazónie na 17%, a bod zlomu na 20 až 25%, ktorý ak sa prekročí tak tento prales sa v najlepšom prípade môže stať suchým trávnatým porastom. Dôvodov odlesňovania je viacero ako nekontrolovaná

expansionia poľnohospodárstva, nelegálna a neobmedzená ťažba zlata, ktorá spôsobuje okrem priameho odlesňovania aj kontamináciu pôdy ortuťou, selektívna ťažba vysokohodnotných druhov drevín, zlá infraštruktúra, požiare v dôsledku vypaľovania lesa za účelom získania plochy pre farmárov, zmena klímy, nedostatok primeraného riadenia a správy prírodných zdrojov a nedostatočné presadzovanie práva. Odlesňovanie a čoraz väčší prienik technológií do pralesa má dopad aj na spôsob života ľudí žijúcich v pralesoch.

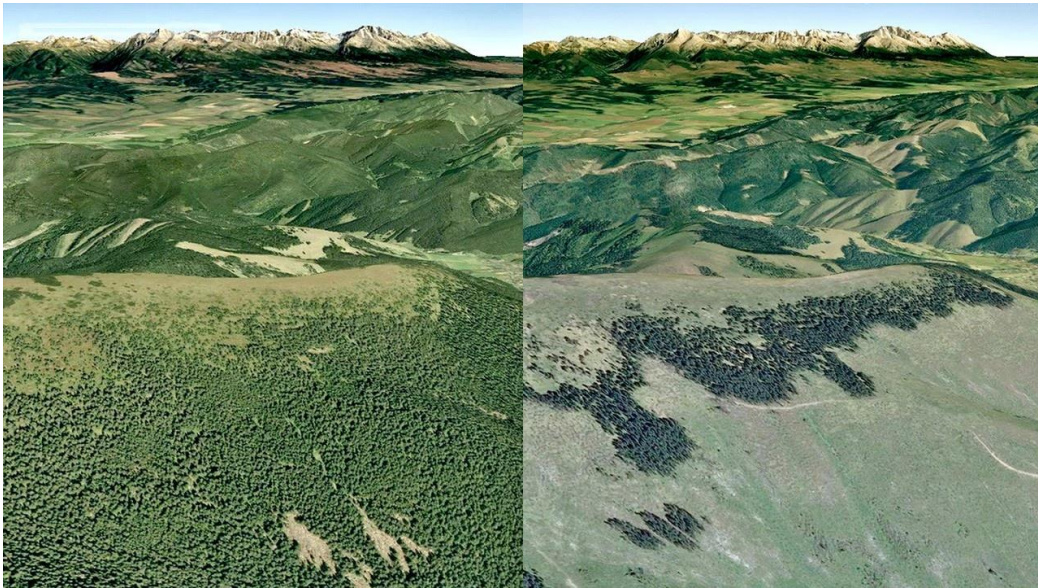


Obrázok 5.8: Odlesnená oblasť amazonského dažďového pralesa (vľavo) (Zdroj: <https://www.axios.com/2023/01/26/amazon-rainforest-degraded>).

Odlesňovanie a degradácia lesov predstavuje prioritný problém aj pre EÚ. V roku 2021 Komisia EÚ predstavila **novú stratégiu EÚ v oblasti lesného hospodárstva do roku 2030**, ktorej cieľom je zvýšiť množstvo a kvalitu lesov v EÚ a podporiť ich úlohu ako zachytávačov uhlíka. Navyše, v roku 2023 Európsky parlament schválil nové pravidlá, podľa ktorých sú spoločnosti povinné overovať, či výrobky (palmový olej, sója, kakao, káva, hospodárske zvieratá a drevo, atď.) ako aj odvodené výrobky (napríklad hovädzie mäso, výrobky z kože, kancelársky papier, drevený nábytok, kozmetika alebo čokoláda), ktoré sú predávané na európskom trhu neprispeli k odlesňovaniu alebo degradácii lesov kdekoľvek na svete. Európsky parlament zahrnul pod degradáciu lesov aj premenu pralesov alebo prirodzene sa obnovujúcich lesov na plantáže alebo iné zalesnené plochy.

K odlesňovaniu na Slovensku (Obrázok 5.9) dochádza v dôsledku ťažby dreva, budovania rekreačných oblastí alebo v dôsledku prírodných katastrof akou bola napríklad veterná kalamita vo Vysokých Tatrách v roku 2004, ktorá zničila v páse lesa širokom 3-4 km

a dlhom 40 km porasty dospelých smrekových porastov a spôsobila významný zásah do integrity lesných ekosystémov.



Obrázok 5.9: Národný park v Nízkych Tatrách v roku 2006 (vľavo) a 2017 (vpravo) (Zdroj: <https://www.cas.sk/fotogaleria/627355/mame-problem-zo-slovenska-miznu-stromy-tatry-prisli-o-tretinu-lesov/1/>).

5.3.2 Klimatické zmeny

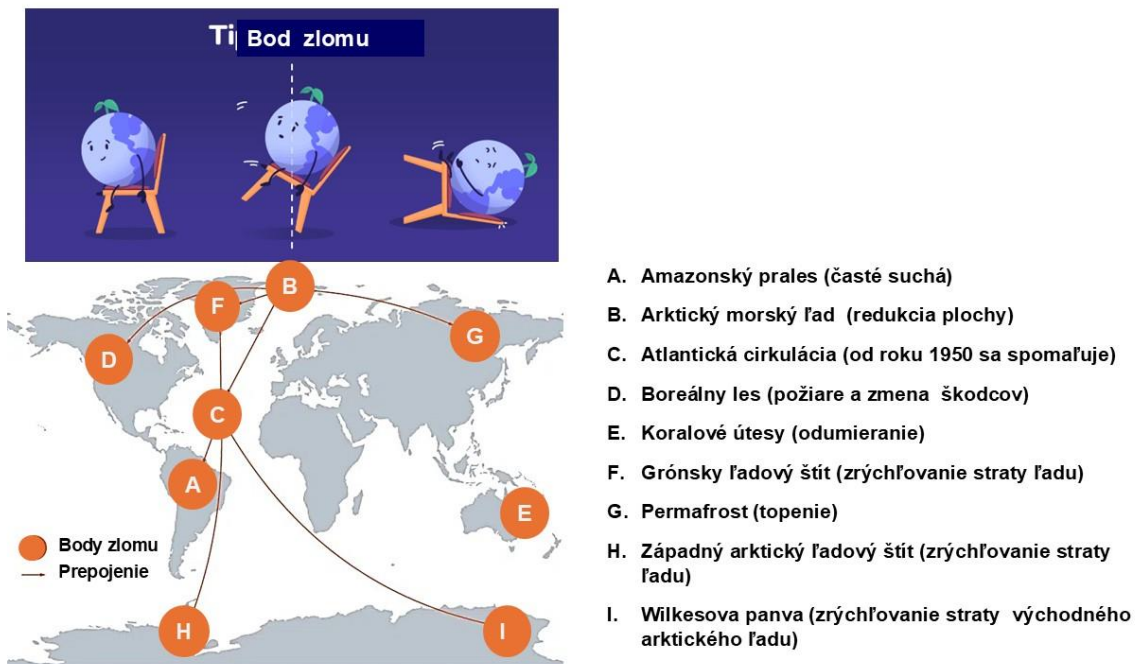
Klimatické zmeny a teda globálne otepľovanie sú primárne spôsobené s ľudskou činnosťou, ako je spaľovanie fosílnych palív a odlesňovanie. Rastúce teploty, zmeny v dažďových zrážkach a extrémne poveternostné udalosti narušujú ekosystémy, čo vedie k zníženiu počtu druhov a v niektorých prípadoch aj k ohrozeniu ich prežitia. Napríklad, zmeny teplôt alebo dažďových zrážok spôsobujú, že rast alebo prežitie určitých rastlín je ohrozené, čo ovplyvňuje aj druhy, ktoré sú od nich závislé. Každé zvýšenie globálnej teploty o 0,5 °C zvyšuje pravdepodobnosť výskytu extrémnych horúčav, silných dažďov a regionálnych súch.

Šiesta hodnotiaca správa **Medzinárodného panelu pre zmenu klímy (IPCC)**, uvádza, že v rámci študovaných scenárov existuje viac ako 50%-ná šanca, že nárast globálnej teploty v rokoch 2021 až 2040 dosiahne alebo prekročí 1,5 °C. Navyše, zvýšenie teploty spôsobuje topenie ľadovcov a ľadových štítov Grónska a Antarktídy, ktoré ak by sa roztopili, globálna hladina mora by stúpala o viac ako 60 metrov. IPCC dospel k záveru, že úbytok ľadu je najväčším prispievateľom k zvýšeniu hladiny morí.

Podľa údajov služby **Copernicus Climate Change Service**, globálne bol rok 2023 najteplejším rokom v histórii merania. Každý mesiac od júna do decembra bolo teplejšie ako v príslušný mesiac v ktoromkoľvek predchádzajúcom roku. Za celý rok sa najviac teplotne nadpriemerných teplôt vyskytlo v severovýchodnej Škandinávii a krajinách pri severozápade Stredozemného mora. Pokračuje dlhodobý trend vyšších povrchových teplôt vzduchu nad európskymi suchozemskými regiónmi. Okrem toho, 22. júla 2024 Zem dosiahla nový rekord v dennej globálnej priemernej teplote a to 17,16 °C, čo presahuje doterajší rekord (17,08 °C), ktorý boli zaznamenaný o rok skôr, 6. júla 2023.

Globálne otepľovanie sa na Slovensku prejavuje nárastom priemernej ročnej teploty vzduchu za posledných 100 rokov o 1,1 °C. Podľa Územnej štúdie Slovenska o zmene klímy sa globálne otepľovanie môže prejavovať na našom území rastom priemerov teploty vzduchu do roku 2075 o 2 až 4 °C.

Ako sa planéta otepľuje, mnohé časti zemského systému prechádzajú rozsiahlymi zmenami. Kumulatívny vplyv týchto zmien môže spôsobiť závažné zmeny základných častí zemského systému. Tieto body zlomu sú kritickými prahovými hodnotami v systéme, ktorých prekročenie vedie k významnej zmene stavu systému, ktorý môže byť nezvratný. **Body zlomu klímy** (Obrázok 5.10) sú v podstate prvky zemského systému, v ktorom môžu malé zmeny spustiť posilňujúce slučky, ktoré „preklopiť“ systém z jedného stabilného stavu do úplne iného stavu.



Obrázok 5.10: Hlavné body zlomu klímy a ich prepojenie. (Zdroj: <https://earth.org/tipping-points-of-climate-change/>, upravené).

Například, globálne otepľovanie a odlesňovanie spôsobí, že Amazonský dažďový prales prekročí bod zlomu. Amazónia do atmosféry uvoľňuje veľké množstvo vody, avšak s masívnym úbytkom stromov a znížením množstva vody vstupujúcej do atmosféry bude Amazónia stále suchšia, pretože kolobeh vody sa preruší. Keď je kolobeh vody natoľko narušený, že zalesnené oblasti už neprodukujú dostatok dažďa na rast dažďového pralesa, Amazónia prekročí bod zlomu. Zmizne navždy a premení sa na zdegradovanú savanu.

Arktída sa otepľuje takmer štyrikrát rýchlejšie ako kdekoľvek inde na svete, čím sa zrýchľuje topenie ľadu z grónskeho ľadovca a topenie arktického morského ľadu. To by mohlo byť to, čo spomaľuje cirkuláciu tepla v oceáne, čo zase ovplyvňuje monzúnový systém nad Južnou Amerikou. Monzúnové zmeny môžu prispievať k zvyšujúcej sa frekvencii sucha nad Amazonským dažďovým pralesom, čím sa znižuje jeho kapacita ukladania uhlíka a zintenzívňuje sa otepľovanie klímy. Naša planéta sa už od priemyselnej revolúcie oteplila približne o 1,2 °C a súčasné záväzky v rámci Parížskej dohody z roku 2015 nás zaväzujú, aby sme zvýšenie v tomto storočí udržali pod hranicou 2 °C. Nedávne hodnotenia zistili, že aj pri prekročení 1,5 °C globálneho otepľovania už hrozí prekročenie niekoľkých z týchto prahov pre body zlomu.

5.3.3 Introdukcia invázných druhov

Introdukcia invázných druhov do nového prostredia môže pripraviť pôvodné druhy o zdroje, loviť ich alebo prenášať choroby, čo môže mať ničivé následky pre pôvodnú flóru a faunu. Invázne druhy živočíchov sú konkurenčne silnejšie, nemajú prirodzených nepriateľov, lovia miestne druhy, čo vedie k úbytku alebo vyhynutiu pôvodných druhov. Ak sú invázne druhy na vyšších úrovniach potravinového reťazca, môžu vyčerpať populáciu koristi, ktorou sa živia. Naopak, keď sú invázne druhy v strede alebo na spodku potravinového reťazca, pôvodné druhy, ktoré sa nimi živia, môžu narásť v populácii, pretože majú dostatok potravy, čo by mohlo mať dôsledky na zvyšok ekosystému.

Príčinou introdukcie a rozšírenie invázných druhov živočíchov je **obchodovanie s nimi a dovoz za účelom ich chovu** pre kožušinu alebo pre teraristické účely. Napríklad, na Slovensku bol takto introdukovaný šakal zlatý, medvedík čistotný alebo norok americký, korytnačka písmenková, raky alebo niektoré druhy rýb. Tieto invázne druhy sa následne z chovov rozšírili do voľnej prírody. Ďalšou možnosťou ich rozšírenia je migrácia takýchto invázných druhov z okolitých štátov.

Invázne druhy rastlín majú vysoký reprodukčný potenciál, dokážu sa rýchlo šíriť vegetatívne alebo produkujú veľké množstvo viabilných semien. Najčastejšie boli introdukované dovozom ako okrasné rastliny, ktoré sa z výsadiieb rýchlo rozšírili do okolia. Príkladom inváznej rastliny na Slovensku je bolševník obrovský, ktorý sa zo zdravotného hľadiska považuje za najnebezpečnejšiu rastlinu našej flóry. Pri kontakte s pokožkou spôsobujú jeho šťavy kožné popáleniny až pľuzgiere. Ich účinok sa znásobuje pri vystavení kože slnečnému žiareniu (Obrázok 5.11).



Obrázok 5.11: Výskyt inváznej rastliny bolševníka obrovského na Slovensku. (Zdroj: <https://maps.sopsr.sk/mapy/invazne.php>; <https://www.tanap.sk/pozor-na-impozantny-no-nebezpecny-bolsevník-obrovsky/>, upravené).

5.3.4 Nadmerné využívanie

Biodiverzitu ovplyvňuje aj nadmerné využívanie prírody v dôsledku neudržateľného lovu divej zveri, rybolovu alebo ťažby dreva s cieľom uspokojiť vysoký dopyt po mäse, pre športové aktivity alebo v dôsledku kontroly nad škodcami. Napríklad, v Anglicku vážne dôsledky pre biodiverzitu malo odlesňovanie lesov v 18. a 19. storočí v dôsledku **industrializácie**.

Komercializácia kožušiny vydry v 18. a 19. storočí v USA a v Rusku spôsobila takmer ich vyhynutie, čo sekundárne ovplyvnilo chaluhoé lesy (husté porasty makroskopických chalúh) a populácie rýb.

Industrializovaný rybolov viedol k vyčerpaniu druhov ako je napríklad tuniak, losos alebo veľryba. Neudržateľné metódy rybolovu (napríklad lov pri dne vlečenými sieťami) tiež zničili

biotopy morského dna, ktoré sú dôležitými oblasťami pre existenciu mnohých druhov. To malo za následok zmenu štruktúry morského ekosystému zvýšením populácie predátorov na úkor ich koristi. Ak sa tieto činnosti nebudú regulovať, bude to viesť k úbytku alebo vyhynutiu určitých druhov a k narušeniu celých ekosystémov.

Sekundárne vyhynutie je proces, ktorý súvisí s tým, že smrť jedného druhu alebo populácie môže spôsobiť zníženie alebo elimináciu iných druhov. Strata jedného druhu môže mať širšie a niekedy nepredvídateľné dopady na celý ekosystém. Strata potravy môže spôsobiť migráciu alebo vyhynutie akéhokoľvek druhu v závislosti od druhu a potravinového zdroja. Napríklad, zničenie bambusových lesov v Číne, môže spôsobiť vyhynutie pandy obrovskej. Vyhynutie dronta nelietavého (dodo) na ostrove Maurícius v dôsledku loveckých aktivít človeka súvisí aj s ubúdaním kedysi dominantej dreviny stromu *Sideroxylon grandiflorum*. Dront nelietavý sa živil jeho ovocím, pričom dokázal spracovať semená tohto stromu, aby mohli vyklíčiť.

5.3.5 Znečistenie pôdy, vody a ovzdušia

Znečistenie z priemyselných, poľnohospodárskych a mestských zdrojov má škodlivé účinky na biodiverzitu. Emisie skleníkových plynov, poľnohospodárske hnojivá, plastový odpad, úniky ropy a mnohé ďalšie zdroje znečistenia majú silný negatívny vplyv na pôdu, sladkú vodu, oceány a atmosféru, od ktorých sú ľudia a živá príroda závislí. **Chemické látky** môžu kontaminovať vodné zdroje a pôdu, čo má vplyv na vodné a suchozemské druhy, zatiaľ čo znečistenie ovzdušia môže poškodiť rastliny a živočíchy.

Do roku 2023 bolo celosvetovo zaregistrovaných pre komerčné účely viac ako 350 000 chemikálií a zmesí chemikálií, pričom sa očakáva, že ich počet bude rásť. Niektoré moderné chemikálie môžu vykazovať zvýšenú toxicitu pre určité skupiny rastlín alebo bezstavovcov.

Napríklad, bolo zistené, že akútna **úmrtnosť Coho lososa**, ktorý sa vyskytuje v severozápadnom Pacifiku a vo väčšine pobrežných potokov a riek od Aljašky po centrálnu Kaliforniu, súvisí s celosvetovo všadeprítomnou prísadou v gumách pneumatík, ktorá sa používa ako antioxidant na zníženie ich starnutia. Jej transformačný produkt [*N*-(1,3-dimetylbutyl)-*N'*-fenyl-*p*-fenylenediamín] je pre tento druh vysoko toxický. Ďalším príkladom sú širokospektrálne **pesticídy neonikotinoídy**, u ktorých boli zdokumentované nepriaznivé vplyvy na viaceré necieľové druhy nielen na súši, ale aj vo vode. Ukázalo sa, že neonikotinoídy

sú zodpovedné za masívny pokles zooplanktónu, čo vedie narušeniu potravinového zdroja, a teda k zníženiu populácie rýb.

Ďalším problémom pre biodiverzitu v tropických ekosystémoch v Južnej Amerike a v juhovýchodnej Ázii je **nelegálna ťažba** zlata, kde sa používa tekutá ortuť, ktorá sa zmieša s vodou a vytáženou rudou. Táto zmes sa následne zahrieva, až kým sa ortuť nevyparí a nezostane čisté zlato. Tropický les má vysokú schopnosť akumulovať ortuť, čo následne vedie ku kontaminácii pôdy a vody.

Bielenie koralov je spojené nielen so zvyšujúcimi sa teplotami a okysľovaním oceánov ale aj s chemickou látkou **oxybenzón**, ktorá sa stále široko používa v opaľovacích krémoch ako ochrana proti UV filtrom.

Priemyselné havárie (Obrázok 5.12) významne zvyšujú riziko ohrozenia biodiverzity. Napríklad, v roku 1976 došlo k havárii v chemickej továrni firmy Icmesa (**Seveso**, Taliansko) (Obrázok 5.12A). Továrň vyrábala okrem iného herbicíd 2,4,5-trichlorofenol (TCP), ktorý sa používal na likvidáciu drevnatých burín. Do ovzdušia počas havárie unikli asi dva kilogramy dioxínu, ktoré zamorili takmer dvetisíc hektárov pôdy v okolí. Na následky otravy ochorelo asi 200 ľudí. V roku 1984 v indickom meste **Bhópál** (Obrázok 5.12B) sa stala havária v továrni na výrobu pesticídov, ktorá je považovaná za najzávažnejšiu nehodu v 20. storočí. Pripravila o život 2750 ľudí a 5000 obyvateľov bolo intoxikovaných, nehovoriac o následkoch na iné živé organizmy v okolí do vzdialenosti 2,5 km.

V roku 2000 sa pretrhla hrádza obsahujúca toxický odpad zo zlatej bane **Baia Mare Aurul** v severozápadnom Rumunsku a tým sa dostalo 100 000 metrov kubických odpadovej vody silne kontaminovanej kyanidom do prítokov Lapus a Somes rieky Tisa, jednej z najväčších v Maďarsku (Obrázok 5.12C, D). Došlo ku kontaminácii 600 km úseku riek Somes, Tisa a Dunaj kalom obsahujúcimi kyanidy, meď a iné ťažké kovy.

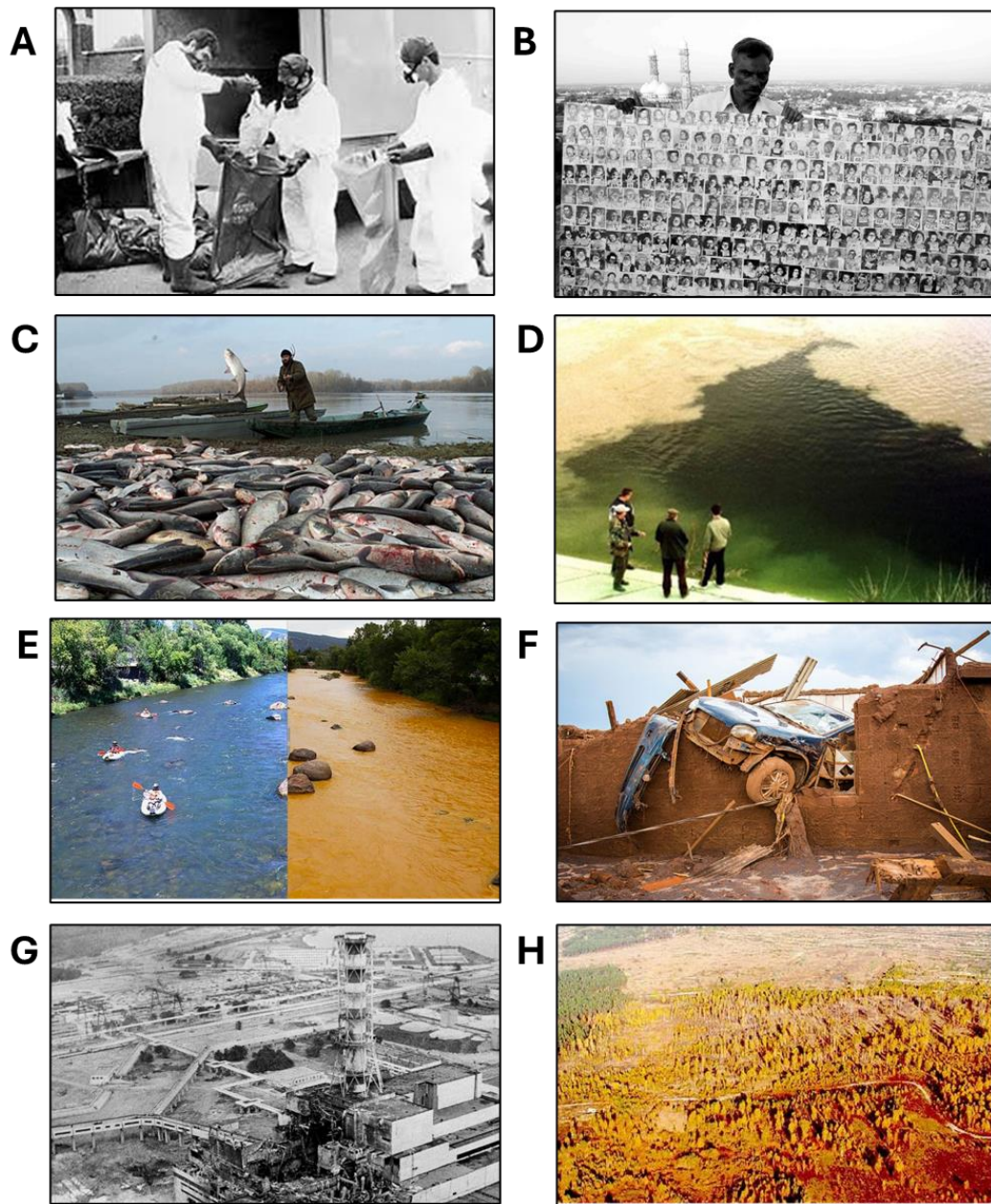
V roku 2015 zlyhala priehrada na hlušinu železnej bane **Fundão** (Brazília), ktorá vyliala 50 miliónov ton bahna a toxického odpadu do brazílskeho Rio Doce, pričom znečistila rieku, kontaminovala poľnohospodársku pôdu, zničila ryby a voľne žijúce zvieratá a znečistila pitnú vodu toxickými látkami pozdĺž 650 kilometrov vodnej cesty (Obrázok 5.12E, F).

26. apríla 1986 počas technicko-bezpečnostných testov vybuchol reaktor 4. jadrovej elektrárne v **Černobyle** (Ukrajina) (Obrázok 5.12G). Chyby v konštrukcii reaktora a v manipulácii s ním viedli k výbuchu, ktorý zničil ochranný kryt reaktora. Počas havárie došlo k viacerým požiarom, ktoré trvali niekoľko dní a rozptýlili obrovské množstvo rádioaktívneho materiálu. Odhaduje sa, že uvoľnená radiácia prevýšila 400 násobok množstva radiácie uvoľnenej atómovou bombou zhodenou USA v roku 1945 na Hirošimu (Japonsko). Všetci

obyvatelia v okruhu 30 km od jadrovej elektrárne museli byť evakuovaní. Následkom havárie sa vytvorila zóna s rozlohou asi 4 700 km², v ktorej bolo zakázané trvalé osídlenie ľuďmi. Vplyv havárie na životné prostredie bol závažný. Napríklad, borovice pokrývajúce približne 4 km² okolo jadrovej elektrárne okamžite odumreli a všetko ich ihličie sčervenalo preto sa táto oblasť nazýva aj Červený les (Obrázok 5.12H). V prvých mesiacoch po výbuchu došlo k nárastu úmrtnosti zvierat a odumretí rastlín; a boli pozorované aj rôzne morfológické, fyziologické a genómové zmeny, v závislosti od toho ako intenzívne bola daná oblasť zasiahnutá rádioaktivitou.

5.3.6 Šírenie infekčných chorôb

Zintenzívnenie šírenia infekčných chorôb je podporované ľudskou činnosťou. K tomu prispieva zmena klímy, strata biodiverzity, degradácia biotopov a zvyšujúca sa miera kontaktov medzi divou zverou a človekom. 75 % nových ľudských patogénov je zoonotických, teda majú živočíšny pôvod. Zoonózy vždy existovali, ale ich frekvencia a geografické rozšírenie sa zvyšuje. V posledných desaťročiach sa vyskytli aj rastúce počty epidémií patogénov voľne žijúcich živočíchov, ktoré spôsobili epidémie, ako je syndróm bieleho nosa netopierov (ochorenie spôsobené plesňou *Geomyces destructans*), odumieranie jaseňov spôsobené patogénnou hubou *Hymenoscyphus fraxineus* a pandemická chytridiomykóza zabíjajúca obojživelníky naprieč kontinentmi. Chytridiomykóza je infekčné hubové ochorenie obojživelníkov spôsobené vodnou hubou *Batrachochytrium dendrobatidis*. Obojživelníci síce trpia celou radou hubových, vírusových alebo bakteriálnych ochorení, avšak iba chytridiomykóza spôsobuje masové vymieranie desiatok druhov.



Obrázok 5.12: Priemyselné havárie Seveso, Taliansko (A), Bhópál, India (B), Baia Mare Aurul Rumunsko (C-D), Fundão, Brazília (E-F), Černobyl Ukrajina (G-H) (Zdroj, : A: <https://discover.hubpages.com/politics/Seveso-man-made-disaster>, B: <https://libcom.org/article/night-gas-bhopal-india>, C, D: <https://www.csmonitor.com/World/Global-News/2010/1007/Hungary-s-toxic-sludge-reminiscent-of-2000-Romania-disaster-but-much-worse>, E, F: <https://christinefolch.com/2015/12/21/colorado-brazil-mine-disasters-kill-two-rivers-in-2015/>, G: <https://chernobylstory.com/blog/chernobyl-red-forest/> a H: <https://www.timesofisrael.com/radiation-expert-ukraine-war-could-pose-greater-nuclear-threat-than-chernobyl/> G, H).

5.3.7 Genetické znečistenie

Pojmom genetické znečistenie sa označuje nežiadúci a nekontrolovaný tok génov z geneticky modifikovaných organizmov do voľne žijúcich populácií alebo kríženie medzi domestikovanými a divo rastúcimi druhmi. O vplyve geneticky modifikovaných organizmov (GMO) na životné prostredie sa vedú búrlivé diskusie s odporcami technológie, a to z obavy ohľadom potenciálneho šírenia génov zabezpečujúcich odolnosť voči antibiotikám (tzv. selekčné markerové gény) a génov zabezpečujúcich toleranciu voči herbicídum a/alebo škodcom. Ak sa takéto gény rozšíria medzi divo rastúce populácie, môžu narušiť existujúce ekosystémy, napríklad tým, že zvýšia konkurencieschopnosť takýchto rastlinných druhov. Genetická kontaminácia môže viesť k zníženiu genetickej diverzity, čo môže mať negatívny dopad na schopnosť rastlín prispôbiť sa meniacim sa podmienkam prostredia. Farmári, ktorí používajú tradičné spôsoby pestovania plodín, môžu mať problémy, ak sa ich úroda neúmyselne skontaminuje nežiadúcim prenosom génov z geneticky modifikovaných rastlín.

5.3.8 Okysľovanie oceánov

Okysľovanie (acidifikácia) oceánov je spôsobené pokračujúcim nárastom antropogénnych emisií oxidu uhličitého. Predstavuje jednu z najdôležitejších hrozieb pre morskú biodiverzitu a fungovanie ekosystémov. Okyslenie morskej vody mení systém uhličitanov a ovplyvňuje metabolizmus a fyziológiu kalcifikujúcich morských druhov, čo vedie k nižšej rýchlosti kalcifikácie a k malformácii alebo rozpadu uhľíkových štruktúr, čo môže následne určovať zmeny v miere prežitia. Výsledkom je pokles populácií koralov (Obrázok 5.13), planktónu alebo mäkkýšov a aj populácií druhov, ktoré sú od nich závislé.

5.3.9 Zjednodušenie ekosystému

Zjednodušenie ekosystému je premena rôznorodých ekosystémov na zjednodušené, teda dochádza k zníženiu rozmanitosti druhov, štruktúr a vzťahov v ekosystéme. Príkladom sú monokultúry alebo mestské oblasti znižujúce rôznorodosť a odolnosť ekosystémov. V dôsledku ľudskej činnosti, zmien v prostredí alebo inváziou cudzokrajných druhov dochádza k

strate komplexnosti krajiny a ekologickej integrity. Výsledkom je ekosystém s nižšou biodiverzitou a zníženou schopnosťou prispôbiť sa zmenám.



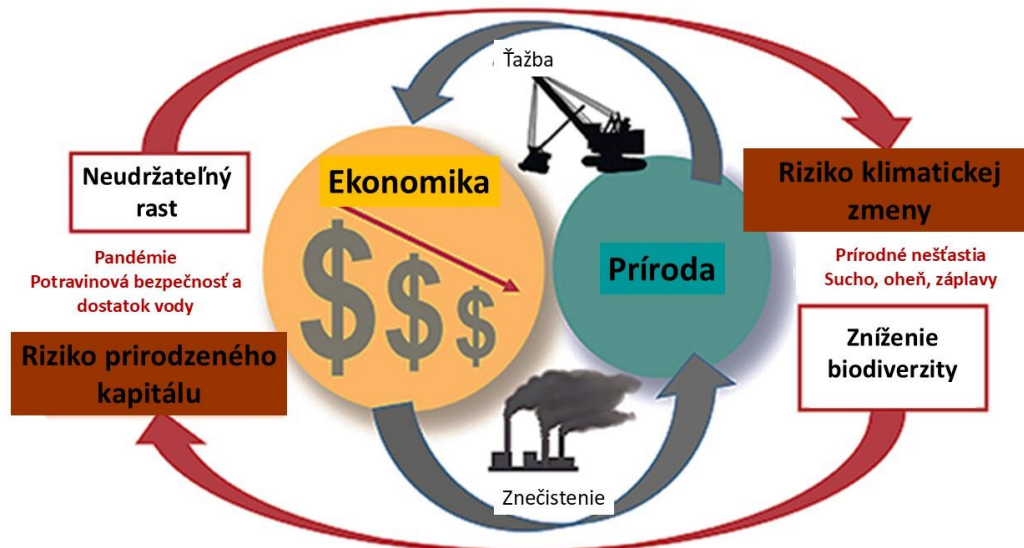
Obrázok 5.13: Korálové útesy a ich zmena vplyvom okysľovania oceánov (Zdroj: <https://www.greaterclevelandaquarium.com/coral-reefs-and-ocean-acidification/>).

5.4 Biodiverzita a potreby človeka

Biodiverzita poskytuje základné ekosystémové služby, ako je opeľovanie, čistenie vody, sekvestrácia uhlíka a úrodnosť pôdy. Tieto služby majú ekonomickú hodnotu a ich pokles v dôsledku straty biodiverzity môže mať negatívne ekonomické dôsledky. Pozitívom je, že biodiverzita môže prispieť k hospodárskemu rozvoju prostredníctvom eko-turizmu. Turisti môžu navštevovať prírodné oblasti a pozorovať prírodné krásy. Úsilie o ochranu biodiverzity často súvisí s ekonomickými otázkami, nakoľko vytvorenie chránených území, a financovanie výskumných a ochranárskych programov si vyžaduje značné finančné zdroje. Zdravé ekosystémy sú nevyhnutné pre dlhodobú ekonomickú udržateľnosť. Úsilie o zmiernenie negatívnych dopadov ekonomie na biodiverzitu často pokrýva integráciu ochrany prírody do ekonomického rozhodovania, prijatie postupov trvalo udržateľného manažmentu rozvoja, podporu obchodných aktivít priaznivých pre biodiverzitu a v neposlednom rade aj politickú podporu. Pre dosiahnutie hospodárskeho rastu a ochrany biodiverzity je potrebné prepojiť ekonomické aktivity s udrzaním biodiverzity.

Naša súčasná paradigma predpokladá, že príroda je neobmedzená, a že ekonomické bohatstvo a ľudské blaho môžu rásť bez ohľadu na vplyv našich činov na prírodu. S prírodou,

ktorá je považovaná za „externú“ ekonomickému životu, sme vytvorili ekonomiku, ktorá ťaží a znečisťuje bez hraníc, čo je však z dlhodobého hľadiska neudržateľné (Obrázok 5.14).



Obrázok 5.14: Súčasná paradigma: ekonomika mimo prírody (Zdroj: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fclim.2022.855803/full> , upravené).

5.4.1 Trvalo udržateľný rozvoj

Koncept trvalo udržateľného rozvoja sa dostal do popredia v roku 1987, kedy Svetová komisia životného prostredia a rozvoja publikovala správu „Naša spoločná budúcnosť“, pričom jasne upozornila na fakt, že z prírody nesmieme odoberať viac, ako sa stačí reprodukovať bez strát na ďalšej produkčnosti. Trvalo udržateľný rozvoj je definovaný ako rozvoj, ktorý umožňuje uspokojovanie potrieb súčasných generácií bez toho, aby boli ohrozené nároky budúcich generácií na uspokojovanie ich potrieb. Je to holistický prístup k spoločenskému pokroku, ktorý sa snaží vytvoriť lepší svet vyvážením ekonomických, sociálnych a environmentálnych cieľov a zároveň zabezpečiť blahobyt súčasných a budúcich generácií. Kladie dôraz na zodpovedný a inkluzívny rozvoj, ktorý rešpektuje hranice planét a podporuje ľudskú dôstojnosť a rovnosť.

Ochrana životného prostredia je ústredným pilierom trvalo udržateľného rozvoja. Zahŕňa zachovanie prírodných zdrojov, zníženie znečistenia a zmiernenie klimatických zmien. Trvalo udržateľný rozvoj podporuje využívanie obnoviteľnej energie, udržateľné poľnohospodárstvo a zodpovedné modely spotreby a výroby. Trvalo udržateľný rozvoj uznáva dôležitosť ekonomického rastu, ale zdôrazňuje posun k spravodlivejším ekonomickým

systemom. To zahŕňa znižovanie chudoby, podporu dôstojnej práce a ekonomických príležitostí pre všetkých a podporu inovácií a udržateľných obchodných praktík. Cieľom je, aby všetci jednotlivci a skupiny mali prístup k základným službám, vzdelávaniu, zdravotnej starostlivosti a sociálnej ochrane. To zahŕňa riešenie otázok ako rodová rovnosť, sociálna spravodlivosť a ľudské práva. Z dlhodobého hľadiska sa trvalo udržateľný rozvoj, berúc do úvahy dôsledky rozhodnutí a opatrení pre budúce generácie snaží vyhnúť krátkodobým ziskom, ktoré môžu viesť k dlhodobým negatívnym vplyvom. Ekonomické, sociálne a environmentálne faktory sú vzájomne prepojené a zmeny v jednej oblasti môžu mať dominový efekt na ostatné, takže cieľom je dosiahnuť rovnováhu. Mnohé z výziev, ktoré rieši trvalo udržateľný rozvoj, sú globálneho charakteru, ako napríklad zmena klímy a strata biodiverzity a preto pre riešenie týchto problémov je nevyhnutná medzinárodná spolupráca.

5.4.2 Ekologická stopa

Ekologická stopa je jedným z nástrojov ako kvantitatívne merať vplyv ľudskej činnosti na životné prostredie, a to z hľadiska prírodných zdrojov a ekosystémov potrebných na podporu týchto činností. Kvantifikuje dopyt, ktorý ľudia kladú na ekosystémy Zeme, a porovnáva ho so schopnosťou planéty regenerovať tieto zdroje a absorbovať vytvorený odpad. Zahŕňa rôzne druhy zdrojov vrátane energie, potravín, vody, pôdy určenej na poľnohospodársku činnosť a bývanie, lesné produkty. Zohľadňuje aj absorpčnú kapacitu ekosystémov z hľadiska odpadu, najmä emisie oxidu uhličitého (Obrázok 5.15).

Biokapacita je to schopnosť Zeme regenerovať sa a poskytovať zdroje požadované ľudstvom a absorbovať odpad, ktorý vzniká ľudskou činnosťou. Je to v podstate ekologický rozpočet planéty. Výpočty ekologickej stopy sú vyjadrené v globálnych hektároch a predstavujú plochu produktívnej pôdy a vody potrebnej na podporu ľudských aktivít a na absorbovanie odpadu vytvoreného takýmito aktivitami. Ak ekologická stopa prekročí biokapacitu Zeme, ľudstvo spotrebúva zdroje rýchlejšie, ako ich planéta dokáže regenerovať.

Ekologickú stopu možno vypočítať pre jednotlivcov, mestá, krajiny alebo celý svet. To umožňuje porovnávať spotrebu zdrojov a vplyv na životné prostredie v rôznych mierkach. Koncept ekologickej stopy pomáha zdôrazniť potrebu trvalo udržateľného riadenia zdrojov a znižovania nadmernej spotreby. Napríklad, v roku 2022 bola svetová priemerná ekologická stopa 2,58 globálnych hektárov na osobu s priemernou biokapacitou 1,51 globálnych hektárov. To znamená, že ľudská spotreba prírodných zdrojov už v roku 2022 prevyšovala schopnosť

Zeme tieto zdroje doplniť. Na pokrytie našich potrieb by sme potrebovali nie jednu, ale 1,71 planét.

V roku 2024 bola svetová priemerná ekologická stopa na osobu 2,6 globálnych hektárov na osobu. Medzi krajiny s najväčším ekologickým deficitom patria USA, ktoré mali v roku 2024 Ekologickú stopu 7,8 globálnych hektárov na obyvateľa. Ekologická stopa jedného obyvateľa Slovenska predstavovala v roku 2024 hodnotu 4,6 globálnych hektárov na obyvateľa. Pre porovnanie, ekologická stopa jedného obyvateľa Slovenska mala k roku 2017 hodnotu 4,51 globálneho hektára.

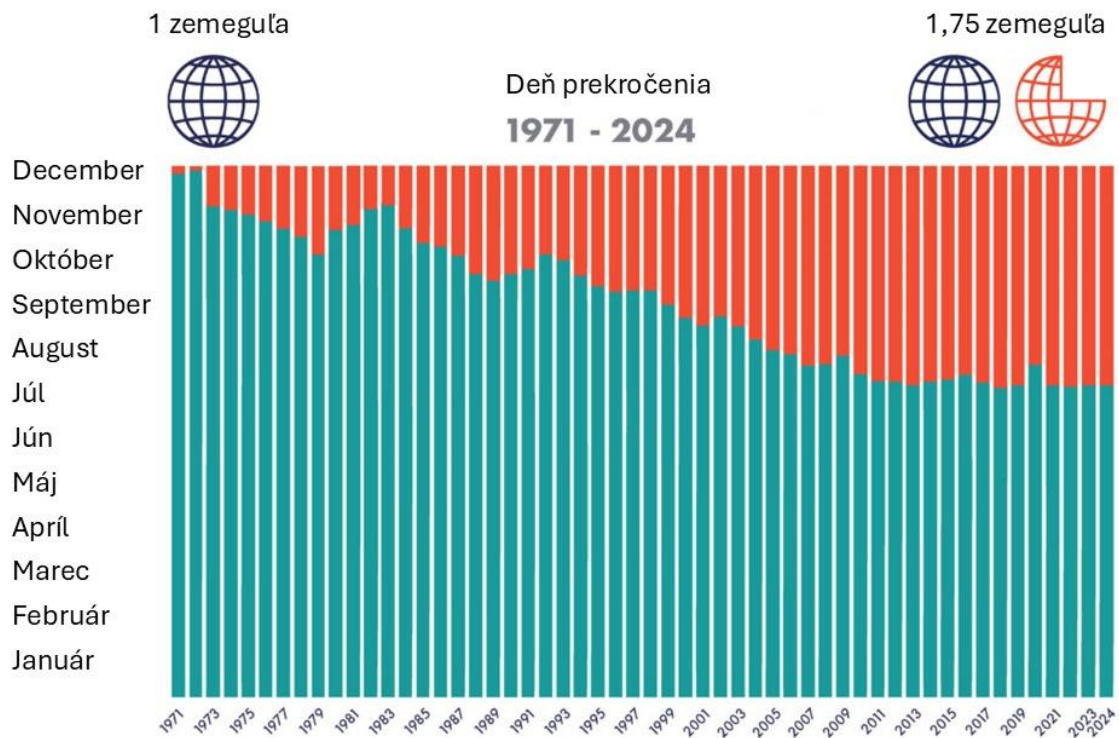


Obrázok 5.15: Zložky ekologickej stopy (Zdroj: <https://www.footprintnetwork.org/2016/02/21/origami-japans-ecological-footprint-common/>, upravené)

5.4.3 Deň prekročenia Zeme

Deň prekročenia Zeme („Overshoot Day“) označuje dátum, kedy dopyt ľuďstva po ekologických zdrojoch a službách v danom roku prevyšuje to, čo môže Zem v danom roku regenerovať. Je to dátum, kedy ľudstvo začína žiť na ekologický dlh. V roku 2024 pripadol Deň prekročenia Zeme na 1. augusta, v roku 2023 na 2. augusta, zatiaľ čo v roku 2020 pripadol

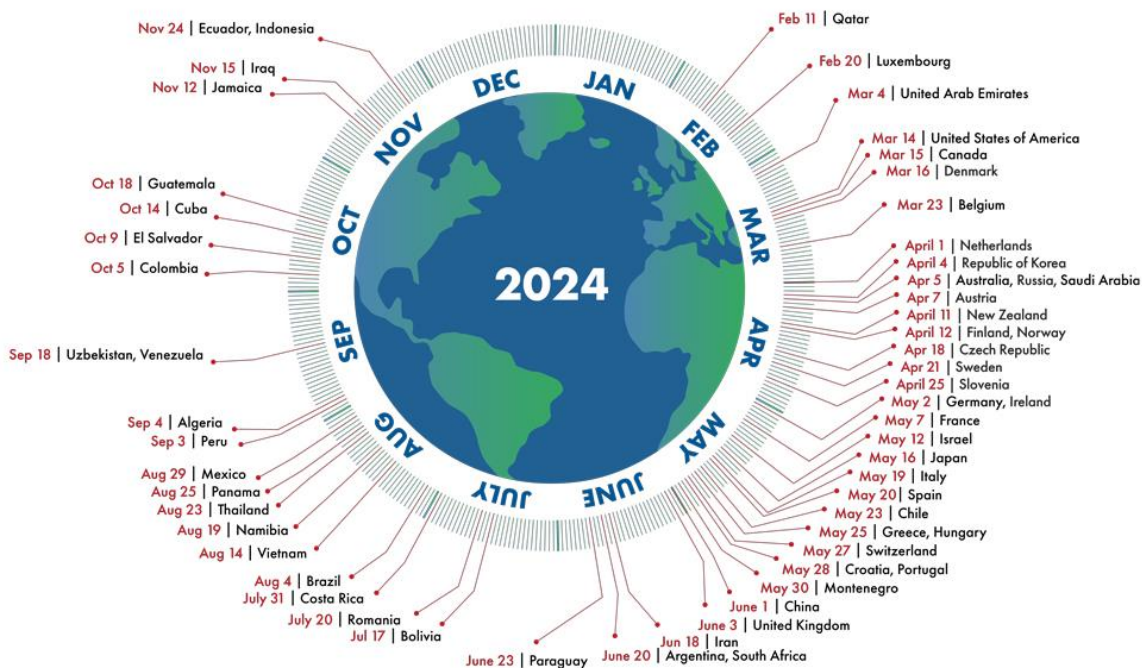
tento deň na 22. augusta (Obrázok 5.16). Deň prekročenia Zeme sa vypočíta tak, že sa biokapacita planéty (v globálnych hektároch) vydelená ekologickou stopou ľudstva (v globálnych hektároch) a vynásobí sa počtom dní v roku, čo je 365.



Obrázok 5.16: Deň prekročenia Zeme v rokoch 1971 - 2024 (Zdroj: <https://www.footprintnetwork.org/our-work/earth-overshoot-day/> upravené)

5.4.3.1 Deň prekročenia krajiny

Deň prekročenia krajiny odráža ekologickú stopu krajiny porovnaním dopytu obyvateľstva a biokapacity národa. Pre Slovensko v roku 2024 pripadol tento deň na 12. 5.2 024 (Obrázok 5.17). Od tohto dátumu žije Slovensko na úkor budúcich generácií. Ak by svetová populácia mala rovnaký životný štýl ako slovenskí občania, na zabezpečenie jej existencie by boli potrebné zdroje 2,75 planét.



Obrázok 5.17: Deň prekročenia krajiny. (Zdroj: <https://www.genevaenvironmentnetwork.org/resources/updates/earth-overshoot-day/>, upravené).

5.4.4 Uhlíková stopa

Oxid uhličitý (CO₂) sa v atmosfére prirodzene vyskytuje a je súčasťou regulačného systému známeho ako uhlíkový cyklus. Veľké a nadmerné koncentrácie CO₂ narúšajú uhlíkový cyklus, zemskú klímu a ekosystém rýchlym zvýšením teploty.

Uhlíková stopa je **podmnožina ekologickej stopy** (Obrázok 5.18), je to súčasť vyjadrenia celkového dopadu ľudských aktivít na životné prostredie. Vo všeobecnosti sa pod uhlíkovou stopou rozumie objem emisií takých plynov (predovšetkým oxidu uhličitého a iných zlúčenín uhlíka), ktoré majú dopad na podnebie Zeme, pričom tieto emisie sú spôsobené človekom. Definícia uhlíkovej stopy nie je jednotná, pretože je možné ju chápať v užšom aj širšom ponímaní.

Koncept uhlíkovej stopy sa používa na hodnotenie a kvantifikáciu environmentálneho vplyvu ľudských činností a činností na planétu, najmä pokiaľ ide o ich príspevok k zmene klímy. Medzi hlavné zdroje uhlíkových emisií, ktoré prispievajú k uhlíkovej stope človeka, patria:

- Emisie z výroby elektriny a tepla, ako aj spotreba paliva v doprave (autá, lietadlá atď.), vykurovanie a chladenie budov.
- Emisie z výrobných a priemyselných činností.
- Emisie z poľnohospodárskych postupov vrátane emisií metánu z hospodárskych zvierat a emisií oxidu dusného z používania hnojív.
- Emisie z odlesňovania a zmien vo využívaní pôdy, ako aj emisie z degradácie lesov.
- Emisie z rozkladu organického odpadu na skládkach a zo spaľovania odpadu.



Obrázok 5.18: Faktory ovplyvňujúce uhlíkovú stopu (Zdroj: <https://medium.com/@prajwalprajju725/how-important-is-it-to-calculate-your-own-carbon-footprint-e6635999a5a0>, upravené).

Medzi **priame emisie** patrí spaľovanie fosílnych palív a medzi **nepriame emisie** zaraďujeme energie získané pre vlastnú spotrebu (transport, spracovanie nakúpených materiálov, nakladanie s odpadmi, atď.).

Znižovanie vlastnej uhlíkovej stopy je kľúčovou stratégiou pri zmierňovaní klimatických zmien. Je to možné dosiahnuť rôznymi prostriedkami, ako je prijatie energeticky účinných technológií, využívanie verejnej dopravy namiesto osobnej dopravy, zníženie spotreby mäsa, minimalizáciou odpadu a podporou obnoviteľných zdrojov energie. Každý z nás produkuje uhlíkovú stopu, pričom jej veľkosť závisí od nášho životného štýlu (cestovanie,

bývanie, stravovacie návyky, atď.). Na stránke Ministerstva životného prostredia SR (<https://iep.sk/kalkulacka>) sa nachádza kalkulačka uhlíkovej stopy, ktorá na základe poskytnutých informácií vypočíta uhlíkovú stopu jednotlivca.

Pre výpočet uhlíkovej stopy môžeme za skleníkové plyny v užšom zmysle považovať buď len oxid uhličitý, alebo viaceré uhlík obsahujúce plyny (metán, alebo aj plyny so skleníkovým efektom bez obsahu uhlíka, ako napríklad oxid dusný). Okrem samotnej definície plynov je možno rozdielne definovať aj aktivity človeka, ktorých dopad sa berie do úvahy. Môžeme brať do úvahy len priame aktivity (napr. používanie motorových prostriedkov alebo spotreba elektrickej energie). Pri širšom pohľade však môžeme brať do úvahy aj emisie, ktoré vznikli počas celého životného cyklu výrobkov a služieb (získanie surovín na ich výrobu, až po spracovanie odpadu z nich), širší prístup je však ťažšie kvantifikovateľný.

Samotné jednotky, v ktorých sa ekologická stopa vyjadruje sú taktiež rôzne. Môže sa jednať o hmotnosť uhlíka (CO₂), ekvivalent hmotnosti CO₂ pre všetky skleníkové plyny alebo môžeme efekt vyjadriť v hektároch, ktoré keby boli porastené zeleňou, by takúto produkciu skleníkových plynov vedeli eliminovať.

Emisie každej krajiny sa kvantifikujú prostredníctvom uhlíkovej stopy, čo je súčet všetkých emisií skleníkových plynov od jednotlivcov, spoločností, priemyselných odvetví až na úrovni krajiny. Medzi troch najväčších producentov CO₂ patrí Čína, USA a India. Slovensko svojou produkciou CO₂ je zaradené na 75. pozíciu zo 185.

5.4.5 Uhlíková neutralita

V reakcii na nárast priemernej globálnej teploty niektoré krajiny podnikli kroky na zníženie emisií oxidu uhličitého. Krajiny sa považujú **za uhlíkovo neutrálnu**, keď odstránia z atmosféry viac CO₂, ako vypustia. Riešením je buď znížiť emisie CO₂ a/alebo zachytávať CO₂.

Cieľom **systému obchodovania s emisiami** v EÚ je znížiť emisie uhlíka v priemyselnom odvetví tým, že spoločnostiam sa ukladá povinnosť mať povolenie na každú tonu CO₂, ktorú vypustia. Firmy ich musia nakupovať prostredníctvom aukcií. Európsky systém obchodovania s emisiami reguluje približne 40 % celkových emisií skleníkových plynov v EÚ a pokrýva približne 10 000 elektrární a výrobných závodov v EÚ.

Ďalším z riešení ako redukovať emisie v EÚ je **zníženie emisií z dopravy**. Spaľovanie paliva je zodpovedné za viac ako tri štvrtiny emisií skleníkových plynov v EÚ. V apríli 2023 Európsky parlament podporil revíziu systému obchodovania s emisiami pre letectvo tak, aby sa

obchodovanie s emisiami vzťahovalo na všetky lety s odletom z Európskeho hospodárskeho priestoru, ktorý tvorí EÚ plus Island, Lichtenštajnsko a Nórsko. Cieľom je, aby dodávatelia začali dodávať udržateľné palivo od roku 2025 a aby do roku 2050 udržateľné palivo predstavovalo 70 % všetkého leteckého paliva na letiskách EÚ. Ďalej, Európsky parlament podporil nulové emisie CO₂ pre osobné automobily do roku 2035. Na dosiahnutie týchto cieľov by všetky nové autá, ktoré prídu na trh EÚ od roku 2035, mali mať nulové emisie CO₂. Prechod na vozidlá s nulovými emisiami musí ísť však zároveň s komplexnou infraštruktúrou pre udržateľné palivá. Predpokladá sa, že do roku 2026 budú elektrické nabíjacie zóny pre autá vybudované minimálne každých 60 kilometrov pozdĺž hlavných ciest EÚ a do roku 2028 vodíkové čerpace stanice každých 100 kilometrov.

Ďalším riešením ako znížiť emisie je podpora **čistých zdrojov energie** ako alternatívy k fosílnym palivám. Napríklad, na vykurovanie a chladenie budov dnes pripadá 40 % všetkej energie spotrebovanej v EÚ. Cieľom je, aby všetky nové budovy v EÚ produkovali od roku 2030 nulové emisie CO₂ (napr. inštaláciou solárnych panelov na novostavby). V súčasnosti viac ako 20 % energie spotrebovanej v EÚ pochádza z obnoviteľných zdrojov. Do roku 2030 sa má zvýšiť podiel obnoviteľných zdrojov energie na konečnej spotrebe energie v EÚ na 42,5 %, pričom cieľom krajín EÚ by malo byť 45 %.

CO₂ sa odstraňuje zo vzduchu buď **prírodnými metódami**, ako je zalesňovanie a používanie inovatívnych techník obhospodarovania pôdy, alebo **prostredníctvom technológií**. Lesy sú prirodzenými zásobárňami uhlíka, čo znamená, že zachytávajú viac uhlíka z atmosféry, ako uvoľňujú. Odlesňovanie a degradácia lesov však znižuje ich schopnosť zachytávať CO₂. V apríli 2023 Európsky parlament schválil nové pravidlá, ktoré spoločnostiam ukladajú povinnosť overovať, či výrobky predávané na európskom trhu neprispeli k odlesňovaniu alebo znehodnocovaniu lesov kdekoľvek na svete.

Zachytávanie a ukladanie uhlíka je ďalším spôsobom znižovania emisií uhlíka. Ide o trojstupňový proces, ktorý zahŕňa zachytávanie CO₂ produkovaného priemyselnou činnosťou, jeho prepravu a potom jeho uskladnenie hlboko pod zem. V prvom kroku sa CO₂ oddelí od ostatných plynov, následne sa CO₂ stlačí a prepraví (potrubím, cestnou alebo lodnou dopravou) na miesto uskladnenia. Nakoniec sa CO₂ vstrekuje do skalných útvarov hlboko pod zemou na za účelom trvalého uloženia. Medzi možné úložiská uhlíkových emisií patria slané vodonosné vrstvy alebo vyčerpané ložiská ropy a plynu.

V poslednom čase je snaha o využitie technológií na odstránenie CO₂ z atmosféry. Jednou z možností je bioenergia, kde rastlinná biomasa (drevo alebo tráva) sa zozbiera a spaľuje v elektrárni, pričom CO₂ sa zachytáva a skladuje. Ďalšou možnosťou je priame zachytávanie

vzduchu, z ktorého sa CO₂ odstraňuje pomocou chemického procesu. Avšak, koncentrácia CO₂ vo vzduchu je omnoho nižšia ako v komínoch elektrární alebo priemyselných závodov, čím je jeho zachytávanie oveľa menej efektívne. Z tohto dôvodu je takáto metóda dosť finančne náročná.

5.4.6 Parížska dohoda 2015

Zmena klímy je globálny problém a vyžaduje spoluprácu všetkých krajín. V roku 2015 sa svetoví lídri dohodli na stanovení nových cieľoch v boji proti zmene klímy. Dohoda nadobudla platnosť 4. novembra 2016, teda po necelom roku od jej prijatia v Paríži. Zmluvnými stranami sú štáty zo všetkých piatich kontinentov sveta a s výnimkou Ruskej federácie; a zahŕňa všetkých významných producentov emisií skleníkových plynov ako je napríklad Čína a USA. Dohodu ratifikovali všetky členské štáty EÚ.

Parížska dohoda je akčný plán na obmedzenie globálneho otepľovania. Vlády sa dohodli, že udržia zvyšovanie globálnej priemernej teploty výrazne pod 2 °C, v porovnaní s obdobím pred priemyselnou revolúciou, a že sa budú usilovať obmedziť toto zvyšovanie na 1,5 °C. Dohoda prináša zmenu, pokiaľ ide o záväzky znižovania emisií skleníkových plynov. V rámci Parížskej dohody sa štáty EÚ (Obrázok 5.19) zaviazali spoločne znížiť do roku 2030 emisie skleníkových plynov o najmenej 40 % v porovnaní s rokom 1990. Okrem toho, EÚ sa snaží regulovať aj ďalšie skleníkové plyny, ktoré zohrievajú našu planétu, ako je metán, fluórované plyny a látky poškodzujúce ozónovú vrstvu. Hoci sa v atmosfére nachádzajú v menšom objeme ako CO₂, môžu mať výrazný otepľovací efekt.

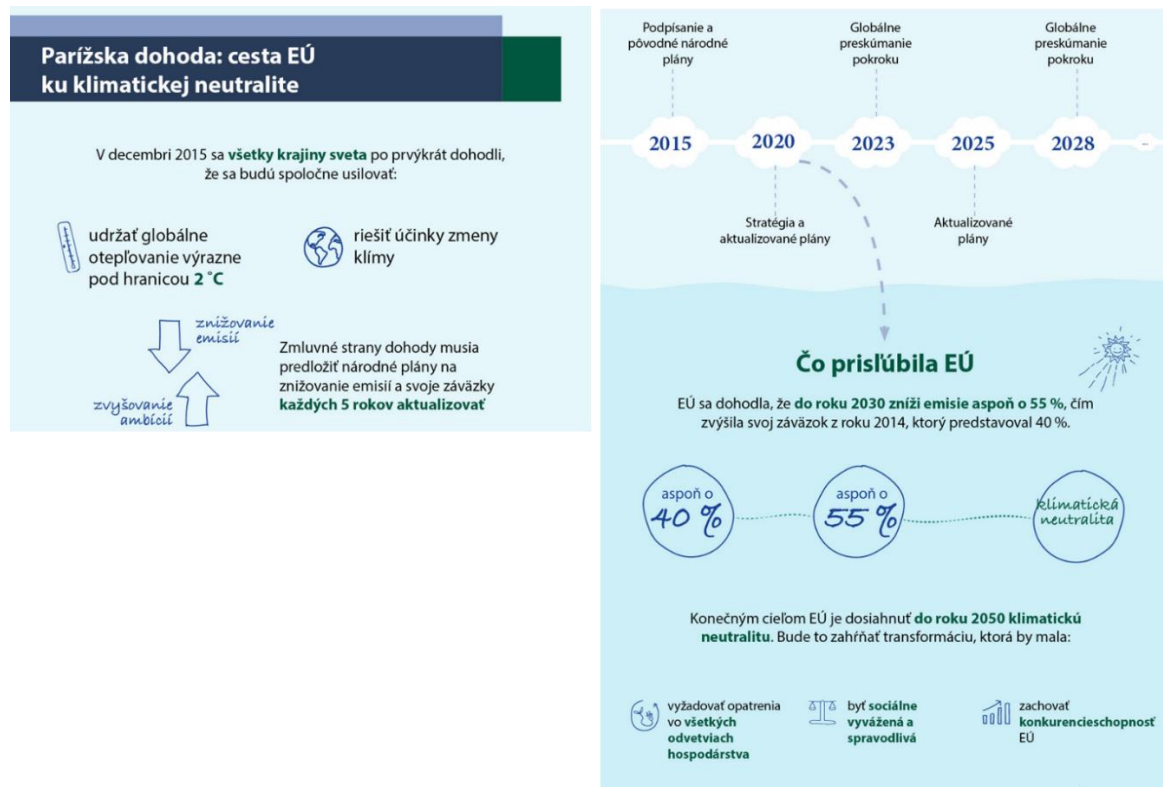
5.4.7 Konferencia o zmene klímy COP26 a COP27

Zasadnutie konferencie Organizácie Spojených národov o zmene klímy COP 26 (akronym „Conference of the parties“) bolo dôležitým podujatím, na ktorom sa zišli po viac ako 30. rokoch lídri zo všetkých krajín sveta, aby sa dohodli na tom, ako **zintenzívniť celosvetové opatrenia** na riešenie **klimatickej krízy**.

Medzinárodná klimatická konferencia COP26 sa konala v roku 2021 v Glasgowe. Hlavným cieľom bolo **zabezpečiť globálnu čistú nulu** (tzn. celkové emisie sú rovnaké alebo menšie ako emisie odstránené zo životného prostredia) do polovice storočia a udržať na dosah maximálne 1,5 °C stupňa otepľovania. Na zasadnutí zmluvné strany preskúmali, do akej miery

sa im darí plniť záväzky v rámci cieľa **Parížskej dohody**. **Zmluvné strany** sa uzniesli, že sa síce dosiahol významný pokrok, avšak na dosiahnutie cieľa 1,5 °C bude ešte potrebné ďalšie úsilie.

27. konferencia OSN o zmene klímy **COP27** sa konala v roku 2022 v Egypte. Na summite sa stretli zmluvné strany so zámerom urýchliť kroky smerom k cieľom Parížskej dohody a Rámcového dohovoru OSN o zmene klímy. Zmluvné strany sa dohodli, že obmedzenie globálneho otepľovania na 1,5 °C si vyžaduje rýchle, hlboké a trvalé zníženie globálnych emisií skleníkových plynov. Medzi zmluvnými stranami sa dosiahla dohoda o vytvorení nových mechanizmov financovania na pomoc rozvojovým krajinám, ktoré sú obzvlášť citlivé na nepriaznivé účinky zmeny klímy.



Obrázok 5.19: Parížska dohoda: cesta EÚ ku klimatickej neutralite (zdroj: <https://www.consilium.europa.eu/sk/infographics/paris-agreement-eu/>, upravené).

5.5 Ochrana biodiverzity

Konferencia Organizácie spojených národov o životnom prostredí človeka v Štokholme v roku 1972 bola prvou svetovou konferenciou, na ktorej sa životné prostredie stalo hlavnou témou. Účastníci prijali sériu zásad správneho manažmentu životného prostredia vrátane Štokholmskej

deklarácie a Akčného plánu pre životné prostredie človeka a niekoľkých rezolúcií. **Štokholmská deklarácia**, ktorá obsahovala 26 zásad, postavila environmentálne otázky do popredia medzinárodných záujmov a znamenala začiatok dialógu medzi vyspelými a rozvojovými krajinami o prepojení medzi hospodárskym rastom, znečistením ovzdušia, vody a oceánov. Akčný plán obsahoval tri hlavné kategórie:

- program globálneho hodnotenia životného prostredia (plán sledovania),
- činnosti environmentálneho manažmentu;
- medzinárodné opatrenia na podporu činností hodnotenia a riadenia vykonávaných na národnej a medzinárodnej úrovni.

Jedným z hlavných výsledkov štokholmskej konferencie bolo vytvorenie Programu OSN pre životné prostredie (UNEP).

Pri príležitosti 20. výročia konania prvej konferencie Organizácie spojených národov o životnom prostredí sa 3.-14. júna 1992 v Rio de Janeiro v Brazílii konala Konferencia Organizácie Spojených národov o životnom prostredí a rozvoji (UNCED), známa aj ako „**Summit Zeme**“. Táto celosvetová konferencia, spojila politických lídrov, diplomatov, vedcov, zástupcov médií a mimovládnych organizácií zo 179 krajín, aby sa masívne zamerali na dopady ľudských socio-ekonomických činností na životné prostredie. V rovnakom čase sa v Rio de Janeiro konalo aj „Globálne fórum“ mimovládnych organizácií, ktoré predstavilo svoju vlastnú víziu budúcnosti sveta vo vzťahu k životnému prostrediu a sociálno-ekonomickému rozvoju.

Konferencia v Rio de Janeiro poukázala na to, že sociálne, ekonomické a environmentálne faktory sú vzájomne závislé a vyvíjajú sa spoločne. Primárnym cieľom konferencie bolo vytvoriť široký program a nový plán pre medzinárodnú činnosť v otázkach životného prostredia a rozvoja, ktorý by pomohol riadiť medzinárodnú spoluprácu a rozvojovú politiku v 21. storočí.

Na konferencii sa dospelo k záveru, že koncepcia trvalo udržateľného rozvoja je dosiahnuteľným cieľom. Uznalo sa, že integrácia a vyváženie hospodárskych, sociálnych a environmentálnych záujmov pri napĺňaní potrieb sú životne dôležité pre udržanie ľudského života na planéte a že takýto integrovaný prístup je možný. Konferencia tiež uznala, že integrácia a vyváženie ekonomických, sociálnych a environmentálnych rozmerov si vyžaduje nové vnímanie spôsobu, akým vyrábame a spotrebujeme, ako žijeme a pracujeme a ako sa rozhodujeme.

Na konferencii boli prijaté 4 základné dokumenty:

1. Deklarácia o životnom prostredí tzv. Rio deklarácia
2. Rámcový dohovor o klimatických zmenách

3. Dohovor o biologickej diverzite
4. AGENDA 21

5.5.1 AGENDA 21

Jedným z hlavných výsledkov konferencie UNCED bola **Agenda 21**, akčný program vyzývajúci k novým stratégiám investovania do budúcnosti na dosiahnutie celkového trvalo udržateľného rozvoja v 21. storočí. Agenda 21 je pomenovaná po 21. storočí, pretože mala usmerňovať globálny rozvoj do 21. storočia. Primárnym cieľom Agendy 21 je podporovať trvalo udržateľný rozvoj, ktorý je definovaný ako rozvoj, ktorý uspokojuje potreby súčasnosti bez toho, aby ohrozil schopnosť budúcich generácií uspokojovať svoje vlastné potreby. Zaoberá sa širokou škálou environmentálnych, sociálnych a ekonomických problémov vrátane ochrany biodiverzity, udržateľného poľnohospodárstva a potravinovej bezpečnosti, prístupu k čistej vode a sanitácii, zníženie chudoby, zdravia a vzdelania, trvalo udržateľný rozvoj miest, obnoviteľná energia, ochrana oceánov a pobrežných oblastí, boj proti odlesňovaniu a rozširovaniu púští, podpora zodpovednej spotreby a výroby.

Agenda 21 poskytuje krajinám rámec na vypracovanie vlastných stratégií a akčných plánov trvalo udržateľného rozvoja. Zdôrazňuje dôležitosť spolupráce medzi vládami, mimovládnyimi organizáciami, podnikmi a miestnymi komunitami na dosiahnutie svojich cieľov. Agenda 21 nebola právne záväzná, ale bola skôr dobrovoľným akčným plánom.

5.5.1.1 AGENDA 2030

Agenda 2030, známa aj ako „**Agenda pre trvalo udržateľný rozvoj**“, je globálna iniciatíva prijatá Organizáciou Spojených národov v septembri 2015. Stavia na základoch Agendy 21 a predstavuje komplexnejší a ambicióznejší rámec na riešenie najzávažnejších ekonomických, sociálnych a environmentálnych výziev. Ústrednou témou Agendy 2030 je udržateľnosť, ktorej cieľom je vytvoriť do roku 2030 **spravodlivejší, prosperujúci a environmentálne udržateľný svet**. Kľúčovou zložkou Agendy 2030 je súbor 17 cieľov (Obrázok 5.20), pričom každý cieľ sa zameriava na špecifické oblasti rozvoja a poskytuje krajinám plán, ktorým sa majú riadiť, aby dosiahli trvalo udržateľný rozvoj.

Na Slovensku sa AGENDA 2030 premietla do užšieho súboru prioritných oblastí, ktoré zohľadňujú špecifiká Slovenska:

1. vzdelanie pre dôstojný život;
2. smerovanie k znalostnej a environmentálne udržateľnej ekonomike pri demografických zmenách a meniacom sa globálnom prostredí;
3. znižovanie chudoby a sociálna inklúzia;
4. udržateľné sídla, regióny a krajina v kontexte zmeny klímy;
5. právny štát, demokracia a bezpečnosť;
6. dobré zdravie.

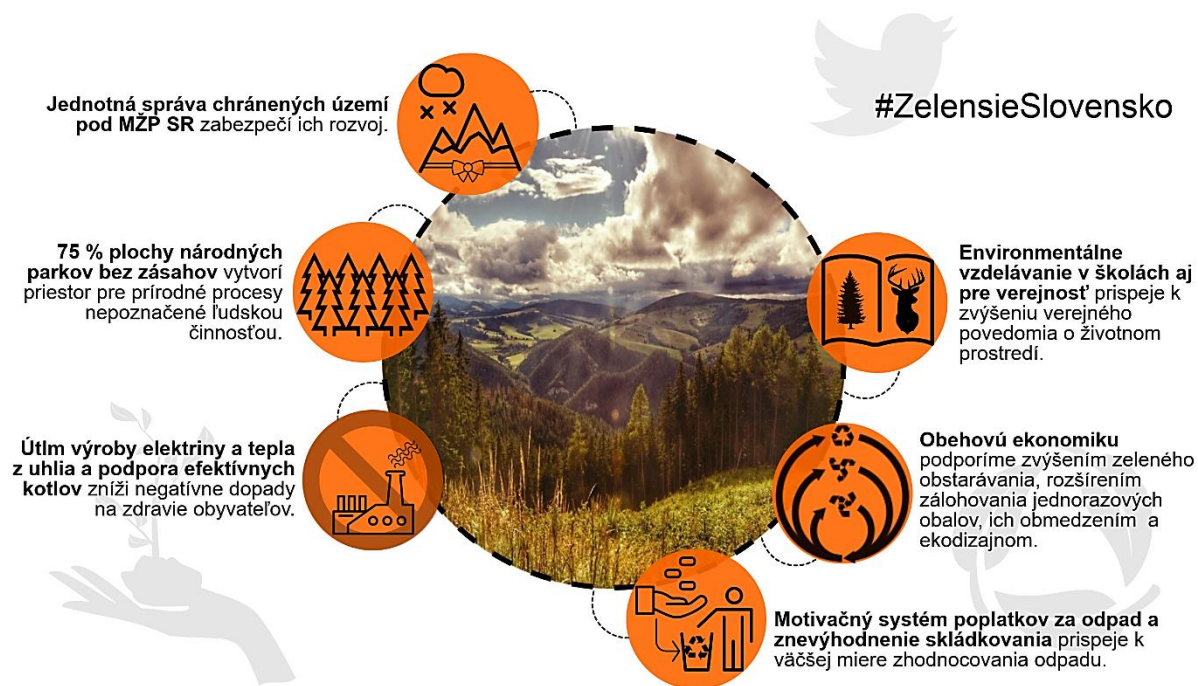


Obrázok 5.20: Ciele AGENDY 2030 (Zdroj: <https://mirri.gov.sk/sekcie/udrzatelny-rozvoj/agenda-2030/>).

5.5.1.2 Envirostratégia 2030

Stratégia environmentálnej politiky Slovenskej republiky do roku 2030 (tzv. Envirostratégia 2030) predstavuje nový strategický dokument pre oblasť životného prostredia s dlhodobými cieľmi zameranými na prechod k zelenému, nízko uhlíkovému a inkluzívnemu hospodárstvu. Nahrádza tak Stratégiu, zásady a priority štátnej environmentálnej politiky z roku 1993.

Najväčšie výzvy životného prostredia na Slovensku (Obrázok 5.21) sú problematika odpadového hospodárstva, kvalita ovzdušia a ochrana biotopov a druhov hlavne v lesných, lúčnych a mokrad'ových ekosystémoch.



Obrázok 5.21: Hlavné opatrenia Stratégie environmentálnej politiky do roku 2030. (Zdroj: https://www.minzp.sk/images/iep/infografika_es_celkovo.png)

Opatrenia potrebné na dosiahnutie **cieľov Envirostratégie 2030** sú:

- znížiť množstvo emisií oproti roku 2005 (SO₂ o 82 %, NO_x o 50 %, NH₃ o 30 %);
- zvýšiť stupeň recyklácie komunálneho odpadu, vrátane jeho prípravy na opätovné použitie, na 60 % a do roku 2035 znížiť mieru jeho skládkovania na menej ako 25 %;
- do roku 2024 prehodnotiť a zjednodušiť systém chránených území a stupňov ochrany,
- odstrániť environmentálne záťaž s najvyššou prioritou riešenia;
- dosiahnuť dobrý stav a potenciál vôd tým, že budú mať aglomerácie s viac ako 2000 obyvateľmi (100 %) a aglomerácie s nižším počtom obyvateľov (50 %) podiel na odvádzaných a čistených vôd;
- zefektívniť systém environmentálnej výchovy, vzdelávania a osvetly.

5.5.2 Dohovor o biologickej diverzite

Dohovor o biologickej diverzite je medzinárodným právnym nástrojom na ochranu biologickej diverzity, trvalo udržateľné využívanie jej zložiek a spravodlivé zdieľanie výhod plynúcich z využívania genetických zdrojov. Hlavným cieľom Dohovoru je **podporovať činnosti, ktoré**

povedú k udržateľnej budúcnosti. Dohovor o biologickej diverzite pokrýva biodiverzitu na všetkých úrovniach a všetky možné oblasti, ktoré priamo alebo nepriamo súvisia s biodiverzitou, od vedy, politiky a vzdelávania až po poľnohospodárstvo, obchod, kultúru a mnohé ďalšie odvetvia. Súčasťou Dohovoru je aj **Kartagénsky protokol** o biologickej bezpečnosti a **Nagojský protokol** o prístupe ku genetickým zdrojom a spravodlivom rovnocennom využívaní prínosov vyplývajúcich z ich spoločného využívania.

Od roku 2001 vydáva Sekretariát Dohovoru o biodiverzite správy o stave biodiverzity. V roku 2010 správa konštatovala, že svet nedosiahol vytýčený cieľ do roku 2010 a to *výrazne znížiť mieru straty biodiverzity na globálnej, regionálnej a národnej úrovni a prispieť tak k zmierneniu chudoby pre prospech všetkého života na Zemi. Z tohto dôvodu zmluvnými stranami bol prijatý nový Strategický plán pre biodiverzitu na obdobie 2011-2020, ktorého víziou je žiť v súlade s prírodou* a hlavným cieľom je, *aby do roku 2050 bola biodiverzita cenená, chránená, obnovovaná a rozumne užívaná, zachovávajúc ekosystémové služby, udržiavajúc zdravú planétu a zabezpečujúc ošoh pre všetkých ľudí.*

V oblasti biodiverzity je **stratégia EÚ do roku 2030** zameraná na ochranu prírody ako súčasť Európskej zelenej dohody.

Stratégia EÚ v oblasti biodiverzity je zameraná na:

- vytvorenie chránených území na aspoň 30% pevniny a mora EÚ; obnovu degradovaných ekosystémov v celej EÚ prostredníctvom konkrétnych opatrení (napríklad zníženie používania pesticídov o 50% alebo výsadba 3 miliárd stromov v celej EÚ);
- vyčlenenie finančných prostriedkov EÚ na ochranu a podporu biodiverzity (20 miliárd ročne).

Základnými dokumentami Dohovoru o biodiverzite v Slovenskej republike sú:

- národná stratégia ochrany biodiverzity na Slovensku prijatá v roku 1997;
- aktualizovaná národná stratégia ochrany biodiverzity do roku 2020 prijatá v roku 2014;
- akčný plán pre implementáciu opatrení vyplývajúcich z Aktualizovanej národnej stratégie ochrany biodiverzity do roku 2020 prijatý v roku 2014.

Koncepcia ochrany prírody a krajiny do roku 2030 si vytýčila za cieľ:

- zlepšiť efektívnosť ochrany a manažmentu chránených území;
- zamedziť zhoršovaniu stavu druhov a biotopov a obnoviť minimálne 15 % degradovaných ekosystémov;

- vytvoriť právne, inštitucionálne a riadiace podmienky pre ochranu krajiny, zabezpečenie stability a konektivity v krajine, odolnosť prírodného prostredia na zmenu klímy a udržateľné využívanie prírodných zdrojov;
- zlepšiť efektívnosť ochrany prírody a krajiny podporou výskumu, výchovy, vzdelávania, osvetu, komunikácie a skvalitnenia systému získavania a poskytovania údajov v oblasti ochrany prírody, biodiverzity a krajiny.

5.5.2.1 Natura 2000



Natura 2000 je európska sústava chránených území členských štátov EÚ, ktorá bola vytvorená za účelom zachovania najcennejších a ohrozených druhov a biotopov Európy. Rozprestiera sa vo všetkých 27 krajinách EÚ na súši (18 %) aj na mori (8 %). Natura 2000 je najväčšou koordinovanou sieťou chránených oblastí na svete. Ponúka útočisko pre najcennejšie a najohrozenejšie druhy a biotopy Európy. Cieľom siete je zabezpečiť dlhodobé prežitie najcennejších a najohrozenejších druhov a biotopov Európy, ktoré sú uvedené v smernici o vtáctve aj v smernici o biotopoch. Natura 2000 nie je systémom prísnych prírodných rezervácií, z ktorých by boli vylúčené všetky ľudské aktivity. Hoci zahŕňa prísne chránené prírodné rezervácie, väčšina pôdy je v súkromnom vlastníctve. Členské štáty musia zabezpečiť, aby boli lokality spravované trvalo udržateľným spôsobom, a to z ekologického aj ekonomického hľadiska.

Natura 2000 pozostáva z chránených vtáčích území určených podľa smernice o ochrane voľne žijúceho vtáctva a území európskeho významu **podľa smernice o ochrane biotopov**. Národný zoznam obsahuje **41 chránených vtáčích území**, ktoré zaberajú 26,2 % z celkovej rozlohy Slovenskej republiky (Sysľovské polia, Tribeč, Ostrovné lúky, Bukovské vrchy, Žitavský luh, Nízke Tatry atď.), ktoré boli vymedzené pre **81 druhov vtáctva** (orol skalný, sokol sťahovavý, výr skalný, bocian biely, bocian čierny, hlucháň hôrny, rybárik riečny, strakoš obyčajný, atď.).

Napríklad, chránené vtáčie územie Sysľovské polia sa nachádza v juhozápadnej časti Slovenska v pohraničnej oblasti s Rakúskou a Maďarskou republikou. Z európskeho hľadiska toto územie plní dôležitú funkciu zimoviska pre približne 10 % stredoeurópskej populácie dropa fúzatého, ktorého prežitie na Slovensku súvisí s ochranou tohto územia. Zimuje tu pravidelne viac ako 1 % stredoeurópskych populácií husí. Sysľovské polia sú zároveň aj posledným pravidelným hniezdiskom dropa fúzatého a sokola červenonohého. Hniezdia tu aj ďalšie vzácne

stepné druhy ako sokol rároh a kaňa popolavá, pričom ich prežitie závisí od udržania pôvodného stavu krajiny a preto na toto územie bolo viac ako 18 rokov zakázané vstúpiť. Po spoločnej dohode s ochranármi sa od roku 2023 sezónne sprístupnil náučný chodník. Pohybovať sa však smie iba po tomto chodníku, ale bez domácich zvierat.

Územia európskeho významu sú vymedzené podľa zákona o ochrane prírody a krajiny (543/2002 Z. z.) v znení neskorších predpisov a platí v nich druhý až piaty stupeň ochrany. Národný zoznam území európskeho významu tvorí 642 lokalít, ktoré prekrývajú 12,75 % výmery Slovenska a predstavujú územia tvorené jednou alebo viacerými lokalitami, na ktorých sa nachádzajú biotopy alebo druhy európskeho významu, na ochranu ktorých sa vyhlasujú tieto chránené územia. Medzi biotopy patria napríklad alpínske trávno-bylinné porasty na silikátovom podklade, bukové a jedľovo-bukové kvetnaté lesy, dubovo-hrabové lesy panónske, horské kosné lúky a kosodrevina, vresoviská a medzi druhmi vretenica malá, zubor hrivnatý, vlk dravý, netopier obyčajný alebo kamzík vrchovský.

O dôležitosti sústavy Natura 2000 v EÚ svedčí aj fakt, že Slovenská republika v roku 2022 prehrala súdny spor o ochranu hlucháňa hôrneho. Európska komisia dostala v roku 2017 viacero sťažností na nadmernú ťažbu dreva na územiach sústavy Natura 2000 vyhlásených na ochranu hlucháňa hôrneho na Slovensku. Európska komisia následne podala na Súdny dvor EÚ žalobu na Slovensko za porušenie smerníc o biotopoch a o vtáctve. Súdny dvor EÚ v celom rozsahu vyhovel žalobe o nesplnenie povinnosti, pričom dospel k záveru, že Slovensko neprijalo vhodné ochranné opatrenia na zabránenie tomu, aby v dôsledku činností hospodárenia v lesoch (intenzívna ťažba dreva na veľkých plochách, používanie pesticídov na boj proti podkôrnemu hmyzu na územiach Natura 2000) nedochádzalo k poškodzovaniu biotopov hlucháňa hôrneho.

5.5.3 Nagojský protokol

Nagojský protokol (prijatý 29. októbra 2010 v Nagoji) sa zaoberá **prístupom ku genetickým zdrojom a spravodlivom zdieľaní výhod** vyplývajúcich z ich využívania, nakoľko mnohé krajiny tretieho sveta nemajú dostatočné prostriedky a kapacity na zabezpečenie nevyhnutnej ochrany biodiverzity na svojom území.

Systém zdieľania benefitov, ktorý Nagojský protokol zavádza, má pomáhať prerozdeľovať prostriedky a zlepšovať kapacity pri dosahovaní cieľov stanovených v Dohovore o biologickej diverzite, najmä ochrana, zachovávanie a udržateľné využívanie

prvkov biodiverzity. Je hlavným medzinárodným nástrojom pre spravodlivé využívanie biologickej diverzity.

Umožňuje stranám dohovoru plne využívať výhody plynúce z genetických zdrojov ktoré im patria, pričom vytvára nové možnosti a stimuly potrebné pre udržiavanie biologickej diverzity. Prispieva k právnej istote a transparentnosti rovnako pre poskytovateľov genetických zdrojov teda štáty, ktoré vlastnia vzácne genetické zdroje, ako aj pre ich užívateľov napr. kozmetické, alebo farmaceutické spoločnosti. Zároveň vytvára spravodlivé podmienky pre prístup a využívanie genetických zdrojov, ktoré je spojené s tradičnými poznatkami pri ich využívaní. Nagojský protokol pomáha zabezpečiť spoločné využívanie prínosov, a tým zvyšuje príspevok biodiverzity k rozvoju a blahu ľudí.

EÚ ponecháva otázku regulácie prístupu ku genetickým zdrojom na jednotlivých členských štátoch a zaoberá sa len otázkou dodržiavania pravidiel užívateľmi na území EÚ, ktoré sú obsiahnuté:

- nariadenie Európskeho parlamentu a Rady EÚ (č. 511/2014) o opatreniach pre dodržiavanie pravidiel, ktoré vyplývajú z Protokolu z Nagoje;
- vykonávacie nariadenie Komisie EÚ (2015/1866), ktorým sa stanovujú podrobné pravidlá, pokiaľ ide o register zbierok, monitorovanie dodržiavania pravidiel zo strany používateľov a osvedčené postupy;
- metodický pokyn k rozsahu pôsobnosti nariadenia a hlavným povinnostiam používateľov v Únii, ktorý má používateľom lepšie objasniť a uľahčiť tzv. postup.

K Nagojskému protokolu pristúpila Slovenská republika ako 70. štát 29. decembra 2015.

5.5.4 Kartagénsky protokol

Kartagénsky protokol k Dohovoru o biologickej diverzite z roku 1993 je medzinárodná dohoda, ktorá riadi transfer živých modifikovaných organizmov („Live modified organisms“, LMO alebo „Genetically modified organisms, GMO) z jednej krajiny do druhej.

Cieľom Kartagenského protokolu je prispieť k zabezpečeniu primeranej úrovne ochrany v oblasti bezpečného prenosu, manipulácie a používania živých modifikovaných organizmov, ktoré sú výsledkom moderných biotechnológií, ktoré môžu mať nepriaznivé účinky na ochranu a trvalo udržateľné využívanie biologickej diverzity, pričom sa zohľadňujú aj riziká pre ľudské zdravie a osobitne sa zameriava na cezhraničné pohyby.

Kartagénsky protokol zavádza termíny:

- **Živý modifikovaný organizmus** (LMO, GMO) je akýkoľvek živý organizmus s novou kombináciou genetického materiálu vytvoreného modernými biotechnológiami;
- **Biologická bezpečnosť** je ochrana ľudského zdravia a životného prostredia pred možnými nepriaznivými účinkami produktov moderných biotechnológií;
- **Živý organizmus** je akéhokoľvek biologický jedinec schopný prenosu alebo replikácie genetického materiálu vrátane sterilných organizmov, vírusov a viroidov;
- **Moderná biotechnológia** zahŕňa:
 - *in vitro* techniky pre nukleové kyseliny vrátane rekombinovanej deoxyribonukleovej kyseliny a priameho injektovania nukleovej kyseliny do buniek alebo organel, alebo
 - fúzie buniek pochádzajúcich z taxonomicky rôznych čeladi, ktoré prekračujú prirodzené fyziologické prekážky reprodukcie alebo rekombinácie a ktoré nie sú technikami využívanými v tradičnom šľachtiteľstve alebo vo výbere.

Kartagénsky protokol je založený na **princípe predbežnej opatrnosti**. Ak existuje hrozba vážneho a nezvratného poškodenia, nedostatok úplnej vedeckej istoty sa nesmie použiť ako dôvod na odloženie nákladovo efektívnych opatrení na zabránenie zhoršovaniu životného prostredia. Protokol zabezpečuje hodnotenie rizík na základe vedecky podložených metodológií. Každá krajina má vytvorené národné kontaktné miesto, ktoré je v kontakte so sekretariátom zriadeným na základe dohovoru.

Administratívne úlohy, ktoré si protokol vyžaduje, vykonávajú určené **národné orgány**, ktoré si krajina určí sama. Kartagénsky protokol ratifikovalo 173 krajín sveta (Obrázok 5.22).



Obrázok 5.22: Krajiny, ktoré ratifikovali Kartagénsky protokol (modrým) (Zdroj: <https://bch.cbd.int/en/>, upravené).

25 krajín ako napr. Argentína, Austrália alebo Kanada síce protokol neratifikovali, ale protokol akceptujú. Slovenská republika ratifikovala Kartagénsky protokol v roku 2003 a platnosť nadobudol v roku 2004.

Konferencia zmluvných strán, na ktorej sa zúčastňujú všetci signatári dohovoru protokol prehodnocuje každých 5 rokov, odporúča opatrenia, ktoré treba prijať a zriaďuje pomocné orgány.

Každý signatár Kartagénskeho protokolu:

- Prijíma potrebné a vhodné právne, administratívne a iné opatrenia na plnenie svojich záväzkov;
- zabezpečuje, aby vývin, manipulácia, preprava, používanie, prenos a uvoľňovanie akýchkoľvek živých modifikovaných organizmov predchádzali alebo znižovali riziko pre biodiverzitu;
- môže prijať dodatočné opatrenia na ochranu zachovania a trvalo udržateľného využívania biologickej diverzity;
- je nabádaný, aby zohľadnil prácu a odborné znalosti medzinárodných orgánov, ktoré sa špecializujú na riziká pre ľudské zdravie;
- môže sa zúčastňovať na bilaterálnych, regionálnych a multilaterálnych dohodách a dojednaniach, a to aj s nesignatárskymi krajinami, za predpokladu, že tieto neznižujú úroveň ochrany;
- musí uplatňovať vhodné mechanizmy, opatrenia a stratégie na kontrolu identifikovaných rizík;
- spolupracuje pri identifikácii živých modifikovaných organizmov, ktoré by mohli mať škodlivé účinky;
- spolupracuje na rozvoji ľudských a inštitucionálnych zdrojov na ochranu biologickej bezpečnosti a zvyšovanie povedomia verejnosti;
- musí informovať dotknuté alebo potenciálne postihnuté krajiny, klíringové stredisko pre biologickú bezpečnosť a v prípade potreby príslušné medzinárodné organizácie o akomkoľvek incidente v rámci svojej jurisdikcie, ktorý by mohol spôsobiť cezhraničnú škodu;
- zabezpečuje bezpečnú manipuláciu, balenie, identifikáciu a prepravu vyvázaných živých modifikovaných organizmov spolu s potrebnou dokumentáciou;

- poskytuje klíringovému stredisku biologickej bezpečnosti podrobnosti o svojich vnútroštátnych zákonoch, hodnoteniach rizík, rozhodnutiach a iných informáciách, ktoré protokol vyžaduje;
- vykonáva vhodné domáce opatrenia na zabránenie a potrestanie nezákonného obchodu so živými modifikovanými organizmami;
- môže od protokolu odstúpiť 1 rok po písomnom oznámení.

Protokol sa vzťahuje na všetok medzinárodný pohyb, tranzit, manipuláciu alebo používanie živých modifikovaných organizmov, ktoré by mohli poškodiť biologickú diverzitu a ľudské zdravie, okrem humánnych liekov, na ktoré sa vzťahujú iné medzinárodné dohody. Postup pokročilého informovaného súhlasu sa vzťahuje na prvý vývoz živých modifikovaných organizmov, ktoré sa zámerné dostanú do životného prostredia, s výnimkou tých, ktoré už boli identifikované ako nie škodlivé pre biodiverzitu alebo ľudské zdravie.

To si vyžaduje:

- vyvážajúca krajina musí vopred písomne oznámiť príslušným dovážajúcim orgánom konkrétne podrobnosti o zásielke;
- dovážajúce orgány musia potvrdiť prijatie oznámenia do 90 dní a rozhodnúť, či môže dovoz pokračovať, pričom môžu:
 - schváliť dovoz s podmienkami alebo bez nich;
 - odmietnuť dovoz;
 - požiadať o dodatočné informácie;
 - rozhodnúť, že na spracovanie oznámenia je potrebný dlhší čas;
 - zmeniť predchádzajúce rozhodnutie na základe nových vedeckých informácií;
 - za určitých okolností uplatniť zjednodušený postup, umožniť, aby určité informácie predložené oznamovateľom zostali dôverné. To neplatí pre všeobecný popis položky, súhrn hodnotenia rizika alebo opatrení na riešenie mimoriadnej udalosti.

5.5.5 Klíringové stredisko biologickej bezpečnosti

Klíringové stredisko biologickej bezpečnosti („Biosafety Clearing House“, BCH) bolo vytvorené za účelom **riadiť výmenu vedeckých, technických, environmentálnych a**

regulačných informácií, pomáhať signatárom, najmä tým, ktorí to najviac potrebujú, pri implementácii protokolu.

BCH poskytuje bezplatný prístup všetkým používateľom. Veľkú časť informácií v BCH vlastní a aktualizujú národné vlády. Informácie sa môžu použiť na pomoc pri prijímaní informovaných rozhodnutí týkajúcich sa dovozu alebo uvoľnenia živých modifikovaných organizmov. BCH podporuje transparentnosť pri rozhodovaní o biologickej bezpečnosti tým, že umožňuje jednoduchý a otvorený prístup ku kľúčovým informáciám, čo uľahčuje efektívnu účasť verejnosti a mimovládnych organizácií na rozhodovacom procese. BCH uľahčuje vedeckú a technickú spoluprácu aj tým, že vedcom umožňuje prispievať k informáciám súvisiacim s biologickou bezpečnosťou alebo k nim pristupovať. Pre priemyselné odvetvie poskytuje jednoduchý prístup k životne dôležitým informáciám týkajúcim sa dovozu a vývozu, vrátane podrobností o národných kontaktoch, príslušných zákonoch a nariadení a rozhodnutí a vyhlásení upravujúcich používanie a zaobchádzanie so živými modifikovanými organizmami.

Klíringové stredisko biologickej bezpečnosti (BCH) má vytvorený **register** živých modifikovaných organizmov (GMO), register organizmov a register genetických prvkov.

Register GMO poskytuje súhrnné informácie o všetkých živých modifikovaných organizmoch registrovaných v BCH, vrátane transformačných udalostí, genetických modifikácií a jedinečného identifikačného kódu (ak je k dispozícii) pre každý záznam. Takisto odkazy na všetky rozhodnutia a správy o hodnotení rizík, ktoré sa týkajú týchto organizmov, sú dostupné prostredníctvom záznamov v registri.

Register organizmov obsahuje súhrnné informácie o tých organizmoch, ktoré boli zaregistrované v BCH ako rodičovské, prijímajúce alebo darcovské organizmy. Register obsahuje odkazy na záznamy o každom organizme, kde možno nájsť ďalšie informácie o príslušných biologických charakteristikách vrátane informácií o taxonomickej klasifikácii, bežnom názve, pôvode atď.

Register genetických prvkov poskytuje súhrn informácií o genetických prvkoch spojených s GMO registrovanými v BCH, vrátane informácií o organizme darcu, udelených vlastnostiach a biologickej funkcii. Register obsahuje odkazy na záznamy o každom genetickom prvku, kde možno nájsť ďalšie podrobnosti.

5.6 Biologické riziko a biologické faktory

Mikroorganizmus je definovaný ako každá mikrobiologická entita (jednotka), bunková i bezbunková, ktorá je schopná reprodukcie alebo prenosu genetického materiálu. Medzi mikroorganizmy patria vírusy, baktérie, huby, prvoky, riasy, eukaryotické bunkové kultúry.

Biologické riziko predstavuje riziko, že biologická udalosť, ako napríklad prirodzene sa vyskytujúce ochorenie, náhodná infekcia, neočakávané zistenie, neoprávnený prístup, strata, krádež, zneužitie alebo úmyselné uvoľnenie a biologických látok (biologické faktory) alebo biologického materiálu nepriaznivo ovplyvní zdravie ľudí, zvierat a životné prostredie.

Za **biologický faktor** považujeme akýkoľvek živý organizmus, ktorý môže potenciálne spôsobiť ochorenie človeka alebo poškodiť životné prostredie. To sa môže prejaviť priamo prostredníctvom infekcie alebo nepriamo prostredníctvom poškodenia životného prostredia. Na rozdiel od chemických rizík, biologické faktory majú schopnosť rozmnožovať sa a dať podnet k vytvoreniu veľkého počtu infekčných organizmov (častíc) z pôvodne malého množstva primárne uvoľneného biologického materiálu. Biologické riziká sú početné a rôznorodé.

Kategórie biologického rizika podľa spôsobu ich vzniku sú:

- **Riziká, ktoré vznikajú prirodzene** - vznik infekčných baktérií rezistentných na existujúce antibiotiká (tuberkulóza, pneumonia, chrípka, ...), patogény objavujúce sa po odlesnení (Ebola, horúčka Lassa, atď.), zoonózy rozšírené z infikovaných zvierat na človeka kontaktom, vektormi, vodou, potravou, toxíny húb, parazitické infekcie človeka, invazívne cudzie druhy (rastliny, zvieratá, mikroorganizmy).
- **Riziká, ktoré môže spôsobiť človek** - biologické faktory uvoľnené človekom (zbrane, terorizmus), biotechnologické riziká (produkty tradičného kríženia a výberu, mutácií, moderných biotechnológií-GMO).

Exponovanie človeka biologickému riziku nastáva vtedy ak:

- **Expozícia je následkom práce samotnej** v mikrobiologickom laboratóriu, skleníkoch a stajniach. Zahrňuje izoláciu, identifikáciu a kultiváciu mikroorganizmov alebo buniek, vrátane materiálu použitého na genetickú modifikáciu, úmyselný kontakt so zvieratami, rastlinami a materiálmi pochádzajúcimi z nich.

- **Expozícia** nie je výsledkom práce samotnej, ale **je následkom nehody**. Biologický faktor sa stal kontaminantom v prostredí, unikal zo zbierky (napr. počas manipulácie s ním alebo s odpadmi) počas práce s výlučkami človeka (injekčné striekačky a ihly ...).
- **Expozícia nie je výsledkom práce**. Jedná sa o nechcený kontakt biologického faktora so zvieratami, živočíšnym alebo rastlinným materiálom alebo pracovníkmi na pracovisku a mimo neho.

Biologické riziko a biologické faktory sú spájané s bezpečnosťou potravín (biologické, chemické alebo fyzikálne faktory v potravinách, ktoré môžu vyvolať nepriaznivý účinok na zdravie človeka), so zoonózami, zdravím zvierat a rastlín.

Biologická bezpečnosť („Biosafety“) zahrňuje princípy, technológie, opatrenia a praktiky obmedzovania, ktoré možno použiť aby sa zabránilo neúmyselnému uvoľneniu alebo neúmyselnému vystaveniu biologickým látkam alebo biologickému materiálu. Biologická bezpečnosť sa vzťahuje na prax a politiku určenú na zabránenie náhodnému uvoľneniu alebo vystaveniu škodlivým biologickým faktorom vrátane patogénov, toxínov a geneticky modifikovaných organizmov.

Biologické ochranné opatrenia („Biosecurity“) predstavujú celý rad nariadení, vrátane medzinárodných zmlúv a národných zákonov, zameraných na ochranu pred náhodnými aj úmyselnými hrozbami. Je to širší súbor opatrení zameraných na ochranu pred úmyselnými aj neúmyselnými hrozbami, ktoré predstavujú biologické faktory. Zahrňujú princípy, technológie, opatrenia a postupy, ktoré možno použiť na prevenciu pred neoprávneným prístupom alebo stratou, krádežou, zneužitím, alebo úmyselným uvoľnením biologickej látky alebo biologického materiálu.

Ako názorne ukázal COVID-19, riziko katastrofickej biologickej udalosti sa zväčšuje čoraz viac s prepojeným svetom, s politickou nestabilitou, urbanizáciou, zmenou klímy a novými technológiami, ktoré uľahčujú, zlacňujú a zrýchľujú vytváranie geneticky modifikovaných patogénov. Tieto riziká sú navyše zosilnené s rastúcim využívaním umelej inteligencie. Pokrok v oblasti biologických vied a biotechnológií je nevyhnutný pre boj proti chorobám, ochranu životného prostredia a podporu hospodárskeho rozvoja. Tie isté inovácie však môžu predstavovať zvýšenie rizika náhodného zneužitia alebo úmyselného zneužitia s potenciálne katastrofálnymi následkami.

5.7 Mikroorganizmy ako biologické faktory

Veľká väčšina mikroorganizmov je pre ľudí neškodná. Mnohé mikroorganizmy sú prospešné a využívajú sa v biotechnológiách na produkciu metabolitov alebo enzýmov alebo na fermentáciu v potravinárskych procesoch. Väčšina priemyselne využívaných mikroorganizmov sú tzv. **GRAS** („Generally Recognized As Safe“) mikroorganizmy, ktoré všeobecne považované za bezpečné, nepredstavujúce žiadne alebo minimálne riziko pre človeka a životné prostredie. Štatút GRAS udeľuje americký Úrad pre kontrolu potravín a liečiv („U.S. Food and Drug Administration“, FDA). Medzi GRAS mikroorganizmy zaraďujeme napríklad *Lactobacillus acidophilus* (výroba kyslomliečnych nápojov), *Saccharomyces cerevisiae* (pekárenské droždie) alebo *Penicillium roqueforti* (výroba modrých syrov typu Roquefort).

Patogenita alebo virulencia je schopnosťou niektorých mikroorganizmov spôsobiť ochorenie. Výsledok infekcie závisí od vlastností patogénu (virulencia, invazívnosť, toxické alebo alergénne účinky), ale aj od stavu imunity hostiteľa. Z tohto hľadiska patogény spadajú do dvoch základných typov:

- **primárne patogény**, ktoré spôsobujú ochorenie aspoň u časti zdravých jedincov;
- **oportúnne patogény**, teda mikroorganizmy, ktoré využívajú tzv. príležitosť. Ich prítomnosť v tele za normálnych okolností nie je pre ľudí problém. V prípade zmenených podmienok, akým je napríklad oslabený imunitný systém alebo narušené zloženie črevných baktérií, však dokážu vyvolať infekciu.

5.7.1 Rizikové skupiny

Jedným z negatívnych dôsledkov práce s patogénmi (tiež nazývanými aj etiologickými agens) je možnosť **získania laboratórnej infekcie** („Laboratory-associated infections“, LAI), pričom laboratórni pracovníci sú vystavení vyššiemu riziku infekcie ako bežná populácia. LAI sa vyskytuje v dôsledku náhodného vystavenia patogénom v laboratórnych podmienkach (napr. *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella*, vírus hepatitídy B), preto je dôležité dodržiavať príslušné stupne ochrany. K expozícii môže dôjsť vdýchnutím infekčných aerosolov, priamym kontaktom porušenej kože alebo slizníc s kvapôčkami obsahujúcimi infekčný mikroorganizmus.

Biologické faktory sa zaraďujú do rizikových skupín na základe:

- **patogenity** biologického faktora, alebo jeho produktu a závažnosti ochorenia, ktoré spôsobuje, jeho virulenciu a infekčnosť, toxicitu, alergénnosť a moduláciu fyziologických aktivít;
- **spôsobu prenosu a hostiteľského rozsahu** biologického faktora, ktoré sú ovplyvnené úrovňou imunity, hustotou a pohybom obyvateľov, prítomnosťou vhodných vektorov a štandardami hygieny;
- **dostupnosti účinných preventívnych opatrení**, akými sú profylaxia, preventívne očkovanie, antiséra, efektívne hygienické opatrenia (potraviny, voda, kontrola patogénov počas pohybu ľudí alebo zvierat, kontrola dovozu infikovaných zvierat a živočíšnych produktov);
- **dostupnosti účinnej liečby**, ktorá zahŕňa pasívnu imunizáciu a post-expozičné očkovanie, antibiotiká a chemoterapeutiká, s prihliadnutím na možnosť vzniku rezistentných kmeňov.

Biologické faktory, o ktorých je známe, že spôsobujú infekciu ľudí zaraďujeme podľa úrovne nebezpečenstva do rizikových skupín 1 až 4 (Obrázok 5.23).



Obrázok 5.23: Rizikové skupiny a úrovne biologickej bezpečnosti. BSL-1 až BSL-4 úroveň biologickej bezpečnosti 1-4. (zdroj: <https://ehs.ucr.edu/image/risk-groups-and-biosafety-levels>, upravené).

Riziková skupina 1 („Risk group 1“, RG-1) zahrňuje biologické faktory, ktoré nie sú spojené s ochorením u zdravých dospelých ľudí alebo zvierat. Patria sem napríklad *E. coli* K-12, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus*, niektoré GM mikroorganizmy.

Riziková skupina 2 („Risk group 2“, RG-2) zahrňuje biologické faktory, ktoré sú spojené s ochorením, ktoré je zriedkavo závažné a na ktoré je často dostupná prevencia alebo liečba. Patria sem napríklad *Streptococcus pyogenes*, *Microsporium canis*, ľudské adenovírusy, *Hepatitis virus*, *Staphylococcus aureus*, niektoré GM mikroorganizmy.

Riziková skupina 3 („Risk group 3“, RG-3) zahrňuje biologické faktory, ktoré sú spojené so závažnými alebo smrteľnými ľudskými chorobami, pre ktoré môžu byť dostupné preventívne alebo terapeutické prostriedky. Zaraďujeme sem napríklad *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Coccidioides immitis*, prióny, *Bacillus anthracis* (antrax), *Mycobacterium tuberculosis* (tuberkulóza), *Coxiella burnetti* (Q horúčka), *Bunyaviridae* (hemoragické horúčky), *Virus dengue* (Dengue horúčka), niektoré GM mikroorganizmy.

Riziková skupina 4 („Risk group 4“, RG-4) zahrňuje biologické faktory, ktoré sú spojené so smrteľnými ľudskými chorobami, pre ktoré nie sú ľahko dostupné preventívne alebo terapeutické prostriedky. Patria sem napríklad vírus *krymsko-konžskej hemoragickej horúčky*, *Ebola virus*, *mammarenavirus Lassa*, *virus Marburg* (zrekonštruovaný vírus chrípky z roku 1918), niektoré GM mikroorganizmy.

Základným cieľom biologickej bezpečnosti je obmedzenie potenciálne nebezpečných biologických faktorov a toxínov. To zahrňuje kombináciu primárnych a sekundárnych bariér, praktík a postupov spojených s manipuláciou a skladovaním nebezpečných biologických faktorov a toxínov v laboratórnom prostredí. Účelom je znížiť riziko vystavenia pracovníkov neúmyselnému uvoľňovaniu nebezpečných látok biologických činiteľov alebo toxínov do okolia. Uskutočňuje sa to pomocou systému fyzikálnych bariér.

Medzi **primárne (fyzikálne) bariéry** patria napríklad, biologicky bezpečné kabinety („Biological safety cabinet“, BSC), nazývané aj biohazardy, utesnené nádoby (utesnené rotory, utesnené vrchnáky centrifúg) alebo utesnené nádoby určené na prenos. Ďalej sú to **osobné ochranné prostriedky** (OOP), ktoré pomáhajú chrániť pracovníkov nielen pred rôznymi zraneniami (napr. fyzikálne, elektrické, tepelné, chemické zranenie), ale aj pred prípadným potenciálnym vystavením biologickým nebezpečenstvám a časticiam prenášaným vzduchom. Štandardné OOP zahrňujú rukavice, plášte, návleky na topánky, laboratórnu obuv s uzavretou špičkou, respirátory, tvárové štíty, bezpečnostné okuliare, ochranné okuliare. OOP je zvyčajne používané v kombinácii s inými kontrolami biologickej bezpečnosti (napr. v kombinácii s BSC). Výber vhodných OOP závisí od identifikovaného biologického rizika.

Sekundárnu (fyzikálnu) bariéru predstavuje návrh a konštrukcia laboratórneho zariadenia. Sekundárne bariéry spolu s ďalšími kontrolami biologickej bezpečnosti pomáhajú zabezpečiť ochranu pracovníkov, okolia a životného prostredia pred možným vystavením nebezpečným biologickým faktorom a toxínom.

5.7.2 Úrovně biologickej bezpečnosti

Úrovně biologickej bezpečnosti („Biosafety levels“, BSL) predpisujú postupy a úrovně obmedzenia pre konkrétny mikroorganizmus alebo materiál (vrátane výskumu zahŕňajúceho GMO). Podobne ako rizikové skupiny, aj BSL sú odstupňované od 1 do 4, pričom postupy BSL-1 sú určené na prácu s najmenej škodlivými biologickými faktormi. Korelujú s rizikovými skupinami, ale nerovnajú sa im (Obrázok 5.23). Úroveň BSL je definovaná na základe rizík súvisiacich so závažnosťou infekcie, spôsobom prenosu infekcie, s povahou vykonávanej práce v laboratóriu, s pôvodom mikróbov, s daným činidlom, s cestou expozície. BSL definujú typy pracovných postupov, ktoré sa môžu vykonávať v laboratórnych podmienkach a určujú úroveň vybavenie laboratória a typ osobných ochranných prostriedkov.

Úroveň biologickej bezpečnosti 1 (BSL-1) je základná úroveň ochrany a je vhodná pre definované a charakterizované kmene životaschopných biologických faktorov, o ktorých nie je známe, že spôsobujú ochorenie imunokompetentných dospelých ľudí.

Úroveň biologickej bezpečnosti 2 (BSL-2) je vhodná na manipuláciu s biologickými faktormi so stredným rizikom, ktoré spôsobujú ochorenie ľudí rôznej závažnosti.

Úroveň biologickej bezpečnosti 3 (BSL-3) je vhodná pre faktory so známym potenciálom pre prenos aerosólmi, pre látky, ktoré môžu spôsobiť vážne a smrteľné infekcie, ktoré sú domorodého alebo exotického pôvodu.

Úroveň biologickej bezpečnosti 4 (BSL-4) je určená pre „exotické“ látky (faktory), ktoré predstavujú vysoké individuálne riziko život ohrozujúceho ochorenia prenášaného infekčnými aerosólmi, a pre ktoré nie je dostupná žiadna liečba.

BSL-1 predstavuje základnú úroveň ochrany, ktorá sa opiera o štandardné, mikrobiologické osvedčené postupy a postupy bez špeciálnych primárnych alebo sekundárnych bariér, okrem dverí, umývadla na umývanie rúk a neporéznych pracovných plôch, ktoré sa dajú čistiť a ľahko dekontaminovať. Požiadavky na laboratória pre BSL-1 až BSL-4 sú zhrnuté v Tabuľke 5.1 a na znázornené na Obrázku 5.24.

Osobitný prístup v laboratóriách BSL-1 až BSL-4 vyžaduje narábanie s **biologickým odpadom**, ktorý vzniká pri činnostiach v laboratóriu. Pri práci v laboratóriu s úrovňou BSL-1 a BSL-2 neznečistené (neinfekčné) odpady môžu byť znovu použité alebo recyklované alebo zlikvidované ako obecný komunálny odpad. Kontaminované (infekčné) odpady (injekčné ihly, skalpely, nože, rozbité sklo) musia byť vždy zhromažďované v kontajneroch odolných proti prepichnutiu s krytmi a musí sa s nimi zaobchádzať ako s infekčným. Kontaminovaný materiál je potrebné i) dekontaminovať v autokláve, následne umyť a opätovne využiť (napr. sklo) alebo zlikvidovať ako bežný komunálny odpad; alebo priamo spáliť v spaľovniach.

Existujú 2 typy laboratórií typu BSL-4 a to laboratórium kabinetu a laboratórium obleku (Obrázok 5.24). V **laboratóriu kabinetu** sa všetka práca s infekčnými mikroorganizmami alebo toxínmi vykonáva v tzv. **biologicky bezpečnom kabineť triedy III** s veľmi starostlivo navrhnutými postupmi, ktoré zabránia prípadnej kontaminácii. Laboratórny priestor je okrem toho určený na zabránenie kontaminácie iných priestorov. Biologicky bezpečný kabinet triedy III je známy tiež ako **rukavicový box**, nakoľko pracovníci manipulujú s infekčným materiálom vo vnútri kabinetu pomocou rukavíc, čo zaisťuje fyzickú bariéru. Sú tu dvojdvérové prenosové systémy, materiály sa zvyčajne prenášajú do a von z kabinetu cez priechodný box. Vo vnútri kabinetu je udržiavaný nižší tlak ako okolité prostredie. To zabezpečí, že ak dôjde k porušeniu, vzduch prúdi do kabinetu a nie von, čím sa zabráni úniku infekčných látok. Mnohé kabiny triedy III sú vybavené systémami, ktoré umožňujú sterilizáciu alebo dekontamináciu celého kabinetu, zvyčajne pomocou chemických látok, ako je formaldehyd alebo pary peroxidu vodíka. Vonkajší vzduch sa pred vstupom filtruje cez filter HEPA a vzduch opúšťajúci kabinet sa pred vetraním vonku filtruje cez dva HEPA filtre.

V **laboratóriu obleku** pracovníci sú povinní nosiť celotelové, vzduchom zásobované obleky, ktoré sú najnáročnejším typom osobných ochranných prostriedkov. Pred opustením laboratória sa všetok personál osprchuje a pred odchodom absolvuje celý rad postupov určených na ich úplnú dekontamináciu. Stručný postup je znázornený na Obrázok 5.25.

Počet laboratórií typu BSL-4 neustále rastie. Súvisí to s výzvami, ktorým musí dnešný svet čeliť. Ich počet začal stabilne rásť od roku 2001, keď v USA zaznamenali rozposlanie listov s antraxom. Pandémia COVID-19 k tomu takisto významne prispela. Napríklad, v roku 2021 bolo vo svete identifikovaných 59 laboratórií tohto typu v 23. krajinách sveta a v roku 2023 to bolo už 69 laboratórií v 27. krajinách (už funkčné, v procese budovania alebo ešte len plánované), pričom prevažujú malé laboratóriá a typom laboratória obleku. Najväčšia koncentrácia laboratórií typu BSL-4 sa nachádza v Európe (Obrázok 5.26). Laboratóriá typu BSL4 môžu slúžiť na určovanie diagnózy podozrenia závažných infekcií, na vedecký výskum

a na vývoj nových a vylepšených vakcín, terapie a diagnostiky. Väčšina BSL-4 sú vládne laboratóriá so zameraním na verejné zdravie. V malom počte sú tu zastúpené aj univerzitné laboratóriá zamerané na vedecký výskum a laboratóriá zamerané na obranu. Existujú však už aj súkromné (2) laboratóriá BSL-4. Niektoré laboratóriá typu BSL4 sa špecializujú na infikované zvieratá a hmyz.

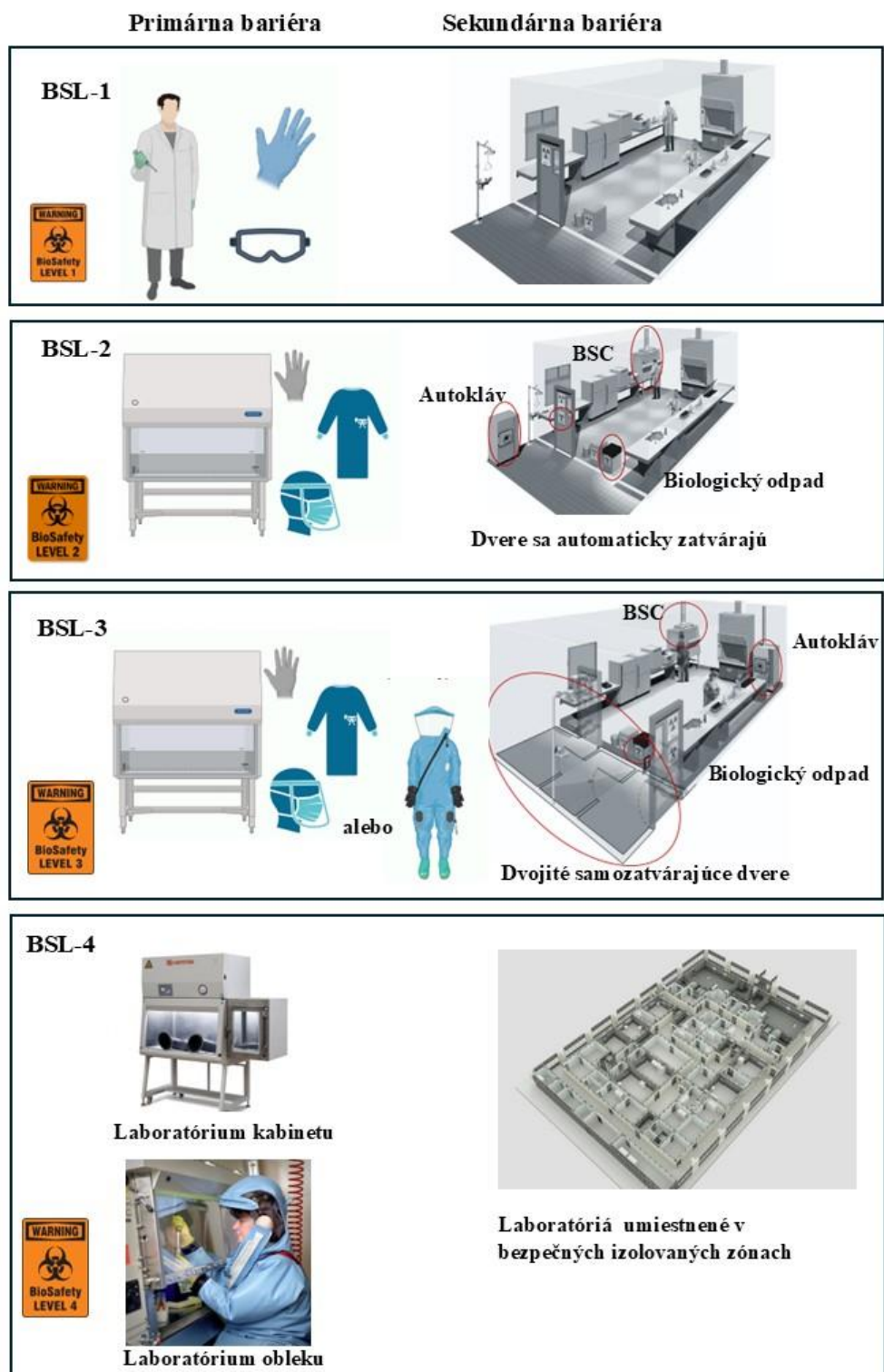
Tabuľka 5.1: Ochranné opatrenia pre prácu v laboratóriu vzhľadom na úrovne biologickej bezpečnosti.

Popis	Úroveň biologickej bezpečnosti			
	BSL-1	BSL-2	BSL-3	BSL-4
Izolácia laboratória	-	-	Áno	Áno
Hermeticky uzatvorené laboratórium (dezinfekcia plynom)	-	-	Áno	Áno
Vchod do laboratória cez dekontaminačnú miestnosť izolovanú od laboratória	-	-	Voliteľné	Áno
Označenie bionebezpečnosti na dverách	-	Áno	Áno	Áno
Nižší tlak úmerný tlaku okolitého prostredia	-	-	Áno	Áno
Zákaz vstupu	-	-	Áno	Áno
Vzduch odsávaný/privádzaný do laboratória filtrovaný cez HEPA filter	-	-	Áno	Áno
Opatrenia na kontrolu aerosólu v ovzduší	-	Minimalizovať	Áno	Áno
Digestor	-	Voliteľné	Áno	Áno
Autokláv	V areáli	V budove	Na Mieste	V laboratóriu, dvojité dvierka
Lahko umývateľné povrchy (odolnosť voči kyselinám, zásadám, dezinfekčným a dekontaminačným činidlám)	Pracovné stoly	Pracovné stoly	Pracovné stoly, podlaha	Pracovné stoly, podlaha, strop, steny
Ochranný odev/rukavice/obuv	Vhodný/-/-	Vhodný/-/-	Vhodný/áno/voliteľné	Výmena odevu a obuvi pred vstupom a výstupom
Rukavice	-	Voliteľné	Áno	Áno
Dekontaminačná sprcha	-	-	Voliteľné	Áno

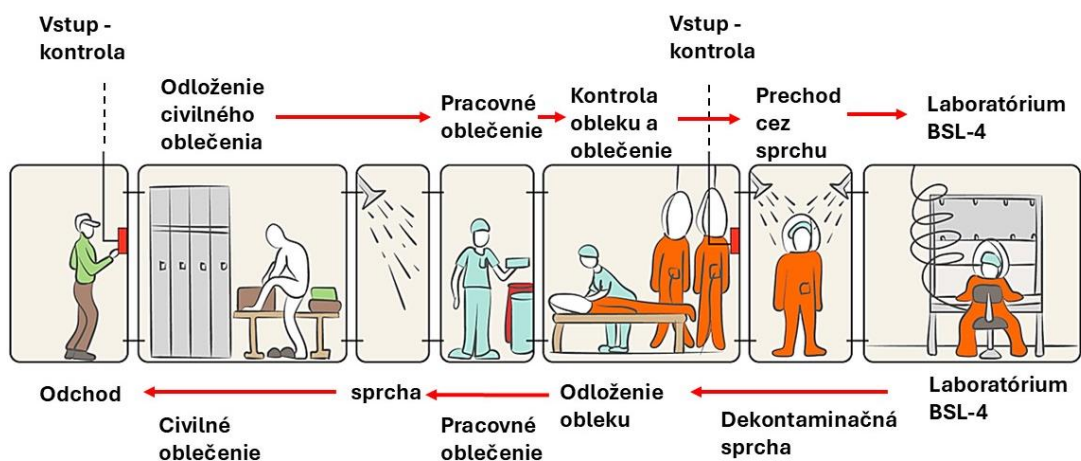
Tabuľka 5.1 (pokračovanie): Ochranné opatrenia pre prácu v laboratóriu vzhľadom na úroveň biologickej bezpečnosti.

Popis	Úroveň biologickej bezpečnosti			
	BSL-1	BSL-2	BSL-3	BSL-4
Očná sprcha	-	Áno	Áno	
Kontrola vektorov (hlodavce, hmyz)	Voliteľné	Áno	Áno	Áno
Pozorovacie okienko	Voliteľné	Voliteľné	Voliteľné	Áno
Inaktivácia MO v odpadových vodách	-	-	Voliteľné	Áno
Inaktivácia MO v kontaminovanom materiály a odpade	Voliteľné	Áno	Áno	Áno

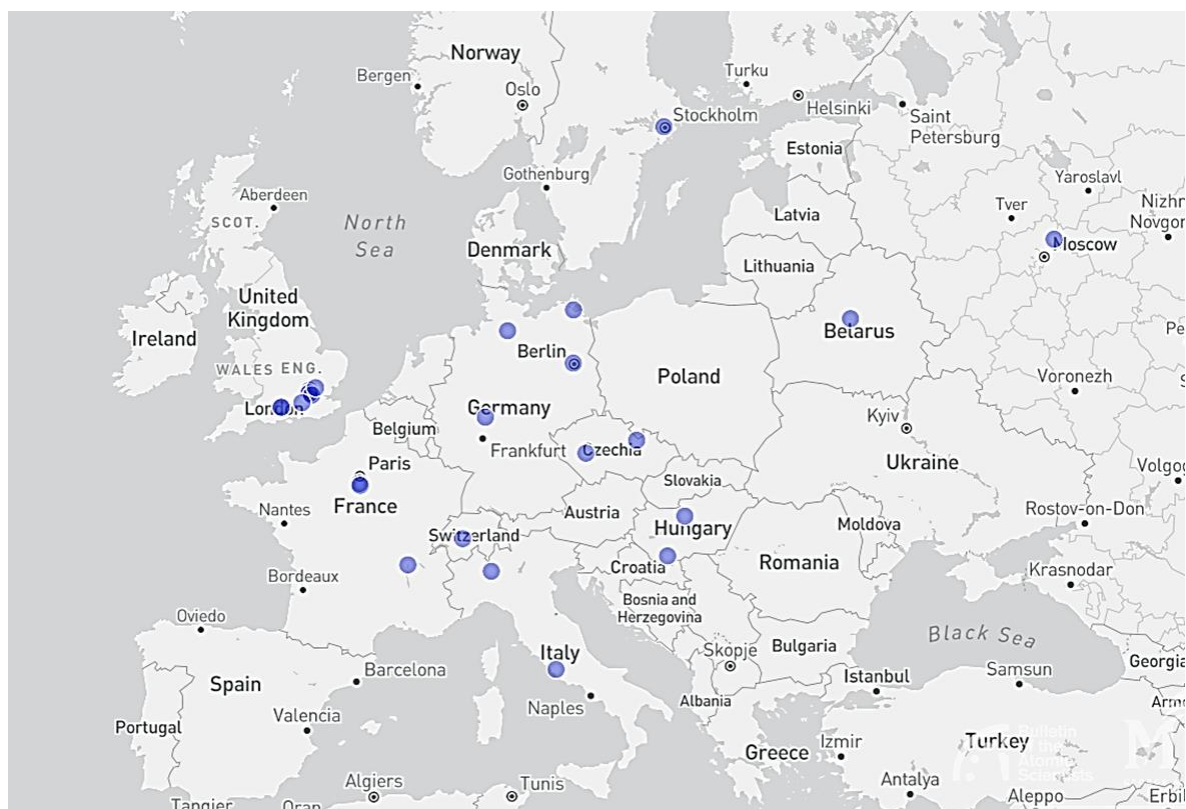
MO - mikroorganizmus



Obrázok 5.24: Primárne a sekundárne bariéry pre jednotlivé úrovne biologickej bezpečnosti. (Zdroj: <https://www.lamsys.com/catalog/biological-safety-cabinet-class-III/bmb-iii-laminar-s-1-2-protect/>; <https://www.htgroup.de/en/solutions/research/solutions/containment-for-bsl-4-laboratories>; <https://www.cidrap.umn.edu/dual-use-research/scientists-voice-support-research-dangerous-pathogens>; Laith a Alnemri, 2022; upravené).



Obrázok 5.25: Všeobecné pravidlá pri vstupe a výstupe z laboratória s úrovňou BSL-4. (Zdroj: <https://www.niaid.nih.gov/about/rocky-mountain-entering-and-exiting-process>, upravené).



Obrázok 5.26: Mapa výskytu laboratórií typu BSL-4 v Európe (Zdroj: <https://www.globalbiolabs.org/>, upravené).

5.8 Mikroorganizmy ako biologické zbrane

Biologické zbrane sú mikroorganizmy alebo iné toxíny, ktoré sa zámerne vyrábajú a uvoľňujú, aby spôsobili ochorenie a smrť ľudí, zvierat alebo rastlín. Navyše, neustále inovácie v biotechnológiách otvárajú nové cesty pre využitie mikroorganizmov pre účely vojenskej účely. Okrem strategických alebo taktických vojenských aplikácií možno biologické zbrane použiť na politické vraždy, infikovanie dobytku alebo zníženie poľnohospodárskej produkcie, čo má za následok nedostatok potravín a ekonomické straty, vznik environmentálnych katastrof alebo zavlečenie chorôb, strachu a vzbudenie nedôvery u ľudí. Biologické zbrane zaraďujeme do skupiny zbraní hromadného ničenia, medzi ktoré patria aj chemické a nukleárne zbrane. Ideálna biologická zbraň by mala mať silný letálny účinok, mala by spôsobiť hromadné ničenie s veľmi vysokou prenosovou rýchlosťou a nemala by byť dostupná liečba. Nevýhodou biologických zbraní sú finančné náklady spojené s ich výrobou, zabezpečením kvality a uskladnením, potrebné laboratórne vybavenie na ich výrobu; a potrebná ochrana pracovníkov podieľajúcich sa na výrobe a manipulácii pred týmito látkami; a ťažkosti s cieľovým doručením a kontrolou nad nimi po ich zámernom uvoľnení. Zvyšujúci sa počet laboratórií BSL-4 vo svete vyvoláva v poslednom období určité obavy ohľadom dostatočného riadenia biologického rizika v týchto laboratóriách. Nebezpečenstvo, ktoré predstavuje náhodné alebo úmyselné uvoľnenie patogénu, ktorý je schopný vyvolať pandémiu, otvára diskusiu ohľadom posilnenia medzinárodného dohľadu nad bezpečnosťou výskumu a laboratórnych praktík v týchto laboratóriách. Navyše, začínajú vznikať už aj súkromné laboratóriá typu BSL-4.

Vo všeobecnosti sa biologické zbrane skladajú z dvoch zložiek:

- **ozbrojenej (biologickej) látky**, ktorou môže byť takmer každý choroboplodný organizmus (baktérie, vírusy, huby, prióny...) alebo toxín (jedy pochádzajúce zo zvierat, rastlín alebo mikroorganizmov alebo podobné látky vyrobené synteticky);
- **doručovacieho mechanizmu** (napr. rakety, bomby, ručné granáty). Je možné použiť aj sprejové nádrže na montáž do lietadiel, áut, nákladných áut a lodí, kontamináciu, vody, potravín a odevov atď.

Pri možnosti použitia mikroorganizmov ako biologických zbraní sa musí brať do úvahy ich:

- **virulencia** - relatívna schopnosť mikroorganizmu spôsobiť chorobu, ktorá sa môže líšiť od druhu k druhu;

- **infekčnosť** - schopnosť pôvodcu vstúpiť, prežiť a množiť sa vo vnútri hostiteľa a akú mieru infekcie môže spôsobiť;
- **inkubačná doba** - časové rozpätie medzi prvým vystavením infekčnej látke a prvým výskytom symptómov v tele hostiteľa;
- **letalita** - schopnosť organizmu spôsobiť smrť;
- **spôsob prenosu** - ako sa organizmus dokáže prenášať v prostredí (pomocou nejakého vektora alebo bez pomoci vektora).

Biologické bojové látky podľa Centra pre kontrolu chorôb a prevencie (USA) môžeme klasifikovať do 3 skupín a to na skupinu A, skupinu B a skupinu C.

Do skupiny A zaraďujeme biologické látky, ktoré sú najrizikovejšie. Ľahko sa šíria a prenášajú z človeka na človeka, spôsobujú vysokú smrtnosť, predstavujú najvyššie riziko pre obyvateľstvo a národnú bezpečnosť. Zaraďujeme sem antrax (*Bacillus anthracis*) botulizmus (*Clostridium botulinum*, toxín) alebo mor (*Yersinia pestis*).

Do skupiny B zaraďujeme biologické látky, ktoré sa prenášajú stredne ľahko, spôsobujú mierne ochorenie a majú nízku smrtnosť. Zaraďujeme sem brucelózu (*Brucella* spp.) toxín *Clostridium perfringens*, mikroorganizmy ohrozujúce bezpečnosť potravín (napr. druhy *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella*), Q horúčka (*Coxiella burnetii*) ricínový toxín z *Ricinus communis*, stafylokokový enterotoxín B, týfusová horúčka (*Rickettsia prowazekii*) vírusová encefalitída, mikroorganizmy ohrozujúce bezpečnosť vody (napr. *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*).

Do skupiny C zaraďujeme mikroorganizmy, ktoré by mohli byť modifikované za účelom hromadného ničenia. Sú jednoduché na výrobu, ľahko sa šíria, majú vysokú mieru chorobnosti a smrtnosti.

5.8.1 História použitia biologických bojových zbraní

Zámerné používanie mikroorganizmov alebo ich toxínov ako biologických zbraní je staré takmer ako ľudstvo samo. Od prehistorických a starovekých gréckych a rímskych čias bolo zaznamenané využívanie otrávených šípov (tetanus) alebo kontaminácia zdrojov pitnej vody mŕtvolami. V 14. storočí pred Kristom, Chetitská armáda posielala baranov nakazených tularémiou svojim nepriateľom alebo v 16. storočí pred Kristom, počas Trójskej vojny Skýtski lukostrelci infikovali svoje šípy tak, že ich ponorili do rozkladajúcich sa mŕtvol a ľudskej krvi

obsahujúcej *Clostridium perfringens* a *C. tetani*. Ďalej napríklad, počas občianskej vojny v Amerike (1861–1863) vojaci Konfederácie predávali jednotkám Únie oblečenie infikované žltou zimnicou a kiahňami a kontaminovali zásoby vody pre jednotky Únie mŕtvolami zvierat. Počas 1. svetovej vojny (1914 - 1918), nemecké jednotky predávali nepriateľom kone, mulice a ovce infikované sopl'avkou a antraxom. Okrem toho sa nemecké vojská pokúsili šíriť cholery v Taliansku a mor v Petrohrade.

5.8.1.1 Antrax

Baktérie *Bacillus anthracis* dokážu tvoriť spóry, ktoré sú schopné prežiť veľmi dlhú dobu v rôznych prostrediach. Spóry sa dajú nájsť v prírode, ale môžu sa získať aj v laboratórnych podmienkach. Názov antrax je odvodený od gréckeho slova antrakis, čo znamená uhlie, pretože kožná forma sa väčšinou prejavuje čiernymi rankami a pri uhynutých zvierat takmer čiernou krvou. Antrax alebo **snet' slezinová** predstavuje jednu z najpravdepodobnejších biologických zbraní. Podľa miesta vstupu nákazy sa u ľudí rozlišujú tri formy ochorenia a to **kožná** (stykom s pokožkou), **pľúcna** (vdýchnutím) a **črevná** (konzumáciou infikovaného mäsa) **forma**.

V infikovaných zvieratách sa *B. anthracis* vyskytuje vo vegetatívnej forme, baktérie sú v poslednej fáze ochorenia vylučované močom, trusom a slinami, dostávajú sa do prostredia, kde za nepriaznivých podmienok vytvárajú spóry. Predpokladá sa, že antrax pochádza z Egypta a Mezopotámie. Mnohí učenci si myslia, že v Mojžišových časoch, mohol antrax spôsobiť to, čo bolo známe ako piata egypská rana, opísaná ako choroba postihujúca kone, dobytok, ovce, ťavy a voly. Antrax dobre poznali aj v starovekom Grécku a Ríme, čo je znázornené v mnohých starovekých spisoch najslávnejších učencov z tých čias. Mnohí vedci si napríklad myslia, že antrax zobrazil Homér v Iliade, a v básňach Virgila, Niektorí dokonca naznačujú, že antrax mohol prispieť k pádu Ríma. Do roku 1930 sa ochorenie vyskytovalo takmer na celom svete. Po zavedení vakcinácie, dekontaminácie a dezinfekcie miesta úhynu zvierat a kontrolami importovaných produktov živočíšneho pôvodu sa jeho výskyt výrazne obmedzil. V Európe sa od roku 1984 vyskytuje len sporadicky.

Prvé úmyselné použitie antraxu bolo zaznamenané počas prvej svetovej vojny Nemeckom, ktoré ako prvé implementovalo vojenský program zameraný na biologické zbrane. V roku 1932 Japonsko v rámci svojho vojenského programu začalo vyrábať antrax, ktorý testovali na väzňoch. Neskôr sa zistilo, že v rámci tohto programu Japonci zaútočili na najmenej 11 čínskych miest antraxom a aj inými biologickými látkami spôsobujúcimi plynovú gangrénu,

meningitídu, cholery, úplavicu a mor tak, že biologické látky rozprášili z lietadiel priamo na domy.

V USA sa začal program biologických zbraní v roku 1942. Spojené štáty uskutočnili experimenty s antraxom, na testovacích miestach v Mississippi a Utahu. V rámci prípravy na reakciu na akékoľvek možné útoky z Nemecka, naplnili viac ako 5000 bômb antraxom. V roku 1969 bol tento program oficiálne zrušený prezidentom Richardom Nixonom.

Veľká Británia spolu s USA v roku 1942 pri pobreží Škótska na malom ostrove Gruinard Island testovali pôsobenie antraxu vypustením bômb obsahujúcich spóry *B. anthracis* nad ostrovom, kde bolo umiestnených 80 oviec, ktoré následne uhynuli. Jedným z najdôležitejších zistení tohto experimentu bolo ako dlho zostáva antrax v prostredí po jeho aplikácii. Ostrov zostal neobývatelný až do roku 1986, kedy sa ho Veľká Británia rozhodla dekontaminovať.

Sovietsky program biologických zbraní začal v polovici 20. rokov minulého storočia a pokračoval tajne až do 90. rokov minulého storočia. Tento program bol rozdelený do 2 fáz. V prvej fáze (do roku 1972) sa výskum zameriaval na využívanie prirodzene vyskytujúcich sa mikroorganizmov. V druhej fáze (1972 -1991) sa výskum zameral na biotechnologický vývoj s cieľom vytvoriť nové alebo modifikovať existujúce bakteriálne a vírusové kmene. V roku 1979 vo Sverdlovsku bolo hlásené nezvyčajné prepuknutie antraxu. Správy o tejto epidémii sa však začali objavovať v západných správach až začiatkom roku 1980. Články v sovietskych lekárskejších a veterinárnych časopisoch popisovali prepuknutie ako prirodzene sa vyskytujúce pri hospodárskych zvieratách, čo spôsobilo 96 prípadov antraxu u ľudí. Z týchto prípadov bolo 79 opísaných ako gastrointestinálny antrax a 17 z nich bol kožný antrax. Sovietska vláda tvrdila, že úmrtia boli spôsobené črevným antraxom z pokazeného mäsa. Až o trinásť rokov neskôr v roku 1992 prezident Boris Jeľcin priznal, že prepuknutie antraxu bolo výsledkom vojenskej činnosti v zariadení, a teda, tým Sovietsky zväz porušoval Dohovor o biologických zbraniach podpísaný v roku 1972.

Iracký program biologických zbraní bol spustený začiatkom 80. rokov 20. storočia Saddámom Husajnom. Výskum bol zameraný na využitie niekoľkých baktérií vrátane *B. anthracis*, toxínov (ako napr. aflatoxínu) a vírusov (napr. vírus ťavích kiahní, vírus chrípky, rotavírus, a západonílsky vírus) ako biologických zbraní. Tento program vyvrcholil hromadnou výrobou biologických zbraní s využitím doručovacích mechanizmov, ako sú bomby a rakety alebo uskladnením biologických látok v sprejových nádržiach za účelom ich neskoršieho šírenia vo forme aerosólov. Počas operácie „Púštna líška“ USA a Veľká Británia zničili miesta, kde prebiehal program zameraný na vývoj biologických zbraní.

5.8.2 Bioterorizmus

Na rozdiel od využitia biologických zbraní pre vojenské účely, pri **bioterorizme** ide o využitie biologických látok na cielený útok na civilné obyvateľstvo, pričom motivácia súvisí s politickým alebo náboženským presvedčením. Cieľom je vyvolať paniku, dosiahnuť hromadné obeť, prípadne spôsobiť ekonomické straty. Ako biologické látky môžu byť použité prirodzene sa vyskytujúce alebo geneticky modifikované mikroorganizmy. Pri vystavení bioteroristickému útoku je rozhodujúca identifikácia biologickej látky, aby sa predišlo panike medzi obyvateľstvom, a lepšie sa mohla kontrolovať chorobnosť a mortalita.

V roku 1972 v USA skupina samozvane označená ako R.I.S.E. sa pokúsila v oblasti Chicaga zaútočiť na systémy úpravy vody. Táto skupina mala v úmysle znovu naštartovať novú spoločnosť s lepšími ekologickými hodnotami, avšak pokus zlyhal, nakoľko niektorí členovia ešte pred uskutočnením odovzdali plány polícii. Ukázalo sa, že skupina vlastnila životaschopné kultúry *Salmonella enterica* sérotyp Typhi, *Shigella sonnei*, *Clostridium botulinum*, *Neisseria meningitidis* a *Corynebacterium diphtheria*.

V roku 1981 vo Veľkej Británii skupina aktivistov „Dark Harvest Commandos“ nechali balík na železnici (linka Londýn – Exeter, v blízkosti kampusu Porton Down). Balík obsahoval zeminu z ostrova Gruinard, testovacieho miesta pre použitie bômb so spórami antraxu britskou vládou počas druhej svetovej vojny. Skupina tvrdila, že vracia „semená smrti“. Vykonaná analýza odhalila nízke koncentrácie spór *B. anthracis*. Skupina poslala druhý balík adresovaný na adresu Konferencie Konzervatívnej strany, avšak v tomto prípade sa v analyzovanej pôde nezistili žiadne spóry.

V roku 1984 v USA, pred nadchádzajúcimi voľbami v okrese Wasco (The Dalles, Oregon), náboženský kult „Rajneeshees“ zamýšľal získať politickú kontrolu tým, že voliči nebudú schopní ísť voliť. Za týmto účelom baktériu *Salmonella enterica* izolovali, kultivovali a masovo produkovali z diskov Bactrol, ktoré legitímne získali od komerčnej spoločnosti VWR v rámci licencie laboratória Rajneesh Medical Corporation. Prvý incident pozostával z kontaminácie rúk niekoľkých obyvateľov. Títo obyvatelia následne si podali ruky s inými a kontaminovali kľučky a pisoáre na súde v okrese Wasco, avšak v dôsledku tohto útoku neboli zaznamenané žiadne obeť. Druhý incident bol uskutočnený v troch okresoch na komisároch, ktorí boli nepriazniví pre kult „Rajneeshees“. Okresným komisárom ponúkli na pitie kontaminovanú vodu. Pri treťom incidente členovia kultu kontaminovali šalátové tyčinky, šalátové dresingy a smotany do kávy v miestnych reštauráciách. V dôsledku toho ochorelo viac

ako 750 ľudí a 45 bolo hospitalizovaných. Členovia kultu tiež študovali použitie niekoľkých ďalších látok (*Salmonella enterica* sérotyp Typhi, *Enterobacter cloacae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Shigella dysenteriae*, hepatitída a HIV) a možnosť kontaminácie systému zásobovania vodou v Dalles pomocou mŕtvych hlodavcov.

V Japonsku sa náboženský kult Aum Shinrikyo stal všeobecne známym za útok spáchaný nervovým plynom Sarin v Tokijskom metre v roku 1995. Kult sa v rokoch 1990 - 1995 však podieľal aj na aktivitách využívajúcich toxíny a mikroorganizmy, ako je botulotoxín, *B. anthracis*, *Vibrio cholera* a *Coxiella burnetii*, pričom sa pokúsil získať aj Ebola vírus. V apríli 1990 sa pokúsili uvoľniť botulotoxín, pomocou vozidla, ktoré jazdilo okolo japonského parlamentu a ďalšie vládne budovy v Tokiu. O tri roky neskôr, pri príležitosti svadby korunného princa rozšírili botulotoxín z nákladného auta obiehajúceho cisársky palác a ďalšie hlavné vládne budovy v Tokiu.

Dňa 18. septembra 2001 (USA), týždeň po útokoch na Dvojičky Svetového obchodného centra v New Yorku, listy obsahujúce spóry *B. anthracis* boli zaslané mediálnym spoločnostiam. Druhá vlna listov bola odoslaná o tri týždne neskôr a to na adresu kancelárie dvoch demokratických senátorov. V dôsledku týchto útokov 22 ľudí ochorelo (11 prípadov inhaláciou a 11 prípadov kožným kontaktom so spórami antraxu), pričom päť prípadov bolo smrteľných. Viac ako 30 ľudí malo pozitívny test na spóry *B. anthracis* a takmer 32 000 jedincov podstúpilo liečbu antibiotikami. V roku 2010 bolo oficiálne vyšetrovanie FBI uzatvorené. Na základe sekvenovania bakteriálnych kmeňov *B. anthracis* nachádzajúcich sa v laboratóriách v USA, bol obvinený mikrobiológ a výskumník biologickej obrany z amerického armádneho lekárskeho výskumného inštitútu infekčných chorôb Bruce Ivins, ktorý však v roku 2008 spáchal samovraždu.

5.8.3 Biozločin

Biozločin zahŕňa hroziace alebo skutočné použitie biologickej látky alebo toxínu s úmyslom spôsobiť škodu inému jednotlivcovi alebo skupine jednotlivcov. Motiváciou sú osobné dôvody ako napr. pomsta, žiarlivosť, túžba po peniazoch. Zvyčajne, páchatelia majú požadované vedecké poznatky a ľahký prístup k biologickej látke.

Prvý zdokumentovaný prípad použitia toxínov s kriminálnym úmyslom je spojený s vraždou kapitána Vassilliho Buturlina, v roku 1910 (Petrohrad, Rusko). Jeho švagor za pomoci

lekára vstrekol kapitánovi Buturlinovi difterický toxín (*Corynebacterium diphtheriae*) kvôli dedičského sporu. Pôvodný plán bol vstreknúť obeť cholery.

V rokoch 1909–1918 francúzsky poisťovací maklér Henri Girard presvedčil svoje obeť, aby si kúpili životné poistenie a urobili z neho ich primárneho príjemcu. On a jeho spolupracovníci pridávali svojim obeť do jedla *Salmonella enterica* serotyp Typhi (ochorenie brušný týfus) a prírodné toxíny z huby patriacej do rodu *Amanita*. K činom sa priznal, ale pred odsúdením spáchal samovraždu.

V rokoch 1935–1936 japonský lekár Tei-Sabro Takahashi pomocou pečiva obsahujúceho *Salmonella enterica* serotyp Typhi infikoval svojich konkurenčných kolegov a ich rodiny. V dôsledku toho 17 kolegov ochorelo a traja následne zomreli. Tei-Sabro Takahashi bol roku 1937 zatknutý a o rok neskôr bol usvedčený a odsúdený na smrť.

V rokoch 1902–1912 sa nemecký kabaretný umelec Karl Hopf pokúsil otráviť svojho otca, matku, dve deti a tri bývalé manželky. Karl Hopf vyštudoval chémiu a pracoval ako farmaceut v Londýne. Podozrivým sa stal, keď jeho 3. manželka začala mať tráviace ťažkosti. Polícia uňho objavila živé kultúry spôsobujúce týfus, cholery a iné patogénne látky. Bol uznaný vinným z otrávenia svojich dvoch detí a svojej prvej manželky, a v pokuse otráviť svoju druhú a tretiu manželku. V roku 1914 bol odsúdený na smrť gilotínou.

V roku 1933 v Kalkate (India) lekár bakteriológ Taranath Bhattacharyna za asistencie Benoyendra Chandra Pandey vstrekol do ramena Benoyendrinho nevlastného brata smrteľnú dávku *Yersinia pestis* (čierny mor). Spor bol iniciovaný o rozdelenie majetku ich otca a kvôli okázalému životnému štýlu nevlastného brata. O tri roky neskôr boli obaja páchatelia usvedčení a odsúdení na smrť.

V roku 1964 japonský lekár, bakteriológ Mitsuru Suzuki bol zadržaný za nakazenie štyroch svojich kolegov, ktorí konzumovali piškóty kontaminované mikroorganizmom spôsobujúcim úplavicu. Následne bol doktor Suzuki spojený so sériou úplavice a prepuknutia brušného týfusu zahŕňajúce takmer 200 pacientov a štyri úmrtia. Vyšetrenie ukázalo, že jeho dizertačná práca zahŕňala štúdie *Salmonella enterica* serotyp Typhi získaného od niekoľkých pacientov, a že tieto baktérie bola hlásené ako ukradnuté z japonského Národného inštitútu zdravia.

V roku 1996 došlo k veľkému prepuknutiu ochorenia spôsobeného *Shigella dysenteriae* typ 2 v lekárskom centre v Texase (USA). Dvanásť členov laboratória ochorelo po tom, čo niekto anonymne ponechal v jedálni infikované muffiny a oriešky. Analýza ukázala, že kmeň *Shigella dysenteriae* identifikovaný v muffinoch bol identický s kmeňom, ktorý sa nachádzal

v laboratórnej zbierke. Následne bola obvinená jedna z členov laboratória Diane Thompson a neskôr odsúdená na 20 rokov väzenia.

V roku 1990 Graham Farlow, asymptomatický HIV-pozitívny väzeň z väznice v Novom Južnom Walese (Austrália) dopichal dozorcovi s ihlou obsahujúcou HIV-pozitívnu krv. O niekoľko mesiacov neskôr bol dozorca testovaný ako HIV-pozitívny a o sedem rokov zomrel.

Nezhody medzi bývalými manželmi ohľadom výživného pre dieťa a otcovstve viedli k tomu, že Brian Stewart pichol svojmu synovi HIV-pozitívnu krv. Štyri roky potom bola synovi diagnostikovaný AIDS. Brian Stewart bol usvedčený a v roku 1998 odsúdený na doživotie za pokus o vraždu.

V roku 1994, pod zámienkou podania injekcie vitamínu B-12, gastroenterológ Richard Schmidt, Janice Trahan injekčne podal HIV-pozitívnu krv. Richard Schmidt sa ešte pred podaním injekcie pokúsil ukončiť 10 rokov trvajúci mimomanželský vzťah s Janice Trahan. V roku 1995 bolo u Janice Trahan potvrdené, že je HIV pozitívna, pričom obvinila doktora Schmidta, že ju nakazil. Komparatívnymi fylogenetickými analýzami sa podarilo identifikovať pacienta, od ktorého krv bola odobratá, teda zdroj vírusu. Bolo to prvýkrát, keď takáto analýza bola uznaná ako dôkaz pred súdom.

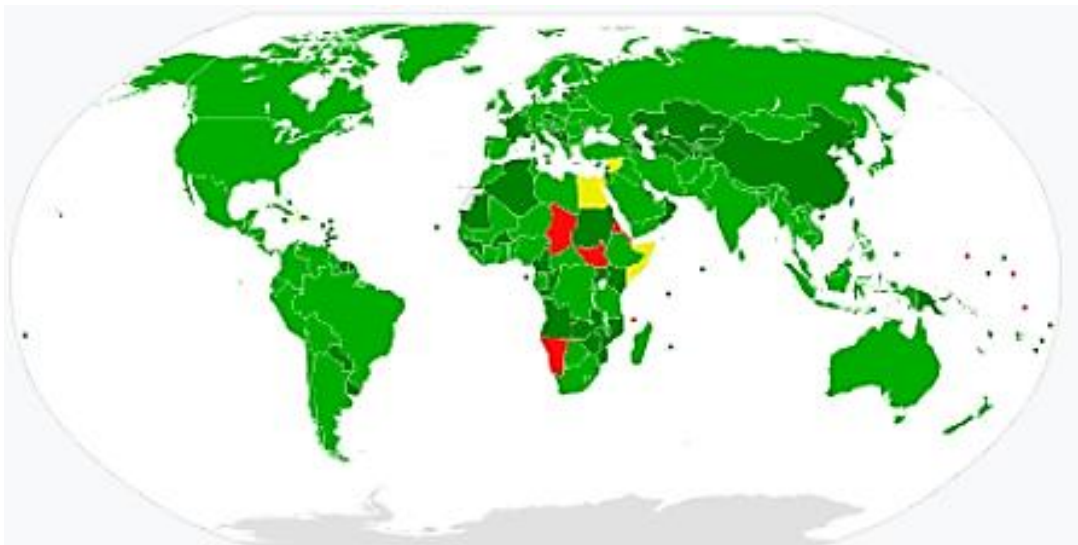
5.8.4 Forezná mikrobiológia

Forezná mikrobiológia je vedná disciplína, ktorá sa opiera o poznatky z mikrobiológie, mikrobiálnej ekológie, epidemiológie verejného zdravia, mikrobiálnej genomiky a toxikológie, bioinformatiky, genetického inžinierstva a procesného inžinierstva. Zameriava sa na objasnenie toho, aká biologická látka bola použitá, odkiaľ pochádza, kde sa prirodzene vyskytuje, aké sú možné prenosové cesty, či je potreba pri prenose zapojenie vektorov (prenášačov), čo môže byť cieľom, ako sa mikroorganizmus vyvinul, či sú v tom zahrnuté toxíny, či je mikroorganizmus na niečo citlivý alebo odolný voči niečomu, či bol mikroorganizmus geneticky upravený. Forezná mikrobiológia má dve hlavné oblasti zamerania a to vedecké a právne resp. trestné. Vedecké zameranie má za cieľ určiť s najvyššou vedeckou presnosťou pôvod patogénu. Právne zameranie má vedeckými dôkazmi určiť, kto bol zodpovedný za činy podľa zásad právneho systému. V prípade bio-terrorizmu, bio-zločinu alebo použitia biologických bojových zbraní je rozhodujúce odhaliť patogén čo najskôr, aby sa minimalizovali zdravotné riziká spojené s jeho rozptýlením. To sa dá dosiahnuť vytvorením programov biologickej bezpečnosti prostredníctvom medzinárodnej spolupráce.

5.8.5 Dohovor o zákaze vývoja, výroby a hromadenia zásob bakteriologických (biologických) a toxínových zbraní a o ich ničení.

Dohovor o zákaze vývoja, výroby a hromadenia zásob biologických a toxínových zbraní a o ich ničení je prvá multilaterálna právne záväzná zmluva zakazujúca kategóriu biologických a toxínových zbraní, teda zbraní hromadného ničenia. Štáty (Obrázok 5.27), ktoré sú zmluvnými stranami tohto Dohovoru sa zaviazali, že za žiadnych okolností nebudú nikdy nevyvíjať, vyrábať, skladovať alebo inak získavať alebo udržiavať:

- biologické látky (mikroorganizmy alebo toxíny), ktoré nie sú určené na profylaktické, ochranné alebo iné mierové účely;
- doručovacie prostriedky určené na použitie takýchto biologických látok alebo toxínov na nepriateľské účely alebo v ozbrojených konfliktoch.



Obrázok 5.27: Participácia krajín na Dohovore o zákaze vývoja, výroby a hromadenia zásob bakteriologických (biologických) a toxínových zbraní a o ich ničení. Bledozeleným – krajiny podpísali a ratifikovali, tmavozeleným – krajiny pristúpili, žltým – len podpísali, červeným – nepodpísali (Zdroj: https://en.wikipedia.org/wiki/Biological_Weapons_Convention, upravené).

Po diskusiách a rokovaníach na fóre OSN pre odzbrojenie, ktoré sa začalo v roku 1969, bola v roku 1972 Zmluva pripravená na podpis a vstúpila do platnosti 26. marca 1975. V súčasnosti ju ratifikovalo 183 zmluvných štátov vrátane Palestíny, štyri štáty sú signatármi (Egypt, Haiti,

Somálsko, Sýria a Tanzánia). Desiat štátov (Čad, Komory, Džibutsko, Eritrea, Izrael, Kiribati, Mikronézia, Namíbia, Južný Sudán a Tuvalu) Zmluvu nepodpísalo a ani neratifikovalo. Od štátov, ktoré ju podpísali/ratifikovali sa vyžaduje, aby zničili všetky nebezpečné biologické látky a aj doručovacie systémy. Avšak, neexistuje žiadny implementačný orgán, ktorý by posudzoval dodržiavanie Zmluvy. V minulosti Zmluvu porušilo niekoľko krajín, ako napríklad Sovietsky zväz, ktorý si zachoval program biologických zbraní aj po ratifikácii alebo Irak a jeho program skrytých biologických zbraní odhalený Osobitnou komisiou OSN pre Irak.

5.9 Geneticky modifikované rastliny a biologické riziko

Geneticky modifikované (GM) alebo transgénne rastliny sú rastliny, ktoré obsahujú gén alebo gény, ktoré boli umelo zavedené do genómu rastliny pomocou súboru techniky rekombinantnej DNA. Miera rizikovosti alebo bezpečnosti GM rastlín závisí od vlastnosti vloženého génu, príjemcu cudzieho génu (tzv. transgénu) a aplikácie GM rastliny. Potenciálne riziko predstavuje dopad na ľudské zdravie (alergicita a toxicita) a životné prostredie (tzv. tok génov).

Pri posudzovaní biologického rizika sa berú do úvahy tieto faktory:

1. **všeobecné a genetické faktory** (história pestovania, prejav pleiotropie, prenášače) (Tabuľka 5.2);
2. **faktory rozmnožovania** (biologická funkčnosť peľu, taxonomicky príbuzné druhy, krížiteľnosť, prežitie hybridnej rastliny, rozmnožovanie GM rastlín, GM semená, dormancia GM semien) (Tabuľka 5.3);
3. **ostatné faktory** (konkurencie schopnosť GM rastlín, toxicita a alergicita, vplyv na ekosystém, odolnosť) (Tabuľka 5.4).

Osobitná pozornosť sa venuje prítomnosti **selekčných markerových génov** v genóme geneticky modifikovaných rastlín. Selekčné markerové (SM) gény zohrávajú dôležitú úlohu počas regenerácie transformovaných buniek, nakoľko len malé množstvo buniek dokáže integrovať cudziu DNA. SM gény sú vnášané do genómu rastlín spolu s cieľným genómom. Ich expresia v rastlinách dáva selektívnu výhodu transgénnym bunkám, avšak po regenerácii transgénnych rastlín strácajú svoj význam. Klasickými a najviac využívanými selekčnými markermi sú gény kódujúce rezistenciu voči antibiotikám a herbicídom. Využívanie SM génov rezistencie voči antibiotikám obrátilo pozornosť odbornej a laickej verejnosti na potenciálny risk spojený s horizontálnym transferom takýchto génov rezistencie do pôdných baktérií alebo

s prenosom do baktérií črevnej mikroflóry cez konzumáciu GM potravín a GM plodín, čím by sa mohla ohroziť antimikrobiálna liečba. Na základe smernice 2001/18/ES Európskeho parlamentu a Rady, GM rastliny, ktoré obsahujú gény rezistencie voči antibiotikám, ktoré sú využívané v humánnej a veterinárnej medicíne, musia byť vyradené zo zavádzania do životného prostredia a nesmú byť uvedené na trh. Európsky úrad pre bezpečnosť potravín (EFSA) sa zaoberal problematikou týkajúcou sa využívania génov rezistencie voči antibiotikám v GM rastlinách berúc do úvahy ich potenciálne nepriaznivý dopad na zdravie človeka a životné prostredie. Panel odborníkov navrhol rozdeliť gény rezistencie voči antibiotikám do troch skupín. **Skupina 1** zahŕňa gény rezistencie, ktoré sa bežne a v hojnej miere vyskytujú v pôde a črevnej mikroflóre a antibiotiká sa nepoužívajú alebo len v minimálnej miere v humánnej a veterinárnej medicíne. Sem EFSA zaradila neomycín fosfotransferázový II (nptII) a hydromycín fosfotransferázový gén, teda gény kódujúce rezistenciu voči antibiotikám kanamycín a hygromycín, respektíve. Pri tejto skupine génov rezistencie nie sú potrebné žiadne obmedzenia týkajúce sa pôdných testov alebo umiestnenia takýchto GM rastlín na trh. Do **skupiny 2** sú zaradené gény rezistencie, ktoré sa bežne vyskytujú v mikroorganizmoch a v životnom prostredí, pričom zabezpečujú rezistenciu voči antibiotikám, ktoré sa používajú v humánnej a veterinárnej medicíne. Patria sem gény rezistencie voči chloramfenikolu, ampicilínu, streptomycínu a spektinomycínu. Ich použitie je limitované len pre laboratórne a poľné pokusy. GM rastliny obsahujúce tieto gény rezistencie sa nemôžu uvoľniť do životného prostredia. Do **skupiny 3** sa zaraďujú gény rezistencie, ktoré sa vo veľkej miere používajú v humánnej medicíne ako napríklad neomycín fosfotransferázový III (nptIII) gén zabezpečujúci rezistenciu voči amikacínu alebo *tetA* gén rezistencie voči tetracyklínom. Také GM rastliny nemôžu byť uvoľnené do životného prostredia a na trh, a ani byť predmetom pôdných pokusov.

Tabuľka 5.2: Všeobecné a genetické faktory.

Faktor hodnotenia	Kritérium odhadu
História pestovania a rozšírenia pestovania rastlinného druhu, z ktorého je odvodená GMR	→ Rozmnožovanie len pomocou človeka, nie sú známe divo-rastúce populácie → Čiastočne domestikovaný druh, známe sú aj divorastúce populácie → Rozmnožovanie bez pomoci človeka, bežne sa vyskytujú divorastúce populácie
Prejav pleiotropie, vplyv expresie cudzorodého génu na agronomické vlastnosti rastlín (fertilita rastlín, zníženie odolnosti voči patogénom....	→ Malá pravdepodobnosť → Veľká pravdepodobnosť

Tabuľka 5.2 (pokračovanie): Všeobecné a genetické faktory.

Faktor hodnotenia	Kritérium odhadu
Mechanizmy (prenášače) rozširovania peľu (hmyz, vietor, voda, vtáky a iné spôsoby)	→ Kontrolovateľné, alebo chýbajú v prírode → Prítomné vo voľnej prírode, ale nekontrolovateľné
Časové ohraničenie funkčnosti peľu vo voľnej prírode	→ Krátka doba funkčnosti (niekoľko hodín až dní) → Dlhá doba funkčnosti (niekoľko dní až mesiacov)
Výskyt voľne rastúcich druhov rastlín taxonomicky príbuzných s GMR	→ Príbuzné druhy nie sú škodlivé (škodcovia, patogény) → Príbuzné druhy sú škodlivé (škodcovia, patogény) → Samotné GMO sú škodlivé (škodcovia, patogény)
Krížiteľnosť medzi GMR a taxonomicky príbuznými druhmi vo voľnej prírode	→ Nie je známa, nemôže sa uskutočniť v konkrétnych ekologických podmienkach → Je známa a môže sa uskutočniť v konkrétnych ekologických podmienkach
Možnosť prežitia hybridnej rastliny medzi GMR a príbuzným druhom z voľnej prírody a konkurenčnej schopnosti hybridov v ekosystéme	→ Nie je reálna → Je veľká pravdepodobnosť prežitia a rozšírenia v ekosystéme

Tabuľka 5.3: Faktory rozmnožovania

Faktor hodnotenia	Kritérium odhadu
Rozmnožovanie GMR rastlinného pôvodu	→ Len vegetatívne → Len generatívne → Vegetatívne aj generatívne
Možnosť voľného rozmnožovania GMR rastlinného pôvodu semenami	→ Malá pravdepodobnosť → Veľká pravdepodobnosť
Dormancia semien GMR	→ Áno, krátky čas → Áno, dlhý čas → Nie je
Časové ohraničenie biologickej funkčnosti semena vo voľnej prírode	→ Krátka doba funkčnosti (do 5 rokov) → Dlhá doba funkčnosti (viac ako 5 rokov)
Mechanizmy rozširovania GMR	→ Vektory rozširovania chýbajú alebo sú kontrolovateľné → Vektory rozširovania sú prítomné ale nekontrolovateľné
Krížiteľnosť medzi GMR a taxonomicky príbuznými druhmi vo voľnej prírode	→ Nie je známa → Nemôže sa určiť v určitých ekologických podmienkach → Je známa a môže sa uskutočniť v konkr. Ekologických podmienkach

Tabuľka 5.3 (pokračovanie): Faktory rozmnožovania

Faktor hodnotenia	Kritérium odhadu
Možnosť prežitia hybridnej rastliny medzi GMO a príbuzným druhom z voľnej prírody a konkurenčnej schopnosti hybridov v ekosystéme	→ Nie je reálna → Je veľká pravdepodobnosť prežitia a rozšírenia v ekosystéme

Tabuľka 5.4: Ostatné faktory.

Faktor hodnotenia	Kritérium odhadu rizika
Konkurencieschopnosť a odolnosť rastlín	→ Znížená → Nezmenená → Zvýšená
Možnosť obsahu toxických a alergénnych látok v GMR	→ Toxické a alergénne látky sú prítomné → Toxické a alergénne látky nie sú prítomné
Koncentrácia akéhokoľvek produktu v potravinovom reťazci alebo prirodzenom kolobehu látok v prírode, v množstve, ktoré by mohlo byť toxické	→ Nie je reálna → Je reálna
Zmena biodegradácie GMR a vplyv na ekosystém	→ Vplyv na ekosystém nie je → Vplyv na ekosystém je len okrajový → Vplyv na ekosystém je značný
Vplyv na iné organizmy	→ Je známy → Nie je známy
Odolnosť voči patogénom, parazitom, predátorom	→ Je znížená → Je nezmenená → Je zvýšená

5.9.1 Analýza rizika v kontexte geneticky modifikovaných organizmov

Analýza rizika predstavuje komplexný proces identifikácie a analýzy potenciálnych negatívnych dopadov geneticky modifikovaných organizmov (GMO) na zdravie človeka a životné prostredie. Tento proces sa vykonáva s cieľom vyhnúť sa týmto rizikám alebo ich zmierniť.

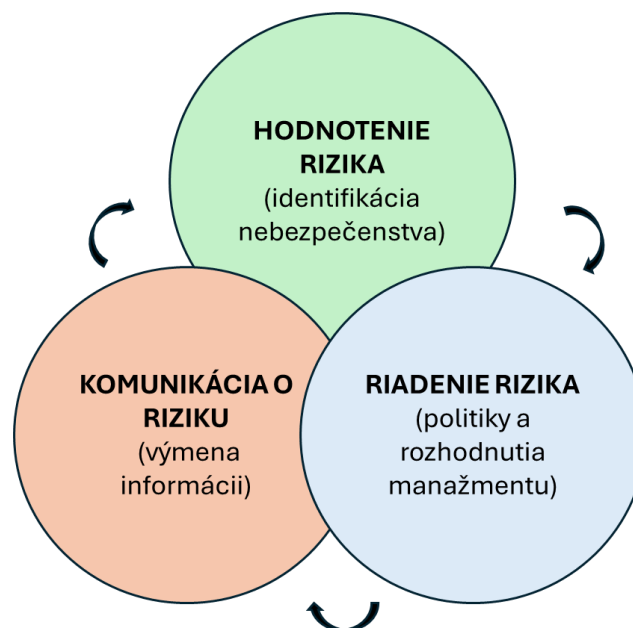
Riziko je to situácia, keď dané okolnosti môžu predstavovať nebezpečenstvo, je to teda možnosť vzniku nepriaznivej (nebezpečnej) udalosti (napr. hrozba pre kvalitu života alebo samotný život jednotlivca alebo skupiny). Pojem riziko nemá jedinú jednoznačnú definíciu, ale

často sa definuje ako pravdepodobnosť poškodenia. Toto sa vo všeobecnosti chápe ako pravdepodobnosť, že v dôsledku činnosti alebo stavu nastane škodlivý následok. Riziko sa často hodnotí prostredníctvom kombinovaného hodnotenia **nebezpečenstva a expozície**. Nebezpečenstvo v kontexte hodnotenia rizika GMO je definované ako potenciál organizmu spôsobiť poškodenie ľudského zdravia a/alebo životného prostredia. Expozícia znamená kontakt medzi nebezpečenstvom a príjemcom. Pri hodnotení rizika GMO možno expozíciu chápať ako cestu a úroveň kontaktu medzi pravdepodobným potenciálnym prijímajúcim prostredím a GMO alebo jeho produktmi. Riziko charakterizuje pripísanie pravdepodobnosti a následkov vystavenia prijímateľa nebezpečenstvu.

Na rozlíšenie nebezpečenstva od rizika môže slúžiť nasledovný príklad: Niektoré kyseliny sú žieraviny a teda predstavujú pre ľudí nebezpečenstvo. Takáto kyselina však predstavuje riziko pre ľudské zdravie len vtedy, ak sú jej ľudia vystavení bez ochrany. Stupeň poškodenia spôsobeného expozíciou bude teda závisieť od toho, či sa človek dostane do kontaktu s kyselinou až po jej silnom zriedení, vtedy riziko poškodenia bude minimálne, ale nebezpečné vlastnosti kyseliny ostanú nezmenené.

Analýza rizika (Obrázok 5.28) zahŕňa nasledovné činnosti, ktoré sú navzájom prepojené:

- **Hodnotenie rizika**
- **Riadenie rizika**
- **Komunikovanie o riziku**



Obrázok 5.28: Analýza rizika a jej zložky (Zdroj: autor).

Všeobecné zásady pri vypracovaní analýzy rizika sú:

- **vedecká podloženosť** – riziko by malo byť posúdené na základe informácií získaných primeranými vedeckými metódami (tie by mali byť prísne, systematické, reprodukovateľné, s testovaním nulovej hypotézy, kvalitatívne a/alebo kvantitatívne) a výsledky sú následne ešte podrobené posudzovaniu;
- **otvorenosť, transparentnosť a zdokumentovateľnosť** – všetky aspekty procesu by mali byť úplne a transparentne (vrátane výberu expertov) zdokumentované, pričom dokumentácia by mala byť prístupná všetkým zainteresovaným stranám a mala by rešpektovať oprávnené obavy, odborníci zodpovední za hodnotenie rizík by mali byť vyberaní na základe ich odborných znalostí, skúseností a ich nezávislosti s ohľadom na záujmy;
- hodnotenie sa vykonáva spôsobom **prípád od prípadu**, t. j. pre každý jednotlivý prípad, pričom metodika hodnotenia rizík a požadované informácie sa môžu líšiť svojou povahou a mierou podrobnosti, plánovaným používaním (v laboratóriu, na poli, na trhu) a pravdepodobným potenciálom prijímajúceho prostredia (prítomnosť divých, príbuzných a necieľových druhov, ohrozených druhov ...);
- **porovnávanie** – riziká by mali byť porovnávané v kontexte s rizikom reprezentovaným ekvivalentným nemodifikovaným príjmom alebo rodičovským organizmom v rámci zamýšľaného použitia, čo si vyžaduje zodpovedajúce komparačné vzorky a základné informácie;
- **systematickosť** – analýza rizík by mala byť vykonávaná spôsobom „krok za krokom“, ktorý zohľadňuje účel, rozsah a hranice posúdenie rizika, zhodnotenie rizika, riadenia a oznamovanie rizika;
- **postupnosť** – riziko by malo byť vyhodnotené a preskúmané systematicky, od jeho zdroja po dôsledky;
- **kompletnosť** – proces analýzy rizika by mal obsahovať všetky zložky analýzy rizika, čerpať informácie zo širokej škály dôveryhodných zdrojov a prihliadať na odborné odporúčania a usmernenia vypracované príslušnými medzinárodnými organizáciami, obsahovať komunikáciu a konzultácie so všetkými zúčastnenými stranami vo všetkých aspektoch a fázach procesu analýzy rizika.

V procese analýzy rizika sa používa niekoľko základných princípov:

- **princíp príbuznosti** - informácie o identite, vlastnostiach a histórii bezpečného používania organizmu, ktorý bol geneticky modifikovaný (napr. potenciál invazívnosti, prítomnosť divých príbuzných a kompatibilných druhov, potenciál alergénosti);
- **princíp podstatnej zhodnosti** (substančnej ekvivalencie) je založený na tom, že GMO je možné porovnávať s jeho konvenčným ekvivalentom, ktorý už má dlhoročnú tradíciu bezpečného používania. Identifikujú sa podobnosti a rozdiely (vrátane zamýšľaných a neplánovaných zmien) medzi GMO a jeho konvenčným ekvivalentom, aby bolo možné určiť či GMO je rovnako bezpečný, alebo vykazuje nejaké nové alebo väčšie riziká ako jeho konvenčný ekvivalent. Podstatná zhodnosť nezakladá absolútnu, ale relatívnu úroveň bezpečnosti, je uznávaná ako jedna zo zásad pre hodnotenie rizík v oblasti životného prostredia a bezpečnosti potravín (tzv. Codex Alimentarius). **Codex Alimentarius** je zbierka medzinárodne schválených potravinových noriem, ktoré majú chrániť zdravie spotrebiteľov a zabezpečovať regulárne postupy pri obchodovaní s potravinami.

Výsledkom môže byť, že

- GMO je v **podstate rovnocenný konvenčnému náprotivku** a je považovaný za rovnako bezpečný;
- GMO je v **podstate rovnocenný konvenčnému náprotivku, s výnimkou definovaných rozdielov**, ktoré sa musia zhodnotiť a vyplývajú z plánovanej genetickej modifikácie, ktorá môže, alebo nemusí zmeniť vlastnosti hostiteľského organizmu;
- **GMO nie je v podstate ekvivalentný konvenčnému náprotivku**
- **princíp predbežnej opatrnosti** - ak možno, so zreteľom na všetky okolnosti predpokladať, že hrozí nebezpečenstvo nenávratného alebo závažného poškodenia zdravia človeka alebo poškodenia životného prostredia, potom nesmie byť pochybnosť o tom, že k takému poškodeniu skutočne dôjde, a je dôvod pre opatrenia, ktoré majú poškodeniu zabrániť;
- **princíp neistoty** je neodmysliteľnou vlastnosťou rizika, je prítomný vo všetkých aspektoch analýzy rizika vrátane posúdenie, riadenia rizika a komunikácie o riziku. Existuje 5 foriem zdroja pochybností:

- epistemický – vyplýva z neistoty poznania, získania a overenia údajov (napr. štatistické chyby, použitie náhradných dát, neúplné, nejednoznačné, nespoľahlivé údaje)
- opisný – neistota opisu (slov, modelov, čísel, obrázkov ...)
- kognitívny – predpojatosť, dohady, špekulácie, zbožné želanie
- entropický (zložitosť) – spojený s komplexnou povahou dynamických systémov (bunky, organizmy, ekosystémy, fyzikálne systémy ...)
- vnútorný – inherentná náhodnosť, variabilita, neurčitosť.

5.9.2 Hodnotenie rizika

Hodnotenie rizika v kontexte geneticky modifikovaných organizmov (GMO) sa týka procesu hodnotenia potenciálnych rizík spojených s uvoľňovaním alebo používaním GMO do životného prostredia. Cieľom hodnotenia rizika je identifikovať a hodnotiť potenciálne nepriaznivé vplyvy GMO na ochranu a trvalo udržateľné využívanie biologickej diverzity, berúc do úvahy aj riziká pre zdravie ľudí.

Hodnotenie rizika sa má vykonávať vedecky správnym a transparentným spôsobom a môže brať do úvahy odborné rady a usmernenia vypracované príslušnými medzinárodnými organizáciami. Nedostatok vedeckého poznania alebo absencia vedeckého konsenzu sa nemusia nevyhnutne pokladať za označenie určitého stupňa rizika, neprítomnosť rizika, alebo prípustné riziko. Riziká súvisiace s GMO alebo produktmi pripravených z nich, by sa mali posudzovať v kontexte rizík, ktoré predstavujú pre nemodifikované organizmy príjemcov alebo parentálnych organizmov v životnom prostredí. Hodnotenie rizika sa musí vykonávať pre každý prípad jednotlivo. Požadované informácie sa môžu od prípadu k prípadu líšiť, v závislosti od GMO, jeho zamýšľaného využitia a prijímajúceho životného prostredia.

Hodnotenie rizika GMO možno rozdeliť do štyroch hlavných fáz:

1. **Identifikácia nebezpečnosti** – identifikácia akýchkoľvek nových genotypových a fenotypových vlastností spojených s GMO, ktoré môžu mať nežiadúce účinky na biodiverzitu v predpokladanom prostredí príjemcu, zohľadnením rizika pre zdravie človeka.
2. **Charakterizácia nebezpečnosti** – kvalitatívne a/alebo kvantitatívne hodnotenie povahy nepriaznivých účinkov spojených s GMO.

3. **Hodnotenie expozície** – hodnotenie expozície životného prostredia, vrátane organizmov, GMO alebo produktov z nich.
4. **Charakterizácia rizika** – kvalitatívny a/alebo kvantitatívny odhad, vrátane sprievodných neistôt, celkového rizika.

V súvislosti s hodnotením rizika týkajúceho sa GMO, by mali byť brané do úvahy nasledujúce charakteristiky GMO:

- **Kto/čo je príjemca, hositeľ**, resp. rodičovský organizmus. Informácie musia obsahovať údaje o:
 - Identite, fenotypových a agronomických vlastnostiach – taxonomické zaradenie, informácie o existencii pohlavne kompatibilných voľne žijúcich druhov.
 - Geografickom rozšírení, pôvode – kde sú oblasti pestovania, centrum pôvodu a genetickej diverzity.
 - História bezpečného používania – akékoľvek známe nutričné, antinutričné, toxikologické, alergénne vlastnosti alebo neznášanlivosť, význam v stravovaní, spôsoby prípravy, pracovania a varení.
 - Analýze zloženia – kľúčové nutrienty, toxíny, alergény, antinutričné látky, biologicky aktívne látky spojené s genetickou modifikáciou.
- **Aké sú vložené gény, sekvencie** a súvisiace informácie o darcovi a spôsobe genetickej modifikácie. Informácie musia obsahovať:
 - Opis darcu – klasifikácia a taxonómia, jeho potenciálna toxicita, alergenicita, patogenicita, história používania a expozície donorov, funkcie rekombinantnej DNA použitej v transformácii.
 - Popis vektora DNA – zdroj a zloženie transformačného vektora (kódujúce sekvencie, promótor, terminátory, mapy s restričnými miestami).
 - Spôsob prenosu transgénu – pri systéme transformácie pomocou *Agrobacterium tumefaciens* – kmeň, plazmidy, pri biolistickej transformácii – dôkaz neprítomnosti cudzorodých sekvencií DNA.
 - Vlastnosti vlozenej sekvencie DNA – počet vložených kópií transgénu, príslušné konce hositeľskej DNA, overenie stability transgénu vo >5 generáciách
 - Charakterizácia miesta vloženia – miesto vlozenej rekombinantnej DNA v genóme hositeľa.
- **Aký je výsledný GMO** z hľadiska:

- Štruktúry, identite a charakteristike bielkoviny – molekulová hmotnosť, aminokyselinové zloženie, úroveň post-translačnej modifikácie (glykozylácie, fosforylácie), imuno-ekvivalencia, aktivita a špecificita, katalyzované reakcie, zmeny na úrovni mikro- a makroprvkov, a kompozičných zložiek.
- Mechanizmus účinku (špecificita) – toxicita pre určité druhy hmyzu (nie človeka), metabolické dráhy, ktoré by mohli byť ovplyvnené, zmenené hladiny enzýmov;
- Toxicity – dokumentované expozície a história bezpečného používania, výsledky testov toxicity.
- Alergénosti – zmeny vlastností alebo úrovne expresie endogénnych alergénnych proteínov a/alebo alergénosti samotného rekombinovaného proteínu.
- Kompozičných analýz – zdrojmi dát sú databázy o existujúcom zložení potravín, chemických analýzach a toxikologických testoch.
- Analýzy bezpečnosti (štúdie na zvieratách) v porovnaní s konvenčným náprotivkom (*in vivo* a *in vitro*), testy chronickej toxicity, karcinogenicity, reprodukčné štúdie;
- Údaje, ktoré umožnia podrobné porovnanie môžu pochádzať z rôznych zdrojov (pestovanie GMO v skleníkoch, teréne).
- Poľných pokusov - sú obvykle vykonávané na základe rôznorodosti environmentálnych podmienok typických pre plánované komerčné pestovanie.
- Či sú dostupné **metódy pre detekciu a identifikáciu GMO**
 - Akými metódami je možné detegovať a identifikovať prítomnosť vlozenej sekvencie.
- Aké je **zamýšľané použitie GMO**:
 - v uzavretých priestoroch s použitím ochranných opatrení;
 - zámerné uvoľňovanie bez použitia ochranných opatrení.
- Aké je **potenciálne prijímacie prostredie**:
 - fyzické umiestnenie;
 - porovnanie medzi bežným prostredím a prostredím, v ktorom bude vykonané uvoľnenie GMO;
 - špecifické environmentálne faktory ovplyvňujúce prežitie a distribúciu GMO (klíma, pôdne podmienky);
 - prítomnosť pohlavne kompatibilných druhov;
 - prítomnosť pohlavne zlučiteľných, voľne žijúcich príbuzných.

Odhad pravdepodobnosti (Obrázok 5.29) je vyhodnotenie pravdepodobnosti s akou skutočne nastane nepriaznivý účinok, s prihliadnutím na úroveň a typ expozície, prostredie alebo príjemcu. Pravdepodobnosť, že dôjde k poškodeniu je vyjadrená ako relatívna, jej meradlom sú frekvencia (počet výskytov za jednotku času) a pravdepodobnosť (v rozsahu 0-1, kde 0 = nemožný výsledok a 1 = istý výsledok). Odhad pravdepodobnosti je prediktívny a presnosť odhadu je priamo úmerná dobe výskytu.

Pravdepodobnosť výskytu javu môže byť:

- **vysoko pravdepodobná** – jav sa očakáva vo väčšine prípadov;
- **pravdepodobná** – jav by mohol nastať v mnohých prípadoch;
- **nepravdepodobná** – jav by mohol nastať za určitých okolností;
- **vysoko nepravdepodobná** (zanedbateľná alebo blížiac sa nula) – jav môže nastať len za veľmi vzácných okolností.

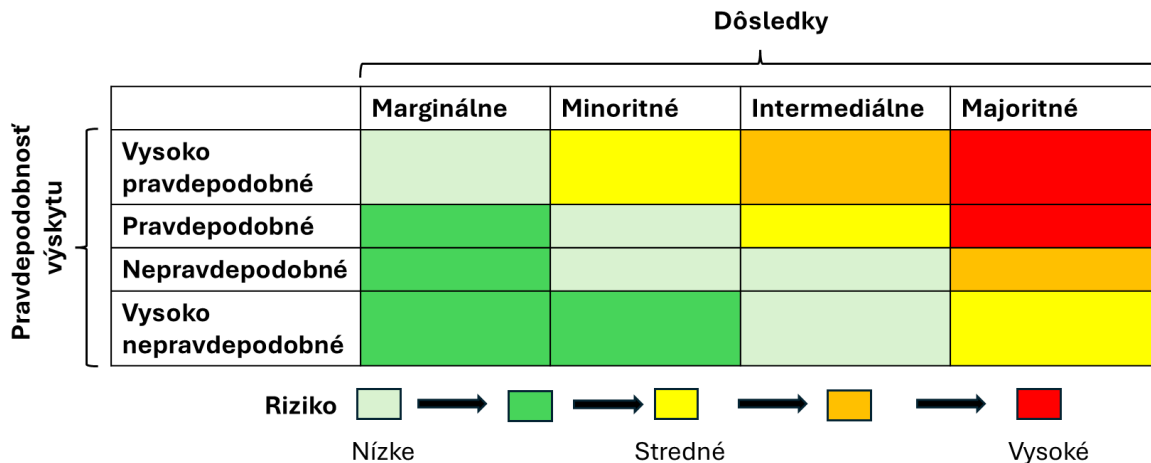
V prípade GMO sú najdôležitejšími faktormi, ktoré prispievajú k stupňu pravdepodobnosti, prežívanie, rozmnožovanie, miera pretrvávania a charakteristiky prijímajúceho prostredia, vrátane jeho biotických a abiotických vlastností.

Dôsledkom nepriaznivého účinku je výsledok, rozsah a závažnosť nepriaznivého účinku spojeného s expozíciou GMO, manipuláciou s ním a jeho používaním alebo výrobkami. Pri hodnotení dôsledkov sa môžu zväziť účinky na jednotlivcov (napr. smrtnosť, znížená alebo zvýšená kondícia atď.) alebo na populácie (napr. zvýšenie alebo zníženie počtu, demografické zmeny atď.) v závislosti od hodnoteného nepriaznivého účinku. V hodnotení rizika by sa mali zväziť dôsledky každého nepriaznivého účinku na základe zosúladenej analýzy toho, čo je známe o GMO, pravdepodobnom potenciálnom prijímajúcom prostredí a konečných bodoch hodnotenia, ako aj na základe hodnotenia pravdepodobnosti.

Dôsledky môžu byť:

- **marginálne** – minimálna alebo žiadna ujma, s výnimkou niekoľkých málo jedincov, ktorí môžu vyžadovať lekárska pomoc, resp. minimálne alebo žiadne zhoršenie životného prostredia;
- **minoritné** – ľahké zranenia niektorých ľudí, ktorí môžu vyžadovať lekárske ošetrovanie, narušenie biologických spoločenstiev, ktoré je reverzibilné a časovo a priestorovo obmedzené;
- **intermediálne** – ublíženie niektorým ľuďom, ktorí vyžadujú značnú lekársku starostlivosť, resp. narušenie biologických spoločenstiev, ktoré je rozšírené, ale reverzibilné alebo s obmedzenou závažnosťou;

- **majoritné** – ťažká ujma niektorým ľuďom, ktorí môžu vyžadovať hospitalizáciu, alebo môže viesť k úmrtiu, resp. rozsiahle biologické a fyzikálne narušenie celku (ekosystémy, spoločensvá, celý druh), ktoré pretrváva v čase alebo nie je ľahko reverzibilné.



Obrázok 5.29: Odhad pravdepodobnosti nepriaznivého účinku a dôsledky (Zdroj: autor).

5.9.3 Riadenie rizika

Procesom riadenie rizika sa posudzuje, či identifikované riziko v hodnotení rizika je prijateľné a či je zvládnuteľné. Posudzuje sa tiež, či výber a implementácia kontrolných opatrení sú vhodné na zabezpečenie minimalizovania alebo kontroly rizika. Stratégie riadenia rizík majú za cieľ **znižit' pravdepodobnosť alebo dôsledky potenciálnych nepriaznivých účinkov** a označujú sa aj ako preventívne opatrenia a opatrenia na zmiernenie.

Proces riadenie rizika typicky obsahuje 4 etapy:

- hodnotenie rizika;
- stanovenie možností riadenia rizika;
- implementácia rozhodnutia o riadení rizika;
- monitorovanie a hodnotenie.

Monitorovanie po uvoľnení GMO je zamerané na zisťovanie zmien (napr. v prijímajúcom prostredí alebo v GMO), ktoré by mohli viesť k nepriaznivým účinkom. Stratégie monitorovania môžu zahŕňať všeobecný dohľad (napr. monitorovanie užitočných druhov hmyzu v príslušnom prostredí), ktorý môže využívať existujúce širšie monitorovacie programy, ktoré môžu identifikovať neočakávané účinky GMO alebo vlastností, ako sú dlhodobé účinky.

Ďalšou možnosťou je špecifický dohľad pre daný prípad, ak sa skúmajú potenciálne nepriaznivé účinky zistené počas hodnotenia rizika. Takým špecifickým dohľadom môže byť napr. monitorovanie vývinu rezistencie hmyzích škodcov po zavedení geneticky modifikovaných plodín odolných voči pesticídom do príslušného prostredia.

Úroveň špecifickosti monitorovacích stratégií sa môže líšiť v závislosti od GMO, zamýšľaného použitia a/alebo pravdepodobného potenciálneho prijímajúceho prostredia. Z tohoto dôvodu je nevyhnutné, aby bola zadefinovaná aj podrobná metodika. Metodológia môže zahŕňať napríklad frekvenciu, miesta a metódy odberu vzoriek, ako aj metódy analýzy (napríklad laboratórne testovanie).

5.9.4 Komunikovanie o riziku

Komunikovanie je procesom výmeny informácií a názorov na riziko a na rizikové faktory medzi zúčastnenými stranami, ktorých sa riziko týka, teda medzi hodnotiteľmi rizika, manažérmi rizika a osobami vystavenými riziku.

Výsledky hodnotenia rizika sú prezentované vo forme písomnej správy vypracovanej hodnotiteľmi rizika. Správa je primárne určená osobám s rozhodovacou právomocou pri prijímaní informovaných rozhodnutí týkajúcich sa bezpečného používania GMO.

Správa o hodnotení rizika zvyčajne obsahuje analytickú syntézu všetkých relevantných krokov a výsledkov procesu hodnotenia rizika a mala by obsahovať:

- pozadie, kontext a rozsah hodnotenia rizika;
- charakterizáciu a odhad rizík;
- popis stratégií riadenia rizík a monitorovania identifikovaných počas hodnotenia rizík;
- zváženie zostávajúcej neistoty;
- odporúčania, či sú alebo nie sú riziká prijateľné alebo zvládnuteľné.

5.9.5 Posudzovanie rizika

Posudzovanie rizika je zamerané na zistenie všetkých existujúcich aj možných budúcich nepriaznivých účinkov na ľudí alebo na životné prostredie, ktoré by vznikli pri používaní genetických technológií a GMO:

- a) v uzavretých priestoroch;
- b) po zámernom uvoľnení GMO do životného prostredia.

Pri posudzovaní rizika sa uplatňuje:

- **princíp prevencie**, ktorý vychádza z poznania, že dôsledky poškodenia životného prostredia sú často nenapraviteľné a je im preto nutné predchádzať priamo pri zdroji, minimalizovať nepriaznivé dôsledky činností na životné prostredie, posudzovať vplyvy činností na životné prostredie, uskutočňovať opatrenia k odvráteniu hrozby alebo k zmierneniu následkov na životné prostredie;
- **princíp predbežnej opatrnosti**, teda ak možno, so zreteľom na všetky okolnosti predpokladať, že hrozí nebezpečenstvo nenávratného alebo závažného poškodenia životného prostredia, nesmie byť pochybnosť o tom, že k takému poškodeniu skutočne dôjde a nesmie byť dôvod pre odklad opatrení, ktoré majú poškodeniu zabrániť.

Rizikami, ktoré súvisia s uvoľnením GMO do životného prostredia sú:

- **riziká pre zdravie ľudí a zvierat** – toxicita, kvalita a bezpečnosť, alergénnosť rezistencia k liečivám;
- **riziká pre životné prostredie** – zotrvanie (trans)génu alebo jeho produktov v prostredí, senzitivita necieľových organizmov, vyvolané zvýšenie množstva použitých chemikálií (najmä pesticídov) v poľnohospodárstve, nepredpokladaná expresia transgénu alebo nestabilita transgénu;
- **riziká pre poľnohospodárstvo** – rezistencia/tolerancia necieľových organizmov, tzv. „superburiny“, zmeny nutričnej hodnoty GMO, uniformita, strata biodiverzity;
- **všeobecné riziká** – strata príslušnosti v systéme, vyššie výrobné náklady (napr. súvisiace s označovaním GMO produktov), etické otázky, otázky viery a pod.;
- **horizontálny transfer génov** – tzv. genetické „znečistenie“ (peľom, semenami) a vznik nežiadanych, nových rekombinovaných mikroorganizmov v prostredí.

Pri posudzovaní rizika GMO sa identifikujú možné nepriaznivé účinky, ktoré môžu byť:

- **priame** – sú dôsledkom prítomnosti GMO a nie sledu udalostí;
- **nepriame** – sú následkom náhodného sledu udalostí mechanizmami ako sú vzájomné pôsobenie, prenos genetického materiálu, zmeny v používaní alebo riadení;
- **bezprostredné** – pozorovateľné už počas uvoľňovania do prostredia (môžu byť priame alebo nepriame);
- **oneskorené** – nepozorovateľné počas uvoľňovania, ale prejavia sa (priamo alebo nepriamo) v neskoršom štádiu uvoľňovania alebo až po jeho skončení;

- **kumulatívne dlhodobé** – sústredené účinky na zdravie ľudí, životné prostredie, rastliny, zvieratá, úrodnosť pôdy, potravinový reťazec, biologickú rozmanitosť, odolnosť proti antibiotikám a iným liečivám a pod.

Výsledkom z hľadiska environmentálneho rizika môžu byť konštatovania, že GMO je:

- **bez rizika**, resp. s minimálnym rizikom;
- **s rizikom, ktoré môže byť jednoducho odstránené** všeobecne známymi opatreniami
- **s rizikom, ktoré môže byť odstránené len špecifickými náročnými zásahmi** (GMO, ktoré nie je možné zavádzať do životného prostredia);
- **s rizikom, ktoré zanechá trvalé následky** a nie je možné ich odstrániť ani náročnými zásahmi (GMO, ktoré nie je možné zavádzať do životného prostredia)

5.10 Regulačný systém týkajúci sa geneticky modifikovaných organizmov v Európskej únii

Európska únia vytvorila právne predpisy na zabezpečenie toho, aby sa moderné biotechnológie, do ktorých patria aj GMO sa uskutočňovali za bezpečných a kontrolovaných podmienok. Cieľom je:

- chrániť zdravie ľudí a zvierat a životné prostredie zavedením hodnotenia bezpečnosti pred uvedením akéhokoľvek GMO na trh;
- zaviesť harmonizované postupy hodnotenia rizika a schvaľovania GMO, ktoré sú účinné, časovo obmedzené a transparentné;
- zabezpečiť jasné označovanie GMO uvádzaných na trh, aby spotrebitelia, ako aj odborníci (napr. poľnohospodári a prevádzkovatelia potravinového a krmivového reťazca) si mohli vybrať;
- zabezpečiť vysledovateľnosť GMO uvádzaných na trh.

Základnú legislatívu EÚ tvorí:

- Smernica 2001/18/ES Európskeho parlamentu a Rady o **zámernom uvoľnení geneticky modifikovaných organizmov** do životného prostredia (2001)
- Nariadenie (ES) č. 1829/2003 Európskeho parlamentu a Rady o **geneticky modifikovaných potravinách a krmivách** (2003)

- Smernica Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) 2015/412, ktorou sa mení smernica 2001/18/ES, pokiaľ ide o možnosť členských štátov **obmedziť alebo zakázať pestovanie GMO** na ich území (2015)
- Nariadenie (ES) č. 1830/2003 o **vysledovateľnosti a označovaní GMO** a sledovateľnosti potravín a krmív vyrobených z GMO (2003)
- Smernica európskeho parlamentu a rady 2009/41/ES o používaní **GMO v uzavretých priestoroch** (2001)

Tieto právne predpisy sú doplnené niekoľkými vykonávacími predpismi alebo odporúčaniami a usmerneniami o špecifickejších aspektoch a sú implementované do legislatívy na úrovni členských štátov.

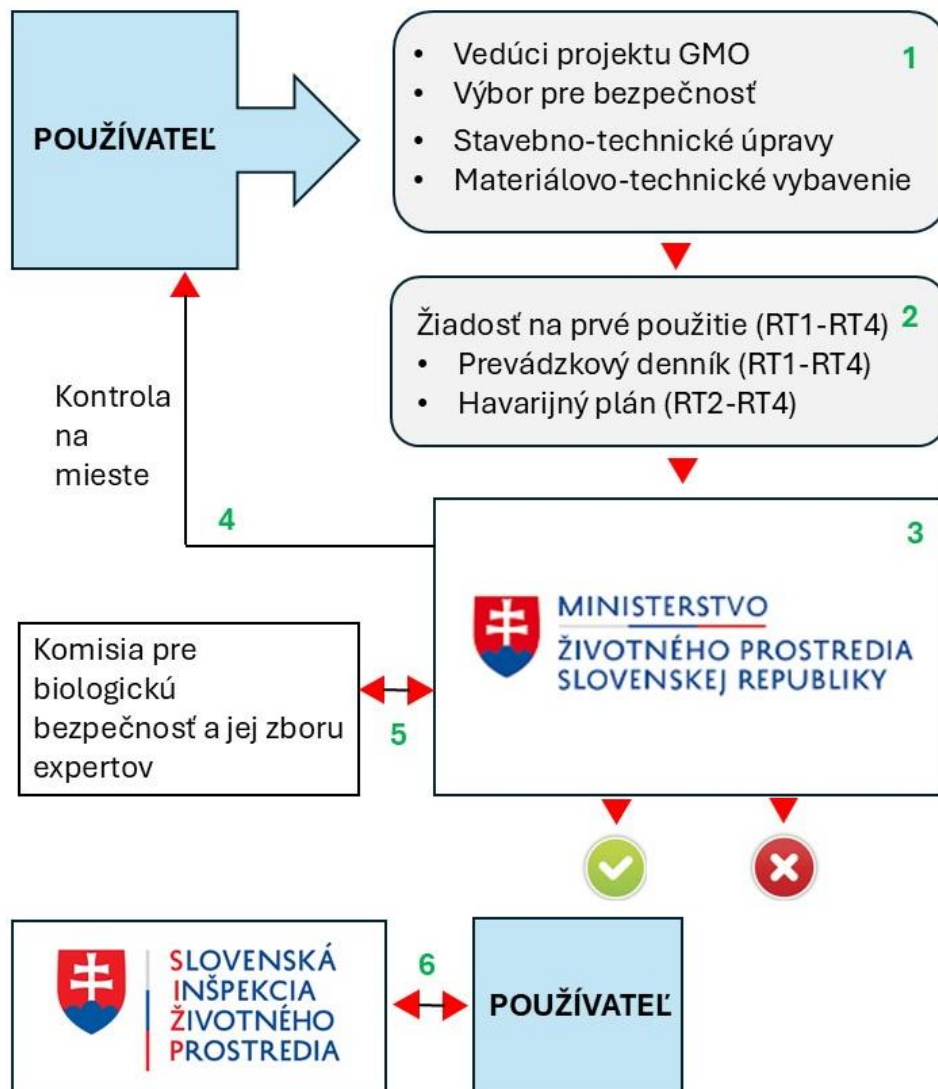
V Slovenskej republike je prvostupňovým orgánom vo veciach týkajúcich sa používania genetických technológií a geneticky modifikovaných organizmov **Ministerstvo životného prostredia SR** (MŽP SR), ktoré vydáva súhlasy na používanie GMO v uzavretých priestoroch, na ich zavedenie do životného prostredia a uvedenie GMO na trh.

Inšpekcia životného prostredia SR (IŽP SR) vykonáva štátny dozor nad používaním genetických technológií a geneticky modifikovaných organizmov a ukladá pokuty za správne delikty. IŽP SR zisťuje ako používatelia dodržiavajú zákon, všeobecne záväzné právne predpisy vydané na jeho vykonanie a povinnosti vyplývajúce z vydaných rozhodnutí. Ak inšpekcia zistí porušenie povinnosti alebo iný nedostatok v činnosti používateľa, upozorní ho na to a uloží mu povinnosť, aby ho v primeranej lehote odstránil, poprípade ak činnosťou používateľa bezprostredne hrozí nebezpečenstvo vzniku havárie s ohrozením ľudského zdravia mimo uzavretých priestorov, IŽP SR zakáže ďalšie používanie genetických technológií alebo geneticky modifikovaných organizmov.

5.10.1 Používanie geneticky modifikovaných organizmov v uzavretých priestoroch

Na používanie GMO v uzavretých priestoroch MŽP SR vydáva súhlas na prvé použitie v uzavretých priestoroch, súhlasy na činnosti zatriedené do rizikových tried RT3 a RT4, vyjadrenia k činnostiam zatriedeným do rizikovej triedy RT2, prípadne aj k činnostiam zatriedeným do rizikovej triedy RT1 na účely evidencie. Postup potrebný pre získanie súhlasu je znázornený na

Obrázku 5.30. Aby vôbec bolo možné pracovať s GMO, musí žiadateľ mať osobu zodpovednú za prácu s GMO na pracovisku tzv. vedúceho projektu a vytvoriť výbor pre bezpečnosť.



Obrázok 5.30: Schéma postupu pri podávaní žiadosti na prácu s genetickými modifikovanými organizmami v uzavretých priestoroch v Slovenskej republike (Zdroj: autor).

Vedúci projektu musí byť osoba bezúhonná bez záznamu v registri trestov a s dostatočnou odbornou praxou (minimálne 3 roky praxe v genetickom inžinierstve a v moderných biotechnológiách). Vedúci projektu musí byť zapísaný v evidencii vedúcich projektov na MŽP SR. U člena výboru pre bezpečnosť sa vyžadujú minimálne 3 roky praxe v používaní genetických technológií a geneticky modifikovaných organizmov.

Výbor pre bezpečnosť pozostáva z minimálne 5 členov, pričom 3 členovia musia byť z externého prostredia a 2 členovia sú z pracoviska žiadateľa (tzv. interní členovia). Každé

zmeny či už v osobe vedúceho projektu alebo vo výbore pre bezpečnosť sa musia ohlasovať MŽP SR.

Návrhom na začatie konania je **podanie písomnej žiadosti na prvé použitie uzavretých priestorov** na MŽP SR (pre všetky RT1-RT4). Žiadosť sa podáva predovšetkým za účelom posúdenia stavebno-technického usporiadania, materiálno-technického vybavenia uzavretých priestorov, prevádzkového režimu a v prípade, že používateľ plánuje v týchto priestoroch vykonávať činnosti zatriedené do rizikovej triedy RT1 aj posúdenie tejto činnosti. Obsahom žiadosti je **aj prevádzkový poriadok zariadenia a posudok z posudzovania rizika**. Prevádzkový poriadok musí obsahovať opis pracovných priestorov, kde sa vykonáva činnosť, pravidlá pre prácu s GMO; spôsob označovania, uchovávanía a likvidácie GMO, podmienky prenosu GMO. Pri činnostiach zatriedených do RT2 až RT4 je súčasťou žiadosti aj **havarijný plán**. Havarijný plán je dokument, v ktorom sú pre prípad vzniku havárie uvedené opatrenia zamerané na odstraňovanie následkov havárie na ľudí a na životné prostredie. Havária je udalosť, pri ktorej došlo pri používaní GMO k ich nekontrolovanému úniku, ktorý predstavuje okamžité alebo neskoršie nebezpečenstvo pre ľudské zdravie alebo životné prostredie

V rámci posúdenia žiadosti sa urobí **ohliadka u žiadateľa** zo strany MŽP SR za účelom preverenia najmä stavebno-technického usporiadania a materiálno-technického vybavenia uzavretých priestorov a dostatočnosti plnenia ochranných opatrení (laboratóriá typu BSL1-BSL4). Ak uzavreté priestory nezodpovedajú stavebno-technickým a materiálno-technickým požiadavkám, MŽP SR zamietne žiadosť o súhlas. Na základe posúdenia žiadosti, zistenia skutočného stavu uzavretých priestorov a odporúčania **Komisie pre biologickú bezpečnosť a jej zboru expertov**, MŽP SR vydá rozhodnutie vo veci prvého použitia uzavretých priestorov. Komisia pre biologickú bezpečnosť a jej zbor expertov je odborným poradným orgánom MŽP SR v oblasti biologickej bezpečnosti, tvoria ju odborníci z vedeckých a iných odborných kruhov, štátnych úradníkov menovaných za jednotlivé zainteresované rezorty ako aj zástupcov verejnosti.

V prípade zatriedenia činnosti do RT1 po udelení súhlasu od MŽP SR, predkladá používateľ **raz za 6 mesiacov** na MŽP SR **ohlásenie údajov o práci s GMO**, s ktorými používateľ vykonával činnosti za toto obdobie.

Ohlásenie o začatí činnosti zatriedenej do RT2 sa podáva sa najneskôr 7 dní pred začatím činnosti, ak boli splnené podmienky uvedené vo vydanom súhlase na prvé použitie uzavretých priestorov. MŽP SR na základe posúdenia ohlásenia oznámi používateľovi buď, že nemá námietky voči ohlásenej činnosti, alebo že môže ohlásenú činnosť vykonávať len na základe súhlasu a zároveň vyzve používateľa, aby podal žiadosť. Činnosti v RT3 a RT4 sa môžu

vykonávať len na základe súhlasu. Povinnosťou každého používateľa GMO je viesť dokumentáciu. Dokumentácia sa vedie v písomnej forme a uchováva sa na mieste zabezpečenom voči strate a odcudzeniu.

5.10.2 Regulačný systém týkajúci sa zámerného uvoľnenia geneticky modifikovaných organizmov v Európskej únii

Zámerné uvoľnenie znamená akékoľvek úmyselné zavedenie GMO, pre ktoré sa nepoužili žiadne kontrolné opatrenia na ohraňovanie ich kontaktu s obyvateľstvom a životným prostredím s cieľom poskytnúť im vysokú úroveň bezpečnosti. Na rozdiel od povolenia na prácu s GMO v uzavretých priestoroch, zámerné uvoľnenie GMO nie je už záležitosťou jednotlivých členských štátov, ale týka sa celého spoločenstva a platí pre všetky členské štáty EÚ. Geneticky modifikované organizmy alebo potravinové výrobky odvodené z GMO možno uviesť na trh v EÚ až po získaní tzv. „**autorizácie**“. Cieľom takéhoto prístupu je ochrániť zdravie a životné prostredie a po získaní autorizácie zabezpečiť voľný pohyb GM produktov v EÚ.

V roku 2001 bola prijatá Európskym parlamentom a Radou smernica (2001/18/ES) týkajúca sa zámerného uvoľnenia GMO do životného prostredia.

Zahrňa dva typy činností GMO:

- experimentálne uvoľnenie GMO do životného prostredia (tzv. pôdne testy);
- uvádzanie GMO na trh (napríklad komerčné pestovanie GM plodín v EÚ, dovoz a transformácia GM plodín v EÚ).

GMO získa autorizáciu len v tom prípade, ak sú splnené dve základné podmienky a to bezpečnosť a sloboda voľby.

Bezpečnosť znamená, že GMO musí byť bezpečný a nemôže predstavovať ohrozenie zdravia ľudí alebo zvierat, musí byť bezpečný pre životné prostredie, všetky produkty z GMO musia byť rovnako bezpečné ako ich konvenčné náprotivky, GMO musí byť testovaný s použitím najmodernejších poznatkov a technológií.

Sloboda voľby znamená, že spotrebiteľia, poľnohospodári (producenti) a spracovateľské podniky musia mať zabezpečenú možnosť použiť alebo odmietnuť GMO a výrobky z GMO, resp. s obsahom GMO. Musí byť zabezpečený princíp koexistencie a teda aj v dlhodobom časovom horizonte musia byť k dispozícii konvenčné, ekvivalentné potraviny bez použitia genetického inžinierstva. Sloboda voľby sa zabezpečí, resp. vykonáva prostredníctvom

označovania GMO a sledovateľnosti. **Označovania GMO** znamená, že ak sú GMO zámerne používané v potravinárskom výrobku, musí to byť jasne uvedené na etikete výrobku, pričom to platí aj pre GMO ako krmovine. **Sledovateľnosť** zahŕňa schopnosť vôbec vysledovať GMO a produkty vyrobené z GMO vo všetkých etapách ich uvádzania na trh.

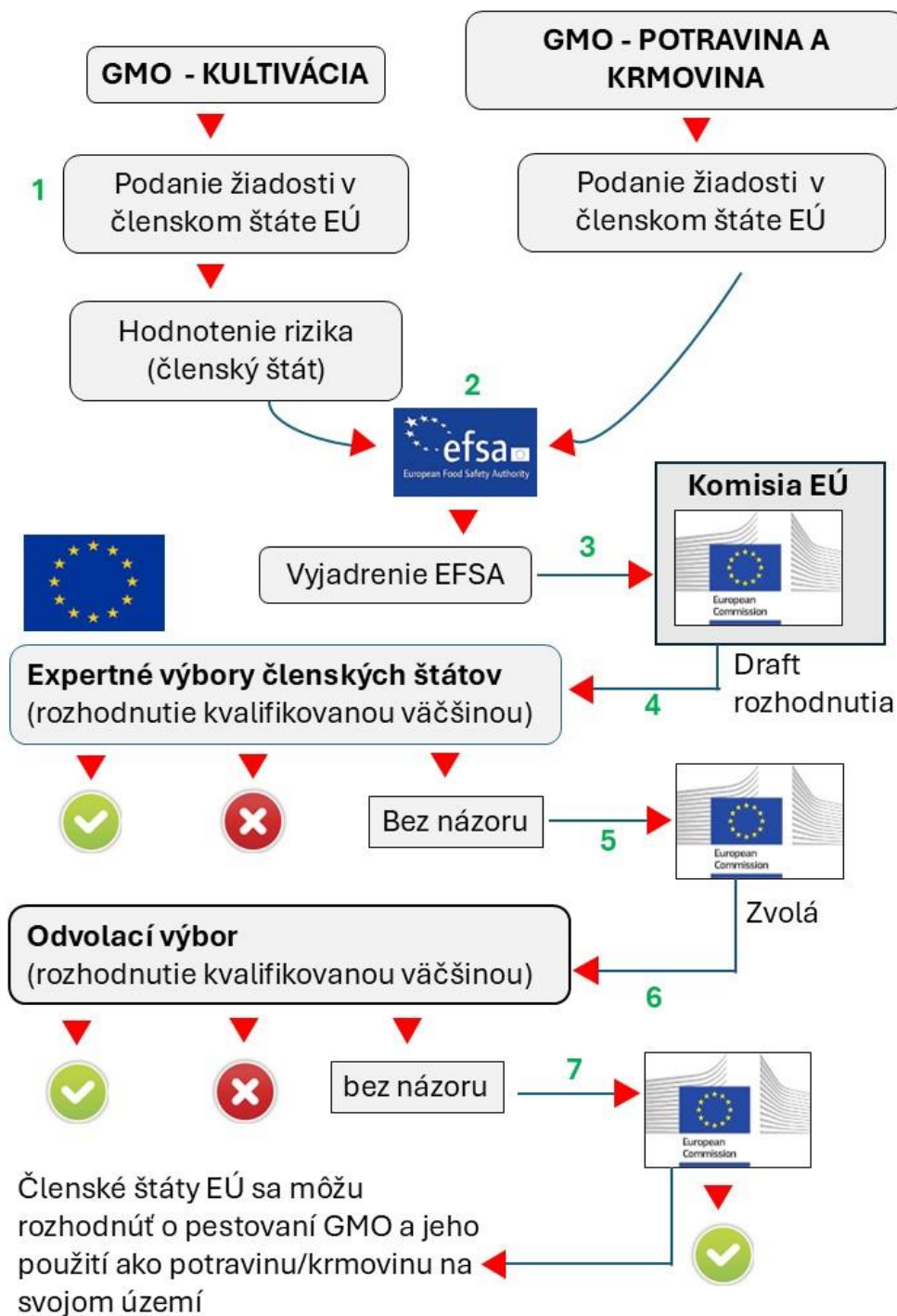
Proces povoľovania sa uskutočňuje na základe princípu „od **prípady k prípadu**“, podľa právnych predpisov EÚ a v závislosti od toho, či je geneticky modifikovaný materiál **schopný sa množiť a kultivovať**, t. j. pestovať až do generatívnej fázy alebo je **už spracovaným produktom**, ktorý už neobsahuje živý GM materiál.

V prípade ak sa GM plodina bude pestovať v EÚ, je potrebné uskutočniť pred podaním žiadosti **poľné pokusy**, aby sa zistilo, či by kultivácia GM plodín vo veľkom meradle, teda na veľkých plochách, mohla mať vplyv na životné prostredie. Týka sa to aj GM plodín, ktoré sa síce nemôžu pestovať v EÚ, ale sa budú dovážať v tzv. „živej forme“ (napr. semená), a teda by sa potenciálne mohli rozšíriť v životnom prostredí. V prípade, že sa GMO bude dovážať už vo forme spracovaných produktov, ktoré sa nepovažujú za živé organizmy, takéto testy sa nevyžadujú.

5.10.3 Proces autorizácie

Žiadosť o **autorizáciu** sa predkladá najskôr príslušnému orgánu (hociktorého) členského štátu. Žiadosť musí jasne definovať rozsah žiadosti, obsahovať štúdie a údaje preukazujúce bezpečnosť výrobku, uvádzať, ktoré časti sú dôverné, a musí obsahovať plán monitorovania, návrh označovania a metódu detekcie. Následne sa žiadosť a všetky doplňujúce informácie poskytnuté žiadateľom sprístupnia **Európskemu úradu pre bezpečnosť potravín (EFSA)**, ktorý je zodpovedný za vedecké hodnotenie rizika týkajúce sa rizika pre životné prostredie a zdravie ľudí a zvierat. Úrad EFSA má možnosť vyžiadať si od spoločnosti dodatočné štúdie/údaje, ak nie je spokojný s predloženými. Hodnotenie rizika je ukončené tým, že EFSA zverejní stanovisko o bezpečnosti GM potravín a krmovín. Potom sa začne mesačná verejná konzultácia, aby mala verejnosť možnosť vyjadriť sa k stanovisku EFSA pred prijatím akéhokoľvek rozhodnutia o riadení rizika. **Komisia EÚ** pripraví návrh vykonávacieho rozhodnutia o udelení alebo zamietnutí autorizácie. Komisia EÚ sa môže odchyliť od stanoviska úradu EFSA, ale potom musí svoje stanovisko odôvodniť. O návrhu rozhodnutia Komisie EÚ predloženom členským štátom sa hlasuje podľa pravidiel kvalifikovanej väčšiny. V prípade, že Stály výbor a Odvolací výbor nestihnú prijať rozhodnutie kvalifikovanou

väčšinou v danom časovom rámci, je na Komisii EÚ, aby prijala konečné rozhodnutie. Platnosť autorizácie je 10 rokov a je obnoviteľná. Schéma postupu v procese autorizácie je uvedená na Obrázku 5.31.



Obrázok 5.31: Proces autorizácie v EÚ. (Zdroj: https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/gmo_auth_decision-making-process.pdf, upravené).

5.10.3.1 Európsky úrad pre bezpečnosť potravín EFSA

Úrad EFSA („European Food Safety Authority“) bol zriadený v roku 2002 ako nestranný zdroj vedeckého poradenstva pre manažérov rizík a na komunikáciu o rizikách spojených s potravinovým reťazcom.



EFSA poskytuje vedecký základ pre zákony a nariadenia na ochranu európskych spotrebiteľov pred rizikami súvisiacimi s potravinami. Do jej kompetencie spadá bezpečnosť potravín a krmív, výživa zdravie a dobré životné podmienky zvierat a ochrana rastlín. EFSA hodnotí bezpečnosť geneticky modifikovaných organizmov predtým, ako môžu byť povolené na použitie ako potraviny alebo krmivo a/alebo na pestovanie v EÚ.

Úlohou EFSA je:

- zhromažďovanie vedeckých údajov a odborných znalostí;
- poskytovanie nezávislého, aktuálneho vedeckého poradenstva o otázkach bezpečnosti potravín;
- komunikovať o svojej vedeckej práci s verejnosťou;
- spolupracovať s krajinami EÚ a medzinárodnými orgánmi;
- posilniť dôveru v systém bezpečnosti potravín EÚ poskytovaním spoľahlivého poradenstva.

EFSA vydáva online vedecký časopis (**EFSA Journal**), ktorý je prístupný pre všetkých. EFSA v ňom publikuje vedecké články, ktoré sa venujú oblasti hodnotenia rizík vo vzťahu k potravinám a krmivám a zahŕňajú výživu, zdravie a dobré životné podmienky zvierat, zdravie rastlín a ochranu rastlín.

5.10.3.2 Referenčné laboratórium Európskej únie pre geneticky modifikované potraviny a krmivá

Referenčné laboratórium Európskej únie pre geneticky modifikované potraviny a krmivá („European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed“, EURL) vykonáva vedecké hodnotenie a validáciu metód zisťovania geneticky modifikovaných potravín a krmív v rámci autorizačného postupu EÚ. Žiadateľ o autorizáciu musí v rámci svojej žiadosti **uviesť metódy detekcie prítomnosti GMO**.



EURL sa zaoberá detekciou nielen autorizovaných GMO, ale aj neautorizovaných GMO, pre prípad, že by sa takéto GMO vyskytli na trhu v EÚ. Je to dôležité aj z hľadiska právneho, aby výsledky analýzy obstáli pred súdom a bolo možné vyvodit' zodpovednosť. V prípade nepovolených GMO je účelom analýzy odhaliť a podľa možnosti identifikovať GM materiál bez potreby kvantifikácie, zatiaľ čo v prípade autorizovaných GMO analýza zahŕňa aj kvantifikáciu.

EURL spolupracuje s EFSA a s laboratóriami zodpovednými za analýzu krmív a potravín v krajinách mimo EÚ. EURL Poskytuje **Národným referenčným laboratóriám (NRL)** podrobné informácie a usmernenia o analytických metódach vrátane referenčných metód. NRL si určujú príslušné orgány každého členského štátu. V Slovenskej republike sú dve Národné referenčné laboratória a to Štátny veterinárny a potravinový ústav v Dolnom Kubíne a Ústredný kontrolný a skúšobný ústav poľnohospodársky v Bratislave.

Na zisťovanie prítomnosti GMO sa používajú metódy založené i) na identifikácii prítomnosti cudzieho proteínu (napr. ELISA) a ii) na identifikácii prítomnosti cudzích DNA sekvencií (PCR, qPCR analýzy).

5.10.3.3 Register geneticky modifikovaných organizmov autorizovaných ako potravina alebo krmovina a produktov z nich v Európskej únii

GMO určené na trh EÚ ako potravina alebo krmovina a produkty z nich, ktoré získali autorizáciu, boli stiahnuté, čakajú na autorizáciu alebo autorizácia už expirovala, sa musia uvádzať v **registri geneticky modifikovaných organizmov** (nariadenie ES 1829/2003) (<https://webgate.ec.europa.eu/dyna2/gm-register/>). Register je online a voľne dostupný. Register poskytuje všetky potrebné informácie ohľadom konkrétneho GMO týkajúce sa transformačnej udalosti; unikátneho identifikačného kódu (ID); komerčnej spoločnosti, ktorá je vlastníkom; génov, ktoré boli vnesené a ich vlastností; typu autorizácie; dátumu autorizácie a jej expirácie; metódy detekcie a iné dokumenty súvisiace s uvoľnením tejto konkrétnej GM plodiny na trh (Tabuľka 5.5).

V roku 2015 bola prijatá nová Smernica Európskeho parlamentu a Rady (2015/412), ktorá reaguje na potreby jednotlivých členských štátov ohľadom GMO. Podľa tejto smernice v procese autorizácie členský štát môže požiadať o zmenu geografického rozsahu žiadosti, aby sa zabezpečilo, že na jeho územie sa nebude vzťahovať autorizácia EÚ. Po získaní autorizácie členský štát môže zakázať alebo obmedziť pestovanie GM plodín na základe dôvodov

súvisiacich okrem iného s cieľmi environmentálnej alebo poľnohospodárskej politiky alebo z iných závažných dôvodov.

Pred prijatím tejto smernice mohli členské štáty dočasne zakázať alebo obmedziť používanie GMO na svojom území, iba ak by mali nové dôkazy o tom, že príslušný GMO predstavuje riziko pre ľudské zdravie alebo životné prostredie. Krajiny, ktoré na základe tejto smernice zakázali pestovanie GMO na svojom území sú Rakúsko, Belgicko, Bulharsko, Chorvátsko, Cyprus, Dánsko, Francúzsko, Nemecko, Grécko, Maďarsko, Taliansko, Lotyšsko, Litva, Luxembursko, Malta, Holandsko, Poľsko, Slovinsko a Veľká Británia (ešte ako člen EÚ). Slovenská republika zatiaľ oficiálne nezakázala pestovanie GMO na svojom území, avšak na Slovensku sa od roku 2017 žiadna GM plodina nepestuje.

Tabuľka 5.5: Ukážka dostupných informácií v EU registri týkajúceho sa GMO (Zdroj: Genetically Modified Organisms www.europa.eu), upravené).

Transformačná udalosť/ Unikátne ID/ Spoločnosť	Bavlník (MON1445)/ MON-Ø1445-2/ Monsanto
Opis	<ul style="list-style-type: none"> - cp4 epsps gén - tolerancia voči glyfosátovým herbicídom - nptII gén - selekčný markerový gén, rezistencia voči kanamycínu a neomycínu - aadA gén - selekčný markerový gén, rezistencia voči spektinomycínu a streptomycínu
Dátum autorizácie Dátum expirácie	24/04/2015 26/04/2025
Použitie	Potraviny produkované z MON-Ø1445-2 Krmoviny produkované z MON-Ø1445-2
Metóda detekcie	qPCR (pomocou špecifických primerov)
Ďalšie informácie o hodnotení rizika	Názor EFSA http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2479.htm

5.10.4 Pestovanie geneticky modifikovaných plodín v Európskej únii

V EÚ získal autorizáciu za účelom pestovania len jediný botanický druh a to kukurica (*Zea mays* L.) MON810 (MON-ØØ81Ø-6, obchodný názov YieldGard™, MaizeGard™) od firmy Monsanto Company. GM kukurica MON810 sa v súčasnosti (2024) pestuje v rámci EÚ len v Španielsku a Portugalsku. GM kukurica MON 810 bola pripravená metódou biolistickej

transformácie. MON810 je rezistentná voči hmyzu z radu Lepidoptera ako je vijačka kukuričná, a stredomorská vijačka kukuričná, ktoré patria k najväčším škodcom kukurice v Európe; a zároveň je aj rezistentná voči glyfosátovým herbicídom. Okrem toho, obsahuje selekčný markerový gén neomycín fosfotransferázový gén (Tabuľka 5.6). GM kukurica MON810 získala autorizáciu v EÚ nielen na pestovanie, ale aj na priame použitie ako krmovina a potravinu; a aj na jej spracovanie.

Pestovanie GM plodín na území EÚ sa riadi Smernicou 2001/18/ES Európskeho parlamentu a Rady, ktorá bola implementovaná do národnej legislatívy jednotlivých členských štátov. Podrobnosti o pestovaní GM plodín v Slovenskej republike upravuje Zákon 184/2006 Z. z. o pestovaní geneticky modifikovaných rastlín v poľnohospodárskej výrobe a Vyhláška 69/2007 Z. z., ktorou sa zákon vykonáva.

Pestovateľ musí oznámiť príslušným orgánom zámer pestovať GM plodinu (len autorizovanú a to v súčasnosti je v EÚ len GM kukurica MON810), absolvovať školenie a uskutočniť príslušné technické opatrenia pri pestovaní, aby sa zabránilo nežiadúcej kontaminácii konvenčnej kukurice s GM kukuricou. Pri pestovaní sa musí dodržať minimálna izolačná vzdialenosť od ostatnej (konvenčnej) kukurice. Platí, že jeden riadok obsevu (tzv. plodinovej bariéry) nahrádza 2 m izolačnej vzdialenosti. Pestovateľ musí vždy vykonať obsev o minimálnej šírke 6 riadkov s konvenčnou kukuricou. Pri zbere sa však táto plodinová bariéra považuje za geneticky modifikovanú kukuricu a zberá sa spoločne s produkciou GM kukurice. Zároveň sa musí dodržať najmenšia izolačná vzdialenosť a to 200 m od porastov pestovaných konvenčným spôsobom hospodárenia a 300 m od porastov pestovaných ekologickým spôsobom hospodárenia. Po skončení zberu GM plodiny pestovateľ musí zabezpečiť dôkladné vyčistenie zberacích strojov. Okrem toho, musí likvidovať prežité jedince pestovaných GM plodín najmenej 2 vegetačné obdobia nasledujúce po ich pestovaní a najmenej 2 roky nesmie pestovať na tom istom pozemku konvenčné plodiny rovnakého botanického druhu. Zozbierané GM plodiny musia byť skladované v osobitných priestoroch, pričom pestovateľ ich musí **označiť výveskou**, kde bude uvedený botanický druh, názov odrody, jednoznačný identifikátor a hmotnosť. Keďže sa jedná o produkt rastlinnej výroby, ktorý obsahuje životaschopný biologický materiál, akým je napríklad zrno, musí byť pri jeho predaji alebo odovzdaní ďalším subjektom označený slovami „geneticky modifikovaný organizmus“ a musí byť uvedený jeho jednoznačný identifikátor. Produkty rastlinnej výroby, ktoré pochádzajú z GM plodín, ale neobsahujú životaschopný biologický materiál, ako je napríklad siláž (siláž však nesmie obsahovať kľúčivé zrná) musia byť pri predaji alebo odovzdaní ďalším subjektom označené slovami „**vyrobené z geneticky modifikovaného osiva**“. Toto označenie musí byť uvedené v

rámci sprievodnej dokumentácie takým spôsobom, aby jednoznačne informovalo odberateľa o tom, že daný produkt pochádza z osiva geneticky modifikovanej plodiny.

Tabuľka 5.6: Súhrn základnej genetickej modifikácie GM kukurice MON810 (Zdroj: ISAAA, upravené).

Vnesený gén	Pôvod (zdroj génu)	Produkt	Funkcia
cry1Ab	<i>Bacillus thuringiensis</i> sub sp. kurstaki	Cry1Ab delta-endotoxín	Poskytuje rezistenciu na hmyz čeľade <i>Lepidoptera</i> tým, že selektívne poškodzuje ich tráviaci trakt
ooxy247	<i>Ochrobactrum anthropi</i> kmeň LBAA	Glyfosát oxidáza	Poskytuje toleranciu voči glyfosátovým herbicídom degradáciou glyfosátu na kyselinu aminometylfosfónovú (AMPA) a glyoxylát
cp4 epsps	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> kmeň CP4	Herbicíd tolerantná forma 5-enolpyruvulšíkimát -3-phosfát syntáza (EPSPS)	Znižuje väzbovú afinitu k glyfosátu, čím sa zvyšuje tolerancia voči glyfosátovému herbicídu
nptII	<i>Escherichia coli</i> Tn5 transpozón	Neomycin fosfotransferáza II	Umožňuje transformovaným rastlinám počas selekcie metabolizovať neomycín a antibiotiká kanamycín

5.10.5 Označovanie geneticky modifikovaných organizmov a ich produktov z nich

5.10.5.1 Povinné označovanie

Označovanie GMO poskytuje spotrebiteľom informácie a umožňuje im **vybrať si** a zároveň umožňuje ich **vysledovateľnosť** vo všetkých fázach dodávateľského reťazca. V súčasnosti 65 krajín sveta (berúc do úvahy aj 28 štátov EÚ) vyžaduje označovanie geneticky modifikovaných potravín/krmovín (Obrázok 5.32A).

V USA sa do roku 2022 označovanie GM potravín vyžadovalo len v prípade, že krmovina/potravina mala nutričné alebo iné vlastnosti týkajúce sa bezpečnosti potravín, ktorá sa výrazne líšili od ich konvenčných náprotivkov. Nezohľadňovalo sa však pri posudzovaní, či boli GM rastliny pripravené metódami genetického inžinierstva. Od roku 2022 výrobcovia potravín a dovozcovia musia označovať potraviny, ktoré sú vyrobené pomocou genetického

inžinierstva alebo obsahujú zložky pochádzajúce z genetického inžinierstva. Táto informácia musí byť zreteľne uvedená na obale (Obrázok 5.32C).

V EÚ sa požiadavka na označovanie vzťahuje na produkty (GM potraviny/krmivá), v ktorých sa nachádza **viac ako 0,9%** GM zložiek potravín/krmív. Požiadavky na označovanie sa nevzťahujú na GM potraviny/krmivá, ktoré obsahujú menej ako 0,9 % zložiek potravín/krmív posudzovaných jednotlivo a ak je táto prítomnosť náhodná alebo technicky nevyhnutná.



Obrázok 5.32: Krajiny, v ktorých je značenie GMO povinné (A). Ukážka značenia, že produkt obsahuje GMO (B) a nové logo na označovanie produktov obsahujúcich GMO v USA (C). (Zdroj: A: <https://www.justlabelit.org/right-to-know-center/labeling-around-the-world/>, upravené, B: https://www.huffpost.com/entry/the-gmo-labeling-conundru_b_10324182, C: <https://www.food-safety.com/articles/7490-new-usda-labeling-for-genetically-modified-foods-goes-into-effect>).

V prípade balených GM potravín/krmív musí sa v zozname zložiek uvádzať „**geneticky modifikované**“ alebo „**vyrobené z geneticky modifikovaných**“ a musí byť uvedený názov organizmu (Obrázok 5.32B).

V prípade produktov bez obalu musia byť tieto slová stále zreteľne zobrazené v tesnej blízkosti produktu (napríklad poznámka na regáli v obchode).

V prípade výrobkov, ktoré sa skladajú zo zmesí GMO, ktoré sa majú používať ako potraviny alebo krmivá alebo na spracovanie, sa tieto informácie môžu nahradiť vyhlásením o používaní prevádzkovateľom. Musia byť sprevádzané zoznamom identifikátorov pre všetky GMO, ktoré boli použité na vytvorenie zmesi.

Niektoré štáty ako napríklad Kanada, jeden z veľkých producentov GM plodín, označovanie GMO vo svojich produktoch na svojom trhu nevyžaduje. Pre zaujímavosť, v roku 2016 sa Kanada stala prvou krajinou, ktorá schválila geneticky modifikovaného lososa „AquaAdvantage“ pre ľudskú spotrebu.

5.10.5.2 Dobrovoľné označovanie

Dobrovoľné označovanie vzniklo v súvislosti s tým, že potravinové výrobky ako mäso, mlieko alebo vajcia pochádzajúce zo zvierat a nie síce geneticky modifikovaného, avšak kŕmeného GM krmivom sa nepovažujú za GM potraviny a nevyžaduje sa, aby boli označené. V snahe vyjsť spotrebiteľom v ústrety v ich požiadavke mať takúto informáciu, niektoré štáty umožňujú označovanie na obaloch týchto produktov ako „**GMO free**“, poprípade iné označenie (Obrázok 5.33). Cieľom je poskytnúť výrobcovi a spotrebiteľovi možnosť voľby alebo vyhnúť sa zavádzajúcim a falošným informáciám.

Niektoré krajiny umožňujú takéto dobrovoľné značenie, iné len za určitých presne definovaných podmienok alebo ho zakazujú ako napríklad Belgicko a Švédsko. Právne predpisy týkajúce sa označovania „GMO free“ v Nemecku existovali už v rokoch 1998 až 2008. Tieto predpisy vylučovali akékoľvek použitie genetického inžinierstva na akejkoľvek úrovni spracovania. Nakoľko bolo mimoriadne komplikované dosiahnuť produkciu bez GM na všetkých úrovniach, takmer žiadne potraviny nemohli byť označené ako „GMO free“ a tak došlo k zmierneniu podmienok. V Slovenskej republike neexistuje legislatíva týkajúca sa podmienok, za akých je možné označovať produkty ako „GMO free“.

Každá krajina si definuje podmienky, či vôbec alebo za akých podmienok je možné použiť GM krmivo pri poľnohospodárskych zvieratách, z ktorých produkty sa môžu označovať

ako „GMO free“. To však závisí od nastavenia v jednotlivých štátoch. Napríklad pri „GMO free“ hydine je možné kŕmiť GM krmivami len do 3 dní po narodení (Rakúsko, Francúzsko) alebo do 10 týždňov pred porážkou (Nemecko). V prípade „GMO free“ ošípaných v Rakúsku nie je možné kŕmiť GM krmivami počas celého obdobia, zatiaľ čo vo Francúzku a Nemecku sa nesmie používať GM krmivo 4 až 4 a pol mesiaca pred porážkou. Označenie „GMO free“ mlieko v Rakúsku je možné vtedy, ak sa GM krmivo nepoužíva minimálne 2 týždne pred dojením, v Nemecku 3 mesiace pred dojením a vo Francúzku 6 mesiacov pred dojením. Označenie „GMO free“ vajcia je možné v Rakúsku, Nemecku a vo Francúzku ak sa GM krmivo nepoužíva minimálne 6 týždňov pred znášaním.

Jediné označenie ako „GMO free“ nie živočíšneho pôvodu získalo pivo Oettinger (Nemecko).



Obrázok 5.33: Ukážka loga používaného na označenie GMO „free“ (Zdroj: <https://stock.adobe.com/search?k=non+gmo+logo>).

5.10.6 Geneticky modifikované zvieratá a ich uvedenie na trh v Európskej únii

Agentúra EFSA vypracovala dva usmerňujúce dokumenty, ktoré načrtávajú špecifické požiadavky týkajúce sa údajov a metodiky hodnotenia rizika geneticky modifikovaných (GM) zvierat. Prvý dokument sa týka hodnotenia bezpečnosti potravín a krmív získaných z GM zvierat a zahŕňa aspekty týkajúce sa zdravia a dobrých životných podmienok zvierat. Druhý dokument poskytuje usmernenie o tom, ako vykonať hodnotenie environmentálnych rizík živých GM zvierat, ktoré sa majú umiestniť na trh EÚ.

Doposiaľ neboli autorizované v EÚ žiadne geneticky modifikované zvieratá, ani potraviny z geneticky modifikovaných zvierat, ani neboli zo strany spoločností podané žiadne žiadosti o schválenie (tzv. autorizácia) na uvedenie na trh. Okrem toho, EÚ zastáva veľmi prísny prístup k regulácii zvierat modifikovaných metódou editácie génov (tzv. CRISPR, „Clustered regularly interspaced short palindromic repeats“), ktorý podporuje zákaz ich

uvádzania do obehu. Európsky súdny dvor v rozpore s vedeckými odporúčaniami v roku 2018 rozhodol, že editácia génov bude regulovaná podľa Smernice 2001/18/ES Európskeho parlamentu a Rady o zámernom uvoľnení geneticky modifikovaných organizmov do životného prostredia.

5.10.6.1 Geneticky modifikované zvieratá a ich uvedenie na trh mimo Európskej únie

Mimo EÚ nie je taký prísny prístup k autorizácii GM zvierat. V Spojených štátoch sú komerčne dostupné tri geneticky upravené potravinové živočíšne produkty. V roku 2015 Americký Úrad pre kontrolu potravín a liečiv („U.S. Food and Drug Administration”, FDA) udelil svoje prvé schválenie pre geneticky modifikovaného lososa atlantického od spoločnosti AquAdvantage upraveného tak, aby dorástol na trhovú veľkosť za polovičný čas ako konvenčný losos (Obrázok 5.34).



Obrázok 5.34: Geneticky modifikovaný losos rastie dvakrát rýchlejšie ako jeho konvenčný náprotivok (Zdroj: <https://www.nature.com/articles/497017a>).

V roku 2020 úrad FDA schválil GM ošípané GalSafe (Obrázok 5.35) ako potravinové a humánne terapeutiká. Alergia alfa-gal alebo alergia na mäso cicavcov je typ alergie, ktorý sa vyznačuje oneskoreným nástupom symptómov (3–8 hodín) po požití mäsa cicavcov a je výsledkom predchádzajúcej expozície človeka kliešťom. Prvýkrát toto ochorenie bolo zaznamenané v roku 2002. Ochorenie je v skutočnosti alergiou na alfa-gal cukor (galaktóza- α -1,3-galaktóza), ktorý sa často nachádza vo väčšine mäsa cicavcov (hovädzie, bravčové,

jahňacie mäso, zverina, atď.). Mäso z ošípaných GalSafe je určené len pre ľudí s alfa-gal alergiou. Ošípané GalSafe by mohli byť však potenciálne použité aj ako zdroj liečivých produktov, ako je liek na riedenie krvi heparín, ktorý neobsahuje detekovateľný alfa-gal cukor. Tkanivá a orgány ošípaných GalSafe by mohli potenciálne riešiť problém imunitného odmietnutia u pacientov, ktorí dostávajú xenotransplantáty, pretože sa predpokladá, že alfa-gal cukor môže byť príčinou odmietnutia pri pacientoch.



Obrázok 5.35: Geneticky modifikované ošípané GalSafe (Zdroj: <https://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/article/default.asp?ID=18511>).



Obrázok 5.36: Pražma červená, ktorej génom bol editovaný pomocou CRISPR (vľavo). Napravo sa nachádza jej konvenčný náprotivok. (Zdroj: <https://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/article/default.asp?ID=19061>).

V roku 2022 FDA schválila hovädzí dobytok pre ľudskú spotrebu, ktorý bol editáciou genómu (CRISPR) upravený tak, aby mal hladšiu a kratšiu srst', čo mu umožní lepšiu tepelnú reguláciu a tým lepší prírastok na váhe.

V Japonsku bola v roku 2021 uvedená na trh pražma červená „Muscle Madai“, ktorá bola upravená editáciou genómu (CRISPR). Vyradením génu myostatínu sa dosiahlo, že došlo k zväčšeniu (1,2 až 1,6 krát) časti určenej na konzumáciu, oproti jej konvenčnému náprotivku (Obrázok 5.36). Okrem toho bola pomocou metódy CRISPR upravená a na trh uvedená ryba štvorzubec (*Takifugu rubripes*) známa ako „torafugu“ za účelom zrýchlenia jej rastu. Takto modifikovaná ryba je asi 1,9 krát ťažšia oproti jej konvenčnému náprotivku. Ryby „torafugu“ sú vo všeobecnosti v Japonsku považované za luxusné jedlo.

5.10.7 Regulačný systém týkajúci sa nových techník šľachtenia v Európskej únii

Nové techniky šľachtenia („New Breeding Techniques“, NBT), medzi ktoré zahrňujeme aj editáciu genómu pomocou CRISPR, sú inovatívne nástroje, ktoré pomáhajú zvyšovať udržateľnosť potravinového systému. Predstavujú možnosť získania rastlín odolnejších voči environmentálnym zmenám, predstavujú výhody pre poľnohospodárov, spotrebiteľov a aj pre životné prostredie.

V EÚ prebieha diskusia ako by sa tieto tzv. NBT rastliny mali regulovať a či by niektoré alebo všetky z nich mali patriť do pôsobnosti právnych predpisov EÚ o geneticky modifikovaných organizmoch. Tí, ktorí sa domnievajú, že NBT by mali byť vyňaté z právnych predpisov o GMO, vo všeobecnosti tvrdia, že konečný produkt je veľmi podobný výrobkom získaným pomocou konvenčných šľachtiteľských techník alebo že podobné zmeny sa môžu vyskytnúť aj prirodzene. Tí, ktorí sa domnievajú, že nové techniky by mali patriť do pôsobnosti právnych predpisov o GMO, tvrdia, že použité postupy znamenajú, že rastliny pripravené pomocou NBT sú v skutočnosti geneticky modifikované.

V júli 2018 Európsky súdny dvor vyniesol rozsudok, v ktorom rozhodol, že na organizmy upravené editáciou genómu sa vzťahujú európske právne predpisy o GMO. Súčasná pravidlá však zaostávajú za vedeckým a technologickým pokrokom a nie sú navrhnuté tak, aby uľahčovali uvádzanie na trh NBT rastliny.

V reakcii na globálnu kritiku a strach zo zaostávania za väčšinou zvyšku sveta začala EÚ postupne prehodnocovať svoj postoj. V roku 2021 bola vypracovaná štúdia, ktorá dospela k

záveru, NBT majú potenciál prispieť k trvalo udržateľnému poľnohospodárstvu, pričom sa uznávajú obavy o bezpečnosť, vplyv na životné prostredie a problém s označovaním takýchto potravín. V roku 2023 Európska komisia vydala nové odporúčania, ktoré vyzývajú na prepracovanie predpisov, aby sa efektívne oddelili NBT od obmedzení týkajúcich sa GMO. Podľa návrhu by sa reštriktívne pravidlá EÚ týkajúce sa GMO už nevzťahovali na rastliny vytvorené pomocou NBT, pokiaľ by úpravy boli porovnateľné s tými, ktoré by sa dali dosiahnuť konvenčným šľachtením. Odporúča sa zaviesť **dve kategórie NBT rastlín**.

Do prvej kategórie by spadali NBT rastliny porovnateľné s prirodzene sa vyskytujúcimi alebo konvenčnými rastlinami a do druhej kategórie by spadali NBT rastliny so zložitejšími modifikáciami. Obe kategórie by mali podliehať rôznym požiadavkám, kým by sa dostali na trh. Rastliny z prvej kategórie by bolo potrebné len oznámiť, zatiaľ čo rastliny z druhej kategórie by prešli rozsiahlejším procesom schvaľovania tak ako je to pri GMO. Odporúčania sa však ešte musia schváliť v rámci EÚ.

5.10.8 Regulačný systém týkajúci sa nových techník šľachtenia mimo Európskej únie

Na rozdiel od EÚ, mnoho krajín sa rozhodlo vyňať editáciu genómu z regulácie GMO, pokiaľ neobsahujú cudziu DNA. Vo všeobecnosti môžeme krajiny podľa ich prístupu rozdeliť do 4 skupín.

Do prvej skupiny patria krajiny, ktoré nemajú žiadne obmedzenia. Patria sem USA a Kanada, ako aj niekoľko juhoamerických a ázijských krajín. V USA potraviny vyrobené pomocou NBT vrátane editácie pomocou CRISPR, sa riadia podobnými štandardmi ako konvenčné potraviny. Rastliny pripravené pomocou NBT sú regulované na základe konečného produktu, nie na základe spôsobu ich prípravy. Kanada v roku 2023 prijala usmernenia o plodinách vytvorených prostredníctvom editácie CRISPR a iných NBT, pričom ich reguluje rovnako ako konvenčné plodiny.

Do druhej skupiny patria krajiny, ktoré podmieňujú súhlas individuálne tzv. „od prípadu k prípadu“. Patrí sem Brazília, Čína alebo Kolumbia.

Do tretej skupiny patria krajiny ako napríklad EÚ, Nórsko alebo Švajčiarsko, v ktorých stále prebieha diskusia o tom, či zjednodušiť pravidlá týkajúce sa NBT rastlín a za akých podmienok.

Do štvrtej skupiny patria krajiny ako Mexiko alebo Nový Zéland, ktoré sa striktné pozerajú na NBT rastliny ako na geneticky modifikované.

5.11 Etické dôsledky využívania moderných biotechnológií

Moderné biotechnológie nám zmenili prístup, akým dokážeme vyrábať potraviny, lieky a priemyselné materiály a otvorili nové možnosti liečby v humánnej medicíne. Napriek pozitívam, biotechnológie nám prinášajú aj celý rad sociálnych, právnych a etických problémov. Etické problémy súvisiace s biotechnológiami môžeme rozdeliť do podkategórií: sociálno-ekonomické, environmentálne a kultúrne problémy; právne a náboženské otázky.

Genetické inžinierstvo otvára otázky o etických hraniciach zlepšovania ľudských vlastností nad rámec toho, čo sa považuje za normálne alebo prirodzené. Kým genetické zásahy zamerané na liečbu genetických ochorení alebo postihnutí sú široko akceptované, obavy vznikajú, keď by genetické inžinierstvo bolo používané na iné ako terapeutické účely. Kritici tvrdia, že by to mohlo prehĺbovať existujúce sociálne nerovnosti, vytvárať nespravodlivé výhody a podkopávať ľudskú dôstojnosť.

Eticky zodpovedné používanie biotechnológií sa netýka len medicínskej oblasti, ale aj poľnohospodárskych biotechnológií. Rastúci dopyt po potravinách a environmentálne zmeny vytvárajú vysoký tlak na zabezpečenie efektívnej produkcie v intenciách udržateľného poľnohospodárstva. Významnú úlohu v tomto začína zohrávať nový prístup pri získavaní rastlín tolerantných voči rôznym abiotickým/biotickým stresom a to s využitím metódy genetickej modifikácie rastlín alebo pomocou CRISPR editácie genómu (tzv. NBT). Tieto prístupy musia byť však eticky zodpovedné, sociálne vnímané, relevantné pre ľudí z rôznych kultúrnych a sociálnych prostredí a predstavené širokej verejnosti presvedčivým a priamočiarym spôsobom. Napriek tomu, že komercializované GM plodiny sú na trhu už viac ako 25 rokov, neustále pretrvávajú etické dilemy a polemiky o rizikách a výhodách GMO.

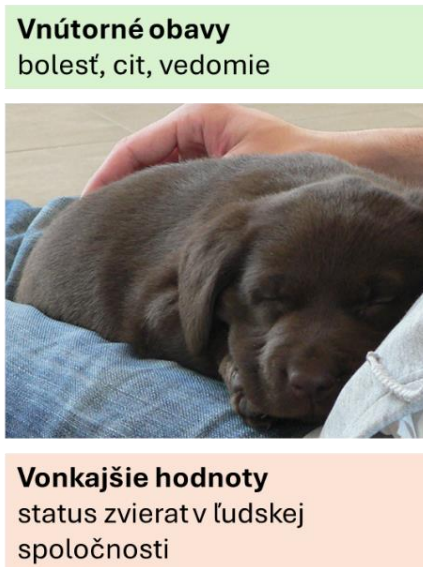
Bioetika sa zaoberá etikou súvisiacou s biologickými poznatkami a vedou o živých systémoch, pričom etika je chápaná ako náuka o tom, prečo robíme to, čo robíme, čo je dobré, ako robiť dobro. **Principalizmus** označuje etické princípy, ktorými sa riadi rozhodovanie v oblasti bioetiky. Tieto princípy poskytujú vyvážený prístup k riešeniu etických dilem zvažovaním viacerých perspektív a hodnôt. Sú to princípy:

- autonómie - rešpektovanie práva jednotlivca robiť vlastné rozhodnutia;
- prospešnosti - povinnosť konať v najlepšom záujme jednotlivca;
- neškodnosti - povinnosť neublížiť;
- spravodlivosti - zabezpečenie spravodlivosti a rovnosti.

Tieto zásady by sa mali však hodnotiť systémom „od prípadu k prípadu“. Hoci princípalizmus poskytuje štruktúrovaný prístup k etickým dilemám (hlavne v medicínskych biotechnológiách), sám o sebe nestačí na riešenie etických problémov, ktoré vyplývajú z moderných biotechnológií. Prvoradé je uvažovanie o tom, čo je správne alebo nesprávne, ako aj hľadanie správnej rovnováhy medzi prínosmi a rizikami biotechnológií a vybrať si medzi alternatívnymi prístupmi tie, ktoré sú v súlade s princípmi bioetiky.

Je to viac ako 25 rokov od narodenia ovce Dolly, prvého klonovaného zvieratá. Tento úspech upriamil pozornosť na reprodukčné klonovanie ľudí a na etické otázky pokiaľ ide o ľudskú identitu, autonómiu a práva, pričom existuje zhoda, že v klonovaní ľudí sa nemá pokračovať. Existujú obavy ohľadom zneužívania genetických modifikácií za účelom zlepšovania určitých vlastností človeka. Génová terapia pri ľuďoch môže viesť k neúmyselným mutáciám alebo dlhodobým účinkom na zdravie, ktoré ešte stále nie sú úplne preskúmané.

Morálny status zvierat a rozhodnutia či je etické, aby ich ľudia používali na výskum, závisí od niekoľkých kľúčových vnútorných atribútov a to ich schopnosti myslieť, schopnosti uvedomovať si členov rodiny, schopnosti cítiť bolesť a stav bytia nažive (Obrázok 5.37).



Obrázok 5.37: Etika týkajúca sa práva zvierat (Zdroj: autor).

Ak teda môžeme dosiahnuť rovnaký cieľ pomocou zvierat ktoré sú „primitívnejšie“ ako tieto, ako napríklad iné cicavce alebo zvieratá primitívnejšie ako cicavce, potom by sme mali používať zvieratá na najnižšej evolučnej úrovni vhodnej na experiment. Mali by sme používať skôr živočíšne bunky ako celé zvieratá. Bolesť, utrpenie a ťažkosti, ktoré zvieratá pociťujú v dôsledku klonovacích postupov, môžu byť odôvodniteľné ich ušľachtilým využitím, ako je liečenie chorôb ľudí a zvierat alebo ochrana ohrozených druhov. Nemalo by to však byť prípustné z dôvodov, ako je zatraktívnenie zvierat pre umelecké účely ako napríklad klonovanie jeleňa za účelom získania veľkého parožia, aby bol atraktívnejší pre poľovníkov.

V poľnohospodárskych biotechnológiách sa etické obavy týkajú napríklad toho ako vývin, produkcia a spotreba GM a NBT plodín môžu ovplyvniť životné prostredie, zdravie a bezpečnosť ľudí, ako aj a slobodu podnikania. Používanie GM rastlín by mohlo potenciálne viesť k strate biodiverzity poprípade narušiť ekosystémy. GM potraviny môžu potenciálne predstavovať nové alergény alebo toxíny, čo vyvoláva obavy o zdravie ľudí.

GM technológie sú často chránené patentami, autorskými právami, ktorých vlastníckmi sú nadnárodné spoločnosti. Niektoré biotechnologické spoločnosti môžu dominovať v kľúčových sektoroch, ako je poľnohospodárstvo (napríklad produkcia geneticky modifikovaného osiva), čo môže viesť k obavám z vytvárania monopolov. Relevantná je aj otázka dostupnosti a prístupnosti (napr. náklady na novú technológiu a sociálno-ekonomické charakteristiky skupín, ktorým bude technológia dostupná) a do akej miery takéto moderné biotechnológie dokážu prispievať k potravinovej bezpečnosti v rozvojových krajinách. Vysoké náklady spojené s modernými biotechnológiami môžu zväčšiť priepasť medzi bohatými a chudobnými.

Riziká a prínosy spojené s novými technológiami možno hodnotiť rôznymi spôsobmi, v závislosti od toho, či sa berú do úvahy sociálne, kultúrne, ekonomické alebo environmentálne faktory. Často sa líšia aj v závislosti od toho, ktorej časti výrobných a dodávateľských reťazcov sa to týka. Zatiaľ čo pre poľnohospodárov pestovanie GM plodín môže byť výhodné, takéto GM plodiny môžu predstavovať riziká resp. môžu byť nepriaznivé pre životné prostredie a neakceptovateľné spotrebiteľmi. Napríklad, GM plodiny prvej generácie boli geneticky modifikované tak, aby predstavovali prínos pre pestovateľov tým, že zlepšili produktivitu a znížili náklady na ochranu plodín. Na druhej strane tieto GM plodiny boli vnímané ako málo prospešné pre spotrebiteľov. Toto nerovnomerné rozloženie rizík a výhod môže spôsobiť nesprávne vnímanie ich hodnôt, ohroziť globálnu potravinovú bezpečnosť a prehĺbovať sociálne nerovnosti, najmä v rozvojových krajinách.

Existujúci regulačný rámec EÚ pre GM plodiny je často kritizovaný ako príliš striktný oproti krajinám s veľkou produkciou ako sú USA alebo Kanada. Prílišná regulácia GM plodín

môže zároveň negatívne ovplyvniť postoje verejnosti a umocňuje vnímanie, že sú rizikové, i keď ich riziká môžu byť podobné ako u ich konvenčných náprotivkoch. Takýto striktný regulačný dohľad môže zvýšiť skepsu verejnosti v súvislosti s poľnohospodárskymi biotechnológiami.

Veľa spotrebiteľov má obmedzené vedomosti a mylné predstavy o moderných biotechnológiách. Často svoje informácie čerpajú z iných ako vedeckých zdrojov. Dôležitá je ich sociálna dôvera (dôvera vo vedu, regulačné agentúry a postupy, postoj politikov atď.) a ich celkové hodnotové nastavenie a náboženská viera. Navyše, existujú rozdielne pohľady medzi vedcami a odborníkmi a laickou verejnosťou na to, čo by sa malo považovať a vyhodnotiť ako riziko. Odborníci a vedci zdôrazňujú kvantitatívne charakteristiky rizika, zatiaľ čo široká verejnosť uprednostňuje kvalitatívne charakteristiky, ktoré nesúvisia s bezpečnosťou GM plodín. V tomto smere vzdelávanie a vedecká komunikácia s laickou verejnosťou založená na dôvere a transparentnosti zohráva dôležitú úlohu a výzvu pri akceptácii moderných biotechnológií širokou verejnosťou.

5.12 Zoznam použitej literatúry

AL-EITAN, L. - ALNEMRI, M. 2022. Biosafety and biosecurity in the era of biotechnology: The Middle East region. In *Journal of Biosafety and Biosecurity*, Volume 4, Issue 2, 2022, s.130-145, doi.org/10.1016/j.jobbb.2022.11.002.

Amazon Conservation 2024, <https://www.amazonconservation.org/the-challenge/threats/>

BHATT, M. – MISHRA, N.K., KUMAR, A, N. – CHAUDHARY, P, SINGH, R. 2018. Genetic pollution: causes and effects. In *Everymans Science* 53 (3):145-148.

Biosafety Clearing House 2024, <https://bch.cbd.int/en/>

BROOThAERTS, W. - JACCHIA, S. - ANGERS, A. - PETRILLO, M. - QUERCI, M. - SAVINI, C. - VAN DEN EEDE, G. - EMONS, H. 2021. New Genomic Techniques: State-of-the-Art Review, EUR 30430 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2021, ISBN 978-92-76-24696-1, doi:10.2760/710056, JRC121847.

Carbon Footprint by Country 2024, <https://wisevoter.com/country-rankings/carbon-footprint-by-country/#slovakia>

Climate Change Service, <https://climate.copernicus.eu/esotc/2023/temperature>

CONSOLI, CH. 2019. Bioenergy and carbon capture and storage, https://www.globalccsinstitute.com/wp-content/uploads/2019/03/BECCS-Perspective_FINAL_PDF.pdf

Convention of Biological Diversity, Slovakia profile, 2024, <https://www.cbd.int/countries/profile/default.shtml?country=sk>

ESLAMI, E., SIAMIAN, H. - ORIMI, J.R. – AGHABEIGLOOEI, Z. - SALIMI-SABOUR, E. - AMROLLAHI-SHARIFABADI, M. 2024. Pattern of bioterrorism in ancient times: lessons to be learned from the microbial and toxicological aspects. In *Wiener Medizinische Wochenschrift*. doi:10.1007/s10354-023-01029-1

EU Register of authorised GMOs, 2024, <https://webgate.ec.europa.eu/dyna2/gm-register/>

European Commission 2022. EU at COP27 Climate Change Conference. https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/priorities-2019-2024/european-green-deal/climate-action-and-green-deal/eu-cop27-climate-change-conference_en

European Commission 2024. Natura 2000, https://ec.europa.eu/environment/nature/natura2000/index_en.htm

European Food Safety Authority 2024, <https://www.efsa.europa.eu/en>

European Parliament 2023. Reducing carbon emissions: EU targets and policies. <https://www.europarl.europa.eu/news/en/headlines/society/20180305STO99003/reducing-carbon-emissions-eu-targets-and-policies>

European Union EUR-Lex (2024). Convention on Biological Diversity — Cartagena protocol on biosafety, <https://eur-lex.europa.eu/EN/legal-content/summary/convention-on-biological-diversity-cartagena-protocol-on-biosafety.html>

Európska rada Európskej únie 2023. Parížska dohoda o zmene klímy, <https://www.consilium.europa.eu/sk/policies/climate-change/paris-agreement/>

Európska rada Európskej únie 2024. Biodiverzita: ako EÚ chráni prírodu, <https://www.consilium.europa.eu/sk/policies/biodiversity/>

Európsky parlament (2019) Opatrenia EÚ proti klimatickým zmenám, <https://www.europarl.europa.eu/news/sk/headlines/priorities/klimatickezmeny/20180703STO07129/opatrenia-eu-proti-kl,imatickym-zmenam>

FLORA, S. J. S. 2020. Biological warfare agents: History and modern-day relevance. In Handbook on biological warfare preparedness, Academic Press, s. 1-11, doi.org/10.1016/B978-0-12-812026-2.00001-3

FRISCHKNECHT, F. 2003. The history of biological warfare. Human experimentation, modern nightmares and lone madmen in the twentieth century. In EMBO Spec No (Suppl 1):S47-52. doi: 10.1038/sj.embor.embor849

Global Biolabs report 2023, <https://www.globalbiolabs.org/>

Global Forest Watch 2024, <https://www.globalforestwatch.org/>

Global Gene Editing Regulation Tracker 2024, <https://crispr-gene-editing-regstracker.geneticliteracyproject.org/>

HARFOUCHE, A.L. - PETOUSI, V. - MEILAN, R. - SWEET, J.- TWARDOWSKI, T. - ALTMAN, A. 2021. Promoting Ethically Responsible Use of Agricultural Biotechnology. In Trends in Plant Science 26 (6):546-559. doi:10.1016/j.tplants.2020.12.015

CHAMI ,R. - COSIMANO T. – FULLENKAMP, C. – NIEBURG, D. 2022. Toward a Nature-Based Economy. Frontiers in Climate 4. doi:10.3389/fclim.2022.855803

LAITH, AE. – ALNEMRI, M. 2022. Biosafety and biosecurity in the era of biotechnology: The Middle East region. Journal of Biosafety and Biosecurity4(2):130-45. doi: org/10.1016/j.jobb.2022.11.002

LENTZOS, F. - KOBLENTZ, G.D. 2023. High Consequence Bio Labs: Growing Risks and Lagging Governance Release of Global BioLabs 2023 Report, Global-Biolabs-2023-Report.pdf (squarespace.com)

MESELSON, M. - GUILLEMIN, J. – HUGHJONES, M. - LANGMUIR, A. - POPOVA, I. - SHELOKOV, A. - YAMPOLSKAYA, O. 1994. The sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. In Science 266 (5188):1202-1208. doi:10.1126/science.7973702

MESSÉAN, A. - ÁLVAREZ, F. – DEVOS, Y. - CAMARGO, A.M. 2024. Assessment of the 2022 post-market environmental monitoring report on the cultivation of genetically modified maize MON 810 in the EU. In European Food Safety Authority (EFSA) DOI:10.2903/j.efsa.2024.8986

Ministerstvo investícií, regionálneho rozvoja a informatizácie Slovenskej republiky 2024. Agenda 2030 v medzinárodnom prostredí, <https://mirri.gov.sk/sekcie/udrzatelny-rozvoj/agenda-2030/>

Ministerstvo životného prostredia Slovenskej republiky 2024. Dohovor o biologickej diverzite (Convention on Biological Diversity/CBD), <https://www.minzp.sk/ochrana-prirody/medzinarodne-dohovory/dohovor-biodiverzite/>

Ministerstvo životného prostredia Slovenskej republiky 2024. Envirostratégia 2030, <https://www.minzp.sk/iep/strategicke-materialy/envirostrategia-2030.html>

Ministerstvo životného prostredia Slovenskej republiky 2024. Natura 2000, <https://www.minzp.sk/ochrana-prirody/uzemna-ochrana/natura-2000.html>

Ministerstvo životného prostredia Slovenskej republiky 2024. Územia európskeho významu, <https://www.minzp.sk/natura2000/uzemia-europskeho-vyznamu/>

NAMBISAN, P. 2017. An Introduction to Ethical, Safety and Intellectual Property Rights Issues in Biotechnology Preface. Cochin University of Science & Technology, Cochin, Kerala, India, ISBN 978-0-12-809231-6, s. 370.

Nariadenie (ES) č. 1830/2003 Európskeho parlamentu a Rady z 22. septembra 2003 o sledovateľnosti a označovaní geneticky modifikovaných organizmov a sledovateľnosti potravín a krmív vyrobených z geneticky modifikovaných organizmov a ktorým sa mení a dopĺňa smernica 2001/18/ES, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK-EN/TXT/?qid=1473246270712&uri=CELEX:32003R1830&from=SK>

Národný park Malá Fatra 2024, <https://www.npmalafatra.sk/priroda/mokrade/>

NICHOLAS, A. - RATHJEN, D.O. - SHAHBODAGHI, S.D. 2021. Bioterrorisms. In *Am Fam Physician* 104(4):376-385, <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2021/1000/p376.html>

OLIVEIRA, M. - MASON-BUCK, G. – BALLARD, D. - BRANICKI, W. - AMORIM, A. 2020. Biowarfare, bioterrorism and biocrime: A historical overview on microbial harmful applications. In *Forensic Science International* 314. doi:10.1016/j.forsciint.2020.110366

ORIZAOLA G. 2020. From nuclear desert to evolutionary lab: The response of living organisms to Chernobyl's ionising radiation. In *Mètode Science Studies Journal*, vol. 10, pp. 193-199, doi.org/10.7203/metode.10.15682

PEIPOCH, M. – BRAUNS, M. - HAUER, F.R. - WEITERE, M. – VALETT, H.M. 2015. Ecological Simplification: Human Influences on Riverscape Complexity. In *Bioscience* 65 (11):1057-1065. doi:10.1093/biosci/biv120

PEREZ, G. – VILA, M. - GALLARDO, B. 2022. Potential impact of four invasive alien plants on the provision of ecosystem services in Europe under present and future climatic scenarios. In *Ecosystem Services* 56. doi:10.1016/j.ecoser.2022.101459

Secretariat of the Convention on Biological Diversity 2024, <https://www.cbd.int/lbcd>

SCHMELLER, D.S. - COURCHAMP, F. - KILLEEN, G. 2020. Biodiversity loss, emerging pathogens and human health risks. In *Biodiversity and Conservation* 29 (11-12):3095-3102. doi:10.1007/s10531-020-02021-6.

SIGMUND, G. – ÅGERSTRAND, M. - ANTONELLI, A. – BACKHAUS, S T. – BRODIN, T. DIAMOND, M.L. – ERDELEN, W.R. - EVERS, D.C. - HOFMANN, T. - HUEFFER, T. - LAI A. – TORRES, J.P.M - MUELLER, L. - PERRIGO, A. L. - RILLIG, M.C. - SCHAEFFER, A. - SCHERINGER, M. - SCHIRMER, K. – TLILI, A. – SOEHL, A. - TRIEBSKORN, R. - VLAHOS, P. - VOM BERG, C. - WANG, Z.Y. - GROH, K. J. 2023. Addressing chemical pollution in biodiversity research. In *Global Change Biology* 29 (12):3240-3255. doi:10.1111/gcb.16689

SINGH, K. - ZEESHAN, Z - KARNA, S. 2023. The Regulation of Biotechnology: Ethical, Legal, and Social Implications. In *Interdisciplinary Studies in Society, Law, and Politics*, 2(3), 44-50, doi.org/10.61838/kman.isslp.2.3.6

Slovenský hydrometeorologický ústav 2024, <https://www.shmu.sk/sk/?page=1379>

SMERNICA 2001/18/ES EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY z 12. marca 2001 o zámernom uvoľnení geneticky modifikovaných organizmov do životného prostredia a o zrušení smernice Rady 90/220/EHS

Smernica Európskeho parlamentu a Rady (EÚ) 2015/412 z 11. marca 2015, ktorou sa mení smernica 2001/18/ES, pokiaľ ide o možnosť členských štátov obmedziť alebo zakázať pestovanie geneticky modifikovaných organizmov (GMO) na ich území, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK-EN/TXT/?qid=1473334289204&uri=CELEX:32015L0412&from=SK>

Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2009/41/ES zo 6. mája 2009 o používaní geneticky modifikovaných mikroorganizmov v uzavretých priestoroch, <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2009/41/oj?eliuri=eli%3Adir%3A2009%3A41%3Aoj&locale=sk>

SMITH, V. – WESSELER, JH.H. – ZILBERMAN, D. 2021. New Plant Breeding Technologies: An Assessment of the Political Economy of the Regulatory Environment and Implications for Sustainability. In *Sustainability* 13 (7). doi:10.3390/su13073687

ŠUSTEK, Z. 2007. Veterná kalamita vo Vysokých Tatrách a jej dopad na spoločenstvá bystruškovitých (Coleoptera, Carabidae). In Zborník Fleischer p. & Matejka, F. (eds.): Pokalamitný výskum v TANAP-e 2007, Tatranská Lomnica, 25. 26. október 2007, Geofyzikálny ústav SAV, ISBN: 978-80-85754-17-9, (43), s. 245 – 255.

Tatranský národný park 2024, <https://www.tanap.sk/pozor-na-impozantny-no-nebezpecny-bolsevník-obrovsky/>

The Convention on Biological Diversity 2024, <https://www.cbd.int/countries/profile/?country=sk#facts>

The European Space Agency 2023. Understanding climate tipping points, https://www.esa.int/Applications/Observing_the_Earth/Space_for_our_climate/Understanding_climate_tipping_points

The European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed 2024, <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/>

The Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) 2024, <https://www.ipcc.ch/sr15/>

The Princeton University Office of Environmental Health and Safety 2024, <https://ehs.princeton.edu/laboratory-research/biological-safety/biosafety-manual/administering-biohazards-animals>

TÓTH D. 2007. Biologická bezpečnosť. SPU Nitra, ISBN 978-80-8069-846-1, s. 463

TRUMP, B. – CUMMINGS, C. - KLASA, K. - GALAITSI, S. - LINKOV, I. 2023. Governing biotechnology to provide safety and security and address ethical, legal, and social implications. *Frontiers in Genetics* 13. doi:10.3389/fgene.2022.1052371

U.S. Food Drug Administration 2024, <https://www.fda.gov/food/agricultural-biotechnology/how-gmos-are-regulated-united-states>

United Nations Office for Disarmament Affairs 2024. <https://disarmament.unoda.org/biological-weapons/about/what-are-biological-weapons/>

United Nations 2024, <https://www.un.org/en/conferences/environment/rio1992>

University of Virginia, Environmental health & safety 2024. <https://ehs.virginia.edu/Biosafety-Riskgroups.html>

VALKOVÁ, D. – TURŇA, J. 2003. Postup hodnotenia rizika z použitia geneticky modifikovaných organizmov. In Vydavateľstvo VEDA, ISBN 80-224-0770-4, s. 54.

Zákon 151/2002 Z. z. z 19. februára 2002 o používaní genetických technológií a geneticky modifikovaných organizmov, <https://www.slov-lex.sk/pravne-predpisy/SK/ZZ/2002/151/>

Zákon 184/2006 Z. z. zo 16. marca 2006 o pestovaní geneticky modifikovaných rastlín v poľnohospodárskej výrobe, <https://www.slov-lex.sk/pravne-predpisy/SK/ZZ/2006/184/>

ZIMNY, T. 2022. New genomic techniques and their European Union reform. Potential policy changes and their implications. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 10. doi:10.3389/fbioe.2022.1019081

ZIPKIN, E.F. - DIRENZO, G.V. 2022. Biodiversity is decimated by the cascading effects of the amphibian-killing chytrid fungus. In *Plos Pathogens* 18 (7). doi:10.1371/journal.ppat.1010624

6 Terminologický slovník

Abiotický stres – negatívny vplyv neživých faktorov prostredia na živý organizmus.

Adventívne korene – korene vytvorené *de novo* z akejkoľvek časti rastliny v *in vitro* kultúre, priamou alebo nepriamou organogenezou.

Agenda 2030 - Agenda pre trvalo udržateľný rozvoj do roku 2030, globálny plán prijatý na Valnom zhromaždení OSN v roku 2015. Obsahuje 17 cieľov pre trvalo udržateľný rozvoj), ktoré sú navrhnuté tak, aby riešili globálne výzvy, ako sú chudoba, nerovnosť, alebo klimatické zmeny.

Agenda 21 – komplexný akčný program, ktorý slúži ako rámec pre udržateľný rozvoj a poskytuje usmernenia pre krajiny na miestnej, národnej a globálnej úrovni na zabezpečenie rovnováhy medzi ekonomickým rozvojom, sociálnym rozvojom a ochranou životného prostredia. Dokument bol prijatý v roku 1992 na Konferencia OSN o životnom prostredí a rozvoji v Rio de Janeiro.

Agrobacterium tumefaciens – gram-negatívna baktéria schopná infikovať dvojkľúčolistové rastliny a vytvárať na nich tumory v dôsledku prenosu časti svojho Ti-plazmidu do rastlinnej bunky a jej včlenenia do genómu rastliny.

Agroinfiltrácia – metóda na dosiahnutie dočasnej expresie cudzieho génu (transgénu) v rastline a produkciu heterologickej (cudzej) bielkoviny.

Agrolistika – technika genetickej transformácie rastlín, v ktorej sa kombinujú výhody transformačného systému *Agrobacterium* s vysokou účinnosťou biolistickej dodávky DNA.

Androgenéza – vývoj zygoty a rastliny iba zo samčieho gametofytu – mikrospór alebo nezrelých peľových zrn, produktom sú androgenické haploidy.

Angioedém - kožné ochorenie, ktoré vzniká opuchom hlbokých vrstiev kože, podkožného tkaniva alebo slizníc.

Antisense RNA – RNA, ktorá je komplementárna k určitej molekule mRNA.

Bacillus thuringiensis – gram-pozitívna pôdna baktéria, produkujúca spóry obsahujúce toxíny s insekticídnymi účinkami na niektoré skupiny hmyzu.

Bakteriocíny – peptidy alebo proteíny syntetizované na ribozómoch baktérií, ktoré sa vyznačujú antimikrobiálnou aktivitou.

Behaviorálny – týkajúci sa správania.

Biocenóza - všetky organizmy (zvieratá, rastliny, mikroorganizmy, človek), ktoré osídľujú určité územie a sú spojené vzájomnými vzťahmi a vzťahmi s prostredím.

Bioekonomika (definícia Európskej komisie) – tie časti hospodárstva, ktoré využívajú obnoviteľné biologické zdroje z pevniny a mora na výrobu potravín, materiálov a energie.

Bioenergetika – produkcia a transformácia obnoviteľných surovín (zdrojov) biologického pôvodu (biomasy) na energiu a výrobu energetických nosičov.

Bioetika - etika súvisiaca s biologickými poznatkami a vedou o živých systémoch, pričom etika je chápaná ako náuka o tom, prečo robíme to, čo robíme, čo je dobré, ako robiť dobro.

Biofortifikácia – proces, ktorým sa zvyšuje nutričná hodnota potravinárskych plodín konvenčným šľachtením rastlín, zlepšenými agronomickými postupmi alebo modernými biotechnológiami.

Biokapacita - schopnosť Zeme regenerovať sa a poskytovať zdroje požadované ľudstvom a absorbovať odpad, ktorý vzniká ľudskou činnosťou.

Biokonzervácia – využitie prírodných látok na konzervovanie potravín, predĺženie ich prirodzenej skladovateľnosti a oddialeniu procesu pokazenia, zničenia.

Biolistika (biobalistika, nastreľovanie génov) - metóda genetickej transformácie DNA rastlín, hlavne jadrovej, ale aj chloroplastovej a mitochondriálnej. Cudzí DNA je do rastlinných buniek introdukovaná pomocou kovových mikročastíc nastreľovaním.

Biologická aktivita – schopnosť molekulárnej entity dosiahnuť definovaný biologický účinok na cieľ, napr. antibakteriálna aktivita ako schopnosť molekúl zabraňovať rastu baktérii, prípadne ich usmrcovať.

Biologická bezpečnosť („Biosafety“) - špecifické laboratórne postupy a protokoly riadené stupňami biologickej bezpečnosti, ktoré sú určené na zabránenie náhodnému vystaveniu alebo uvoľneniu škodlivých biologických látok v kontrolovanom prostredí, ako sú laboratória, a na ochranu jednotlivcov a životného prostredia pred neúmyselnými biologickými rizikami.

Biologické ochranné opatrenia („Biosecurity“) - celý rad nariadení, vrátane medzinárodných zmlúv a národných zákonov, zameraných na ochranu pred náhodnými aj úmyselnými hrozbami. Je to širší súbor opatrení zameraných na ochranu pred úmyselnými aj neúmyselnými hrozbami, ktoré predstavujú biologické faktory.

Biologické riziko - riziko, že biologická udalosť nepriaznivo ovplyvní zdravie ľudí, zvierat a životného prostredia.

Biologické zbrane - mikroorganizmy alebo iné toxíny, ktoré sa zámerne vyrábajú a uvoľňujú, aby spôsobili ochorenie a smrť ľudí, zvierat alebo rastlín.

Biologický faktor - akýkoľvek živý organizmus, ktorý môže potenciálne spôsobiť ochorenie človeka alebo poškodiť životné prostredie.

Bioprodukty – výrobky úplne alebo čiastočne odvodené z obnoviteľných materiálov biologického pôvodu.

Bioreaktor – zariadenie alebo systém, ktorý vytvára biologicky aktívne prostredie, v ktorom sa uskutočňuje chemický proces (aeróbny alebo anaeróbny), v ktorom sú zúčastnené organizmy alebo biochemicky aktívne látky odvodené z takýchto organizmov.

Bioremediácie – akýkoľvek proces, v ktorom sú pôsobením živých či mŕtvych organizmov, alebo ich častí, toxické a rizikové látky premieňané na netoxické a nerizikové látky.

Biotechnológie (definícia OECD a Európskej komisie) – aplikácie vied a technológií na živé organizmy a ich časti, produkty a ich modely, na zmeny živých a neživých materiálov za účelom produkcie vedomostí, tovarov a služieb.

Bioterorizmus - využitie biologických látok na cieľný útok na civilné obyvateľstvo, pričom motivácia súvisí s politickým alebo náboženským presvedčením.

Biotop - súbor všetkých činiteľov (živých aj neživých), ktoré vzájomným spolupôsobením vytvárajú životné prostredie daného jedinca, druhu, populácie alebo spoločenstva.

Biozločin - hroziace alebo skutočné použitie biologickej látky alebo toxínu s úmyslom spôsobiť škodu inému jednotlivcovi alebo skupine jednotlivcov. Motiváciou sú osobné dôvody.

Body zlomu klímy - prvky zemského systému, v ktorom môžu malé zmeny spustiť posilňujúce slučky, ktoré „preklopia“ systém z jedného stabilného stavu do úplne iného stavu.

Bt-plodina – geneticky upravená (modifikovaná) plodina obsahujúca endospórové (kryštalické) toxíny baktérie *Bacillus thuringiensis*, aby bola odolná voči určitým hmyzím škodcom.

Bunkové šľachtenie – spôsob šľachtenia využívajúci bunkové, pletivové a orgánové kultúry rastlín *in vitro*.

Cisgenóza – prenos nezmeneného, pôvodného génu s regulačnými sekvenciami vlastnými alebo pochádzajúcimi z príbuzného, krížiteľného druhu.

CRISPR/Cas – technológia editovania génov a genómov.

Cybrid (cytoplazmatický hybrid) – hybrid vytvorený fúziou cytoplazmiem dvoch buniek, pričom nedochádza k fúzii jadier.

Čisté zdroje energie - typy energie, ktoré produkujú minimálne alebo žiadne emisie skleníkových plynov a iných znečisťujúcich látok počas ich výroby a používania.

Dedivosť – podiel genotypovej zložky na celkovom prejave vlastnosti (fenotype).

Deň prekročenia Zeme - dátum, kedy dopyt ľudstva po ekologických zdrojoch a službách v danom roku prevyšuje to, čo môže Zem v danom roku regenerovať.

Dihaploid – rastlina odvodená z haploidnej bunky, ktorej počet chromozómov sa spontánne alebo chemicky zdvojnásobil.

DNA markery – DNA sekvencia so známou lokalizáciou na chromozóme, ktorá môže byť použitá na identifikovanie jedinca alebo geneticky viazaného znaku a vlastnosti.

Dohovor o biologickej diverzite - medzinárodný právny nástroj na ochranu biologickej diverzity, trvalo udržateľné využívanie jej zložiek a spravodlivé zdieľanie výhod plynúcich z využívania genetických zdrojov.

Domestikácia – adaptovanie zvierat alebo rastlín v priebehu času, z divokého alebo prirodzeného stavu, najmä selektívnym šľachtením, na život v úzkom spojení s ľuďmi a v prospech ľudí.

Donor – darca.

Druhovú diverzitu - počet druhov a početnosť každého druhu, ktoré žijú na určitom mieste.

Editovanie génov – úprava genetického kódu organizmu, pri ktorej sa v DNA jeho genómu vykonávajú zmeny vkladáním, odstraňovaním, úpravou alebo nahrádzaním.

Ekologická stopa - ukazovateľ, ktorý vyjadruje množstvo prírodných zdrojov, ktoré ľudia spotrebujú, a aký to má vplyv na životné prostredie.

Ekosystémová biodiverzita - zaoberá sa štúdiom rôznych ekosystémov v určitej lokalite a ich celkovým vplyvom na človeka a životné prostredie ako celok.

Ekosystémová integrita - široké označenie úplnosti a funkčnosti ekosystému a jeho ekologických procesov.

Elicitácia – navodenie chemického alebo fyzikálneho stresu aplikovaním rôznych biotických a abiotických elicitorov.

Elicitor – faktor stimulujúci odpoveď rastliny na stres produkciou sekundárnych metabolitov.

Embryokultúry – kultivácia izolovaných nezrelých a zrelých embryí v *in vitro* kultúrach.

Emulgácia – proces miešania dvoch kvapalín, ktoré sú za normálnych podmienok nemiešateľné, s cieľom pripraviť emulziu.

Endosperm – vnútorná vrstva semena; pletivo, ktoré obklopuje embryo v semene rastlín a tvorené je látkami potrebnými pre reguláciu a výživu embrya v prvých fázach jeho vývinu pri klíčení.

Enkapsulácia – obalovanie, opúzdrovanie; proces uzatvárania pevných častíc alebo plynov do inertného polymérneho obalu, ktoré sú tým chránené a izolované pred vonkajším prostredím. Týmto procesom dochádza k zlepšeniu vstrebateľnosti látok v ľudskom tele

(napr. železo), predĺženiu životnosti produktov a zamedzeniu nežiadúcich vedľajších účinkov. Enkapsulácia tiež mení skupenstvo a hustotu látky, napr. nutraceutika.

Enkapsulácia (pri rastlinách) – technika na uzatváranie častí rastlín (somatických embryí, meristemických pletív, rastových vrcholov) do alginátových kapsúl obsahujúcich nutričné zložky, prípadne aj rastové regulátory.

Envirostratégia 2030 - stratégia environmentálnej politiky Slovenskej republiky do roku 2030 pre oblasť životného prostredia s dlhodobými cieľmi zameranými na prechod k zelenému, nízko uhlíkovému a inkluzívnemu hospodárstvu.

Estrálny cyklus (estrus) - súbor opakujúcich sa fyziologických zmien vyvolaných reprodukčnými hormónmi samíc cicavcov.

Explantát – časť rastlinného pletiva, získaná z ľubovoľnej časti rastliny, ktorý sa používa ako východiskový materiál pre kultiváciu in vitro na regeneračné alebo neregeneračné účely.

Extrúzia – proces spracovania krmiva za vysokého tlaku a teploty.

FAD2 – molekula (flavínadenín-dinukleotid) s oxidačnoredukčnými vlastnosťami. Je súčasťou dôležitých enzýmov.

Fermentácia – anaeróbny biologický proces, ktorým živé mikroorganizmy premieňajú uhl'ovodíky (cukry a škroby) na jednoduchšie látky.

Fermentácia – proces premeny organických látok pomocou enzýmov obsiahnutých v mikroorganizmoch, ktorý v potravinárstve môže spôsobiť zmenu potravy v zmysle vyššej nutričnej kvality, vyššej stráviteľnosti a konzervovania (označuje sa aj ako kvasenie).

Forezná mikrobiológia - vedná disciplína, ktorá sa opiera o poznatky z mikrobiológie, mikrobiálnej ekológie, epidemiológie verejného zdravia, mikrobiálnej genomiky a toxikológie, bioinformatiky, genetického inžinierstva a procesného inžinierstva.

Funkčná diverzita - počet rôznych druhov žijúcich v regióne, ich vzájomné vzťahy a ich funkcie v ekosystéme ako napr. potravinové vzťahy.

Funkčná potravina – potravina prirodzená alebo spracovaná, ktorá obsahuje ako doplnok k jej nutričným komponentom zložky prospešné pre zdravie, fyzické schopnosti a duševnú pohodu človeka.

Fúzia protoplastov – typ genetickej modifikácie pri rastlinách, pri ktorej sa spájajú dva protoplasty z odlišných druhov rastlín, aby vytvorili somatický hybrid – novú hybridnú rastlinu s charakteristikami oboch.

Fytoextrakcia – metóda fytoremediácií, založená na schopnosti rastliny prijímať a akumulovať niektoré znečisťujúce látky vo svojom organizme počas vegetácie na kontaminovanej pôde.

Fytofiltrácia (rizofiltrácia) – metóda fytoremediácií, založená na schopnosti rastlinných koreňov odstraňovať kontaminanty z vody a vodných systémov.

Fytonutrient – tiež známe ako fytochemikálie, sú bioaktívne zlúčeniny produkované rastlinami a akumulované v rôznych častiach, najmä v dôsledku sekundárneho metabolizmu. Fytonutrienty nie sú nevyhnutné pre náš život, na rozdiel od vitamínov a minerálov, ale ich konzumácia pomáha predchádzať chorobám a udržať telo v správnej funkcii. Majú vysoký oxidačno-redukčný potenciál, ich funkciou je spomaľovať alebo rušiť nežiaduce oxidačné reakcie už na intracelulárnej úrovni. Dokážu odstraňovať reaktívne formy kyslíka a iné voľné radikály, redukovať medzi produkty reťazových oxidačných zmien a tlmiť aktivitu endogénnych antioxidantných enzýmov.

Fytoremediácie – technológie využívajúce živé rastliny na čistenie pôdy, vody a vzduchu kontaminovaných nebezpečnými kontaminantmi.

Fytoastabilizácia – metóda fytoremediácií, pri ktorej rastlina obmedzuje rozpustnosť cudzorodej látky v prostredí alebo ju mení na menej prijateľnú.

Fytoastimulácia – metóda fytoremediácií, pri ktorej rastlina vo svojej koreňovej sfére alebo rizosfére zvyšuje aktivitu mikroorganizmov rozkladajúcich organické kontaminanty v pôde.

Fytovolatilizácia – metóda fytoremediácií, pri ktorej rastlina prijíma kontaminanty koreňmi a ich premieňa ich plynné skupenstvo a uvoľňuje do atmosféry.

Gaméta – pohlavná bunka.

Genetická diverzita – genetická a biologická variabilita prítomná v rámci druhu.

Genetická modifikácia – technika na zmenu charakteristík organizmu prenosom časti DNA z jedného organizmu do iného organizmu.

Genetická väzba – vyjadruje vzájomnú blízkosť génov alebo iných sekvencií DNA lokalizovaných na tom istom chromozóme (čím bližšie sú pri sebe, tým väčšia je pravdepodobnosť, že budú zdedené spolu, tým je genetická väzba silnejšie).

Genetické znečistenie - nekontrolovaný tok génov z geneticky modifikovaných organizmov do voľne žijúcich populácií alebo kríženie medzi domestikovanými a divo rastúcimi druhmi.

Genetický „drift“ - náhodná zmena frekvencie alel v populácii z generácie na generáciu spôsobená mechanizmom pohlavného rozmnožovania.

Geneticky modifikovaná rastlina – rastlina, ktorej genetický materiál bol zmenený spôsobom, ktorý sa prirodzene pri pohlavnom rozmnožovaní a prirodzenej rekombinácii nevyskytuje.

Genetický zdroj – akýkoľvek materiál rastlinného, živočíšneho, mikrobiálneho alebo iného pôvodu obsahujúci funkčné jednotky dedičnosti.

Génová banka – technické zariadenie, v ktorom sa uchovávajú genetické zdroje v zbierkach semien, rastlín, pletivových kultúr, kryokonzervovaných častí potenciálne užitočných druhov, najmä druhov obsahujúcich gény dôležité pre šľachtenie rastlín.

Génová rodina – skupina príbuzných génov, ktoré kódujú podobné bielkovinové produkty a ktoré vznikli historicky postupnou duplikáciou génov a mutáciami počas evolúcie. Kódované proteíny môžu získavať nové funkcie a gény z jednej génovej rodiny (prípadne superodiny) sú buď zoradené na jednom chromozóme, ale často sú rozptýlené v celom genóme na viacerých chromozómoch.

Gnotobiológia – náuka o bezmikróbnych živočíchoch.

Graafov folikul – dutina vznikajúca vo vaječníku, v tekutine ktorej sa nachádza vajíčko (oocyt), steny Graafovej folikuly produkujú samičie hormóny.

GRAS („Generally Recognized As Safe“) - mikroorganizmy, ktoré sú všeobecne považované za bezpečné, nepredstavujúce žiadne alebo minimálne riziko pre človeka a životné prostredie.

GWAS („Genome Wide Association Studies“) – porovnávanie genetických variantov v genóme s prejavmi vo fenotype.

Gynogenéza – vývoj haploidnej rastliny zo samičieho gametofytu – z neoplodneného vajíčka, vaječníku, alebo kvetných púčikov.

„Hairy roots“ - zvláštny typ „vlasových“ koreňov vytvorených po genetickej transformácii rastliny baktériou *Agrobacterium rhizogenes*.

Haploid – jedinec s jednou (polovičnou) sadou chromozómov vo svojich bunkách.

Haploidný – polovičný počet (jedna sada, zostava) chromozómov.

Hemostáza – schopnosť organizmu zrážaním krvi zastaviť krvácanie.

Heterokaryon – viacjadrová bunka obsahujúca geneticky odlišné bunkové jadrá.

Heterologická bielkovina – cudzia bielkovina produkovaná introdukovaným génom pochádzajúcim z iného organizmu.

Hotspots - oblasti s najrozmanitejšou biodiverzitou na svete.

Hydrogél – gélovitý produkt vyrobený z polymérnej látky nerozpustnej alebo len čiastočne rozpustnej vo vode, ktorého hlavnou schopnosťou je viazať vodu, napučať vo vode a zväčšiť niekoľkonásobne objem bez straty materiálovej súdržnosti.

Hyperakumulátor (rastlinný) – rastlina schopná rásť v pôde alebo vo vode s vysokou koncentráciou kontaminantov.

Chemoterapia – technika eliminácie rastlinných patogénov, zvlášť vírusov, pomocou chemických látok.

IGF-I – inzulínu podobný rastový faktor 1.

In planta technika – technika na genetické modifikácie rastlín intaktných rastlín alebo rastlinných tkanív bez in vitro kultúry, najznámejšou a najpoužívanejšou je metóda ponárania kvetných púčikov („floral dip“) do suspenzie *Agrobacterium tumefaciens*.

In vitro – z latinčina „v skle (napr. v skúmavke, Petriho miske, kultivačnej nádobe)“, postupy, testy a experimenty vykonávané mimo živého organizmu, v kontrolovanom prostredí.

In vitro mutagenéza – mutagenéza vykonávaná (indukovaná) v in vitro podmienkach.

Industrializácia - proces prechodu z poľnohospodárskej ekonomiky na ekonomiku založenú na priemyselnej výrobe.

Intaktnosť ekosystému - ekosystém sa samoorganizuje alebo sa sám opravuje; a po narušení sa vráti do stavu celistvosti.

Intragenóza – prenos nových kombinácií génov a regulačných sekvencií vlastných alebo pochádzajúcich z rovnakého druhu.

Invázne druhy – nepôvodné druhy, ktoré sa na novom území rýchlo rozšírili a ohrozujú biodiverzitu.

Izoformy enzýmov – mnohopočetné formy enzýmov pochádzajúce z toho istého génu, ktoré sa líšia rozdielnymi posttranslačnými modifikáciami alebo alternatívnym zostrihom. Môžu katalyzovať rôzne reakcie.

Izotonický roztok – roztok, ktorý má rovnaký osmotický tlak ako porovnávaný roztok.

Jedlá vakcína – potravina, typicky rastlina alebo jej časť (plod, semeno, vegetatívna časť), pôsobiaca ako vakcína proti určitej chorobe, po orálnom požití stimuluje imunitný systém (slizničný aj humorálny).

Kalus (in vitro) – masa nediferencovaných a neorganizovaných buniek vzniknutá na explantáte *in vitro*, ako odpoveď na poranenie a stimuly, najčastejšie na prítomné rastové regulátory.

Kapacitácia – dozrievanie spermie v reprodukčnom trakte samice.

Kartagénsky protokol - protokol o biologickej bezpečnosti k Dohovoru o biologickej diverzite, medzinárodná dohoda zameraná na reguláciu cezhraničného pohybu geneticky modifikovaných organizmov a ich použitie.

Klíringové stredisko biologickej bezpečnosti - systém, ktorý bol vytvorený ako súčasť Kartagénskeho protokolu o biologickej bezpečnosti. Cieľom je zdieľanie informácií a

podpora transparentnosti v oblasti geneticky modifikovaných organizmov a ich cezhraničného pohybu.

Knockdown génu – zníženie expresie génu, umlčanie génu.

Koleoptila – časť embrya obilnín (*Poales*) často považovaná za prvý list; pošva, ktorá kryje základ výhonku, predlžuje sa pri klíčení embrya a chráni mladý výhonok pri prerastaní v pôde.

Konverzia krmiva – množstvo produktu (prírastok živej hmotnosti, produkcia mlieka) na jednotku krmiva.

Koreňové kultúry – typ *in vitro* kultúry iniciovaný z odobraných a kultivovaných koreňových segmentov.

Kryokonzervácia – metóda zachovania biologických materiálov (napr. genetických zdrojov rastlín aj živočíchov) hlbokým zmrazovaním v tekutom dusíku.

Kryoprotektant – chemická látka, ktoré účinne dehydratuje rastlinný materiál a indukuje kryoprotektívny proces, čo chráni bunky a pletivá pred poškodeným nízkou teplotou, látka zabráňujúca tvorbe ľadových kryštálov v zamrazovaných bunkách.

Kryoterapia – metóda umožňujúca eradikáciu fytopatogénov (vírusov, fytoplaziem, baktérií) v tekutom dusíku postupmi kryokonzervácie.

Kultúra nodálnych článkov – mikropropagačná technika *in vitro* využívajúca nodálny segment stonky obsahujúci axilárny meristém.

Laboratórium obleku – laboratórium typu BSL-4, v ktorom pracovníci nosia celotelové, vzduchom zásobované obleky.

Lipozómy – synteticky pripravené guľovité štruktúry z lipidovej dvojvrstvy, ktoré slúžia ako vehikulum (nosiť, prostredník) na dopravenie vitamínov alebo liečiv na požadované miesto v organizme.

Lokus génový – lokalizácia génu na ramene chromozómu.

Makroživiny – primárne metabolity ako sacharidy, tuky a proteíny nevyhnutné pre správne fungovanie organizmu, organizmus ich produkuje vo veľkých množstvách a vo veľkých množstvách ich aj potrebuje prijímať.

Markerom asistovaná selekcia (MAS) – nepriamy selekčný proces, pri ktorom sa znak (gén), ktorý je predmetom záujmu, vyberá na základe znaku (markeru), ktorý je v genetickej väzbe so znakom (génom).

Meristém – pletivá špecializované na tvorbu nových buniek, ktoré sa následne diferencujú a menia na bunky všetkých pletív rastliny.

Meristémová kultúra – mikropropagačná technika využívajúca meristémy.

Mikropropagácia – klonálne rozmnožovanie rastlín v *in vitro* kultúrach, produkcia klonov.

Mikrospórové kultúry – technika kultivácie mikrospór (samčieho gametofytu) *in vitro* s cieľom produkovať haploidné rastliny.

Mikroživiny – vitamíny a minerálne látky, ktoré organizmus potrebuje prijímať v menších dávkach ako makroživiny.

Molekulárne biotechnológie – použitím laboratórnych techník na štúdium a modifikáciu nukleových kyselín a proteínov, je výsledkom konvergencie viacerých oblastí výskumu, ako sú molekulárna biológia, mikrobiológia, biochémia, imunológia, genetika a bunková biológia. Vyvíja produkty a služby hlavne pre farmaceutický a potravinársky priemysel a poľnohospodárstvo.

Molekulárne poľnohospodárstvo (farmárstvo) – produkcia najmä farmaceuticky dôležitých a komerčne cenných rekombinantných bielkovín v rastlinách.

Molekulárne šľachtenie – technika používania DNA markerov úzko spojených s fenotypovými znakmi v selekcii jedincov z potomstva, pre konkrétny šľachtiteľský cieľ.

Molekulárny marker – molekula (bielkovina, DNA) alebo jej časť, ktorá môže byť použitá na identifikovanie jedinca alebo geneticky viazaného znaku a vlastnosti.

Mutačné šľachtenie – šľachtenie využívajúce fyzikálne alebo chemické mutagény na vyvolanie genetických variácií (mutácií) v rastlinách na vývoj nových odrôd.

Nagojský protokol - medzinárodná dohoda, ktorá sa zameriava na prístup k genetickým zdrojom a spravodlivé rozdelenie výhod, ktoré z nich vyplývajú.

Natura 2000 – európska sústava chránených území členských štátov EÚ, ktorá bola vytvorená za účelom zachovania najcennejších a ohrozených druhov a biotopov Európy.

Nidácia – proces vnorenia vyvíjajúceho sa embrya (blastocysty) do steny matrice.

Nutričná hodnota krmiva – obsah živín v jednotlivých zložkách krmiva.

Odroda – skupina rastlín, v rámci najnižšieho známeho botanického triedenia, ktorú možno definovať podľa prejavu znakov vyplývajúcich z daného genotypu alebo kombinácie genotypov, odlíšiť od akejkoľvek inej skupiny rastlín podľa prejavu najmenej jedného znaku a považovať za jednotnú s ohľadom na jej schopnosť nemeniť sa pri rozmnožovaní.

Okyslenie oceánov – zníženie pH oceánu počas dlhšieho časového obdobia, ktoré je spôsobené predovšetkým pohlcovaním oxidu uhličitého z atmosféry.

Omnipotentná bunka – schopná diferenciacie na ktorúkoľvek bunku tela.

Organogénéza – tvorba orgánov z kultivovaných rastlinných explantátov *in vitro*.

Organoleptický – vnímateľný zmyslami, napr. organoleptická vlastnosť v potravinárstve predstavuje charakteristiky, ktoré je možné hodnotiť ľudskými zmyslami, zmyslové

posudzovanie využívajúce hlavné zmyslové vnemy na hodnotenie vlastností výrobku (napr. vzhľad, vôňa, chuť, teplota a podobne).

Ovulácia – prasknutie Graafovho folikulu a uvoľnenie vajíčka schopného oplodnenia.

Označovanie geneticky modifikovaných organizmov (GMO) - informácia na etikete výrobku o tom, že GMO bolo zámerne použité v potravinárskom výrobku.

Parížska dohoda - akčný plán na obmedzenie globálneho otepľovania.

Patogenita - schopnosť niektorých mikroorganizmov spôsobiť ochorenie. Výsledok infekcie závisí od vlastností patogénu (virulencia, invazívnosť, toxické alebo alergénne účinky), ale aj od stavu imunity hostiteľa.

Peľnicová kultúra – technika kultivácie peľníc, obsahujúcich samčí gametofyt *in vitro* s cieľom produkovať haploidné rastliny.

Pleiotropia – stav, kedy jeden gén ovplyvňuje viacero fenotypových prejavov.

Plemenitba – cieľavedomé rozmnožovanie zvierat s cieľom udržať alebo zlepšiť ich znaky a vlastnosti.

Plemenná hodnota – odhad pôsobenia genotypu zvierateľa na úžitkovú vlastnosť vyjadrený ako odchýlka od priemeru tejto vlastnosti pri vrstovníkoch.

Plodina – úžitkový rastlinný druh, rastlina, ktorú ľudia pestujú a využívajú.

Podvýživa – nedostatok potravy na zabezpečenie výživových a energetických potrieb organizmu.

Polymerizácia – proces, pri ktorom sa molekuly základnej látky (monoméry) zlučujú do väčších celkov (makromolekuly, polymérne látky) bez toho, aby vznikol nejaký vedľajší produkt.

Polymorfizmus – výskyt dvoch alebo viacerých foriem jedného znaku v populácii

Postprandiálny – objavujúci sa po jedle. Napr. postprandiálna glykémia vyjadruje hodnotu cukru v krvi po jedle a vypovedá o tom, ako sa organizmus diabetika vyrovnal s príjmom jedla.

Potrava – všetky suroviny slúžiace na výživu.

Potravinárske suroviny – produkty poľnohospodárskej výroby, prírodné rastliny a voľne žijúce zvieratá slúžiace priamo alebo nepriamo ako potrava.

Potravinová pyramída – schéma navrhovaného množstva rôznych druhov potravín v dennom jedálničku človeka.

Potravinová vláknina – jedlý rastlinný a živočíšny materiál, ktorý nie je hydrolyzovaný endogénnymi enzýmami ľudského tráviaceho systému, čiastočne alebo úplne je hydrolyzovaný črevnou mikrobiotou a je stanovovaný akceptovateľnými metódami.

Potravinové biotechnológie – využitie biotechnologických princípov v produkcii potravín s cieľom poskytnúť bohatšie, lacnejšie a výživnejšie zásoby potravín pre uspokojenie potrieb rastúcej globálnej populácie.

Poživatiny – potrava slúžiaca na výživu ľudí, ktorú delíme na potraviny, pochutiny a nápoje.

Prebiotikum – zložka potravín, ktorá nie je hydrolyzovaná enzýmami tráviaceho traktu človeka, selektívne stimuluje rast a/alebo aktivitu probiotických mikroorganizmov v hrubom čreve a ďalších mikroorganizmov prirodzene sa vyskytujúcich v tráviacom trakte.

Prekurzor – východisková látka; zložka, z ktorej vzniká chemickou premenou výsledný produkt.

Princíp predbežnej opatrnosti - ak existuje hrozba vážneho a nezvratného poškodenia, nedostatok úplnej vedeckej istoty sa nesmie použiť ako dôvod na odloženie nákladovo efektívnych opatrení na zabránenie zhoršovaniu životného prostredia.

Princíp prevencie - vychádza z poznania, že dôsledky poškodenia životného prostredia sú často nenapraviteľné a je im preto nutné predchádzať priamo pri zdroji, minimalizovať nepriaznivé dôsledky činností na životné prostredie, posudzovať vplyvy činností na životné prostredie, uskutočňovať opatrenia k odvráteniu hrozby alebo k zmierneniu následkov na životné prostredie.

Princípalizmus označuje etické princípy, ktorými sa riadi rozhodovanie v oblasti bioetiky.

Prirodzený výber - proces, pri ktorom sa mení genofond populácie v dôsledku rozmnožovania jedincov, ktorí dokážu odolávať zmenám prostredia.

Probiotikum – živé organizmy, ktoré pri podávaní v primeranom množstve prispievajú k zdraviu hostiteľa.

Proces autorizácie - administratívny proces zo strany EÚ na udelenie súhlasu, na základe ktorého geneticky modifikované organizmy (GMO) alebo potravinové výrobky odvodené z GMO získajú súhlas a možno ich uviesť na trh v EÚ.

Propagula – časť organizmu rastliny, z ktorej sa dá rastlina rozmnožiť.

Protoplast – rastlinná bunka, ktorej bunková stena bola odstránená, obalená iba cytoplazmatickou membránou.

Prvojadro - haploidné jadro samčej a samičej gaméty v zygote až do času fúzie pri oplodnení.

Pseudoobilniny – druhy rastlín podobné obilninám v tom, že ich hlavnou zásobnou látkou semena je škrob a majú rovnaké hospodárske využitie ako obilniny, ale nepatria medzi trávy (rod *Poales*). V potravinárstve sa s obľubou využívajú ako náhrada pšenice pre ľudí s intoleranciou na lepok, napr. laskavec, proso, mrlík, pohánka.

Receptor - špecifická štruktúra, ktorá je schopná prijať signál s fyzikálnou alebo chemickou podstatou.

Recipient – prijímateľ.

Rekombinovaná bielkovina – bielkovina kódovaná rekombinovanou DNA.

Reológia – náuka o tokových vlastnostiach látok (nielen tekutých, ale aj plynných a za istých okolností aj pevných) v závislosti od podmienok okolitého prostredia. V potravinárstve sa často reologicky meria škrob a potraviny, ktoré ho obsahujú, napr. múky.

Retrogradácia – útlm, pokles, ústup, regresia, spätný alebo spiatočný proces; proces vylúčenia, tzv. vyvločkovania amylozy z roztokov škrobu.

Riziko - situácia, keď dané okolnosti môžu predstavovať nebezpečenstvo, je to teda možnosť vzniku nepriaznivej (nebezpečnej) udalosti.

RNA interferencia (RNAi) – post-transkripčné umlčanie génov regulujúce expresiu génu kódujúceho bielkovinu.

Rukavicový box - biologicky bezpečný kabinet triedy III, v ktorom pracovníci manipulujú s infekčným materiálom vo vnútri kabinetu pomocou rukavíc, čo zaisťuje fyzickú bariéru.

Ruminálny – bachorový

Saccharomyces cerevisiae – kvasinka, jednobunkový eukaryotický mikroorganizmus známy už od ranných čias biotechnológií pre svoje fermentačné vlastnosti.

Sekundárny metabolit – produkt metabolizmu rastliny, ktorý nie je nevyhnutný pre jej normálny rast, vývoj alebo reprodukciu organizmu, slúžiaci na zabezpečovanie sekundárnych požiadaviek (obrane proti patogénom, škodcom a iným biotickým a abiotickým stresom).

Sekvenovanie – určenie poradia nukleotidov v DNA.

Selekčné markerové gény – gény vnášané do genómu hostiteľa s cieľom zabezpečiť selekčnú výhodu pre bunky, ktoré prijali cudziu DNA.

Selektívne šľachtenie – po vykonaní umelého kríženia (hybridizácie) rodičovských rastlín sa z množiny vytvoreného potomstva selektujú žiadani jedinci.

Sloboda voľby - zabezpečená možnosť použiť alebo odmietnuť geneticky modifikované organizmy (GMO) a výrobky z GMO, resp. s obsahom GMO.

Somaklon – rastlina, ktorá bola regenerovaná v kultúre *in vitro* zo somatických buniek materskej rastliny.

Somaklonálna variabilita – variácie, ktoré vznikli v rastlinách, ktoré boli produkované, alebo prešli *in vitro* kultúrou.

Somatická embryogenéza – proces, pri ktorom somatické embryo a rastlina z neho regenerovaná pochádzajú z jedinej somatickej bunky.

Somatická hybridizácia – asexuálna hybridizácia fúziou protoplastov *in vitro*, za vzniku hybridnej bunky a regenerovanej hybridnej rastliny.

Somatické embryo – embryo podobné zygotickému embryu vytvorené zo somatickej bunky, schopné vyvinúť sa (regenerovať) na kompletnú rastlinu.

Somatický hybrid (symetrický) – hybridná rastlina s charakteristikami oboch rodičov, vzniknutá po fúzii protoplastov a splynutí jadier oboch protoplastov.

Stráviteľnosť – schopnosť organizmu rozložiť a využiť jednotlivé zložky krmiva.

Summit Zeme (Konferencia OSN o životnom prostredí a rozvoji) - jedna z najväčších a najvýznamnejších medzinárodných konferencií venovaných otázkam životného prostredia a udržateľného rozvoja, ktorá sa konala v roku 1992 v Riu de Janeiro (Brazília). Summit zjednotil svetových lídrov, odborníkov a aktivistov, aby prijali opatrenia na riešenie globálnych environmentálnych problémov.

Superovalácia – zvýšený počet ovulácií pri podaní exogénnych hormónov.

Syndróm kolapsu včiel - jav, ku ktorému dochádza, keď väčšina včiel robotníc v kolónii zmizne a zanechá po sebe kráľovnú, veľa potravy a niekoľko včelích sestier, ktoré sa starajú o zostávajúce nezrelé včely a kráľovnú.

Šľachtenie – proces, ktorým sa objavujú, vytvárajú a vyvíjajú nové odrody rastlín a ktorým sa udržiavajú ich znaky a vlastnosti počas rozmnožovania. Zlepšujú sa úžitkové a iné znaky a vlastnosti rastlín tvorivou vedecko-výskumnou činnosťou človeka, na účely objavenia, vytvorenia alebo vyvinutia novej odrody.

Štokholmská deklarácia - jeden z prvých významných medzinárodných dokumentov, ktorý uznal potrebu globálnej spolupráce v oblasti ochrany životného prostredia a udržateľného rozvoja.

Taxonomická diverzita - počet rôznych druhov žijúcich v regióne a ich vzájomné vzťahy.

Termoterapia – metóda eradikácie fytopatogénov (hlavne vírusov) s použitím zvýšenej teploty v kultivovaných meristemických pletivách rastliny *in vitro*.

Textúra – vnútorná štruktúra, stavba, vnútorné usporiadanie alebo zloženie; v potravinárstve je to súbor vlastností požívateľin vnímaný zmyslami - v ústach, hmatom a zrakom.

Tok génov - prenos genetického materiálu z jednej populácie na druhú.

Totipotencia – schopnosť bunky vytvoriť akýkoľvek iný typ bunky organizmu vďaka obsahu kompletnej genetickej informácie pre celý organizmus a schopnosti diferenciácie.

Transgén – gén, ktorý je prirodzeným spôsobom, alebo technikami genetického inžinierstva, prenesený z jedného organizmu do druhého.

Transgenóza – prenos génu a regulačných sekvencií cudzích, z nepríbuzného a nekrížiteľného druhu.

Trvalo udržateľný rozvoj - koncept rozvoja, ktorý uspokojuje potreby súčasnej generácie bez toho, aby ohrozoval schopnosť budúcich generácií uspokojovať svoje vlastné potreby.

Uhlíková neutralita - stav, pri ktorom je celkové množstvo emisií oxidu uhličitého produkovaných ľudskou činnosťou vyvážené rovnakým množstvom CO₂, ktoré je odstránené z atmosféry alebo kompenzované rôznymi opatreniami.

Uhlíková stopa - objem emisií takých plynov (predovšetkým oxidu uhličitého a iných zlúčenín uhlíka), ktoré majú dopad na podnebie Zeme, pričom tieto emisie sú spôsobené človekom.

Vajíčková kultúra (ovokultúra) – *in vitro* kultivácia nezrelých, neopelených vajíčok (samičieho gametofytu) s cieľom produkovať haploidy.

Vákuová infiltrácia – technika infiltrácie *Agrobacterium tumefaciens* hlboko do rastlinného pletiva pomocou vákua.

Viskozita potravinovej vlákniny – schopnosť zložiek potravinovej vlákniny viazať vodu a vytvárať tak gélovitý roztok (viskozita = odpor tekutiny proti toku alebo zmene tvaru).

Vitrifikácia – proces, kedy sa normálne bunky rastliny alebo explantátu v *in vitro* kultúre stanú hyperhydrickými v dôsledku vysokého obsahu vody (sú sklovité, priesvitné).

Výživa – súbor procesov, ktorými organizmus prijíma a zužitkúva v jedle obsiahnuté látky za účelom príjmu energie, látok na stavbu a obnovu telesných tkanív a látok na zabezpečenie a reguláciu životne dôležitých procesov a fyziologických funkcií.

Vzdialená hybridizácia – kríženie (hybridizácia) medzi jedincami patriacimi do dvoch rôznych druhov alebo rodov.

Xenotransplantácia – prenos tkaniva alebo orgánu z iného druhu do organizmu človeka.

Zámerné uvoľnenie geneticky modifikovaných organizmov - znamená akékoľvek úmyselné zavedenie GMO, pre ktoré sa nepoužili žiadne kontrolné opatrenia na ohraničenie ich kontaktu s obyvateľstvom a životným prostredím s cieľom poskytnúť im vysokú úroveň bezpečnosti.

Zdravá strava – vyvážená zmes rôznych potravín poskytujúcich spoločne všetky základné

Zelené biotechnológie – biotechnológie aplikované v poľnohospodárstve a lesníctve.

Zjednodušenie ekosystému - premena rôznorodých ekosystémov na jednoduchšie, zníženie rozmanitosti druhov, štruktúr a vzťahov v ekosystéme.

Zlatá ryža – geneticky modifikovaná ryža, ktorá dokáže vo svojich semenách akumulovať β -karotén, ktorý je prekurzorom vitamínu A.

Zygota – diploidná bunka vzniknutá po splynutí samčej a samičej gaméty.

Zygotické embryo – embryo vzniknuté zo zygoty, ktorá je výsledkom splynutia gametických (pohlavných) buniek – vajíčka a peľového zrna.

Živina – látka, ktorú organizmus využíva pre svoje životné pochody.

Živý modifikovaný organizmus - akýkoľvek živý organizmus s novou kombináciou genetického materiálu vytvoreného modernými biotechnológiami.

Živý organizmus - akéhokoľvek biologický jedinec schopný prenosu alebo replikácie genetického materiálu vrátane sterilných organizmov, vírusov a viroidov.

Rastlinné, živočíšne a potravinárske biotechnológie, ich regulácia a biologická bezpečnosť

Vysokoškolská učebnica

Autori:

Prof. RNDr. Ján Kraic, PhD (6,2 AH)

Doc. RNDr. Ján Rafay, CSc. (2,9 AH)

Doc. RNDr. Michaela Havrlentová, PhD. (6,2 AH)

Doc. Ing. Jana Moravčíková, PhD (6,2 AH)

Recenzenti:

Prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc.

Prof. Ing. Katarína Ražná, PhD.

Doc. RNDr. Ján Salaj, DrSc.

Vydavateľ: Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Fakulta prírodných vied, 2024

Vydanie: prvé, online www.ucm.sk/files/sk/ine-pracoviska/centrum-informacnych-zdrojov-ucm-trnave/referat-informacnych-sluzieb/e-zdroje/ucebne-texty-k-stiahnutiu/rastlinne.pdf

Počet strán: 405 (21,5 AH)

ISBN 978-80-572-0480-0