

Centrum výskumu rastlinnej výroby

Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany

Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovenská republika

Tel.: +421-33-7722311, +421-33-7722312, +421-33-7722326, +421-33-7722327,

Fax.: +421-33-7726306

ŽIADOSŤ

**O VYDANIE SÚHLASU SO ZAVEDENÍM GENETICKY
MODIFIKOVANÝCH VYŠŠÍCH RASTLÍN DO ŽIVOTNÉHO
PROSTREDIA ZA ÚČELOM REALIZÁCIE POĽNÝCH POKUSOV**

**Línie a hybridy odvodené z cukrovej repy H7-1
(KM-000H71-4)**

Splnomocnená osoba:

doc. RNDr. Ján Kraic, PhD.
riaditeľ CVRV – VÚRV Piešťany

OBSAH

Zoznam pôvodných skratiek v angličtine	3
Časť A: Všeobecné náležitosti žiadosti	
1. Názov projektu	4
2. Žiadateľ	5
3. Poverený zástupca žiadateľa	7
4. Charakteristika nakladania s geneticky modifikovaným organizmom	7
5. Doba zavádzania do životného prostredia	8
6. Zavádzanie rovnakého GMO do životného prostredia v EU alebo mimo EU	9
7. Podané žiadosti do životného prostredia rovnakého GMO v EU	9
8. Podané žiadosti do životného prostredia rovnakého GMO mimo EU	9
9. Hodnotenie rizika zavádzania GMO do životného prostredia	10
Časť C: Ďalšie náležitosti žiadosti pre geneticky modifikované vyššie rastliny	
1. Údaje o príjemcovi, prípadne (kde je to aplikovateľné) o rodičovskom organizme	25
2. Údaje týkajúce sa geneticky modifikovanej rastliny	30
3. Údaje o množstve geneticky modifikovaných vyšších rastlín, ktoré majú byť použité, a o celkovej rozlohe pozemkov	59
4. Pracoviská a pozemky, na ktorých bude zavádzanie do životného prostredia prebiehať	60
5. Opis nakladania s geneticky modifikovanými vyššími rastlinami	63
6. Opatrenia na ochranu zdravia ľudí, zvierat, životného prostredia a biologickej rozmanitosti a nakladanie s odpadom	67
7. Zhrnutie informácií o plánovaných poľných pokusoch uskutočňovaných za účelom získania nových údajov o vplyve zavádzania geneticky modifikovaných vyšších rastlín do životného prostredia na zdravie ľudí, zvierat a životné prostredie	72
Zoznam literatúry	73
Prílohy	
č. 1 Mapa Borovce	
č. 2 Havarijný plán Borovce	
č. 3 Posudok z hodnotenia rizika	
č. 4 Informácia o spracovaní odpadu	
č. 5 Summary Notification Information Format (SNIF) for the release of GMHP	

ZOZNAM SKRATIEK

bp	nukleotidové páry báz
°C	stupne Celzia
CMS	cytoplazmatická samčia sterilita
Da	Dalton
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EFSA	Európsky úrad pre potravinovú bezpečnosť (European Food Safety Authority)
ELISA	imunoabsorpčná enzýmová analýza (Enzyme-linked immunosorbent assay)
ERA	posudzovanie rizika pre životné prostredie (Environmental risk assessment)
EU	Európska únia
FMV	vírus mozaiky krtičníka (Figworth mosaic virus)
fw	čerstvá hmotnosť
GM	geneticky modifikovaný
GMVR	geneticky modifikovaná vyššia rastlina
kb	nukleotidová kilobáza
kDa	kiloDalton
LB	ľavá hraničná sekvencia
NA	bezpredmetné (not applicable)
OECD	Organizácia pre ekonomickú spoluprácu a rozvoj
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PEP	fosfoenolpyruvát
RB	pravá hraničná sekvencia
RNA	ribonukleová kyselina
S3P	šikimát-3-fosfát
sp.	druh (species)
ssp.	poddruh (subspecies)
T-DNA	prenášaná DNA (transferred DNA)
UK	Spojené kráľovstvo (United Kingdom)

ČASŤ A VŠEOBECNÉ NÁLEŽITOSTI ŽIADOSTI

1. Názov projektu

Žiadosť podľa smernice 2001/18/ES, časť B a zákona č.151/2002 Z.z. v platnom znení o vydanie súhlasu so zavedením geneticky modifikovaných (GM) línií a hybridov cukrovej repy do životného prostredia v Slovenskej republike v rámci projektu s názvom:

„Poľná skúška na posúdenie línií a hybridov cukrovej repy (*Beta vulgaris*), odvodených z geneticky transformovanej línie H7-1 odolnej voči herbicídu glyfozát.“
(*„Field evaluation of sugar beet (*Beta vulgaris*) lines and hybrids derived from transformation event H7-1 tolerant to the herbicide glyphosate.“*)

Jednoznačný identifikačný kód (podľa databázy OECD, Biotrack) pre cukrovú repu H7-1 je **KM-000H71-4**.

SESVanderHave má licenciu na používanie geneticky transformovanej línie H7-1 cukrovej repy a získal F1 hybridné rastliny krížením GM línie H7-1 s vlastnými (SESVanderHave) konvenčnými udržiavateľmi sterility cukrovej repy línií typu O. Zo spätných s líniami typu O sa môže vnesená vlastnosť kombinovať a fixovať do materského komponentu pre tvorbu línií so samčnou sterilitou a homozygotnou z hľadiska vlastnosti tolerancie ku glyfozátu. Takéto línie so samčou sterilitou hrížené s konvenčnými diploidnými opel'ovačmi sú používané na produkciu finálnych hybridných kombinácií, ktoré budú predmetom posudzovania v navrhovanej poľnej skúške.

Všetky spätné kríženia sa uskutočnili v posledných rokoch v skleníkoch belgického pracoviska SESVanderHave, ktorý je na to určený a osivo hybridov bolo vyprodukované v USA, kde je línia H7-1 deregulovaná a komercializovaná od r. 2008.

Genetický materiál, ktorý bude predmetom skúšania bude pozostávať z

⇒ maximálne päť (5) glyfozát-tolerantných hybridov cukrovej repy a

⇒ dvoch (2) ne-GM kontrolných odrôd cukrovej repy.

Realizácia poľných štúdií s hybridmi geneticky transformovanej cukrovej repy sa plánuje za účelom získania informácií týkajúcich sa agronomických vlastností a účinnosti GM cukrovej repy ohľadom na vnesenú vlastnosť tolerancie ku glyfozátu.

Cukrová repa H7-1 exprimuje bielkovinu 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázu (CP4 EPSPS) z kmeňa CP4 baktérie *Agrobacterium* spp., t.j. enzým, ktorý zabezpečuje toleranciu k herbicídom obsahujúcim ako aktívnu zložku glyfozát (N-[fosfonometyl] glycín). Hybridy cukrovej repy odvodené konvenčným šľachtením z línie H7-1 preto produkujú „transgénnu“ bielkovinu zdedenú z tejto GM línie cukrovej repy, t.j. bielkovinu CP4 EPSPS. Zamýšľané použitie testovaných GM cukrových riep je zabezpečenie tolerancie k herbicídom obsahujúcim glyfozát.

Pre uskutočnenie zamýšľaných poľných pokusov bolo vykonané hodnotenie environmentálneho rizika s cieľom posúdenia bezpečnosti pre človeka, živočíchy a životné prostredie. Hodnotenie environmentálneho rizika bolo vykonané na základe podstatnej zhody cukrovej repy H7-1 s konvenčnou cukrovou repou (s výnimkou zavedenej črty tolerancie ku glyfozátu), a na základe podrobnej charakterizácie novo exprimovaného proteínu CP4 EPSPS. Na základe tohto hodnotenia je možné súhrnne konštatovať, že riziko vyvolania nepriaznivých účinkov s dopadom na ľudské zdravie alebo zdravie živočíchov či prijímajúceho životného prostredia, vyplývajúce zo zámerného uvoľnenia cukrovej repy H7-

1, resp. línií a hybridov cukrovej repy odvodených z transformácie H7-1, je pre účely testovania v poľných skúškach zanedbateľné.

Poľné pokusy s líniami a hybridmi cukrovej repy, odvodenými z genetickej transformovanej línie H7-1 odolnými voči herbicídu glyfozát sú plánované na roky 2010-2012.

Žiadosti o zavedenie genetickej modifikovanej cukrovej repy H7-1 v zmysle Časti B Nariadenia 90/220/EEC a 2001/18/EC boli doteraz podané v rôznych krajinách Európy (Belgicko, Spojené kráľovstvo, Taliansko, Holandsko, Francúzsko, Nemecko, Španielsko, Česká republika a Poľsko). Cukrová repa H7-1 bola od r. 1998 uvoľnená do životného prostredia na účely poľného testovania aj v rôznych lokalitách U.S.A., Kanady, Chile a v Japonsku. Tieto poľné testy boli vykonané za účelom produkcie materiálu pre regulačné štúdie a na hodnotenie agronomickej výkonnosti (účinnosť, selektivita, úrodové skúšky).

Po dôkladnom schvaľovacom posúdení bola cukrovej repe H7-1 udelená environmentálna autorizácia v Spojených Štátoch Amerických (2005), Kanade (2005) a Japonsku (2007).

Výsledky poľných testov a post-marketingové skúsenosti v uvedených krajinách nepriniesli žiadne dôkazy o tom, že by cukrová repa H7-1 spôsobovala akékoľvek nepriaznivé účinky na ľudské zdravie, zdravie živočíchov, alebo na životné prostredie. S výnimkou je vlastnosti tolerancie ku glyfozátu nie je cukrová repa H7-1 odlišiteľná od konvenčných odrôd cukrovej repy.

2. Žiadateľ

2.1. Názov inštitúcie alebo spoločnosti

Centrum výskumu rastlinnej výroby (CVRV) - Výskumný ústav rastlinnej výroby (VÚRV) Piešťany

2.2 Sídlo

Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

2.3 IČO (pokiaľ je pridelené)

42157005

2.4 DIČ (pokiaľ je pridelené)

2022751181

2.5 Predmet činnosti (podľa zakladateľského dokumentu alebo zápisu v obchodnom registri)

Predmetom činnosti CVRV je:

1. Výskum, vývoj a vedecko-technické služby so zameraním na:
 - regulovanie faktorov podmieňujúcich a ovplyvňujúcich kvantitu a kvalitu úrod hlavných poľných plodín, špeciálnych plodín a trávnych porastov;
 - udržateľné zlepšovanie a optimalizovanie pestovateľských systémov a technológií v rastlinnej výrobe, vrátane integrovaných, alternatívnych a ekologických foriem, so zohľadnením výrobných, pôdnych, geografických, klimatických, ekonomických a ekologických osobitostí regiónov a podmienok prostredia;
 - prátotechniku a využívanie trávnych a iných porastov pre technologicky, ekonomicky, environmentálne a zdravotne vhodné formy živočíšnej produkcie;

- uplatnenie princípov koexistencie pri využívaní všetkých foriem pestovateľských technológií a biologických materiálov, vrátane geneticky modifikovaných rastlín;
 - udržateľnú produkciu biomasy a spôsobov jej využitia pre energetické a nepotravné účely;
 - vplyv a dôsledky klimatických zmien na priebeh produkčného procesu rastlinnej výroby a možnosti adaptácie poľnohospodárstva na tieto zmeny;
 - vplyv ekologických záťaží na vlastnosti pôdy a rastlinnej produkcie, analýza prenosu cudzorodých látok do produktov rastlinnej výroby, surovín a výrobkov z nich a možnosti jeho eliminácie;
 - ekologizáciu a biologizáciu rastlinnej výroby;
 - mimoprodukčné a krajínovorné funkcie rastlinnej a poľnohospodárskej výroby a ich úlohu v živote vidieka a jeho rozvoji;
 - zhromažďovanie, štúdium, ochranu a využitie genofondu rastlín pre poľnohospodárstvo a výživu;
 - analýzu genotypov a fenotypov rastlín, vzťahy medzi nimi a tvorbu nových biologických materiálov so zlepšenými vlastnosťami s využitím progresívnych metód;
 - biotechnologické postupy aplikovateľné v rastlinnej výrobe a poľnohospodárstve, vrátane modifikácií genómov rastlín;
 - geneticky podmienenú toleranciu a rezistenciu rastlín proti nepriaznivým faktorom prostredia;
 - zlepšovanie kvality, bezpečnosti a funkčnosti potravinových zdrojov a ich využitia v živočíšnej výrobe, potravinárstve a iných odvetviach.
2. Transfer a realizovanie poznatkov a výsledkov výskumu a vývoja do praxe.
 3. Rozvoj, udržiavanie a skvalitňovanie infraštruktúry pre všetky formy výskumu a vývoja.
 4. Koordinovanie Národného programu ochrany genofondu rastlín a činnosť Génovej banky Slovenskej republiky a iných, rezortných programov.
 5. Šľachtenie nových odrôd poľných a špeciálnych plodín, prípadne aj ďalších rastlinných druhov a udržiavanie registrovaných a v poľnohospodárstve využívaných odrôd.
 6. Analytické činnosti v chemickej, fyzikálnej, biologickej, technologickej, sociálno-ekonomickej, krajínovornej a ďalších oblastiach súvisiacich s predmetom činnosti.
 7. Monitoring, prieskum, zber a analýzu údajov a informácií pre prípravu stratégií, prognóz, koncepcií, expertíz, štúdií, návrhov a syntéz v oblasti všeobecnej a špeciálnej rastlinnej výroby, poľnohospodárstva a súvisiaceho výskumu a vývoja.
 8. Poradenskú, hodnotiacu a projektovú činnosť pre uplatňovanie inovatívnych prvkov vo výskume, vývoji, rastlinnej výrobe a poľnohospodárstve.
 9. Kontrolnú činnosť na základe poverenia zriaďovateľa.
 10. Navrhuje a zúčastňuje sa prípravy a zmien technických noriem a iných legislatívnych predpisov súvisiacich s predmetom činnosti.
 11. Získavanie, poskytovanie a šírenie vedecko-technických informácií pre potreby výskumu, vývoja, šľachtenia, poradenstva a praxe.
 12. Edičnú a informačnú činnosť, vydávanie vedeckých, odborných a popularizačných tlačovín, periodického i neperiodického charakteru.
 13. Využitie výsledkov výskumu a vývoja pri spolupráci s univerzitami vo vedeckej a odbornej výchove a ďalšom vzdelávaní vedecko-výskumných pracovníkov a študentov všetkých stupňov vysokoškolského vzdelávania.
 14. Akreditované a iné formy ďalšieho vzdelávania a celoživotného vzdelávania pre potreby výskumu, vývoja a praxe.
 15. Aktívnu účasť v národnej a medzinárodnej vedecko-technickej spolupráci, účasť v projektoch medzinárodného výskumného priestoru, riešenie projektov v rámci

medzinárodných centier výskumu a vývoja, aktivity v medzinárodných organizáciách a orgánoch.

16. Vykonávanie činností s cieľom tvorby vlastných zdrojov.

17. Plní ďalšie úlohy stanovené zriaďovateľom.

2.5 Štatutárny orgán žiadateľa

Centrum výskumu rastlinnej výroby – Výskumný ústav rastlinnej výroby, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany

Riaditeľ CVRV: doc. RNDr. Ján Kraic, PhD.

Telefón: 033/7722311

Fax: 033/7726306

e-mail: Sekretariát CVRV vurv@vurv.sk

3. Poverený zástupca žiadateľa

Ján Kraic, doc., RNDr., PhD.

Riaditeľ, Centrum výskumu rastlinnej výroby – Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany

4. Charakteristika nakladania s geneticky modifikovaným organizmom

4.1. Účel zavádzania do životného prostredia, prípadne názov a označenie projektu, zadávateľ

Žiadateľ, Centrum výskumu rastlinnej výroby – Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany (CVRV-VÚRV), plánuje zavádzanie GM cukrovej repy (hybridov odvodených z transformovanej línie H7-1) do životného prostredia v spolupráci so spoločnosťou SESVanderHave. Garantom realizácie poľných pokusov (príprava lokality, jednotenie rastlín, aplikácia glyfozátu, celkové agronomické hodnotenie, monitoring po uvoľnení a zneškodňovanie rastlinného materiálu) bude CVRV-VÚRV. Spoločnosť SESVanderHave bude zodpovedná za prípravu a dovoz osiva, sejbu, zber a v spolupráci s CVRV-VÚRV za jednotenie rastlín a monitoring po uvoľnení. Spoločnosť SESVanderhave počas pestovania geneticky transformovaného materiálu na mieste zavádzania bude rešpektovať príslušné národné predpisy pre uvoľňovanie GMO rastlín, ako aj vlastné smernice SESVanderhave pre manipuláciu s geneticky transformovaným materiálom cukrovej repy.

Spoločnosť SESVanderHave má licenciu na používanie geneticky transformovanej línie H7-1 cukrovej repy a získal F1 hybridné rastliny krížením GM línie H7-1 s vlastnými (SESVanderHave) konvenčnými udržiavateľmi sterility cukrovej repy línií typu O. Zo spätných s líniami typu O sa môže vnesená vlastnosť kombinovať a fixovať do materského komponentu pre tvorbu línií so samčnou sterilitou a homozygotnou z hľadiska vlastnosti tolerancie ku glyfozátu. Takéto línie so samčou sterilitou krížené s konvenčnými diploidnými opel'ovačmi sú používané na produkciu finálnych hybridných kombinácií ("Round'Up Ready" hybridy), ktoré budú predmetom posudzovania v navrhovanej poľnej skúške.

Tento typ skúšok výnosu a pozorovania je súčasťou štandardného šľachtiteľského programu, v ktorom sa línie a hybridy intenzívne testujú pre tvorbu optimálnych odrôd, vyhovujúcich komerčným požiadavkám trhu, vrátane slovenského, s dôrazom na zistenie požiadaviek pestovateľov na vysoko výnosné odrody pre oblasť strednej Európy, akými sú vysoký výnos, extrahovateľnosť bieleho cukru, nízka prítomnosť hliny na repe a rezistencia k hubovým a vírusovým ochoreniam.

Cieľmi poľného testovania bude

- získať údaje o výnose geneticky transformovanej cukrovej repy "Round'Up Ready", ošetrenej herbicídmi Roundup alebo konvenčnými herbicídmi,
- získať údaje o výnosoch GM cukrovej repy ak sa použije ako herbicíd Roundup,
- zistiť dopady použitia herbicídu Roundup na zdravotný stav rastlín cukrovej repy a
- preukázať odolnosť hybridov Round'Up Ready cukrovej repy a flexibilitu pre užívateľa.

Všetka pestovaná cukrová repa v tejto skúške výnosu ostane vo vegetatívnom štádiu. Pravidelná kontrola skúšky skúsenými pracovníkmi najmenej jedenkrát za dva týždne umožnia odhaliť všetky vybiehajúce rastliny. V prípade výskytu vybehlic budú uskutočnené opatrenia na likvidáciu vybehlic pred tvorbou kvetov.

4.2 Predpokladaný výsledok zavádzania do životného prostredia

Výsledkom zavádzania do životného prostredia bude získanie dát týkajúcich sa agronomických vlastností geneticky modifikovaných hybridov cukrovej repy odvodených z línie H7-1 a účinnosti tolerancie GM cukrovej repy voči herbicídmi na báze glyfozátu.

5. Doba zavádzania do životného prostredia

5.1 Celková doba zavádzania geneticky modifikovaného organizmu do životného prostredia a dátum jeho predpokladaného zahájenia

Zavádzanie GM hybridov cukrovej repy odvodených z geneticky transformovanej línie H7-1 do životného prostredia je plánované v období rokov 2010-2012.

5.2 Závazný harmonogram (rozpis jednotlivých čiastkových etáp, dátum ich predpokladaného zahájenia a doba ich trvania)

Na každý rok, tj. v rokoch 2010, 2011 a 2012 sa plánujú nasledovné aktivity:

- získanie dát týkajúcich sa agronomických vlastností geneticky modifikovaných hybridov cukrovej repy,

- hodnotenie tolerancie GM cukrovej repy voči herbicídmi na báze glyfozátu.

Počas riešenia projektu budú sledované nasledovné ukazovatele pre každú plochu

- úroda koreňa
- obsah cukru
- čistota šťavy

ako aj fenotypové pozorovania cukrovej repy ošetrenej herbicídmi Roundup počas rastovej sezóny v porovnaní s cukrovou repou ošetrovanou tradičnými herbicídmi (farba listov, životaschopnosť, reakcia na stres, atď.)

Môže sa stať, že v danom roku, alebo v celom období 2010 – 2012 bude realizovaná iba časť hore uvedených aktivít. V súlade so zákonom č. 151/2002 Z.z. v platnom znení, bude MŽP každoročne informované o realizovaných aktivitách.

Každý rok je predpokladaný dátum zahájenia (sejby) v strede marca a zber najneskôr 15. decembra. Dátum výsevu sa môže meniť podľa podmienok počasia skorej jari.

6. Plánuje žiadateľ zavádzanie rovnakého geneticky modifikovaného organizmu do životného prostredia v niektorom členskom štáte Európskych spoločenstiev alebo mimo jeho územia?

UK, ES

7. Podal žiadateľ žiadosť pre zavádzanie rovnakého geneticky modifikovaného organizmu do životného prostredia v niektorom členskom štáte Európskych spoločenstiev ?

B/ES/09/28; B/ES/10/02

Pri geneticky modifikovanej línii cukrovej repy H7-1 bol uskutočnený veľký počet poľných skúšok v rôznych oblastiach pestovania cukrovej repy v Európe, v Rusku, Severnej a Južnej Amerike (viď časť C.4 SNIF). V rámci týchto skúšok neboli zistené žiadne nepriaznivé vplyvy testovanej cukrovej repy na životné prostredie.

8. Podal žiadateľ žiadosť pre zavádzanie rovnakého geneticky modifikovaného organizmu do životného prostredia alebo do obehu mimo územia Európskych spoločenstiev ?

Žiadosti o zavedenie geneticky modifikovanej cukrovej repy H7-1 v zmysle Časti B Nariadenia 90/220/EEC a 2001/18/EC boli doteraz podané v Belgicku, Spojenom kráľovstve, Taliansku, Holandsku, Francúzsku, Nemecku a Španielsku (viď Tab. 1). Ďalej bola cukrová repa H7-1 uvoľnená od r. 1998 do životného prostredia na účely poľného testovania v rôznych lokalitách U.S.A., Kanady, Ruska, Chile, v Českej republike a v Poľsku. Tieto poľné testy boli vykonané za účelom produkcie materiálu pre regulačné štúdie a na hodnotenie agronomickej výkonnosti (účinnosť, selektivita, úrodové skúšky).

Po dôkladnom schvaľovacom posúdení bola cukrovej repe H7-1 udelená environmentálna autorizácia v Spojených štátoch Amerických (2005), Kanade (2005) a Japonsku (2007).

Výsledky poľných testov a post-marketingové skúsenosti v uvedených krajinách nepriniesli žiadne dôkazy o tom, že by cukrová repa H7-1 spôsobovala akékoľvek nepriaznivé účinky na ľudské zdravie, zdravie živočíchov, alebo na životné prostredie. S výnimkou je vlastnosti tolerancie ku glyfozátu nie je cukrová repa H7-1 odlišiteľná od konvenčných odrôd cukrovej repy.

Tab. 1 Zoznam predchádzajúcich notifikácií cukrovej repy H7-1 v zmysle Časti B Nariadenia 90/220/EEC a 2001/18/EC od r. 1995 do 2008

Rok	Krajina	Číslo notifikácie
1995	Belgicko	B/BE/95/WSP4 (Monsanto)
1996	Belgicko	B/BE/95/WSP4 (Monsanto)
	Spojené kráľovstvo (UK)	B/GB/96/R22/7 (96/R 22/7) (Monsanto)
1997	Belgicko	B/BE/95/WSP4 (Monsanto)
	Taliansko	B/IT/97/18 (Monsanto)
	Holandsko	B/NL/96/22 (BGGO 96/22) (Monsanto)
1998	Belgicko	B/BE/95/WSP4 (Monsanto)
	Taliansko	B/IT/97/18 (Monsanto)
	Francúzsko	B/FR/97/10/11 (Monsanto)

Rok	Krajina	Číslo notifikácie
1999	Holandsko	B/NL/96/22 (BGGO 96/22) (Monsanto)
	Spojené kráľovstvo (UK)	B/GB/98/R22/11 (B/UK/98/R22/11) (Monsanto)
	Belgicko	B/BE/95/WSP4 (Monsanto)
	Francúzsko	B/FR/99/01/07 (Monsanto/KWS)
	Francúzsko	B/FR/99/11/02 (KWS)
	Nemecko	B/DE/99/94 (ZG2 6786-01-0094) (Monsanto)
	Taliansko	B/IT/97/18 (Monsanto)
	Taliansko	B/IT/99/03 (KWS)
	Taliansko	B/IT/99/27 (KWS)
	Taliansko	B/IT/99/36 (KWS)
2000	Španielsko	B/ES/99/03 (Monsanto)
	Holandsko	B/NL/96/22-EXT1 (BGGO 96/22-01) (Monsanto)
	Spojené kráľovstvo (UK)	B/GB/98/R22/11 (B/UK/98/R22/11) (Monsanto)
	Belgicko	B/BE/95/WSP4 (Monsanto)
	Belgicko	B/BE/00/VSP2 (KWS)
	Francúzsko	B/FR/99/01/07 (Monsanto/KWS)
	Francúzsko	B/FR/00/07/01 (KWS)
	Nemecko	B/DE/99/94 (ZG2 6786-01-0094) (Monsanto)
	Španielsko	B/ES/00/08 (Monsanto)
	Holandsko	B/NL/96/22-EXT1 (BGGO 96/22-01) (Monsanto)
2001	Belgicko	B/BE/95/WSP4 (Monsanto)
	Francúzsko	B/FR/99/01/07 (Monsanto/KWS)
	Nemecko	B/DE/99/94 (ZG2 6786-01-0094) (Monsanto)
	Holandsko	B/NL/96/22-EXT1 (BGGO 96/22-01) (Monsanto)
2002	Nemecko	B/DE/99/94 (ZG2 6786-01-0094) (Monsanto)
2005	Švédsko	B/SE/04/7951 (Syngenta Seeds)
2006	Španielsko	B/ES/06/01 (Monsanto)
2008	Nemecko	B/DE/07/192 (Planta KWS)
	Španielsko	B/ES/08/01 (Monsanto)
	Španielsko	B/ES/08/28 (SESVanderHave)
	Spain	B/ES/08/35 (Syngenta Seeds)

9. Hodnotenie rizika zavádzania geneticky modifikovaného organizmu do životného prostredia

9.1 Zhrnutie hodnotenia rizika

Hodnotenie rizika je v tejto žiadosti vykonané podľa Smernice 2001/18/ES, časti B, a zákona č. 151/2002 Z.z. v platnom znení.

Analýza vlastností cukrovej repy H7-1, s prihliadnutím ku skúsenostiam z poľných skúšok tejto cukrovej repy v rámci krajín EU, ako aj vo svete, ukázala, riziko potenciálnych nežiadúcich účinkov na zdravie ľudí, zvierat a smerom k životnému prostrediu, vyplývajúcim z plánovaných pokusov s vyššie uvedenými líniami a hybridmi GM cukrovej repy, je možné považovať za zanedbateľné.

Celkovo je možné konštatovať, že cukrová repa H7-1 je z hľadiska bezpečnosti pre životné prostredie, ľudí a živočíchy rovnako bezpečná ako konvenčná cukrová repa. Tento záver vychádza z podstatnej totožnosti cukrovej repy H7-1 s jej konvenčným náprotivkom a tiež z intenzívnej charakterizácie jedinej “novej” vlastnosti, t.j. zavedenej tolerancie k

herbicídu Roundup, ktorej aktívnou zložkou je glyfozát. Vlastnosť tolerancie ku glyfozátu získala GM cukrová repa H7-1 expresiou enzýmu CP4 EPSPS, kódovanej genetickou transformáciou vloženou cudzorodou DNA.

Na základe podrobnej molekulárnej charakterizácie genetickej modifikácie, podrobnej charakterizácie exprimovaného enzýmu CP4 EPSPS, histórie bezpečného využívania skupiny proteínov EPSPS a hostiteľskej rastliny cukrovej repy, agronomickej, fenotypovej, kompozičnej a nutričnej totožnosti cukrovej repy H7-1 s konvenčnou cukrovou repou, ako aj absencie toxicity pre živočíchy je na záver možné konštatovať, že environmentálne či zdravotné riziko spojené so zámerným uvoľnením cukrovej repy H7-1, obsahujúcej vložený úsek génu *cp4 epsps* z baktérie *Agrobacterium* sp., do životného prostredia s cieľom realizovať poľné skúšky je zanedbateľné a nijako sa nelíši od rizika spojeného s pestovaním akejkoľvek inej cukrovej repy.

9.2. Hodnotenie rizika

9.2.1 Hodnotenie možných škodlivých účinkov nakladania s líniami a hybridmi cukrovej repy, odvodenými z geneticky transformovanej línie H7-1 a odolných voči herbicídu glyfozát v spojení s:

9.2.1.1. príjemcom

Cukrová repa (*Beta vulgaris*) sa v Európe intenzívne pestuje takmer 200 rokov. Pestované odrody cukrovej repy nie sú ani perzistentné, ani invázívne, a iba zriedkavo sa nájdu medzi inými plodinami alebo na prirodzených stanovištiach. Pestovanie cukrovej repy sa nepovažuje za problém z hľadiska zaburinenia poľnohospodárskych plôch, a na prirodzených stanovištiach prežíva iba v prípade veľmi slabej konkurencie ostatných druhov.

9.2.1.2. s vloženým dedičným materiálom (pôvodom z darcovského organizmu)

Hybridy cukrovej repy, odvodené z geneticky transformovanej línie H7-1 a odolné voči herbicídu glyfozát vznikli použitím štandardných šľachtiteľských metód vnútrodruhovej hybridizácie a obsahujú dedičný materiál introdukovaný do línie H7-1 cukrovej repy prostredníctvom genetickej transformácie s využitím *Agrobacterium tumefaciens*. Tento dedičný materiál tvorí expresná kazeta génu *cp4 epsps*, nachádzajúca sa v T-DNA oblasti transformačného vektora PV-BVGT08.

Genetické elementy vnesené do genómu cukrovej repy H7-1, ktoré sú prítomné medzi pravou a ľavou hraničnou sekvenciou T-DNA plasmidu PV-BVGT08, tvoria súčasť expresnej kazety génu *cp4 epsps*, pozostávajúcej z promotora 35S z modifikovaného vírusu mozaiky krtičníka (P-FMV), zavádzacej sekvencie génu *ctp2* z *Arabidopsis thaliana* pre expresiu v chloroplaste, kódujúcej sekvencie *cp4 epsps* z *Agrobacterium* sp., kmeňa CP4, a neprekladanej sekvencie E9 3' z génu *rbcS E9* hrachu siateho (*Pisum sativum*). Opis jednotlivých genetických prvkov a ich funkcií je uvedený v časti 2.4, Tab. 3 a v časti 2.5 tejto žiadosti.

Nie je známe, že by dedičný materiál, ktorý bol vnesený do rastlín cukrovej repy, uvedený v Tab 3. a charakterizovaný v bode 2.5. predkladanej žiadosti, mal škodlivé účinky na zdravie ľudí, zvierat alebo životné prostredie.

Je možné konštatovať, že riziko výskytu možných škodlivých účinkov v spojení s vloženým dedičným materiálom, je možné považovať za zanedbateľné.

9.2.1.3. s vektorom

Na vytvorenie cukrovej repy H7-1 prostredníctvom genetickej transformácie využitím *Agrobacterium tumefaciens* bol použitý odzbrojený binárny vektor PV-BVGT08, ktorý obsahuje oblasť DNA (T-DNA) ohraničenú sekvenciami pravého a ľavého okraja, ktoré nesú expresnú kazetu génu *cp4 epsps*, spôsobujúceho toleranciu ku glyfozátu.

Vektor PV-BVGT08 je odzbrojený binárny vektor rastlinnej transformácie *Agrobacterium tumefaciens* so zdvojenými hraničnými sekvenciami, pozostávajúci z 8590 bp. Obsahuje sekvencie DNA, ktoré sú nevyhnutné pre prenos T-DNA do bunky. Tieto sekvencie sa nazývajú oblasťami pravého okraja (RB) a ľavého okraja (LB), a každá oblasť obsahuje sekvenciu s 21-25 bp, definujúcimi rozsah DNA o ktorom sa predpokladá že bude prenesený do rastlinného genómu. Genetické elementy prítomné medzi okrajmi T-DNA sú v poradí od pravého okraja k ľavému okraju nasledovné:

- promótor 35S (P-FMV) z modifikovaného vírusu mozaiky krtičníka (*Figwort mosaic virus*);
- zavádzacia sekvencia génu *ctp2* z arábkovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana*) pre expresiu v chloroplaste (*ctp2*);
- kódovacia sekvencia génu *epsps* z baktérie *Agrobacterium* sp. kmeň CP4 (*cp4 epsps*), a
- neprekladaná sekvencia E9 3' z génu *rbcS E9* (E9 3') hrachu siateho (*Pisum sativum* L.).

Promótor, zavádzacia sekvencia, kódovacia sekvencia a nepreložená sekvencia E9 3' tvoria expresnú kazetu *cp4 epsps*.

Plazmid PV-BVGT08 okrem toho obsahuje konštitutívny bakteriálny markerový gén *aadA*, zabezpečujúci rezistenciu k spektinomycínu a streptomycínu, ako aj počiatky replikácie DNA (*ori-V* a *ori-322*), potrebné pre replikáciu a udržanie plazmidu PV-BVGT08 v baktériách. Všetky posledne menované genetické prvky sú umiestnené mimo oblasti T-DNA. Podľa očakávania, žiadny z týchto prvkov (*aadA*, *ori-V*, *ori-322*) nebol zavedený do genómu cukrovej repy H7-1.

Gén *cp4 epsps* bol pôvodne izolovaný z *Agrobacterium* sp. kmeň CP4 a kóduje 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázu (CP4 EPSPS), ktorá je na rozdiel od väčšiny prirodzených rastlinných a mikrobiálnych EPSPS enzýmov prirodzene odolná voči glyfozátu (Padgett *et al.*, 1996a). EPSPS katalyzuje konverziu šikimát-3-fosfátu (S3P) a fosfoenolpyruvátu (PEP) na 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát (EPSP), medziprodukt nutný pre tvorbu aromatických aminokyselín (Haslam, 1974; Herrmann, 1983). Gén *cp4 epsps* kóduje CP4 EPSPS, proteín veľkosti 47,6 kDa, pozostávajúci z jediného polypeptidu so 455 aminokyselinami, ktorý je vysoko odolný voči glyfozátu a ktorý zabezpečuje toleranciu ku glyfozát pri rastlinách (Padgett *et al.*, 1996a).

Genetická mapa vektora PV-BVGT08 je znázornená na Obr. 1 a opis jednotlivých genetických prvkov plazmidu, ich veľkostí a funkcií je uvedený v časti 2.4, Tab. 3 predkladanej žiadosti.

Nie sú známe žiadne spôsoby škodlivosti použitých vektorov, je teda možné konštatovať, že riziko výskytu možných škodlivých účinkov v spojení s vektorom, je možné považovať za zanedbateľné.

9.2.1.4. s vložením konštruktú

Na vytvorenie cukrovej repy línie H7-1 bol použitý transformačný systém využívajúci na vnášanie cudzorodých génov do rastlinného genómu baktériu *Agrobacterium tumefaciens*. Klíčne listy diploidnej fertílnej línie cukrovej repy boli ošetrované suspenziou *A. tumefaciens* nesúcich binárny transformačný vektor označovaný PV-BVGT08 a v *in vitro* kultúre regenerované transformované rastliny. Transformačný systém prostredníctvom *A. tumefaciens* je známy transferom a stabilnou integráciou časti DNA vektorového plazmidu, tzv. T-DNA („*transferred DNA*“) ohraničenej sekvenciami pravého (pravá hraničná sekvencia, RB, „*right border sequences*“) a ľavého okraja (ľavá hraničná sekvencia, LB, „*left border sequences*“). T-DNA plazmidu PV-BVGT08 nesie expresnú kazetu génu *cp4 epsps*, zabezpečujúcu v rastlinách exprimujúcich tento gén toleranciu ku glyfozátu.

Nie je známe, že by vložením expresnej kazety génu *cp4 epsps* do rodičovskej línie cukrovej repy došlo k mutácii niektorého génu, významného pre funkciu genómu hostiteľa. Je teda možné konštatovať, že riziko výskytu možných škodlivých účinkov v spojení s vložením konštruktú je možné považovať za zanedbateľné.

9.2.1.5. so signálnymi a selekčnými génmi

Pôvodná genetická transformácia bola vykonaná použitím viacklíčkovej línie cukrovej repy KWS, chránenej vlastníckymi právami. Ako zdroj explantátu boli použité klíčne listy, získané zo sterilných klíčnych rastlín línie 3S0057 cukrovej repy (KWS SAAT AG). Transformácia sa uskutočnila s využitím suspenzie *Agrobacterium tumefaciens*, obsahujúcej plazmid PV-BVGT08. Napokon bol na selekciu predpokladaných transformačných udalostí použitý ako selekčné činidlo glyfozát.

Expresná kazeta génu *cp4 epsps*, t.j. oblasť medzi pravou a ľavou hraničnou sekvenciou T-DNA plazmidu PV-BVGT08 sa skladá z promotora 35S z modifikovaného vírusu mozaiky krtičníka (P-FMV), zavádzacej sekvencie génu *ctp2* z *Arabidopsis thaliana* pre expresiu v chloroplaste, kódujúcej sekvencie *cp4 epsps* z *Agrobacterium* sp., kmeňa CP4, a neprekladanej sekvencie E9 3' z génu *rbcS E9* hrachu siateho (*Pisum sativum*). Okrem vyššie vymenovaných genetických elementov expresnej kazety génu *cp4 epsps* sa v T-DNA oblasti plazmidu PV-BVGT08 nenachádzajú žiadne signálne, ani selekčné markerové gény.

Plazmid PV-BVGT08 okrem oblasti T-DNA obsahuje aj konštitutívny bakteriálny markerový gén *aadA*, zabezpečujúci rezistenciu k spektinomycínu a streptomycínu, ako aj počiatky replikácie DNA (*ori-V* a *ori-322*), potrebné pre replikáciu a udržanie plazmidu v baktériách. Tieto genetické prvky sa nachádzajú v kostrovej („*backbone*“) časti plazmidu, t.j. sú umiestnené mimo oblasti T-DNA. Ako potvrdili molekulárne analýzy (viď časť 2.11, bod iv predkladanej žiadosti), žiadny z týchto prvkov (*aadA*, *ori-V*, *ori-322*) nebol vložený a zabudovaný do genómu cukrovej repy H7-1.

9.2.1.6. s inzertom

Pre charakterizáciu DNA, vkladanej do genómu cukrovej repy H7-1 bola použitá molekulárna analýza. Genomická DNA bola analyzovaná pomocou Southernovej hybridizácie s cieľom určiť počet vložení (počet vložených integrovaných DNA v rámci genómu cukrovej repy), počet kópií (počet kópií integrovanej DNA v rámci jedného lokusu), integritu vkladanej sekvencie a neprekladanej oblasti 3', ako aj prítomnosti či absencie kostrových sekvencií plazmidu.

Výsledky analýz podporujú nasledovné závery:

(1) genóm cukrovej repy H7-1 obsahuje jedinú vloženú sekvenciu DNA, obsahujúcu jedinú kópiu expresnej kazety *cp4 epsps*, použitú pri genetickej transformácii;

(2) expresná kazeta *cp4 epsps* a jej genetické prvky v rámci tejto inzercie sú intaktné;

(3) genóm cukrovej repy H7-1 neobsahuje žiadne detekovateľné kostrové sekvencie hlavného reťazca plazmidovej DNA. Predovšetkým je zrejmé, že pôvodcy replikácie (*ori-V* a *ori-322*) a gén *aadA* nie sú v cukrovej repe H7-1 prítomné.

Výsledky molekulárnej analýzy ďalej podporujú záver, že introdukovaná DNA prítomná v cukrovej repe H7-1 kóduje iba očakávaný proteín CP4 EPSPS v plnej dĺžke.

Molekulárne analýzy stability vlozenej sekvencie DNA (viď časť 2.16 žiadosti) naznačujú, že akákoľvek významná zmena molekulárnej charakteristiky zdedenej DNA inzertu v cukrovej repe H7-1 je veľmi nepravdepodobná, je teda možné konštatovať, že riziko výskytu možných škodlivých účinkov cukrovej repy H7-1 v spojení s inzertom, je možné považovať za zanedbateľné.

9.2.1.7. s výsledným geneticky modifikovaným organizmom

Vychádzajúc zo podstatnej zhody cukrovej repy H7-1 s konvenčnými odrodami cukrovej repy a z podrobnej charakterizácie jedinej “novej” vlastnosti, t.j. introdukovanej tolerancie k herbicídu Roundup, prepožičanej expresiou enzýmu CP4 EPSPS (viď body a-i časti 9.2.1.10 žiadosti) je možné konštatovať, že cukrová repa H7-1 je z hľadiska životného prostredia, zdravia ľudí a živočíchov rovnako bezpečná ako konvenčná cukrová repa.

9.2.1.8. s miestom a rozsahom nakladania s geneticky modifikovaným organizmom

CVRV-VÚRV Piešťany v spolupráci so SESVanderHave uskutoční jednu poľnú skúšku s hybridmi odvodenými z geneticky transformovanej línie H7-1 na jednej lokalite Slovenska v r. 2010-2012.

Tento typ skúšok výnosu a pozorovania je súčasťou štandardného šľachtiteľského programu, v ktorom sa línie a hybridy intenzívne testujú pre tvorbu optimálnych odrôd, vyhovujúcich komerčným požiadavkám trhu, vrátane slovenského, s dôrazom na zistenie potrieb pestovateľa ohľadne vysoko výnosných odrôd pre oblasť strednej Európy, akými sú vysoký výnos, extrahovateľnosť bieleho cukru, nízka prítomnosť hliny na repe a rezistencia k hubovým a vírusovým ochoreniam. Poľné pokusy s GM cukrovou repou sú plánované na jednej lokalite a na obmedzenej ploche (max. 2000 m²).

Vzhľadom k tejto ploche, charakteru pokusov a charakteru lokality (vedených výskumným pracoviskom CVRV – VÚRV Piešťany), je možné považovať riziko výskytu možných škodlivých účinkov, v spojení s miestom a rozsahom nakladania s geneticky modifikovaným organizmom za zanedbateľné.

9.2.1.9. so životným prostredím v mieste nakladania s geneticky modifikovaným organizmom

Cukrová repa H7-1 bude pestovaná v lokalite Borovce, (VÚC Trnava, Slovensko). Lokalita sa nachádza v geografickej oblasti, kde sa cukrová repa bežne pestuje. Životné prostredie v mieste nakladania s geneticky modifikovanou cukrovou repou tvorí poľnohospodársky využívané pozemky. Lokalita plánovaných poľných pokusov nie je

v blízkosti chránených oblastí. Preto sa v uvedenom prostredí neočakávajú žiadne škodlivé účinky pestovania cukrovej repy H7-1.

Pre zamedzenie úniku geneticky modifikovanej cukrovej repy do okolitého prostredia prostredníctvom vegetatívnych propagúl (odvodených z vegetatívnych častí rastlín), peľu, alebo semien (v prípade výskytu vybehlíc), bude použitých niekoľko preventívnych opatrení:

1. Skúška sa uskutoční v rámci plochy pestovania jačmeňa, kde je jačmeň pravidelne pestovaný. Skúška bude obklopená 5 m pásom neosiatej pôdy, v súlade s odporúčaním spoločnosti SESVanderHave týkajúcim sa pracovných postupov.

2. Všetky šarže semena pre skúšku budú testované za kontrolovaných podmienok v štatisticky výpovednom teste pre zistenie potenciálnej prítomnosti prímiesnej repy, tak aby sa vysiali iba semená šarží, ktoré nebudú obsahovať žiadny merateľný podiel takejto prímiesnej repy.

3. Všetko prevážané osivo (príp. iný rastlinný materiál) bude transportované v uzavretých a označených obaloch a bude evidované.

4. Rastlinám repy v skúške a jej okolí nebude umožnené kvitnutie. Za normálnych podmienok počasia ostávajú všetky rastliny skúšobnej repy vo vegetatívnom štádiu.

5. Pravidelné návštevy lokality skúšky a jej okolia skúsenými odborníkmi zabezpečia včasné zistenie všetkých vybehlíc. Ak sa spozorujú akékoľvek príznaky vybehlíc, uplatnia sa postupy na ich zneškodnenie dostatočne skoro pred rozkvitnutím.

Je preto možné konštatovať, že riziko výskytu možných škodlivých účinkov v spojení so životným prostredím v mieste nakladania s geneticky modifikovaným organizmom je zanedbateľné.

9.2.1.10. s možnými interakciami medzi geneticky modifikovaným organizmom a životným prostredím v mieste nakladania

Táto časť obsahuje hodnotenie environmentálnych rizík („*Environmental Risk Assessment*“, ERA), opisujúcich potenciálne nepriaznivé environmentálne účinky, ktoré by sa mohli objaviť – aspoň teoreticky – pri zámernom uvoľnení GM vyššej rastliny (GMVR) na poliach v rámci Európy. Tieto teoretické účinky cukrovej repy H7-1 sú vyhodnotené nižšie.

Základom tohto hodnotenia rizika je potvrdenie skutočnosti, že cukrová repa H7-1 sa významne nelíši od konvenčnej cukrovej repy (s výnimkou vloženéj vlastnosti tolerancie ku glyfozátu), čo umožňuje nepredpokladať akúkoľvek zmenu interakcií tejto cukrovej repy s biotickými zložkami prostredia v porovnaní s konvenčnou cukrovou repou.

a) Pravdepodobnosť, že sa za podmienok uvádzania do životného prostredia stanú geneticky modifikované vyššie rastliny odolnejšie než príjemca alebo rodičovský organizmus v poľnohospodárskych biotopoch a inváznejšou v prírodných biotopoch

Cukrová repa sa v Európe intenzívne pestuje už takmer 200 rokov. Pestované odrody cukrovej repy nie sú perzistentné ani invazívne a iba zriedkavo boli pozorované medzi inými plodinami alebo na prirodzených stanovištiach. Cukrová repa nie je považovaná za problematickú z hľadiska zaburinenia poľnohospodárskych lokalít a na prirodzených stanovištiach prežíva iba pri veľmi slabej konkurencii iných druhov.

Predmetom tejto žiadosti je udelenie povolenia k zavádzaniu geneticky modifikovaných hybridov cukrovej repy H7-1 do životného prostredia v Slovenskej republike za účelom realizácie poľných štúdií a nie komerčné pestovanie týchto hybridov.

Ak by introdukovaná vlastnosť zmenila biologickú kondíciu cukrovej repy H7-1, alebo jej hybridov s ne-GM cukrovou repou, vzniknutých použitím konvenčného šľachtienia, mohlo by to mať za následok zvýšenú perzistenciu alebo invazívnosť týchto riep v porovnaní s bežnými odrodami cukrovej repy. Preto zavedená vlastnosť tolerancie ku glyfozátu je charakteristikou, ktorá môže - aspoň teoreticky - spôsobiť nepriaznivý účinok na životné prostredie.

V plnej šírke následkov uvedeného konštatovania by mohla zvýšená perzistencia posunúť cukrovú repu medzi buriny a dať tak vznik invazívnemu druhu, šíriacemu sa v prostredí. Takáto zmena či dopad by však pre túto rastlinu boli atypické, a neboli popísané počas celých desaťročí šľachtienia rastlín a ani iných foriem zavádzania genetickej diverzity do cukrovej repy.

Pestované odrody *Beta vulgaris* nie sú invazívne, mimo oblastí pestovania predstavujú slabú konkurenciu a majú len málo burinných vlastností. Nízkou schopnosť prežívania cukrovej repy určujú mnohé faktory. Najdôležitejším faktorom je, že sa repa iba pomaly zapája a počas tohto obdobia je citlivá na konkurenciu.

Cukrová repa sa obyčajne rozmnožuje semenami. Na poliach produkujúcich korene je rozširovanie semenami obmedzené, nakoľko sa repa zbiera na konci prvej rastovej sezóny ešte pred kvitnutím. Kľčky ponechané na poli po zbere buliev ("groundkeepers") a vrcholové listy ("tops") s veľkou časťou ponechaného koreňa príležitostne prežívajú miernejšiu zimu a môžu počas nasledujúcej jari vytvoriť kvetnú byľ, ale v ďalšom oševnom postupe nepredstavujú problém z hľadiska zaburinenia. Pestovaná cukrová repa za normálnych okolností neprežíva ako burina, a kľčky a vrcholové listy sa len veľmi zriedkavo objavujú medzi inými plodinami, v priekopách či na okrajoch ciest. Rozširovanie touto cestou je veľmi vzácné, nakoľko farmári zapracúvajú takéto zvyšky plodín do pôdy, a ak sa objavia pri nasledujúcej plodine, riešia ich širokolistovými herbicídmi alebo inými pestovateľskými opatreniami. Malá časť rastlín pestovanej cukrovej repy môže počas prvého roka vykvitnúť, ak sú klíčence vystavené neskorým mrazom krátko po zapojení (vybehlice). Farmári obvykle vybehlice odstraňujú, nakoľko tieto znižujú výnosy a produkciu cukru. Ak sa vybehlice neodstránia pred vytvorením semien, ich semená sa môžu stať jedným zo zdrojov burinnej repy, ktorú farmári kontrolujú vhodnými praktikami pre obmedzenie burín. Na záver je možné konštatovať, že cukrová repa nepredstavuje v poľnohospodárskom prostredí problém ako burina, a že v prirodzenom prostredí prežíva len pri veľmi slabej konkurencii iných druhov.

Vyššie uvedené pozorovania nie sú odlišné pre cukrovú repu H7-1. Ako je uvedené v [časti 2.12](#) tejto žiadosti, cukrová repa H7-1 je v podstatne ekvivalentná bežným (konvenčným) odrodám cukrovej repy, okrem vnesenej vlastnosti tolerancie ku glyfozátu. Výsledky poľných skúšok cukrovej repy H7-1 preukázali, že je nepravdepodobné aby táto cukrová repa mala pozmenené svoje genotypové, agronomické, reprodukčné vlastnosti a schopnosť prežívania či rozširovania, ak sa porovná s bežnými odrodami cukrovej repy (viď [časť 2.15](#)). Za predpokladu, že genetické modifikácie nespôsobili biologicky významné fenotypové rozdiely, ktoré by viedli k zmene klíčivosti, schopnosti prežívania alebo biologickej kondícii týchto rastlín v porovnaní s konvenčnými jedincami, je vysoko nepravdepodobné, že by cukrová repa H7-1 mohla mať vyššiu schopnosť prežívania v prijímajúcom prostredí, alebo že by bola v prirodzenom prostredí invazívnejšia ako bežná cukrová repa. Vlastnosť tolerancie ku glyfozátu by nemala spôsobiť žiadne významné zvýhodnenie ani znevýhodnenie, vedúce k zmenenej schopnosti prežívania tejto cukrovej repy (viď [časť 9.2.1.10, bod b](#)).

Záverom je možné konštatovať, že pravdepodobnosť neúmyselného rozšírenia sa cukrovej repy H7-1 v nepoľnohospodárskej krajine je zanedbateľná, nakoľko cukrová repa nie je perzistentná ani invazívna a tieto charakteristiky ostávajú pri cukrovej repy H7-1 nezmenené

ak ju porovnáme s konvenčnou cukrovou repou. V nepravdepodobnom prípade vzídenia rastliny cukrovej repy H7-1 v nepoľnohospodárskom prostredí budú dôsledky tolerance ku glyfozátu pre prostredie zanedbateľné. Preto aj riziko neúmyselného rozširovania sa cukrovej repy H7-1 cestou jej zburinenia je zanedbateľné. Nakoľko riziko je zanedbateľné, nezvažuje sa aplikácia nijakých stratégií riadenia rizika.

b) Každá ďalšia selekčná výhoda alebo nevýhoda plynúca z genetickej modifikácie, t.j. selekčnú výhodu geneticky modifikovaného organizmu v porovnaní s príjemcom, prípadne rodičovským organizmom

Ak introdukovaná vlastnosť cukrovej repy H7-1 zabezpečuje významnú selektívnu výhodu, toto je potrebné chápať pri porovnaní s konvenčnou cukrovou repou a ostatnými rastlinnými druhmi. Významná zmena biologických charakteristík cukrovej repy H7-1 by mohla viesť ku konkurenčnému zvýhodneniu tejto cukrovej repy oproti ostatným rastlinám. Z tohto dôvodu je introdukovaná vlastnosť charakteristikou geneticky modifikovanej vyššej rastliny (GMVR), ktorá by aspoň teoreticky mohla spôsobiť nepriaznivé dopady na životné prostredie, posudzované v tejto časti.

Ak by introdukovaná vlastnosť viedla k selektívnej výhode cukrovej repy H7-1, resp. jej hybridov s ne-GM líniami vzniknutými použitím konvenčného šľachtenia, potom by sa v plnej šírke tohto dôsledku mohla cukrová repa H7-1 stať invazívnym druhom, šíriacim sa v prostredí. Bolo však už preukázané, že zavedenie vlastnosti tolerance ku glyfozátu do cukrovej repy H7-1 nevedlo k žiadnym biologicky významným zmenám ostatných fenotypových charakteristík, a že všetky sledované aspekty rastu rastliny, jej vývoja, morfológie, citlivosti voči škodcom, agronomických prejavov, zloženia, úžitkovosti a zdravotných dopadov na živočíchy a človeka tejto cukrovej repy ostávajú nezmenené. Bolo konštatované, že cukrová repa H7-1 je fenotypovo a agronomicky totožná s konvenčnou cukrovou repou, okrem vlastnosti tolerance ku glyfozátu. Z toho vyplýva, že posúdenie získaných konkurenčných (ne)výhod sa obmedzuje na vlastnosť tolerance ku glyfozátu, pretože neboli introdukované žiadne ďalšie nové vlastnosti.

V porovnaní s konvenčnou cukrovou repou poskytuje prítomná vlastnosť tolerance ku glyfozátu v tejto cukrovej repy, na rozdiel od citlivosti ku glyfozátu burín rastúcich na poli spolu s plodinou, cukrovej repy výhodu, avšak toto je základná charakteristikou pestovateľského systému Roundup Ready® a uplatňuje sa výhradne v prípade ošetrovania plodín herbicídmi, obsahujúcimi ako aktívnu zložku glyfozát. Táto selektívna výhoda (t.j. tolerancia k ošetrovaniu glyfozátom) sa uplatňuje na poli výhradne za špecifických podmienok, ktoré sú predvídateľné, priestorovo ohraničené a krátkodobé.

V poľnohospodárskom prostredí budú burinne rastúce rastliny (“volunteers”) a vybehlice (“bolters”) odolné voči glyfozátu farmármi pozorne monitorované rovnakým spôsobom ako bežné zburinené plodiny, a uplatnia sa rovnaké opatrenia na ich odstránenie s cieľom minimalizovať výskyt zburinenej repy, nesúcej charakteristiku odolnosti voči glyfozátu. Burinne rastúce rastliny repy odolné ku glyfozátu, ktoré zriedkavo prežijú zimu, a vybehlice nebudú spôsobovať farmárom problémy, a ak sa aj objavia, budú riešené manuálne alebo inými herbicídmi s odlišným mechanizmom účinku.

Výskyt zburinenej repy sa nekontroluje herbicídmi pre cukrovú repu, pretože použité chemikálie nie sú schopné odlišovať pestovanú plodinu od zburinenej repy. V súčasnosti sa problémy so zburinovou repou minimalizujú odstraňovaním vybehlic zburinenej repy

® Roundup Ready je registrovanou obchodnou značkou firmy Monsanto Technology LLC.

manuálne alebo chemicky, plytkou kultiváciou, používaním šarží semena s vysokou čistotou a neskorým výsevom. Uplatnenie cukrovej repy H7-1, ak sa riadi podľa odporúčaní, umožní farmárom účinne kontrolovať zburinenú repu a použitím Správnej poľnohospodárskej praxe oddialiť a minimalizovať výskyt tolerantnej zburinenej repy. Ak farmári neuplatňujú Správnu poľnohospodársku prax, situácia na takýchto farmách sa vráti do aktuálneho scenára, v ktorom chemické ošetrenie nerozlišuje medzi pestovanou plodinou a zburinenou repou.

V prostredí, v ktorom chýba selektívny tlak aplikácie glyfosátu neprináša charakteristika toleancie ku glyfozátu selektívnu výhodu a nebude poskytovať priamu konkurenčnú výhodu pre voľne žijúce rastliny, ani nepriamo voľnej prírode prostredníctvom interakcie s týmito voľne žijúcimi rastlinami.

Na záver je možné konštatovať, že rastliny cukrovej repy H7-1, alebo jej hybridy s ne-GM cukrovou repou, vzniknuté použitím konvenčného šľachtenia, budú mať za špecifických podmienok na poli selektívnu výhodu oproti burinám citlivým ku glyfozátu (t.j. po ošetrení glyfozátom), a tieto podmienky sú predvídateľné, priestorovo ohraničené, krátkodobé a riešiteľné zavedením Správnej poľnohospodárskej praxe. V prostredí, kde chýba selektívny tlak aplikácie glyfosátu neprináša charakteristika toleancie ku glyfozátu žiadnu selektívnu výhodu. Z toho vyplýva, že jediná selektívna výhoda cukrovej repy H7-1, a jej hybridov s ne-GM cukrovou repou, vzniknutých použitím konvenčného šľachtenia, spojená s introdukovanou vlastnosťou toleancie ku glyfozátu, sa považuje za zanedbateľné riziko pre životné prostredie.

c) Možnosť prenosu génu do takých istých alebo iných pohlavne zlučiteľných druhov rastlín za podmienok pestovania geneticky modifikovaných vyšších rastlín a akákoľvek výberová výhoda alebo nevýhoda, ktorá je na takýto druh rastlín prenesená

Cukrová repa je alogamný (cudzoopelivý) druh, opelovaný vetrom a zriedkavejšie hmyzom. Prenos génov repným peľom je prirodzený fenomén, podstatný pre reprodukciu rastliny, avšak v prírode existujú prirodzené prekážky, znižujúce účinnosť prenosu a oplodnenie kvetov peľom v prirodzených poľných podmienkach: pre optimálne oplodnenie musia byť kvety sexuálne kompatibilné, schopné prijať peľ vtedy keď je dostupný (synchronia) a musia byť blízko ku zdroju peľu. Navyše peľ cukrovej repy ostáva na poli životaschopný najviac 24 hodín (Artschwager and Starrett, 1933). Ďalšími faktormi, ovplyvňujúcimi frekvenciu cudzoopelenia sú ploidia odrody a zloženie hybridu cukrovej repy.

Koncentrácia peľu cukrovej repy sa prudko znižuje rozptylom v ovzduší a sadaním peľu na povrch, kde sa rozkladá. Niektoré štúdie ukazujú, že hustota peľu cukrovej repy výrazne klesá so vzdialenosťou. V jednej štúdii vo vzdialenosti 900 m od zdroja koncentrácia peľu cukrovej repy klesla na 0,3 % (Dark, 1971). Iný pokus, realizovaný v Nemecku (Jensen and Bogh, 1942) zaznamenal maximálny tok peľu meraný ako cudzoopelenie kompatibilnou cukrovou repou a cvikľou (*B. vulgaris*) na úrovni 0,1 % vo vzdialenosti viac ako 400 metrov. Dlhodobé pokusy realizované vo Francúzsku s použitím CMS rastlín ako lapačov peľu ukazujú, že peľový oblak sa zmenšuje o 83% po 30 metroch (CETIOM, 1999).

V prípade dozrievania rastlín cukrovej repy H7-1, tvorby peľu a opelenia susednej rastliny vlastnosti prítomné v cukrovej repe H7-1 môžu byť prenesené, vrátane introdukovanej vlastnosti toleancie ku glyfozátu, a táto sa môže preniesť na potomstvo prijímajúcej rastliny. Nakoľko genetická modifikácia nezmenila reprodukčné charakteristiky cukrovej repy H7-1 (viď časť 2.15), potenciálne vzdialené kríženie introdukovanej vlastnosti je charakteristikou GMVR, ktorá by teoreticky mohla spôsobiť nepriaznivé dopady na životné prostredie.

Ak by prenos (cudzoopelením) introdukovanej vlastnosti na sexuálne kompatibilné rastliny prinieslo akúkoľvek konkurenčnú výhodu a zlepšenie biologickej kondície prijímajúcej rastliny, mohla by sa táto rastlina stať invazívnym druhom a rozšíriť sa v prostredí.

Cukrová repa sa prevažne pestuje pre jej vegetatívny koreň (bulvu) a jej životný cyklus je v poľnohospodárskej produkcii obmedzený na vegetatívne štádium. Potenciál cudzoopelenia pestovanej cukrovej repy je zanedbateľný, nakoľko bulvy cukrovej repy zberajú na konci pestovateľskej sezóny pred vytvorením semien. Je možné si predstaviť, že na poliach produkujúcich bulvy sa objaví niekoľko vybehlic a opelia iné vybehlice. Aj keby došlo k prekríženiu medzi cukrovou repou H7-1 a susednými rastlinami cukrovej repy, vlastnosť tolerancie ku glyfozátu priniesie selektívnu výhodu výhradne za podmienok, že sa cukrová repa ošetruje herbicídmi obsahujúcimi glyfozát, čo je predvídateľné, priestorovo obmedzené a krátkodobé, a nemá žiadne nepriaznivé dopady na poľnohospodárske prostredie.

K hybridizácii medzi pestovanou repou a príbuznými druhmi rodu *Beta* bežne dochádza za posledných 200 rokov. Odrody cukrovej repy môžu voľne hybridizovať so všetkými druhmi sekcie *Beta*, ak sú vhodné podmienky. Cukrová repa H7-1 môže teda hybridizovať s členmi sekcie *Beta* za vzniku plodného potomstva.

Pestovaná cukrová repa a voľne žijúca cukrová repa sú výrazne self-inkompatibilné rastliny, čo je faktor, ktorý zvyšuje možnosť prenosu génov, avšak všetky dôkazy svedčia o tom, že *B. vulgaris* sa voľne kríži iba s určitými členmi rodu *Chenopodiaceae* v rámci sekcie *Beta* (De Bock, 1986), akými sú jej voľne žijúci príbuzní *B. maritima*, *B. macrocarpa* a *B. atriplicifolia* (Abe *et al.*, 1986; De Bock, 1986) rastúce ako buriny na poliach alebo ako ruderálne druhy v rôznych častiach Stredomoria. Hybridy cukrovej repy s týmito druhmi sú za normálnych okolností plne fertílne, okrem hybridov medzi *B. vulgaris* a *B. macrocarpa*, u ktorých sa vyskytuje čiastočná streilita peľu a dochádza k odumretiu embrya hybridu. Prenos génov bol preukázaný medzi pestovanou cukrovou repou a voľne žijúcou repou introgresiou jednoročného habitu do pestovanej repy (Boudry *et al.*, 1993) a introgresiou génov z pestovanej cukrovej repy do populácií voľne žijúcej repy (Bartsch *et al.*, 1999).

Potenciál hybridizácie a introgresie medzi pestovanou, burinnou a voľne žijúcou repou je vysoký v osivárskych oblastiach, kde dochádza k masívnej produkcii peľu. V takomto prípade môže peľ cukrovej repy H7-1 potenciálne opeliť voľne žijúcu repu, a vlastnosť sa môže preniesť do populácie voľne žijúcej repy. V skutočnosti je toto riziko minimalizované producentmi osív cukrovej repy, ktorí musia zabezpečiť súlad s určitými normami pre oblasti produkcie semien. Minimálne izolačné vzdialenosti pre osivárske polia sú povinné podľa pestovateľských noriem OECD pre cukrovú repu OECD (OECD, 2000) a oblasti produkcie semien sú prísne kontrolované z hľadiska prítomnosti rastlín voľne žijúcej repy. Polia a ich okolie sa pravidelne kontrolujú: v prípade výskytu voľne žijúcej alebo burinne rastúcej repy sa tieto odstránia a lokalita sa naďalej monitoruje. Ak sa pri produkcii osiva cukrovej repy H7-1 ako materské rastliny používajú diploidné jedince so samčou sterilitou a opelia sa voľne žijúcimi jednoročnými rastlinami za vzniku jednoročnej repy odolnej ku glyfozátu, kvitnúcej v prvom roku, alebo v prípade výskytu vybehlic tolerantných ku glyfozátu ich farmári odstránia ručne alebo herbicídmi na inej báze než glyfozát, aby zabránili rozptylu peľu a obmedzili straty výnosov cukru. Vo všeobecnosti je obvyklý podiel prítomných vybiehajúcich rastlín pri pestovaní cukrovej repy nižší než 1 %, preto je pravdepodobnosť významného peľom sprostredkovaného toku génov medzi plodinami minimálna.

Ďalším zdrojom produkcie peľu môžu byť burinne rastúce rastliny cukrovej repy H7-1, resp. jej hybridov s ne-GM líniami vzniknutých použitím konvenčného šľachtenia. V predošlom odstavci už bolo popísané, ako môžu pestovatelia kontrolovať takéto burinné

rastliny repy ich zapracovaním do pôdy v skorom štádiu ich vývoja, alebo pomocou chemikálií. Prítomnosť zburinenej cukrovej repy tolerantnej ku glyfozátu sa dá minimalizovať zavedením Správnej poľnohospodárskej praxe. Ak však farmári nepostupujú podľa odporúčaných postupov a kontrola burinnej repy nie je účinná, môžu sa vyskytnúť prípady burinnej repy odolnej voči glyfozátu, ktoré bude potrebné kontrolovať tak ako bolo popísané v časti 9.2.1.10, bod b.

Dokonca aj v prípade, že sa preniesie vlastnosť odolnosti voči glyfozátu do populácie voľne žijúcej repy, nedôjde k významnej selektívnej výhode vlastnosti odolnosti ku glyfozátu u populácie voľne žijúcej repy, nakoľko aplikácia glyfozátu v prirodzených stanovištiach je mimoriadne zriedkavá. Preto aj napriek tomu, že pravdepodobnosť prenosu introdukovanej vlastnosti tolerance ku glyfozátu cudzoopelením na voľne žijúcich príbuzných cukrovej repy H7-1 nie je zanedbateľná, pravdepodobnosť že by sa stala príčinou nepriaznivého dopadu na životné prostredie je zanedbateľná.

Z toho vyplýva, že cukrová repa H7-1 má rovnaké vlastnosti ako bežná cukrová repa okrem svojej tolerance ku glyfozátu, vrátane potenciálu pre cudzoopelenie. Avšak cudzoopelenie bude zanedbateľné, nakoľko predkladaná žiadosť sa týka pestovania derivátov cukrovej repy H7-1, t.j. línií a hybridov cukrovej odvodených z transformácie H7-1 konvenčným šľachtením v rámci skúšky, to znamená, že táto cukrová repa sa bude pestovať pre jej vegetatívny koreň (bulvu) a jej životný cyklus bude v poľnohospodárskej produkcii obmedzený na vegetívne štádium. V ostatných prípadoch, ak sa cukrová repa pestuje pre produkciu semena, sa nepredpokladá vyššia miera prenosu transgénnej vlastnosti aká je pri bežnej cukrovej repe, a na poliach sa bežne aplikujú postupy na obmedzenie transferu génov z rastliny na rastlinu. Environmentálne riziko, vyplývajúce z transferu génov, teda zo samotnej cukrovej repy H7-1 je zanedbateľné.

d) Možný bezprostredný alebo oneskorený dopad na životné prostredie vyplývajúci z priamych a nepriamych vzájomných pôsobení medzi geneticky modifikovanými vyššími rastlinami a cieľovými organizmami (pokiaľ cieľový organizmus existuje)

Neboli identifikované žiadne znaky, ktoré by mohli spôsobiť nepriaznivé účinky na životné prostredie. Nakoľko cukrová repa H7-1 je odolná voči herbicídom s aktívnou zložkou glyfozátom, nemá cieľové organizmy, s ktorými by reagovala, priamo ani nepriamo.

e) Možný bezprostredný alebo oneskorený dopad na životné prostredie vyplývajúci z priamych a nepriamych vzájomných pôsobení medzi geneticky modifikovanými vyššími rastlinami a cieľovými organizmami, vrátane vplyvu na úroveň populácií konkurentov, bylinožravcov, prípadne symbiontov, parazitov a patogénov

Nakoľko bolo preukázané, že cukrová repa H7-1 sa na poli správa rovnako ako bežná cukrová repa (s výnimkou vloženéj vlastnosti tolerance ku glyfozátu), jej východisková interakcia s ostatnými organizmami prostredia sa nepovažuje za odlišnú od interakcie konvenčnej cukrovej repy, s výnimkou dodatkovej potenciálnej expozície bylinožravých škodcov cukrovej repy proteínu CP4 EPSPS. Potenciálna expozícia necieľových organizmov tomuto proteínu v prijímajúcom prostredí je charakteristikou GMVR a môže teoreticky spôsobiť nepriaznivý dopad na životné prostredie. Necieľové organizmy predstávajú všetky živé organizmy, živočíchy či rastliny, ktoré môžu byť neúmyselne ovplyvnené

prostredníctvom špecifického alebo nešpecifického mechanizmu ako výsledku novo exprimovaných proteínov.

Teoretickým následkom kontaktu necieľových organizmov s vloženým proteínom (ktorý preň môže byť toxický) môže byť dopad na ich populačné hladiny.

Cukrová repa H7-1 produkuje proteín CP4 EPSPS, ktorý zabezpečuje toleranciu ku glyfozátu. Spoločnosťou Monsanto boli podobne vyvinuté a uvedené na trh geneticky modifikované odrody sóje, kukurice, bavlníka a repky olejnej odolné voči glyfozátu, ktoré exprimujú prakticky identický proteín CP4 EPSPS. Tento proteín, aj keď sa jedná pri plodinách odolných ku glyfozátu o novo exprimovaný proteín, nie je pre prírodu novým proteínom. Kódujúca sekvencia génu *cp4 epsps* vo vektore, použitom na vytvorenie vyššie zmienených glyfozát-tolerantných rastlín je odvodená z genómu baktérie *Agrobacterium* sp. kmeňa CP4, bežnej v pôde sa vyskytujúcej baktérie. CP4 EPSPS je enzýmom, zapojeným do šikimátovej biosyntetickej dráhy, nie je cieleň proti žiadnemu organizmu a nemá toxické účinky. Proteín CP4 EPSPS je štrukturálne a funkčne podobný ostatným enzýmom EPSPS, ktoré sú prirodzene prítomné v bežne konzumovaných rastlinných a mikrobiálnych zdrojoch. Proteíny EPSPS majú bezpečnú históriu vo vzťahu k necieľovým organizmom, pretože akýkoľvek necieľový organizmus interagujúci s cukrovou repou vyvinul úzku interakciu so širokým spektrom zelených rastlín a mikroorganizmov, a teda historicky bol exponovaný členom tejto bezpečnej skupiny proteínov. Na základe všadeprítomnosti, histórie a bezpečnosti proteínov EPSPS, nie je *a priori* dôvod predpokladať, že by proteín EPSPS mohol vykazovať biologickú aktivitu smerom k necieľovým organizmom.

Zástupcovia opel'ovačov, pôdnych organizmov, užitočných článkonožcov a škodcov boli vystavené účinkom čistej bielkoviny CP4 EPSPS, ako aj pletivám glyfozát-tolerantných plodín obsahujúcich proteín CP4 EPSPS: *Plathypena scabra* (Green cloverworm), *Schizaphis graminum* (Greenbugs), *Diuraphis noxia* (Russian wheat aphids), *Aceria tosichella* (Wheat curl mites), *Ostrinia nubilalis* (vijačka kukuričná, European corn borer) a *Sesamia* spp., dážďovky (*Eisenia fetida*) a *Folsomia candida* z radu *Collembola*. Pri týchto organizmoch sa nezistili žiadne toxické účinky, ani rozdiely vo vývoji a schopnosti prežívania po použití rastlín tolerantných voči glyfozátu v porovnaní s konvenčnými odrodami.

Záverom je na základe dobre opísaného spôsobu účinku enzýmov EPSPS a absencie nepriaznivých účinkov potvrdených rôznymi štúdiami možné konštatovať, že riziko cukrovej repy H7-1 pre necieľové organizmy je vysoko nepravdepodobné. Nakoľko riziko priamych alebo nepriamych škodlivých účinkov je zanedbateľné, nie sú potrebné stratégie na riadenie rizika.

f) Možné okamžité alebo oneskorené účinky na ľudské zdravie vyplývajúce z možných priamych alebo nepriamych interakcií medzi geneticky modifikovanou vyššou rastlinou a osobami prichádzajúcimi s ňou do styku

Bolo preukázané, že cukrová repa H7-1 je zložením totožná s konvenčnou cukrovou repou, a že má rovnaké bezpečnostné charakteristiky, ako aj rovnaké agronomické a fenotypové charakteristiky okrem dedenej vlohy zabezpečujúcej toleranciu ku glyfozátu, poskytnutej expresiou proteínu CP4 EPSPS. Teoreticky by potenciálna toxicita alebo alergenita mohla byť spojená s novosyntetizovaným proteínom geneticky modifikovanej plodiny. Expresia proteínu CP4 EPSPS je teda charakteristikou GMVR, ktorá by teoreticky mohla spôsobiť zdravotný dopad pri profesionálnej expozícii. Ak by zavedený proteín mal

toxický alebo alergénny potenciál, spôsobilo by to významné zmeny bezpečnostných aspektov manipulácie s cukrovou repou.

Nakoľko táto žiadosť sa týka pestovania línií a hybridov cukrovej repy odvodených z transformácie H7-1 pre skúšobné účely, osoby, ktoré prídu do kontaktu s touto cukrovou repou budú prevažne odborní pracovníci a poľní laboranti. Pravdepodobnosť kontaktu s cukrovou repou H7-1 nie je odlišná od profesionálnej expozície pri manipulácii s bežnou cukrovou repou.

Potenciál nepriaznivých účinkov novo exprimovanej bielkoviny na ľudské zdravie je opísaný v časti 2.18. Závery posúdenia bezpečnosti proteínu CP4 EPSPS pre ľudské zdravie boli preukázané na základe a) vyčerpávajúcej charakterizácie proteínu, b) chýbajúcej podobnosti so známymi proteínovými toxínmi a alergénmi, c) rýchlym rozkladom v simulovaných podmienkach žalúdočných a črevných štiav, a d) žiadnej akútnej toxicity proteínu podľa výsledkov štúdie akútnej toxicity na hlodavcoch pri podávaní sondou. V žiadnom z týchto prípadov nebol predložený žiaden dôkaz, ktorý by mohol vyvolať obavy z hľadiska nepriaznivých účinkov na ľudské zdravie.

Ani údaje zo skúšok v Európe nepriniesli žiadne dôkazy dopadov na zdravie po profesionálnej expozícii ľudí, manipulujúcich s cukrovou repou H7-1 ako výsledok potenciálnej toxicity alebo alergénnosti exprimovaných proteínov.

Na záver je možné konštatovať, že pravdepodobnosť akýchkoľvek nepriaznivých účinkov na ľudí ako výsledok ich kontaktu s touto cukrovou repou sa nijako nelíši od konvenčnej cukrovej repy, nakoľko cukrová repa H7-1 obsahuje vyššie uvedený proteín CP4 EPSPS, ktorý má zanedbateľný potenciál spôsobiť akékoľvek toxické alebo alergické prejavy u človeka. Riziko zmenených aspektov profesionálnej expozície tejto repe je preto zanedbateľné a nevyžaduje žiadne stratégie riadenia rizika.

g) Možné okamžité alebo oneskorené účinky na zdravie zvierat a dôsledky pre potravinový reťazec vyplývajúce z konzumácie geneticky modifikovaného organizmu alebo geneticky modifikovaného produktu, ktorý je určený pre použitie ako krmivo

Cukrová repa H7-1 je podstatne ekvivalentná s bežnou cukrovou repou, okrem vlozenej vlastnosti tolerancie ku glyfozátu. Vychádzajúc z niekoľkých storočí skúseností s bežnou domestikovanou cukrovou repou v Európe, potenciál vyvolania nepriaznivých zdravotných účinkov na hospodárske zvieratá cukrovou repou je zanedbateľný. Teoreticky je možná potenciálna toxicita alebo alebo nutričná deficiencia ako dôsledok novo exprimovaných proteínov v plodine. Expresia proteínu CP4 EPSPS je preto charakteristikou GMVR, ktorá by teoreticky mohla spôsobiť nepriaznivý účinok. Ak by tento introdukovaný proteín cukrovej repy H7-1 mal akýkoľvek toxický či alergénny potenciál, alebo nepriaznivý účinok na užitočnosť tejto cukrovej repy, znamenalo by to významnú zmenu aspektov jej nutričnej hodnoty a bezpečnosti použitia ako krmiva. Takáto zmena by mohla vyústiť do zmeny charakteristík zvierat, ako je zmena parametrov rastu, účinnosti krmenia, tvorby mlieka alebo zhoršeného zdravotného stavu.

Nakoľko predkladaná žiadosť sa týka realizácie skúšobného pestovania a neobsahuje využitie produkcie ako krmiva pre zvieratá, pravdepodobnosť objavenia nepriaznivého účinku na potravinový/krmivový reťazec či užitočnosť ako výsledku expozície hospodárskych zvierat krmivu s obsahom zdedeného proteínu je zanedbateľná.

Ako je diskutované v časti 2.18, exprimovaný proteín má dlhú históriu bezpečného používania. Bielkovina CP4 EPSPS nevykazuje žiadne príznaky toxicity po testovaní akútnej orálnej toxicity na hlodavcoch po podávaní sondou, rýchlo sa odbúrava v simulovanom prostredí žalúdočných a črevných štiav a neboli pozorované žiadne biologicky relevantné štrukturálne analógie s alergénmi alebo humánnymi či živočíšnymi toxínmi. Analytické štúdie okrem toho preukázali, že cukrová repa H7-1 je zložením a nutričnou hodnotou rovnaká ako bežná cukrová repa, a pre využitie ako potraviny alebo krmoviny je teda rovnako bezpečná ako bežná cukrová repa.

Na záver je možné konštatovať, že pravdepodobnosť potenciálneho nepriazniveho účinku na zvieratá, kŕmené cukrovou repou H7-1, a na ľudí konzumujúcich produkty z týchto zvierat je zanedbateľná. Preto je aj riziko cukrovej repy H7-1 pre potravinový/krmivový reťazec zanedbateľné, a nie sú potrebné žiadne stratégie na riadenie rizika.

h) Možné okamžité alebo oneskorené účinky na biogeochemické procesy vyplývajúce z možných priamych a nepriamych interakcií geneticky modifikovaného organizmu a cieľových a necieľových organizmov v blízkosti uvoľnenia geneticky modifikovaného organizmu do životného prostredia

O pestovaní cukrovej repy je vo všeobecnosti známe, že má nepriame dopady na biogeochemické procesy prostredníctvom orby a aplikácie hnojív. Nakoľko bolo preukázané, že cukrová repa H7-1 je zložením rovnaká ako konvenčná cukrová repa a má aj totožné agronomické a fenotypové charakteristiky, (viď časť 2.15 a 2.18), nejestvuje dôkaz o tom, že by sa táto repa akokoľvek líšila od bežnej cukrovej repy z hľadiska jej vplyvu na hladinu živín v pôde.

Teoreticky expresia zdedeného proteínu CP4 EPSPS je charakteristikou GMVR, ktorá by mohla nepriamo spôsobiť nepriaznivý environmentálny dopad na biogeochemické procesy. Ak by vložený proteín vykazoval akýkoľvek potenciál vyvolania nepriaznivých účinkov na populácie dekompozítorov alebo detrit požírajúcich organizmov v pôde, mohli by byť ovplyvnené biogeochemické procesy, v ktorých tieto organizmy zohrávajú úlohu, čo by mohlo mať za následok zmeny kolobehu živín v životnom prostredí.

Nakoľko predkladaná žiadosť sa týka veci realizácie skúšobného pestovania cukrovej repy H7-1, resp. línií a hybridov cukrovej repy odvodených z transformácie H7-1, pravdepodobnosť akejkoľvek významnej expozície pôdneho ekosystému rastlinám tejto cukrovej repy, a radikálna zmena skladby pôdneho ekosystému je zanedbateľná.

Proteíny CP4 EPSPS patria medzi dobre známe, bezpečné skupiny proteínov EPSPS, bežne prítomné v baktériách, hubách, riasach a vo všetkých vyšších rastlinách. Väčšina samotných dekompozítorov exprimuje proteíny EPSPS. Preto nejestvuje *a priori* dôvod očakávať, že by proteín CP4 EPSPS mohol mať nepriaznivý účinok na funkciu dekompozície. Enzým CP4 EPSPS je súčasťou šikimátovej biochemickej dráhy, nie je cieleň proti žiadnym organizmom a nemá toxický mechanizmus účinku (viď časť 9.2.1.10, bod e). Z toho vyplýva, že potenciál aktivity tohto proteínu smerom k mikroorganizmom zapojeným do biochemických procesov v pôde je zanedbateľný. Okrem toho bolo preukázané, že tento proteín podlieha v pôde rýchlej degradácii (Dubelman *et al.*, 2005). Takáto rýchla degradácia výrazne podporuje tvrdenie o neexistujúcom škodlivom účinku proteínu EPSPS na organizmy, zapojené do dekompozičnej funkcie, a na necieľové pôdne organizmy všeobecne.

Na záver je možné konštatovať, že nepriaznivé účinky na kolobeh živín v pôde ako dôsledok potenciálnych nepriaznivých účinkov zdedených proteínov na cieľové či necieľové

organizmy, zúčastňujúce sa biochemických procesov v pôde sú zanedbateľné, a nie sú potrebné žiadne stratégie na riadenie rizík.

i) Možné okamžité alebo oneskorené priame a nepriame účinky na životné prostredie v dôsledku použitia špecifických kultivačných, pestovateľských a zberových techník použitých v súvislosti s geneticky modifikovanými vyššími rastlinami v prípade, že sa tieto techniky líšia od techník bežne používaných pri nakladaní so zodpovedajúcimi nemodifikovanými vyššími rastlinami

Nakoľko cukrová repa H7-1 je totožná s bežnou cukrovou repou (okrem vlozenej vlohy zabezpečujúcej toleranciu ku glyfozátu), všetky v súčasnosti používané agronomické postupy pestovania cukrovej repy v EÚ sa môžu uplatniť aj na pestovanie cukrovej repy H7-1 a nie sú potrebné žiadne nové alebo špecifické technológie pestovania, menežmentu ani zberu.

V skutočnosti sa očakáva, že pestovanie cukrovej repy H7-1 bude mať pozitívny dopad na súčasné agronomické technológie pestovania cukrovej repy, a že prinesie úžitok farmárom aj životnému prostrediu. Výhody pestovania tejto cukrovej repy umožnia farmárom využiť priaznivé environmentálne a bezpečnostné vlastnosti herbicídov (viď Smernica Rady 91/414/EEC, Príloha I uvádzajúca glyfozát). Cukrová repa odolná voči glyfozátu zvyhodňuje pestovateľov tým, že poskytuje (1) dodatočnú možnosť širokospektrálnej kontroly burín pri pestovaní cukrovej repy, (2) nový mechanizmus účinku herbicídov pre kontrolu burín cukrovej repy počas sezóny, (3) vyššiu flexibilitu ošetrovania burín "podľa potreby", (4) nákladovo efektívne riešenie ochrany pred burinami, a (5) vynikajúcu zhodu so systémami obmedzenej orby. Z použitia ochrannej orby okrem toho vyplýva množstvo environmentálnych prínosov, ako je zlepšená kvalita pôdy, lepšia infiltrácia vody, znížená erózia a sedimentácia vodných zdrojov, znížené vyplavovanie živín a pesticídov do povrchových vôd, zlepšenie stanovišť pre voľne žijúce organizmy, zvýšené zadržiavanie uhlíka v pôde, zníženie spotreby palív a presadzovanie trvalo udržateľných poľnohospodárskych praktík (Bennett *et al.*, 2006; Bennett *et al.*, 2004; Brickley *et al.*, 2006; Elmegaard and Pedersen, 2001; May *et al.*, 2004; Petersen and Röver, 2005; Strandberg and Pedersen, 2002).

Na záver je možné konštatovať, že žiadna z charakteristík cukrovej repy H7-1 nebola posúdená ako možný zdroj nepriaznivých účinkov na životné prostredie cestou špecifických požiadaviek na zmeny pestovateľských postupov. Preto sa environmentálne dopady technológií pestovania, riadenia a zberu, použité v plánovanej skúške nepovažujú za odlišné od pestovania akejkoľvek inej cukrovej repy. Nakoľko riziko je zanedbateľné, nie je potrebné vypracovať žiadne stratégie pre riadenie rizík.

ČASŤ C
ĎALŠIE NÁLEŽITOSTI ŽIADOSTI PRE GENETICKY MODIFIKOVANÉ VYŠŠIE RASTLINY

1. Údaje o príjemcovi, prípadne (kde je to aplikovateľné) o rodičovskom organizme

1.1 Údaje o príjemcovi, prípadne (kde je to aplikovateľné) rodičovskom organizme

Čeľaď: *Chenopodiaceae*

Rod: *Beta*

Druh: *vulgaris* (2n = 18)

Poddruh: *vulgaris*

Kultivar/šľachtiteľská línia alebo kmeň: 3S0057

Triviálny názov: cukrová repa

1.2 Pôvod (zbierka, zbierkové číslo, dodávateľ)

Tab. 2 popisuje taxonomické členenie rodu *Beta* podľa (De Bock, 1986)

Tab. 2 Taxonomické členenie rodu *Beta*

	Druh	Ploidia (2n)
Sekcia 1	<i>Beta</i> (syn : <i>vulgares</i>)	
	<i>B. vulgaris</i> L.	18
	<i>B. maritima</i> L.	18
	<i>B. macrocarpa</i> Gus.	18, 36
	<i>B. atriplicifolia</i> Rouy	18
	<i>B. patula</i> Ait.	18
	<i>B. orientalis</i> Roth.	18
Sekcia 2	<i>Corollinae</i>	
	<i>B. macrorhiza</i> Stev.	18
	<i>B. lomalogona</i> Fish et Mey.	18, 36
	<i>B. corolliflora</i> Zos.	36
	<i>B. trigyna</i> Wald et Kit	45, 54
	<i>B. intermedia</i> Bunge	36
	<i>B. foliosa</i> Hausskn.	18 ¹
Sekcia 3	<i>Nanae</i>	
	<i>B. nana</i> Bois. et Held.	18
Sekcia 4	<i>Patellares</i>	
	<i>B. procumbens</i> Chr. Sm.	18
	<i>B. webbiana</i> Moq.	18
	<i>B. patellaris</i> Moq.	36

¹ Podľa (Fehr *et al.*, 1987).

1.3 Údaje o rozmnožovaní

1.3.1 Spôsob rozmnožovania

Cukrová repa (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*) je z hľadiska spôsobu rozmnožovania podrobne charakterizovaná a jej biológia bola detailne popísaná (Cooke and Scott, 1993). Obyčajne sa rozmnožuje semenami.

Väčšina genotypov cukrovej repy je výrazne nekompatibilná sama so sebou, preto sa pri dodržaní prísnej izolácie tvorí len veľmi málo alebo žiadne semená. Táto inkompatibilita je spôsobená štyrmi spolupôsobiacimi *S*-lokusmi, z ktorých každý nesie dve *S*-alely (Larsen,

1977a; Larsen, 1977b). "Pseudo-kompatibilita" alebo "pseudo-samoopelenie" sa môže objaviť vďaka zlyhaniu mechanizmu inkompatibility. Pri rôznych genotypoch dochádza k rôznemu stupňu prejavu, ktoré je výrazne ovplyvnené faktormi prostredia, zvlášť teplotou (Larsen, 1977a). Takmer úplné samoopelenie je spôsobené prítomnosťou špeciálneho dominantného génu samoopelenia (Savitsky, 1954). Cukrová repa sa obyčajne opeľuje vetrom, v menšej miere hmyzom.

Pre produkciu semien sa používajú vernalizované sadenice cukrovej repy (stecklingy), produkované v prvej sezóne vegetačného rastu. V nasledovnej sezóne sa presádzajú na pole, kde dochádza k zmnoženiu semien.

K rozmnožovaniu môže dôjsť aj pomocou vegetatívnych pletív krčka alebo častí koreňov ponechaných na poli po zbere úrody (angl. „*groundkeepers*“). Môže sa stať, že sa počas nasledujúcej sezóny objaví obnovený rast a produkcia plodných semien. Rozmnožovanie týmto spôsobom je však ojedinelé, nakoľko farmári zapracúvajú takéto zvyšky úrody do pôdy a znemožňujú tak ich prežitie.

1.3.2 Špecifické faktory, ktoré ovplyvňujú rozmnožovanie (ak existujú)

Za normálnych okolností je cukrová repa diploidná s počtom chromozómov $2n = 2x = 18$. Na začiatku štyridsiatych rokov minulého storočia bola zavedená do pestovateľskej praxe v Európe umelo indukovaná autotetraploidná cukrová repa ($2n = 4x = 36$), čo viedlo k vzniku takzvaných polyploidných alebo anizoploidných odrôd cukrovej repy pozostávajúcich zo zmesi tetraploidných ($2n = 4x = 36$), triploidných ($2n = 3x = 27$) a diploidných ($2n = 2x = 18$) rastlín. V polovici šesťdesiatych rokov minulého storočia sa začalo s masívnym nahrádzaním týchto odrôd triploidnými hybridnými odrodami. V súčasnosti sa na trhu vyskytujú obe hybridné odrody - diploidné ako aj triploidné.

Pestovaná cukrová repa je dvojročná plodina, na rozdiel od voľne žijúcej repy, ktorá sa správa ako jednoročná alebo takmer jednoročná. Jednoročné správanie je riadené dominantnou alelou *B* (alela vybiehania), ktorá ak je prenesená do pestovanej cukrovej repy vyvoláva tvorbu kvetnej byle a vybiehanie cukrovej repy na produkčných plochách (Milford, 2006). Za normálnych okolností cukrová repa na produkčných plochách repného koreňa nekvitne, kvitnutie však môže byť vyvolané zníženou teplotou (vernalizáciou) (Bosemark, 2006). Dôsledkom toho je veľmi zriedkavé objavenie kvetov na produkčných plochách repného koreňa. Pestovatelia však vynakladajú značné úsilie, aby zabránili prítomnosti vybehlic v šľachtením prispôbených odrodách.

Vývoj hybridných odrôd cukrovej repy bol umožnený objavením cytoplazmatickej samčej sterility (CMS) pri cukrovej repe (Owen, 1945) a následným rozvojom hybridných pestovateľských techník (Owen, 1948). CMS pri cukrovej repe je výsledkom interakcie medzi jadrovými génmi a zmenami mitochondriálneho genómu (Halldén *et al.*, 1990; Powling, 1982).

Ako už bolo popísané, prechod z vegetatívneho do reprodukčného obdobia vyžaduje obdobie vernalizujúcej nízkej teploty. Dĺžka trvania teplotnej indukcie je daná geneticky. Nakoľko svoju významnú úlohu v indukcii kvitnutia zohráva aj dĺžka dňa, používa sa termín "fototermálna indukcia kvitnutia", osobitne v prípadoch, kedy sa indukuje kvitnutie dvojročných genotypov a produkujú sa semená v prvom roku ovplyvnením teploty a dĺžky dňa. Genetika odolnosti voči vybiehaniu ostáva zatiaľ neobjasnená. Niektoré štúdie predpokladajú, že je riadená niekoľkými génmi s rôznym stupňom dominancie (Le Cohec and Soreau, 1989), v iných sa uvádza, že je prevažne recesívna (McFarlane *et al.*, 1949).

Voľne žijúce druhy rodu *Beta* v oblasti Stredozemného mora sú väčšinou jednoročné, ale objavujú sa aj dvojročné typy. Severoatlantické typy *B. maritima* sú na rozdiel od nich obvykle dvojročné.

1.3.3 Životnosť jednej generácie rastliny

Cukrová repa je za normálnych okolností dvojročná rastlina a vytvára v prvom roku veľké dužinaté korene (bulvy), v druhom roku kvetnú byľ. Koreňová plodina sa obvykle vysieva na jar a zbiera na jeseň toho istého roku. V niektorých oblastiach Severnej Európy s miernejšími zimami však môžu byť odrody odolné voči vybiehaniu vysievané na jeseň a zberané v lete nasledujúceho roka.

1.3.4 Údaje o schopnosti prežívania rastliny (sexuálna kompatibilita s inými pestovanými alebo planými druhmi a rozšírenie týchto kompatibilných druhov v SR)

1.3.4.1 Cudzoopelenie s pestovanými materiálmi cukrovej repy

Druh *Beta vulgaris* predstavuje viacero pestovaných foriem *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*, vrátane cukrovej repy, kŕmnej repy, mangoldu, cvikly, žltej repy šalátovej a červenej repy šalátovej (OECD, 2001). Tieto poddruhy sú navzájom krížiteľné hoci jednotlivito sú sami so sebou nekompatibilné. Hybridizácia medzi niektorými z týchto druhov je obmedzená vďaka rozdielnemu času kvitnutia a rozdielom v úrovni ploidie medzi normálnymi diploidmi a umelo vytvorenými tetraploidmi. Napriek tomu, že tieto druhy sa zberajú na konci prvého vegetačného obdobia pred obdobím kvitnutia, čím sa minimalizuje možnosť hybridizácie, je túto skutočnosť potrebné zohľadniť v oblastiach produkcie semien.

Cukrová repa je prevažne vetromopelivá a vzdialenosť prenosu peľu závisí na sile vetra, vzdušnej vlhkosti a teplote (Eastham and Sweet, 2002; Vigouroux *et al.*, 1999). Koncentrácia peľu cukrovej repy sa prudko znižuje rozptylom v ovzduší a sadaním peľu na povrch, kde sa rozkladá. Niektoré štúdie ukazujú, že hustota peľu cukrovej repy výrazne klesá so vzdialenosťou. Pokusy so zachytávaním peľu v UK ukázali, že vo vzdialenosti 900 m od miesta uvoľnenia v smere vetra koncentrácia peľu klesá na 0,3 % (Dark, 1971). Dlhodobé pokusy realizované vo Francúzsku v rokoch 1996 až 1998 s použitím CMS rastlín ako lapačov peľu ukazujú, že peľový oblak sa znižuje o 83% po 30 metroch (CETIOM, 1999).

Na poliach produkujúcich korene je teoreticky možné očakávať produkciu peľu rastlinami vybehlíc odolnými ku glyfozátu. Tento peľ môže opeliť ostatné vybehlice na tom istom poli a susedných poliach a produkovať plodné hybridy. Potomstvom v takom prípade by boli burinne rastúce rastliny repy majúce vlastnosť odolnosti voči glyfozátu v následnej rotácii plodín. Tieto burinné rastliny je však možné ľahko kontrolovať využitím dostupných metód ochrany, akými sú mechanická orba alebo použitie komerčne dostupných schválených herbicídov proti širokolistým burinám.

1.3.4.2 Cudzoopelenie s divorastúcimi materiálmi cukrovej repy

Hybridizácia medzi *Beta vulgaris* a špecifickými členmi rodu *Beta* nie je vylúčená. Hybridy sú obvykle mohutné a plodné a nevykazujú inkompatibilitu na chromozomálnej úrovni (OECD, 2001). Hybridy medzi *B. vulgaris* a *B. macrocarpa* sú však vzácne vďaka odlišnému času kvitnutia týchto paralelných druhov, čo má často za následok čiastočnú sterilitu peľu a odumretie embryí (Abe *et al.*, 1986).

Voľne žijúce druhy rodu *Beta* rastú ako burina na poliach a neobrobenej pôde mnohých oblastí Stredomoria. Sporadický peľ burinných rastlín má iba veľmi limitovanú možnosť kontaminovať pestovanú semennú plodinu pôvodných syntetických odrôd, nakoľko tieto sú dostatočne chránené prebytkom vlastného peľu. Zavedením hybridných odrôd, pri ktorých je na semenárskych poliach až 75% rastlín so samčou sterilitou, však môže kontaminácia cudzím peľom predstavovať problém, predovšetkým pri produkcii triploidných semien, nakoľko tetraploidné samčie rodičovské rastliny otvárajú obvykle svoje kvety a uvoľňujú peľ v neskorších predpoludňajších hodinách oproti diploidným rastlinám (Scott and Longden, 1970). Diploidné sterilné samčie kvety môžu teda byť otvorené pre opelenie náhodným peľom po určitý čas takmer každé predpoludnie počas obdobia kvitnutia.

Tok génov medzi pestovanou cukrovou repou a voľne žijúcou repou bol preukázaný introgresiou prejavu jednoročnosti do pestovanej repy (Boudry *et al.*, 1993) a introgresiou génov do populácií voľne žijúcej repy (Bartsch *et al.*, 1999).

S druhmi sekcie *Corollinae* je len ťažko možné vytvoriť umelé hybridy (Van Geyt *et al.*, 1990). Takéto hybridy sú však vysoko sterilné a produkujú len niekoľko semien po spätnom krížení s cukrovou repou. Umelé hybridy medzi cukrovou repou a členmi sekcie *Procumbens* obvykle hynú v štádiu sadeníc. Je ich možné experimentálne zachovať vrúbľovaním na cukrovú repu a tak vytvoriť životaschopné rastliny. Takéto hybridy sú však takmer úplne sterilné a produkujú iba niekoľko semien po spätnom krížení. Nie sú známe nijaké hybridy medzi pestovanou cukrovou repou a *B. nana* zo sekcie *Nanae*. Záverom je možné konštatovať, že v rámci čeľade *Chenopodiaceae* je akékoľvek kríženie medzi pestovanou cukrovou repou a druhmi zo sekcií mimo sekcie *Beta* vysoko nepravdepodobné.

Nebol doteraz publikovaný žiadny dôkaz existencie akéhokoľvek mechanizmu mimo pohlavného kríženia, ktorým by sa prenášali gény z rastlín cukrovej repy na iné organizmy.

1.4 Schopnosť prežitia

1.4.1 Schopnosť vytvárať štruktúry, ktoré umožňujú prežitie alebo dormanciu, a dĺžka možného prežívania alebo dormancie

Cukrová repa sa rozmnožuje predovšetkým semenami a prirodzená reprodukcia vegetatívnymi pletivami nie je známa. U rodu *Beta* sa však objavuje apomixia výhradne u polyploidných druhov patriacich do sekcie *Corollinae*.

Pestovaná cukrová repa obvykle neprežíva ako burina, burinne rastúce rastliny cukrovej repy je možné pozorovať len zriedka medzi inými plodinami, v priekopách či na okrajoch ciest. Ak sa burinne rastúca cukrová repa objaví medzi inými plodinami, bežne sa dá odstrániť širokolistovými herbicídmi používanými na odstránenie burín alebo inými agrotechnickými praktikami. Kfčky ponechané na poli po zbere koreňov (angl. „groundkeepers“) obvykle prežijú miernu zimu a môžu počas nasledovnej jari produkovať kvetnú byľ, nepredstavujú ale problém z hľadiska zaburinenia pri najbližšej rotácii plodín, nakoľko sú ľahko odstrániteľné zaužívanými agrotechnickými postupmi opísanými vyššie.

Prežívanie cukrovej repy závisí aj na teplotných podmienkach. Dlhšie trvajúce teploty pod -5°C rastliny poškodzujú, čo obvykle vedú k ich úhynu.

1.4.2 Ďalšie špecifické faktory umožňujúce prežitie

Vid' časť 1.4.1.

1.5 Údaje o rozširovaní rastliny (šírenie rastliny v prostredí, spôsob a rozsah šírenia – pokles množstva peľu a semien v závislosti na vzdialenosti od zdroja, sily a smeru, toku vody a ďalších faktoroch)

1.5.1 Spôsob a rozsah šírenia (pokles množstva peľu a semien v závislosti na vzdialenosti od zdroja, sily a smeru vetru, toku vody a ďalších faktoroch)

Rozširovanie rastliny prichádza do úvahy na troch úrovniach: semenami, peľom a pomocou kŕčkov.

Rozširovanie semien

Na poliach produkujúcich semená rastliny cukrovej repy neuvolňujú semená tak ľahko ako niektoré voľne žijúce druhy rodu *Beta*, ktoré uvoľňujú semená počas ich dozrievania. Ak sa však semenné rastliny zberajú príliš neskoro, určitá časť semien sa vďaka uvoľneniu stratí. Semená sa môžu stratiť aj počas zberu a prepravy, prípadne šíriť vďaka živočíchom ako sú vtáky a myši.

Na poliach produkujúcich korene bude šírenie semien obmedzené, nakoľko cukrová repa sa zberá na konci prvej rastovej sezóny pred rozkvitnutím a tvorbou semien. Semeno z vybehlic alebo zo znovu vyrastených rastlín by sa však mohlo viesť k vzniku populácií burinnej repy. Farmári prijímajú opatrenia na zabránenie rastu populácií burinnej rastúcej repy na komerčných poliach, pretože kvalita týchto burinnej rastúcich rastlín je nízka, a v prípade ich prítomnosti v zberanej plodine znižujú jej kvalitu a hodnotu. Farmári preto pestujú cukrovú repu napríklad v osevnom postupe s inými plodinami, čo poskytuje možnosť kontroly rastu burinnej repy na plochách plodiny cukrovej repy.

Väčšina semien po dopade na pôdu vyklíči počas tej istej sezóny. Vzhľadom na prítomnosť inhibítorov klíčenia, a ako dôsledok nedostatočných podmienok však niektoré semená nevyklíčia. Tieto semená sa môžu na jeseň dostať zaoraním do pôdy, do hĺbky kde je vyklíčenie nemožné a kde sa môžu dostať do štádia dormancie. Neskôr sa môžu dostať opäť na povrch vyoraním a vtedy môžu vyklíčiť. Na poliach produkujúcich semená alebo na šľachtiteľských semenných poličkách môžu niektoré semená premiestniť mimo poľa vtáky živiace sa semenami.

Semená cukrovej repy môžu prežiť v pôde v dormantnom stave desať a viac rokov a zachovať si časť svojej klíčovú kapacitu (Bouver, 1976; Lysgaard, 1991; OECD, 2001). V prípade vyklíčenia burinnej cukrovej repy v porastoch nasledujúcej plodiny osevného postupu môže byť táto kontrolovaná v súčasnosti povolenými herbicídmi na širokolisté buriny, čím sa nebude ďalej rozširovať.

Rozptyl peľu

Cukrová repa je cudzoopelivá, t.j. opeluje sa krížne. Peľové zrná sa šíria prevažne vetrom, ale aj hmyzom. Peľ je mimoriadne citlivý na vlhkosť a jeho životnosť v poľných podmienkach nie je dlhšia ako 24 hodín (Artschwager and Starrett, 1933). Peľ však môže prežívať aj niekoľko dní, ak je sucho a chladno (Brouwer, 1976); *p.* Sekcia B.2).

Šírenie vegetatívnych rastlinných štruktúr

Na poliach produkujúcich korene sa krčky a listy repy bežne počas zberu odsekávajú od koreňa a zaprávajú sa do pôdy, kde sa biologicky rozložia. Zaorané krčky či kusy koreňov sa môžu vyvinúť v rastliny, ale stáva sa tak zriedkavo.

1.5.2 Špecifické faktory ovplyvňujúce šírenie (ak existujú)

Vid' časť 1.5.1.

1.6 Údaje o zemepisnom rozšírení rastliny

Voľne žijúci príbuzní cukrovej repy pochádzajú z Malej Ázie, niektoré formy sú však pomerne rozšírené v celej oblasti Stredozemného mora. Všetky pestované druhy cukrovej repy, listová cukrová repa rovnako ako repa s mohutným koreňom pravdepodobne vznikli z voľne žijúcej stredomorskej cukrovej repy výberovým krížením.

Cukrová repa je hlavnou plodinou pre výrobu cukru v miernom pásme severnej pologule. Od polovice štyridsiatych rokov minulého storočia sa cukrová repa pestuje aj ako zimná plodina v krajinách s teplejším podnebíom ako sú Turecko, Maroko, Alžírsko, Egypt, Sýria, Irak a Irán.

1.7 Opis prirodzeného miesta výskytu rastliny, pokiaľ nie je rastlina v SR pestovaná, popis habitu vrátane informácie o prirodzených konzumentoch, patogénoch, parazitoch, konkurentoch a symbiontoch

V SR je cukrová repa pestovaná v rozsahu približne do 11000 ha ročne.

1.8 Opis iných možných vzájomných pôsobení geneticky modifikovanej rastliny s organizmami v ekosystéme, v ktorom sa rastlina obvykle pestuje, vrátane údajov o jej toxických účinkoch na ľudí, zvieratá a iné rastliny

Je známe, že cukrová repa interaguje s inými organizmami prostredia. Listy a korene rastúce na poli slúžia ako potrava pre hmyz a cicavce. Cukrová repa je tiež náchylná na viaceré hubové a vírusové ochorenia, ako aj konkurenciu tvorenú burinami z okolia.

Cukrová repa nie je patogénna ani škodlivá. Cukrová repa sa bežne pestuje a história jej bezpečného používania je dlhá.

1.9 Účinky na zdravie ľudí, zvierat a životné prostredie.

- *toxicita*
- *alergénnosť*
- *iné*

Saponíny sú triterpénové glykozidy, ktoré sa prirodzene vyskytujú v rôznych plodinách pestovaných pre potravinové a krmivové použitie, napr. vo fazuli, hrachu, zemiakoch, čaji a tiež v cukrovej repe. Hydrolýza glykozidu uvoľňuje v lipidoch rozpustný sapogenín. Hlavným sapogenínom v cukrovej repe je kyselina oleanolová, ktorej štruktúra je veľmi dobre charakterizovaná. Vo všeobecnosti majú saponíny trpkú chuť a pôsobia ako odpudzovače pred skrímením. Saponíny sú aktívne eliminované počas spracovávania cukrovej repy, preto neznamenia riziko pre ľudské zdravie. Analýza obsahu saponínov pri cukrovej repe pozostáva z uvoľnenia kyseliny oleanolovej, ktorá je kvantifikovaná metódou HPLC.

Cukrová repa nie je patogénna alebo škodlivá pre človeka. V Európe sa pestuje takmer 200 rokov a má dlhú históriu bezpečného používania.

2. Údaje týkajúce sa geneticky modifikovanej rastliny

2.1. Slovenský a latinský rodový a druhový názov geneticky modifikovaném vyššej rastliny, s presným určením kultivaru (odrody, línie, hybridu)

Slovenský názov: Repa obyčajná cukrová

Latinský názov: *Beta vulgaris* L.

Hybrid/-y: hybridy geneticky modifikovanej línie H7-1

2.2. Opis a charakteristika dedičných vlastností, ktoré boli vložené alebo zmenené, vrátane signálnych a selekčných génov a predchádzajúcich modifikácií a popis ich fenotypových prejavov

Geneticky modifikovaná cukrová repa H7-1 nesie plne funkčnú a intaktnú expresnú kazetu génu *cp4 epsps*, kódujúcu proteín CP4 EPSPS, ktorý prepožičiava cukrovej repe odolnosť voči herbicídu glyfozát. Glyfozát má vynikajúce schopnosti na likvidáciu burín a tiež všeobecne známe priaznivé charakteristiky ekologickej a zdravotnej bezpečnosti. Citlivosť konvenčných pestovaných plodín na glyfozát však bráni sezónnemu využitiu tohto herbicídu na nadzemné časti plodín. Rozsah využitia glyfozátu pre uplatnenie sezónnej aplikácie na väčšinu plodín ako je cukrová repa poskytuje farmárom nové možnosti v boji s burinami. Použitie glyfosátu v prípade cukrovej repy je veľmi významné, nakoľko farmárom umožňuje využiť priaznivé ekologické vlastnosti tohto herbicídu.

2.3. Typ genetickém modifikácie

2.3.1 Vnesenie cudzorodého dedičného materiálu

Pre charakterizáciu DNA, vlozenej do genómu cukrovej repy H7-1 bola použitá molekulárna analýza. Genomická DNA bola analyzovaná pomocou metódy Southernovej hybridizácie (Southern, 1975) s cieľom určiť počet vložení (počet vložených integrovaných DNA v rámci genómu cukrovej repy), počet kópií (počet kópií integrovanej DNA v rámci jedného lokusu), integritu vkladaneho promotora, kódujúcej sekvencie a neprekladanej oblasti 3', ako aj prítomnosti či absencie hlavných reťazcov plazmidu.

Výsledky analýz podporujú nasledovné závery:

(1) genóm cukrovej repy H7-1 obsahuje jednoduchú vložená časť DNA s jednou kópiu expresnej kazety génu *cp4 epsps*, použitej na genetickú transformáciu;

(2) expresná kazeta génu *cp4 epsps* a jej prvky v rámci jedného vloženia sú intaktné;

(3) genóm cukrovej repy H7-1 neobsahuje žiadne zistiteľné hlavné reťazce DNA plazmidu. Predovšetkým je zrejmé, že pôvod replikácie (*ori-V* a *ori-322*) a gén *aada* nie sú prítomné v cukrovej repe H7-1.

Výsledky molekulárnej analýzy podporujú záver, že vložená DNA prítomná v cukrovej repe H7-1 kóduje iba očakávaný proteín CP4 EPSPS v plnej dĺžke.

Nasledujúca časť opisuje experimenty molekulárnej analýzy, vykonané za účelom charakterizácie DNA vlozenej do genómu cukrovej repy H7-1.

2.3.2 Vyňatie časti dedičného materiálu

Nevzťahuje sa.

2.3.3 Kombinácia vyňatia a vnesenia dedičného materiálu

Nevzťahuje sa.

2.3.4 Bunková fúzia

Nevzťahuje sa.

2.3.5 Iné

Nevzťahuje sa.

2.4 Vlastnosti a pôvod použitého vektoru (pokiaľ bol vektor pri genetickej modifikácii použitý, plus mapa vektora)

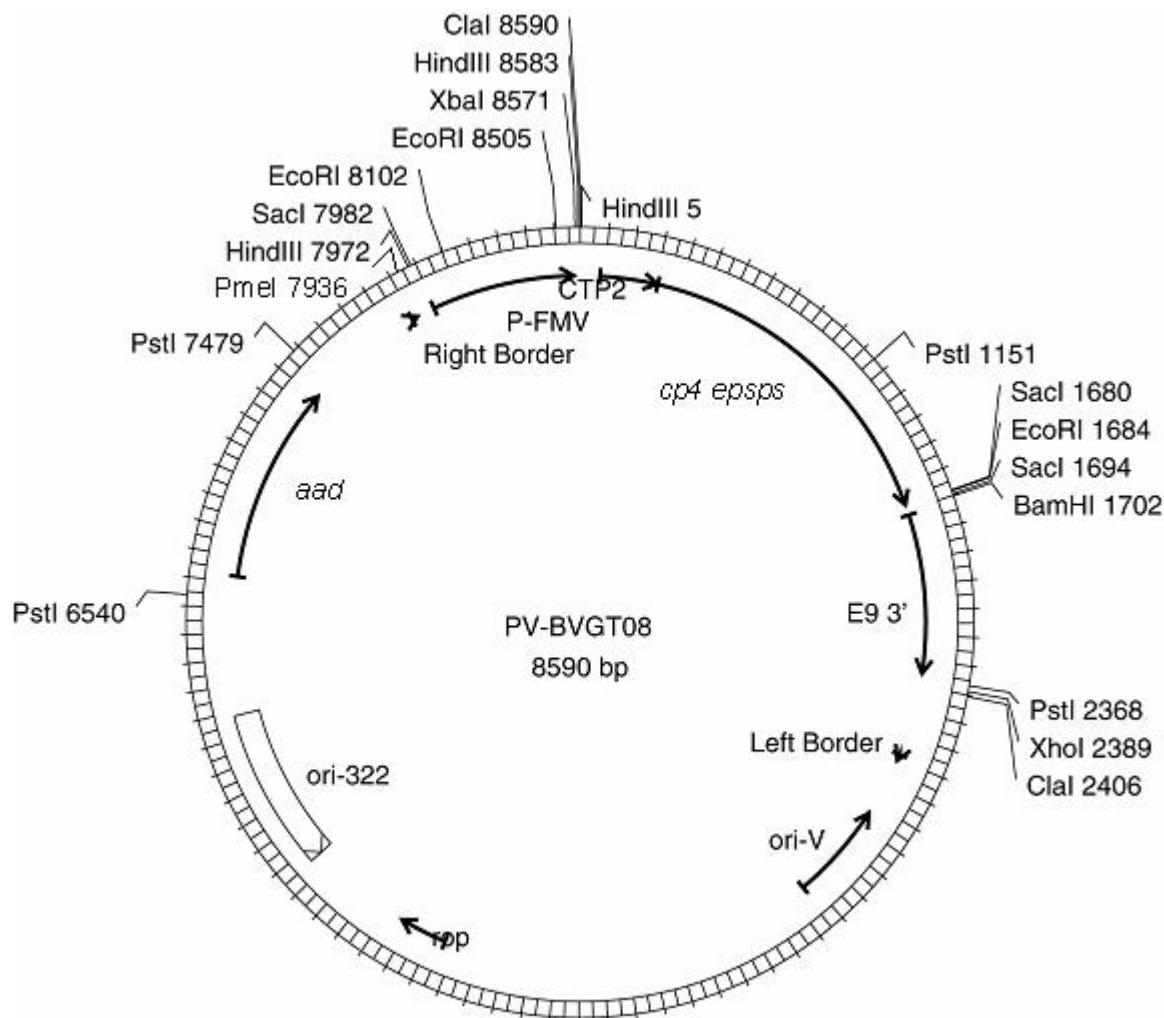
Vektor PV-BVGT08 je odzbrojený binárny vector pre genetickú transformáciu rastlín pomocou *Agrobacterium tumefaciens*. Je to rastlinný transformačný vector so zdvojenými hraničnými sekvenciami pozostávajúci z 8590 bp. Obsahuje sekvencie DNA, ktoré sú nevyhnutné pre prenos T-DNA do bunky. Tieto sekvencie sa nazývajú hraničnými sekvenciami pravého okraja (RB) a ľavého okraja (LB), a každá z týchto oblastí obsahuje sekvenciu 21-25 bp, definujúcu rozsah DNA, o ktorom sa predpokladá že bude prenesený do rastlinného genómu. Genetické elementy prítomné medzi hraničnými sekvenciami T-DNA sú v poradí od pravého okraja k ľavému okraju nasledovné:

- promótor 35S z modifikovaného vírusu mozaiky krtičníka (P-FMV);
- zavádzacia sekvencia génu *ctp2* z *Arabidopsis thaliana* pre expresiu v chloroplastoch;
- kódujúca sekvencia génu *epsps* z *Agrobacterium* sp. kmeň CP4 (*cp4 epsps*), a
- neprekladaná sekvencia E9 3' génu *rbcS E9* (E9 3') z hrachu.

Promótor, zavádzacia sekvencia, kódujúca sekvencia a neprekladaná sekvencia tvoria expresnú kazetu génu *cp4 epsps*.

Plazmid PV-BVGT08 okrem toho obsahuje bakteriálny markerový gén *aadA*, zabezpečujúci odolnosť proti antibiotikám spektinomycín a streptomycín, ako aj počiatky replikácie DNA (*ori-V* a *ori-322*), potrebné pre replikáciu a udržanie plazmidu PV-BVGT08 v baktériách. Všetky tieto genetické prvky sú umiestnené mimo T-DNA. Podľa očakávaní, žiadny z týchto prvkov nebol zabudovaný do genómu cukrovej repy H7-1 (Vid' časť 2.11. bod (iv)).

Mapa plazmidu PV-BVGT08 je na Obr. 1 a popis všetkých genetických prvkov plazmidu sa nachádza v Tab. 3. Niektoré miesta štiepenia reštrikčnými endonukleázami s umiestnením básových párov sú vyobrazené na Obr. 1, vrátane tých ktoré boli identifikované v texte a ktoré boli použité v molekulárnej genetickej analýze.



Obr. 1 Kruhový diagram plazmidu PV-BVGT08. Genetické prvky a reštrikčné oblasti pre enzýmy použité v Southernových analýzach (s polohami relatívnymi k plazmidovému vektoru) sú zodpovedajúco vyobrazené na vnútornej, ako aj vonkajšej strane mapy plazmidu.

Tab. 3 Súhrn genetických prvkov plazmidu PV-BVGT08

Genetické prvky	Veľkosť (kb)	Funkcia
Pravý okraj	0,025	Nukleotidová sekvencia veľkosti 21-25 bp, ktorá pôsobí ako iniciačný bod transferu DNA do rastlinnej bunky a pôvodne bola izolovaná z <i>A. tumefaciens</i> pTiT37 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)
P-FMV	0,672	Promótor 35S z modifikovaného vírusu mozaiky krtičníka (FMV, Figwort mosaic virus) (Gowda <i>et al.</i> , 1989; Richins <i>et al.</i> , 1987; Sanger <i>et al.</i> , 1990; Shepherd <i>et al.</i> , 1987)
<i>ctp2</i>	0,31	Sekvencia pre tranzitový peptid z génu <i>ShkG</i> z <i>Arabidopsis thaliana</i> , kódujúceho enzýmu EPSPS (Klee <i>et al.</i> , 1987)
<i>cp4 epsps</i>	1,363	Kódujúca sekvencia pre 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázu (EPSPS) z <i>Agrobacterium</i> sp. kmeň CP4 (Padgett <i>et al.</i> , 1995)
E9 3'	0,63	Neprekladaná sekvencia 3' génu E9 hrachu (<i>Pisum sativum</i>), kódujúceho menšiu podjednotku ribulózo-1,5-bisfosfát karboxylázy (<i>rbcS2</i>) (Coruzzi <i>et al.</i> , 1984; Morrelli <i>et al.</i> , 1985)
Ľavý okraj	0,025	Nukleotidová sekvencia veľkosti 21-25 bp, ktorá určuje transfer T-DNA do

		rastlinných buniek, pôvodne izolovaná z plazmidu pTi15955 <i>A. tumefaciens</i> , derivátu plazmidu oktopínového typu pTiA6 (Barker <i>et al.</i> , 1983)
<i>ori-V</i>	0,393	Počiatok replikácie z plazmidu RK2 so širokým okruhom hostiteľov pre udržanie plazmidu v bunkách <i>Agrobacterium</i> spp. (Rogers <i>et al.</i> , 1987)
<i>ori-322</i>	0,629	Počiatok replikácie z pBR322 pre udržanie plazmidu v <i>E. coli</i> (Sutcliffe, 1979)
<i>rop</i>	0,191	Segment plazmidu pBR322, ktorý potláča tvorbu RNA prajmeru, kritického pre udržanie plazmidu v bakteriálnych hostiteľoch ako je <i>E. coli</i> (Bolivar <i>et al.</i> , 1977; Cesareni <i>et al.</i> , 1982)
<i>aadA</i>	0,789	Bakteriálny gén kódujúci aminoglykozidy modifikujúci enzým 3' (9)-O-nukleotidyl-transferázu z transpozónu Tn7 (Fling <i>et al.</i> , 1985)

2.5 Údaje o každej časti úseku DNA, ktorý bol vnesený do organizmu príjemcu (pokiaľ genetická modifikácia zahŕňa vnesenie dedičného materiálu)

2.5.1 Pôvod (slovenské a latinské rodové a druhové meno darcovského organizmu presným určením kultivaru – odrody, rasy, plemena, línie, formy, hybridu, kmeňa, patovaru)

Genetické prvky určené na vloženie, ktoré sú prítomné medzi pravým a ľavým okrajom T-DNA, tvoria súčasť expresnej kazety génu *cp4 epsps*, pozostávajúcej z promotora 35S z modifikovaného vírusu mozaiky krtičníka (P-FMV), zavádzacej sekvencie *ctp2* pre expresiu v chloroplastoch z rastliny *Arabidopsis thaliana*, kódujúcej sekvencie génu *cp4 epsps* z baktérie *Agrobacterium* sp., kmeň CP4, a neprekladanej sekvencie E9 3' génu *rbcS E9* z hrachu siateho (*Pisum sativum*). Opis jednotlivých genetických prvkov a ich funkcií je uvedený nižšie.

Promótor P-FMV

Iniciácia prepisu kódujúcej sekvencie *ctp2::cp4 epsps* je riadená promótorom génu 35S. Tento promótor z modifikovaného vírusu mozaiky krtičníka (FMV) je významne aktívny v rastlinných bunkách (Gowda *et al.*, 1989; Richins *et al.*, 1987; Sanger *et al.*, 1990; Shepherd *et al.*, 1987).

Zavádzacia sekvencia ctp2 pre expresiu v chloroplastoch

Cieľový objekt glykozátu v rastlinách - enzým 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntáza (EPSPS) - sa nachádza v chloroplastoch. Množstvo proteínov, nachádzajúcich sa v chloroplastoch, vrátane EPSPS sa exprimuje z jadrových génov vo forme prekurzorov a sú transportované do chloroplastov pomocou tranzitového peptidu pre chloroplast (CTP, *chloroplast transit peptide*), ktorý je počas procesu importu z prekurzora odštiepený. Bolo dokázané *in vivo* (Timko *et al.*, 1988) aj *in vitro* (Della-Cioppa *et al.*, 1986; Della-Cioppa *et al.*, 1987), že nechloroplastové proteíny môžu byť cieleňé do chloroplastu použitím fúzovaných proteínov obsahujúcich CTP. Na dosiahnutie chloroplastovej lokalizácie proteínu CP4 EPSPS, ktorý ako bakteriálny proteín neobsahuje CTP, sekvencia *ctp2* cieleňá na lokalizáciu do chloroplastu a pochádzajúca z génu *epsps* z arábkovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana*) (Klee *et al.*, 1987) bola pripojená na kódujúcu sekvenciu génu *cp4 epsps*. Bolo preukázané, že chimérický proteín CTP-CP4 EPSPS umožňuje import do chloroplastov izolovaných z *Lactuca sativa* (Della-Cioppa *et al.*, 1986; Della-Cioppa *et al.*, 1987). Cieleňá lokalizácia proteínu CP4 EPSPS do chloroplastu sa pre dosiahnutie najvyššej možnej hladiny tolerance ku glykozátu ukazuje ako kritická (Della-Cioppa *et al.*, 1987).

Kódujúca sekvencia génu cp4 epsps

Gén *cp4 epsps* bol pôvodne izolovaný z *Agrobacterium* sp. kmeň CP4 a kóduje 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázu (CP4 EPSPS), ktorá je na rozdiel od väčšiny prirodzených rastlinných a mikrobiálnych EPSPS enzýmov prirodzene odolná voči glyfozátu (Padgett *et al.*, 1996a). Enzým EPSPS katalyzuje konverziu šikimát-3-fosfátu (S3P) a fosfoenolpyruvátu (PEP) na 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát (EPSP), medziprodukt nutný pre tvorbu aromatických aminokyselín (Haslam, 1974; Herrmann, 1983). Gén *cp4 epsps* kóduje CP4 EPSPS, proteín veľkosti 47,6 kDa, pozostávajúci z jediného polypeptidu so 455 aminokyselinami, ktorý je vysoko odolný voči glyfozátu a ktorý vyvoláva toleranciu ku glyfozátu pri rastlinách, do ktorých bol vnesený (Padgett *et al.*, 1996a).

Neprekladaná 3' sekvencia génu E9

Za kódujúcou sekvenciou *ctp2::cp4 epsps* nasleduje sekvencia DNA E9 3' odvodená z hrachu siateho (*Pisum sativum*), obsahujúca neprekladanú 3' oblasť génu pre menšiu podjednotku (*RbcS*) ribulózo-1,5-bisfosfát karboxylázy hrachu, E9 (Coruzzi *et al.*, 1984). Táto sekvencia riadi ukončenie transkripcie a polyadenyláciu mRNA génu *ctp2::cp4 epsps*.

Hraničné sekvencie T-DNA

Plazmid PV-BVGT08 obsahuje oblasti pravého okraja a ľavého okraja ohraničujúce tú časť DNA, ktorá sa má zabudovať do genómu cukrovej repy a ktoré sú nevyhnutné pre účinný prenos T-DNA do rastlinnej bunky. Tieto hraničné oblasti boli odvodené z plazmidov baktérie *Agrobacterium tumefaciens* (Barker *et al.*, 1983; Depicker *et al.*, 1982).

2.5.2 Funkčná charakteristika

Funkčná charakteristika úsekov DNA vnesených do organizmu príjemcu je uvedená v časti 2.5.1.

2.5.3 Veľkosť

Súhrn genetických prvkov plazmidu PV-BVGT08 a ich veľkostí je uvedený v Tab. 3.

2.6 Pokiaľ sa jedná o vyňatie časti dedičného materiálu (delécie), veľkosť a funkcie vyňatého úseku

Cukrová repa H7-1 bola vyvinutá zavedením génovej kazety *cp4 epsps* do genómu cukrovej repy prepožičiavajúcej geneticky transformovaným rastlinám toleranciu k herbicídum, ktorých aktívnou zložkou je glyfozát. Počas vývoja geneticky transformovanej cukrovej repy H7-1 nedošlo k žiadnym snahám o odstránenie alebo o inú modifikáciu genómovej DNA.

2.7 Opis metódy použitej pre genetickú modifikáciu

Na vytvorenie geneticky transformovanej cukrovej repy H7-1 bol použitý transformačný systém pomocou *Agrobacterium tumefaciens* s využitím binárneho vektora označovaného PV-BVGT08. Vektor PV-BVGT08 obsahuje oblasť DNA (T-DNA) ohraničenú sekvenciami pravého a ľavého okraja, ktoré nesú expresnú kazetu génu *cp4 epsps*, ktorý spôsobuje toleranciu ku glyfozátu.

Pôvodná genetická transformácia bola vykonaná použitím vlastníckymi právami chránenej viacklíčkovej línie cukrovej repy KWS. Ako zdroj explantátov boli použité kľúčne listy,

získané zo sterilných kľúčnych rastlín tejto línie cukrovej repy. Genetická transformácia sa uskutočnila s využitím bunkovej suspenzie baktérie *Agrobacterium tumefaciens*, obsahujúcej plazmid PV-BVGT08. Napokon bolo pre selekciu predpokladaných transformačných udalostí použité ako selekčné činidlo herbicíd glyfozát.

2.8 Umiestnenie vloženého dedičného materiálu v rastlinnej bunke (vložený do chromozómov, chloroplastov alebo v neintegrovanej forme)

Cukrová repa H7-1 obsahuje jedno vloženie (inzert) v genóme, segregujúce podľa pravidiel Mendelovskej genetiky. Výsledky *Chi*-kvadrát analýzy segregračných údajov cukrovej repy H7-1 sú v súlade s modelom jediného aktívneho miesta vloženia (inzercie) expresnej kazety génu *cp4 epsps* do jadrovej genomickej DNA (viď časť 2.11).

Na základe spôsobu dedičnosti vnesených znakov a vlastností po samoopelení alebo hybridizácii s inými rastlinami cukrovej repy bolo potvrdené, že vlastnosť tolerancie ku glyfozátu segreguje podľa Mendelových pravidiel dedičnosti. To tiež indikuje, že inzert bol stabilne zabudovaný do jadrového genómu a nie je lokalizovaný ani v mitochondriálnom, ani v chloroplastovom genóme.

2.9 Počet kópií vloženého dedičného materiálu

Na stanovenie počtu kópií vloženého dedičného materiálu v genóme cukrovej repy H7-1 boli uskutočnené rozsiahle molekulárne analýzy. Výsledky molekulárnych analýz, ako aj údaje o Mendelovskej dedičnosti introdukovaných vlastností podporujú záver, že geneticky transformovaná cukrová repa H7-1 obsahuje jedno vloženie (inzert) dedičného materiálu a toto inzerčné miesto obsahuje jednu kópiu expresnej kazety génu *cp4 epsps*. Metódy stanovenia a výsledky molekulárnych analýz determinácie počtu inzercií a počtu kópií vložených sekvencií sú uvedené v časti 2.11.

2.10 Stabilita vloženého dedičného materiálu a stabilita jeho umiestnenia

Stabilita inzertu v rôznych generáciách geneticky transformovanej cukrovej repy H7-1 bola študovaná použitím Southernových hybridizačných analýz, ktoré ukázali, že inzert je stabilný počas najmenej troch generácií. Okrem toho bola pri cukrovej repe H7-1 hodnotená stabilita tolerancie k herbicídu počas viacerých generácií v štvorročných poľných testoch uskutočnených vo viacerých Európskych štátoch. Tieto potvrdili, že vlastnosť tolerancie k herbicídu bola stabilne inkorporovaná a úroveň tolerancie ku glyfozátu bola konzistentná v rámci lokalít ako aj jednotlivých generácií.

2.11 Metódy stanovenia uvedených údajov

(i) Počet vložení (inzercií)

Pri cukrovej repe H7-1 bol zisťovaný počet vložených úsekov integrovanej DNA do genómu cukrovej repy (t.j. počet vložení). Pre stanovenie počtu vložení bola genomická DNA štiepená reštrikčnými enzýmami *HindIII*, *XbaI* a *BamHI* (Obr. 2). Ako negatívna kontrola bola štiepená pomocou *BamHI* DNA z bežnej cukrovej repy s podobným genetickým pozadím ako má H7-1. DNA plazmidu PV-BVGT08 bola použitá ako pozitívna kontrola.

XbaI, *BamHI* a *HindIII* neštiepia v rámci kódujúcej sekvencie génu *cp4 epsps* (Obr. 2), preto by mal každý enzým uvoľniť jednoduchý fragment DNA, obsahujúci časti vlozenej

DNA a príslušnú rastlinnú genomickú DNA, a hybridizovať so sondou *cp4 epsps*. Počet zistených fragmentov určuje počet vložení, prítomných v génome cukrovej repy H7-1.

Výsledky ukazuje Obr. 3. Po štiepení enzýmami *HindIII*, *XbaI* alebo *BamHI* bol detekovaný len jeden hybridizačný fragment. Fragментy veľkosti 5.2 kb po štiepení pomocou *HindIII* (Obr. 3, stĺpec 4), 4 kb po štiepení pomocou *XbaI* (Obr. 3, stĺpec 5) a cca 11 kb po štiepení pomocou *BamHI* (Obr. 3, stĺpec 7) ukázali, že genóm cukrovej repy H7-1 obsahuje jednu kópiu vlozenej DNA. Hybridizácia DNA plazmidu PV-BVGT08 sondou *cp4 epsps* dala podľa očakávania signál 8.6 kb (Obr. 3, stĺpec 1). Druhý, menší a veľmi nejasný prúžok je pravdepodobne spôsobený neúplným štiepením plazmidu PV-BVGT08. Tento odhad vychádza z poznatku, že plazmidy sa môžu vyskytovať v rôznych formách (izoformách), t.j. kruhových, lineárnych alebo multimérnych ako napr. konkataméry. Nekompletné štiepenie vysoko koncentrovanej vzorky plazmidovej DNA aplikovanej na agarózový gél môže viesť k pozorovaniu jedného alebo viacerých prúžkov. Negatívna kontrola (Obr. 3, stĺpec 8) negenerovala podľa očakávania žiaden signál.

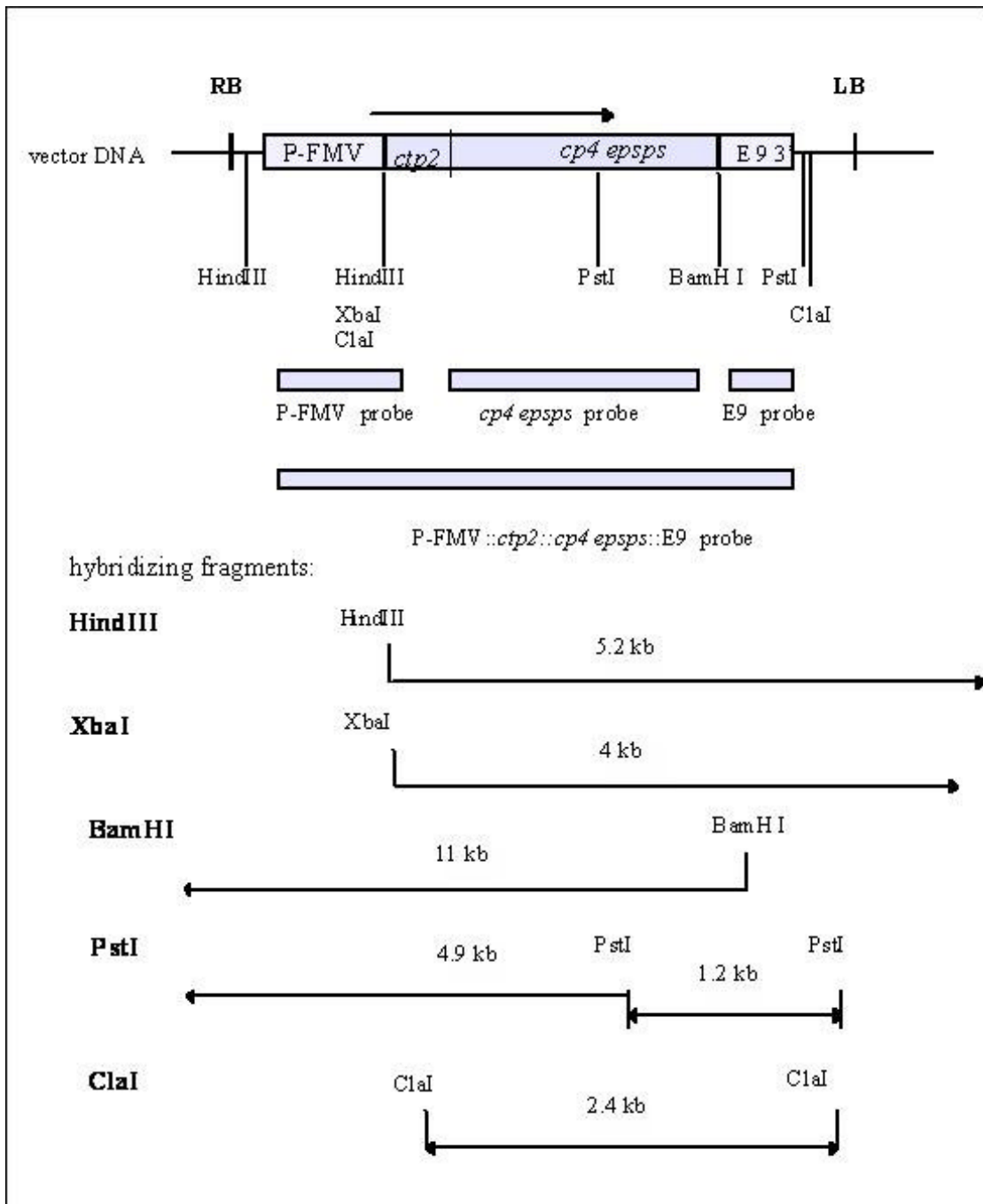
(ii) Počet kópií

Jeden lokus môže teoreticky obsahovať viac ako jednu kópiu inzertu DNA. Je to však málo pravdepodobné vzhľadom na veľkosti fragmentov restriktčných štiepení opísaných vyššie. Ak by bola pri cukrovej repe H7-1 prítomná prítomná viac ako jedna kópia inzertu DNA, pravdepodobne by sa zistili aj ďalšie fragmenty.

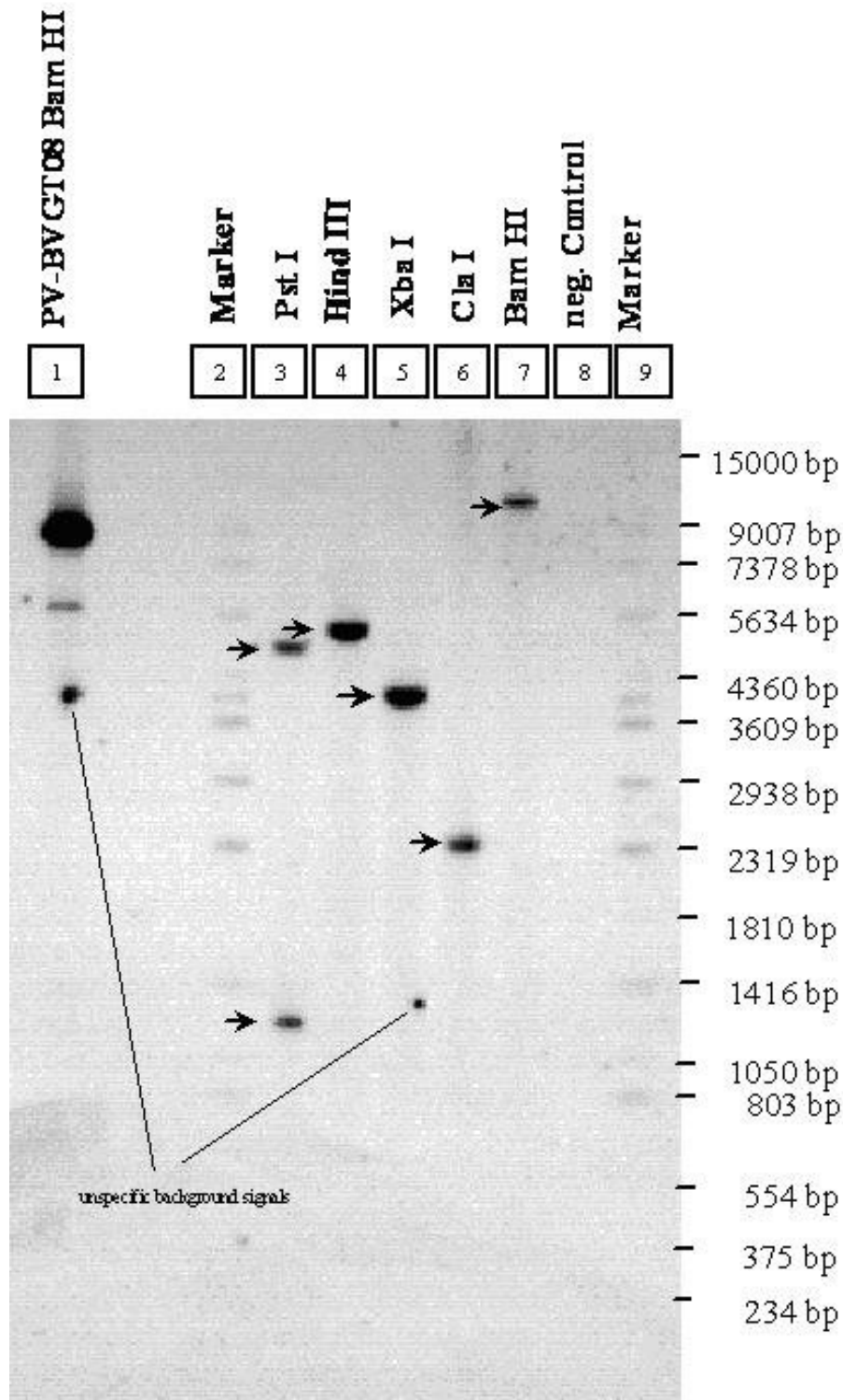
Prítomnosť jedinej kópie inzertu DNA bola potvrdená štiepením restriktčným enzýmom *PstI*. Enzým *PstI* štiepi T-DNA, t.j. oblasť medzi ľavou a pravou hraničnou sekvenciou, na dvoch miestach (Obr. 2). Jedno z restriktčných miest sa nachádza vo vnútri kódujúcej sekvencie génu *cp4 epsps*. Preto po štiepení genomickej DNA cukrovej repy H7-1 pomocou *PstI* by sa dalo očakávať, že sa po použití sondy odvodenej z génu *cp4 epsps* zistia dva hybridizačné fragmenty. Jeden z očakávaných fragmentov by zodpovedal internému fragmentu veľkosti okolo 1.2 kb. Druhý fragment by obsahoval časť inzertu súbežne s príslušnou rastlinnou genomickou DNA. Opätovne platí, že ak by sa tu nachádzala viac ako jedna kópia, museli by sa zistiť ďalšie fragmenty.

Výsledky ukazujú, že *PstI* štiepi DNA podľa očakávania. Bol zistený interný fragment veľkosti 1.2 kb a jediný doplnkový fragment veľkosti cca 4.9 kb (Obr. 3, stĺpec 3).

Ako doplnková vnútorná kontrola bola genomická DNA cukrovej repy H7-1 rozštiepená pomocou enzýmu *ClaI* (Obr. 3, stĺpec 6). *ClaI* štiepi vloženú expresnú kazetu *cp4 epsps* na dvoch miestach. Podľa očakávania so sondou odvodenu z génu *cp4 epsps* hybridizoval len jediný fragment veľkosti 2.4 kb. Tento výsledok tiež potvrdzuje neporušenosť integrovaného fragmentu DNA v cukrovej repe H7-1.



Obr. 2 Schematické zobrazenie inzertu v cukrovej repe H7-1. Na obrázku je lineárna mapa inzertu a genomická DNA susediaca s inzertom v H7-1. Horná časť obrázku zobrazuje genetické prvky vo vnútri inzertu, ako aj restričné miesta použité v Southernových hybridizačných analýzach. Pravouhlé pruhy pod zobrazeným inzertom ukazujú sondy použité pre analýzy. V dolnej časti obrázku sú znázornené veľkosti fragmentov DNA po štiepení príslušnými restričnými enzýmami.



Obr. 3 Southernova hybridizačná analýza cukrovej repy H7-1: analýza počtu vložení a počtu kópií. Rôzne vzorky obsahujúce 10 µg genomickej DNA cukrovej repy H7-1 boli štiepené príslušnými restriktónymi enzýmami *Pst*I, *Hind*III, *Xba*I, *Cla*I a *Bam*HI (stĺpce 3 až 7). Genomická DNA negatívnej kontroly bola štiepená enzýmom *Bam*HI (stĺpec 8). DNA plazmidu PV-BVGT08 ako pozitívna kontrola bola štiepená pomocou *Bam*HI (stĺpec 1). Stĺpce 2 a 9 obsahujú makery veľkostí DNA fragmentov. Hybridizačná membrána bola analyzovaná pomocou sondy pre fragment kódujúcej sekvencie génu *cp4 epsps* a značenej ^{32}P . Sonda je vnútornou sekvenciou kódujúcej sekvencie génu *cp4 epsps*, pokrývajúcej báze páry 447 až 1555.

(iii) Integrita vlozenej expresnej kazety génu cp4 epsps

Integrita expresnej kazety génu *cp4 epsps* a jej jednotlivých prvkov (promótor P-FMV, kódujúca sekvencia génu *cp4 epsps*, a neprekladaná sekvencia E9 3') bola stanovená pomocou štiepenia restriktčnými enzýmami *HindIII* pre promótor P-FMV, *HindIII* a *BamHI* pre kódujúcu sekvenciu *ctp2::cp4 epsps*, a *EcoRI* a *PstI* pre neporušenosť neprekladanej sekvencie E9 3'. Boli vykonané aj doplnkové experimenty s použitím restriktáz *SacI* a *XhoI* pre oblasť P-FMV::*ctp2::cp4 epsps* a pre neprekladanú sekvenciu E9 3'. Genomická DNA z konvenčnej odrody cukrovej repy s podobným genetickým pozadím ako má H7-1 bola použitá ako negatívna kontrola, zatiaľ čo DNA plazmidu PV-BVGT08 zmiešaná s genomickou DNA negatívnej kontroly bola použitá ako pozitívna kontrola. DNA extrahovaná z cukrovej repy H7-1 a z pozitívnej a negatívnej kontroly boli štiepené rovnakými enzýmami. Tieto enzýmy štiepia vo vnútri integrovaného DNA inzertu medzi ľavou a pravou hraničnou sekvenciou (pozri mapu plazmidu na Obr. 1). Preto ak sú zodpovedajúce prvky intaktné, veľkosť hybridizovaných fragmentov pre DNA cukrovej repy H7-1 a DNA PV-BVGT08 by mali byť rovnaké.

Ako doplnkový dôkaz intaktnosti bola genomická DNA cukrovej repy H7-1 a DNA PV-BVGT08 štiepená pomocou enzýmu *XbaI*. *XbaI* štiepi jeden krát vo vnútri plazmidového vektora a jeden krát vo vnútri vlozenej DNA, t.j. medzi promótorom a kódujúcou sekvenciou *ctp2::cp4 epsps* (Obr. 1 a Obr. 2). Preto je možné očakávať detekciu pruhu veľkosti 8.6 kb pre DNA plazmidu PV-BVGT08, zodpovedajúceho veľkosti kompletného plazmidu, a fragmentu spojovacej sekvencie medzi inzertom a genomickou DNA pri cukrovej repe H7-1, ktorá bude mať odlišnú veľkosť v porovnaní s pruhom DNA plazmidu PV-BVGT08.

Výsledky sú znázornené na nasledujúcich obrázkoch.

Obr. 4: Enzymatické štiepenie genomickej DNA cukrovej repy H7-1 a plazmidovej DNA pomocou *HindIII* a *BamHI* uvoľnil kódujúcu sekvenciu *ctp2::cp4 epsps*. Hybridizačná membrána bola analyzovaná použitím ³²P značenej sondy z fragmentu génu *cp4 epsps*, vytvorenej PCR. Negatívna kontrola (stĺpec 3) nevykazovala žiadne hybridizačné prúžky. Genomická DNA z cukrovej repy H7-1 (stĺpec 2) a plazmidová DNA PV-BVGT08 v zmesi s DNA negatívnej kontroly (stĺpec 4) vytvorili každá prúžok veľkosti cca 1,7 kb, ktorý zodpovedá očakávanej veľkosti. Výsledkom štiepenia pomocou *XbaI* bol očakávaný prúžok linearizovanej DNA plazmidu PV-BVGT08 o veľkosti 8.6 kb (stĺpec 7). V prípade cukrovej repy H7-1 štiepenie vytvorilo spojovací fragment medzi inzertom a genomickou DNA veľkosti cca 4,0 kb (stĺpec 5; viď aj Obr. 2). Negatívna kontrola opätovne nevytvorila žiaden signál (stĺpec 6).

Obr. 5: Enzymatické štiepenie genomickej DNA cukrovej repy H7-1 a plazmidovej DNA pomocou *HindIII* uvoľnilo promótor P-FMV, ktorý bol analyzovaný pomocou fragmentu P-FMV značenom ³²P a generovaným PCR. Negatívna kontrola (stĺpec 5) nevykazovala hybridizačný signál. Genomická DNA z cukrovej repy H7-1 (stĺpec 6) a plazmidová DNA PV-BVGT08 v zmesi s DNA negatívnej kontroly (stĺpec 4) vytvorili každá hybridizačný fragment veľkosti cca 0,6 kb. Tieto fragmenty zodpovedajú očakávanej veľkosti promótoru P-FMV.

Výsledkom štiepenia pomocou enzýmu *XbaI* bol predpokladaný prúžok veľkosti 8,6 kb z linearizovaného plazmidu (stĺpec 1) a spojovací fragment medzi inzertom a genomickou DNA veľkosti cca 1,3 kb z cukrovej repy H7-1 (stĺpec 3). Prítomnosť fragmentu veľkosti 1,3 kb je tiež ďalším dôkazom toho, že cukrová repa H7-1 obsahuje iba jedinú kópiu expresnej kazety génu *cp4 epsps*. Negatívna kontrola (stĺpec 2) opätovne nevytvorila žiaden signál.

Štiepenie pomocou *SacI* a *XhoI* uvoľnilo dva fragmenty, jeden z nich obsahoval promótor P-FMV spolu s kódujúcou sekvenciou *ctp2::cp4 epsps*, a ďalší s obsahom neprekladanej sekvencie E9 3' (pozri mapu plazmidu na Obr. 1). DNA plazmidu PV-BVGT08 v zmesi s DNA negatívnej kontroly a genomickej DNA cukrovej repy H7-1 boli hybridizované kompletnou sondou expresnej kazety génu *cp4 epsps* značenou ³²P (zo štiepenia enzýmami *PmeI* plus *XhoI*). Hybridizačná membrána ukazuje predpokladaný hybridizačný prúžok P-FMV::*cp4 epsps* veľkosti 2,3 kb, a neprekladanú sekvenciu E9 3' veľkosti 0,7 kb (stĺpce 9 a 11). Negatívna kontrola (stĺpec 10) opätovne nevykázala žiaden hybridizačný signál.

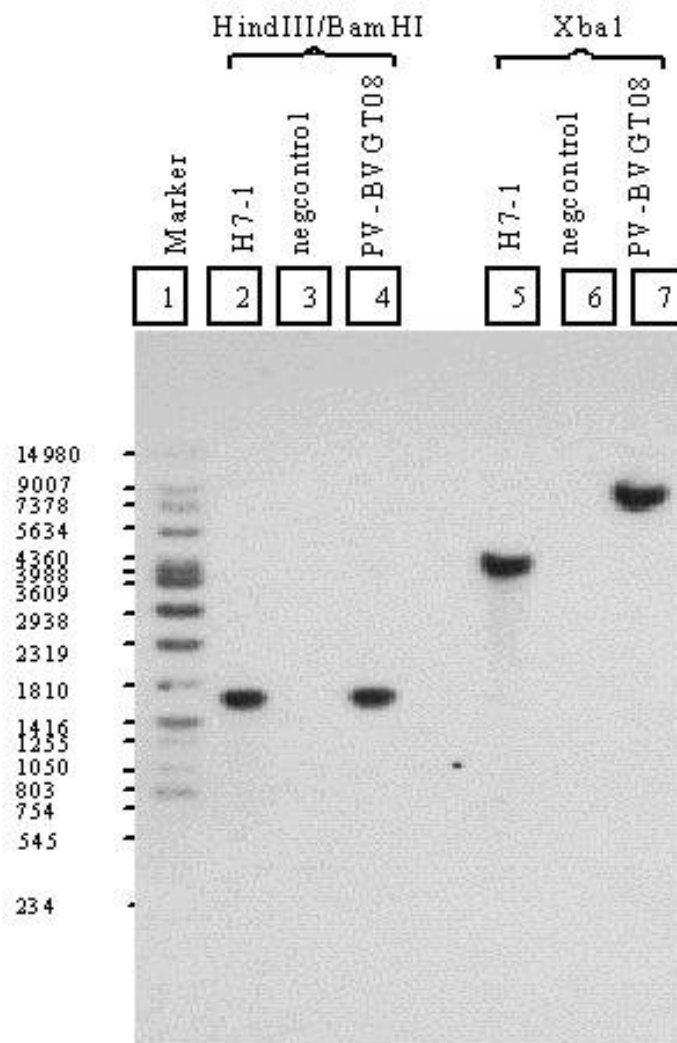
Obr. 6: Enzymatické štiepenie genomickej DNA cukrovej repy H7-1 a plazmidovej DNA pomocou *PstI* a *EcoRI* uvoľnilo fragment, ktorý hybridizoval s neprekladanou sondou sekvencie E9 3' značenou ³²P. Plazmidová DNA zmiešaná s DNA negatívnej kontroly (stĺpec 2) a genomická DNA z cukrovej repy H7-1 (stĺpec 4) vytvorili každý hybridizačný prúžok veľkosti cca 0,6 kb, ktorý zodpovedá predpokladanej veľkosti fragmentu E9 3'.

Výsledkom enzymatického štiepenia pomocou *XbaI* bol očakávaný hybridizačný prúžok veľkosti 8,6 kb z linearizovaného plazmidu (stĺpec 5) a cca 4,0 kb veľký spojovací fragment medzi inzertom a genomickou DNA z cukrovej repy H7-1 (stĺpec 7), potvrdzujúc tak prítomnosť jedinej kópie inzertu.

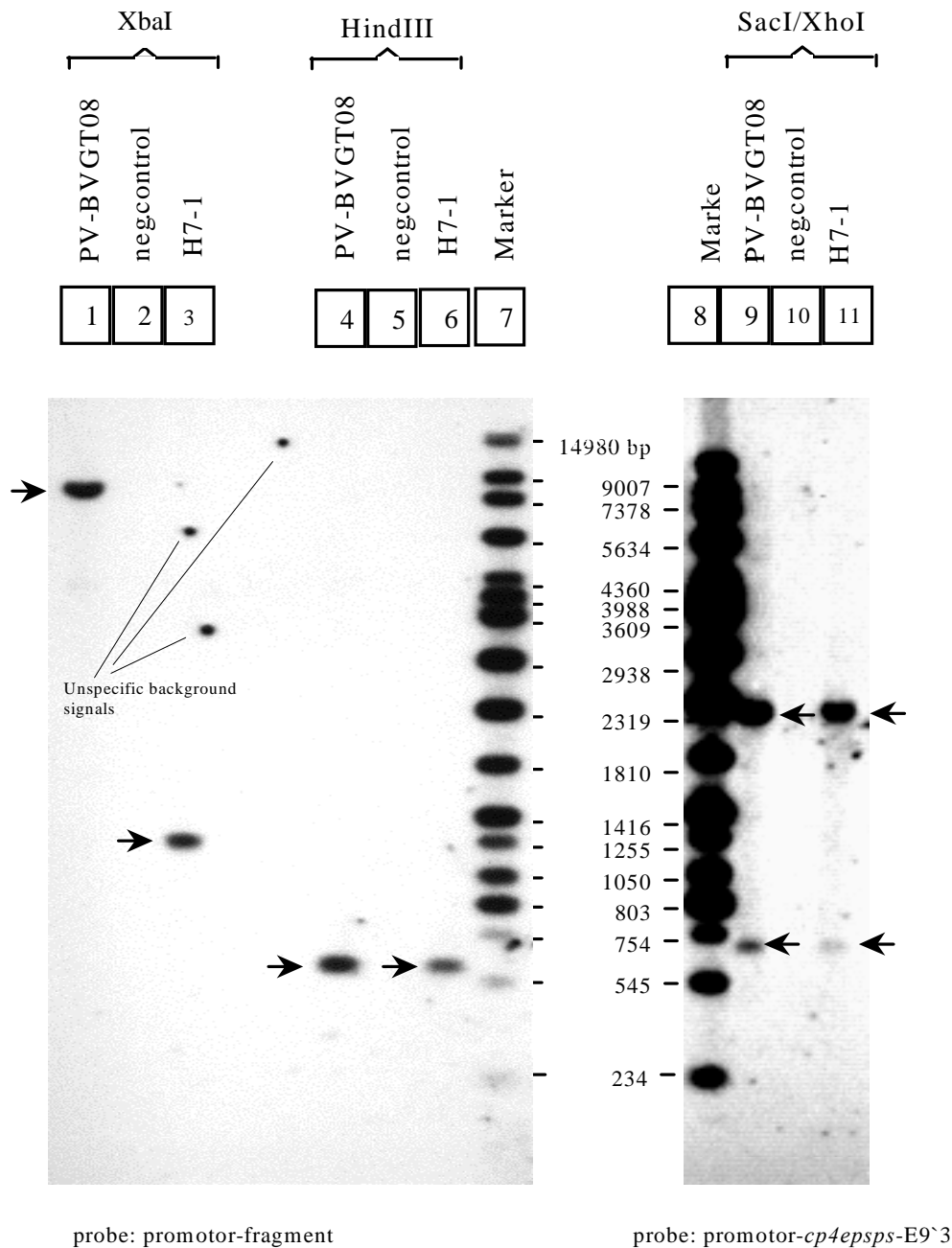
Štiepenie pomocou restriktívneho enzýmu *PstI* uvoľnilo fragment, ktorý obsahoval neprekladanú sekvenciu E9 3' plus časť zakončenia 3' kódujúcej sekvencie génu *cp4 epsps*, ktorá hybridizovala s tou istou sondou neprekladanej sekvencie E9 3' značenej ³²P. Ako sa očakávalo, v genomickej DNA cukrovej repy H7-1 (stĺpec 8), ako aj v plazmidovej DNA (stĺpec 10) sa zistil fragment veľkosti 1,2 kb.

Výsledkom enzymatického štiepenia pomocou *HindIII* bol prúžok veľkosti 8,0 kb z linearizovaného plazmidu, krátenej o sekvenciu promótoru (stĺpec 13), a 5,2 kb veľký spojovací fragment medzi inzertom a genomickou DNA z cukrovej repy H7-1 (stĺpec 11). Jediný fragment veľkosti 5,2 kb zo štiepenia pomocou *HindIII*, a jediný fragment veľkosti 4,0 kb zo štiepenia pomocou *XbaI* tiež preukazujú, že cukrová repa H7-1 obsahuje iba jednu kópiu vlozenej DNA.

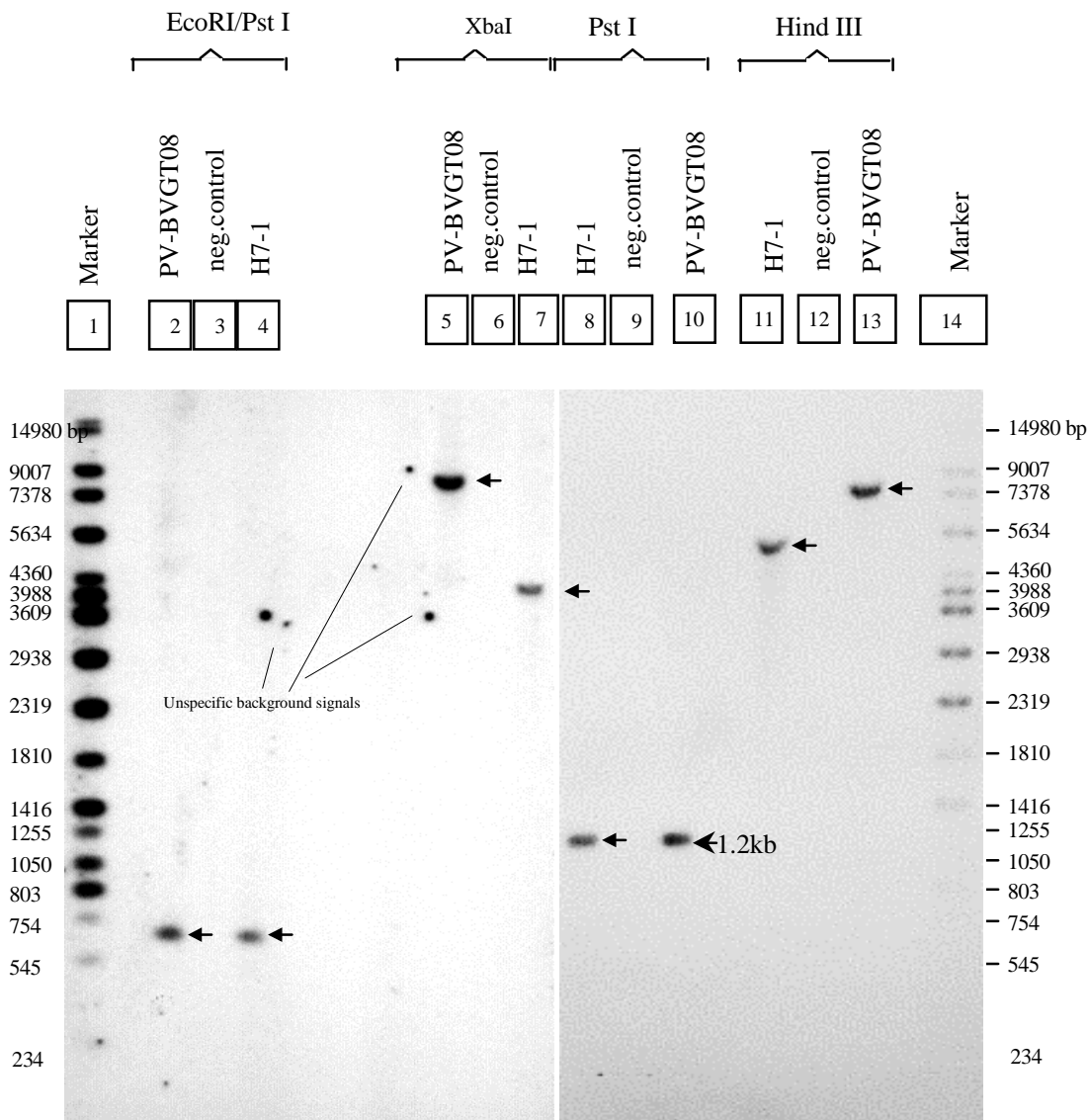
Žiadna z negatívnych kontrol, štiepených rôznymi enzýmami, nevyprodukovala žiadne hybridizačné prúžky (stĺpce 3, 6, 9 a 12).



Obr. 4. Southernova hybridizačná analýza cukrovej repy H7-1: neporušenosť kódujúcej sekvencie *ctp2::cp4 epsps*. 10 µg genomickej DNA cukrovej repy H7-1, DNA negatívnej kontroly alebo DNA plazmidu PV-BVGT08 zmiešanej s DNA negatívnej kontroly bolo štiepených pomocou restriktázy *Xba*I (stĺpce 5, 6 a 7) alebo pomocou enzýmov *Hind*III plus *Bam*HI (stĺpce 2, 3 a 4). Hybridizačná membrána bola analyzovaná sondou z fragmentu génu *cp4 epsps* (PCR) značenou ³²P. Táto sonda predstavuje sekvenciu PV-BVGT08 od bp 447 do 1555.



Obr. 5 Southernova hybridizačná analýza cukrovej repy H7-1: neporušenosť P-FMV. 10 µg genomickej DNA cukrovej repy H7-1, DNA negatívnej kontroly alebo DNA plazmidu PV-BVGT08 zmiešanej s DNA negatívnej kontroly bolo štiepených pomocou restriktázy *HindIII* (stĺpce 4, 5 a 6), *XbaI* (stĺpce 1, 2 a 3), alebo *SacI* plus *XhoI* (stĺpce 9, 10 a 11). Hybridizačná sonda bola analyzovaná sondou odvodenou z promótoru (zo štiepenia *HindIII*, totožného so sekvenciou PV-BVGT08 od bp 7972 do 8583) a značeného ³²P, alebo kompletnou kazetou expresie génu *cp4 epsps* (zo štiepenia enzýmami *PmeI* plus *XhoI*, totožnou so sekvenciou plazmidu PV-BVGT08 od bp 7935 do 2389).



Obr. 6. Southernova hybridizačná analýza cukrovej repy H7-1: neporušenosť E9 3'. 10 µg genomickej DNA cukrovej repy H7-1, DNA negatívnej kontroly, alebo DNA plazmidu PV-BVGT08 zmiešanej s DNA negatívnej kontroly bolo štiepených pomocou *EcoRI* plus *PstI* (stĺpce 2, 3 a 4), *XbaI* (stĺpce 5, 6 a 7), *HindIII* (stĺpce 11, 12 a 13) alebo iba pomocou *PstI* (stĺpce 8, 9 a 10). Hybridizačná membrána bola analyzovaná pomocou sondy odvodenej z neprekladanej sekvencie E9 3' zo štiepenia *BamHI* plus *XhoI* značenej ^{32}P a totožnej so sekvenciou PV-BVGT08 od bázoového páru 1702 do 2389.

(iv) Posúdenie neprítomnosti hlavného reťazca plazmidu PV-BVGT08

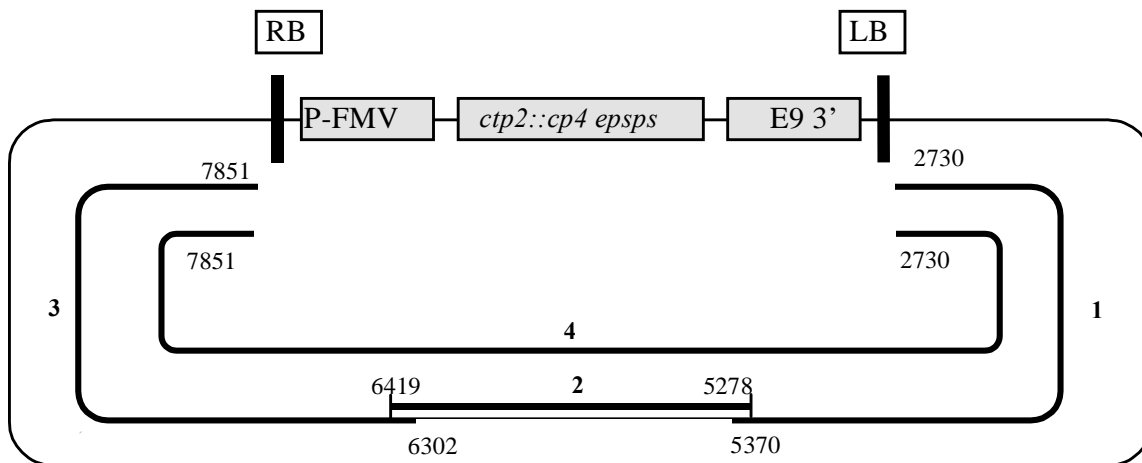
Neočakával sa transfer genetických prvkov pochádzajúcich z oblastí mimo hraničných sekvencií T-DNA na plazmide PV-BVGT08 (*ori-V*, *ori-322* a *aada*) do genómu cukrovej repy.

Pre potvrdenie toho, že do genómu cukrovej repy H7-1 neboli prenesené žiadne sekvencie hlavného reťazca plazmidu (angl. *plasmid backbone sequences*) boli genomická DNA cukrovej repy H7-1, DNA negatívnej kontroly a DNA plazmidu PV-BVGT08 porovnané s DNA cukrovej repy H7-1 štiepenej restriktčným enzýmom *XbaI* a analyzované troma prekrývajúcimi sa sondami vytvorenými pomocou PCR (sondy 1, 2 a 3, Obr. 7),

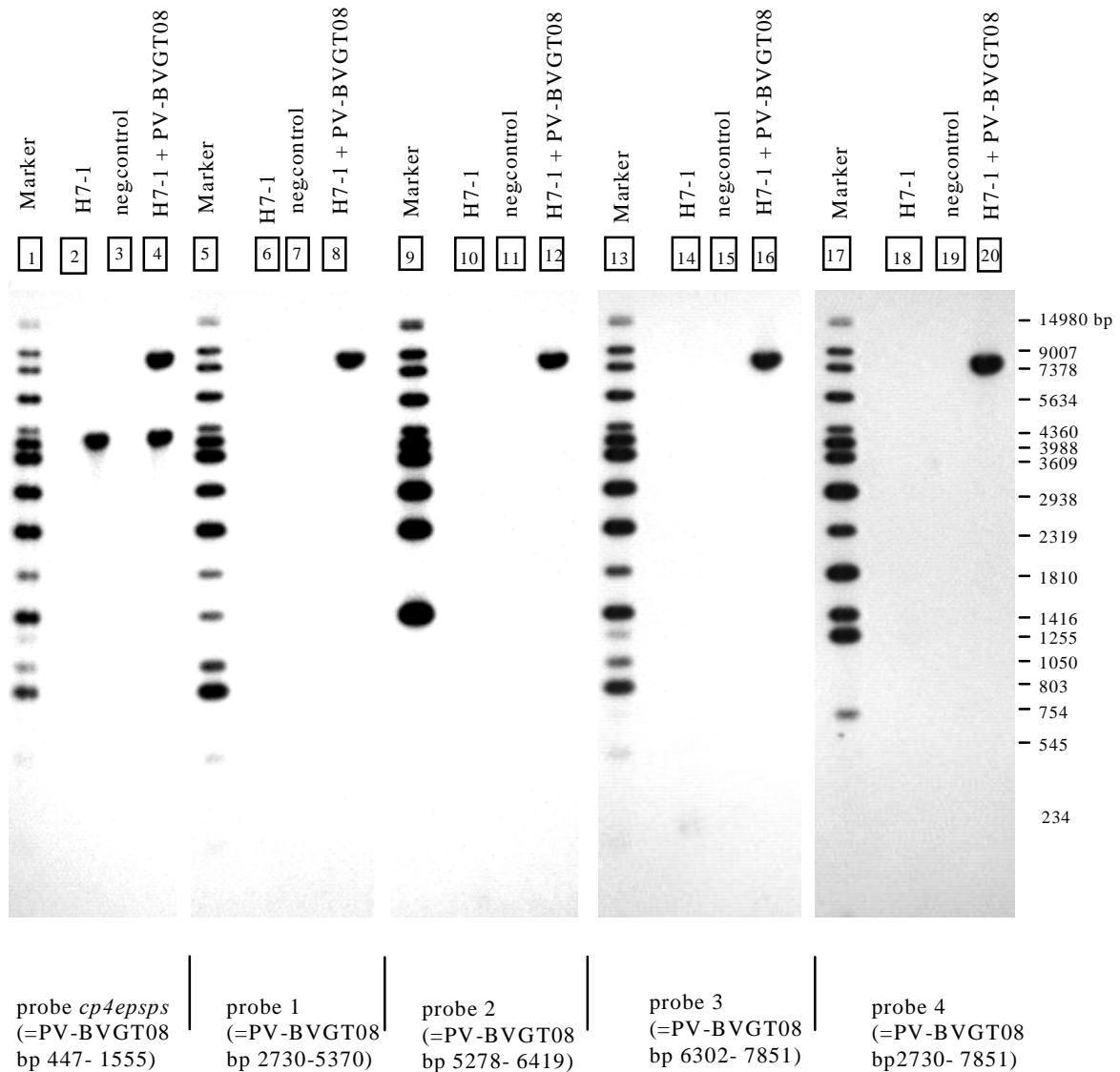
pokrývajúcimi celú sekvenciu hlavného reťazca plazmidu. Použila sa aj štvrtá sonda, pozostávajúca z celého hlavného reťazca v jedinom fragmente (sonda 4, Obr. 7).

Obr. 8 znázorňuje výsledky hybridizačných analýz podľa Southerna s využitím štyroch sond pre potvrdenie absencie sekvencií hlavného reťazca plazmidu. V stĺpcoch 6, 10, 14 a 18, štiepenej genomickej DNA cukrovej repy H7-1, analyzovanej prekrývajúcimi sa sondami hlavného reťazca, sa nepreukázali žiadne hybridizačné pružky. Rovako neboli preukázané ani v negatívnej kontrole (stĺpce 3, 7, 11, 15 a 19). Iba pozitívna kontrola (DNA plazmidu PV-BVGT08 pridaná ku genomickej DNA cukrovej repy H7-1) vykazovala podľa očakávania pružky veľkosti 8,6 kb (stĺpce 4, 8, 12, 16 a 20). Tieto pružky predstavujú linearizovanú DNA plazmidu PV-BVGT08.

Ako kontrola koncentrácie DNA boli genomická DNA cukrovej repy H7-1 (stĺpec 2) a DNA plazmidu PV-BVGT08 pridané ku genomickej DNA cukrovej repy H7-1 (stĺpec 4), všetky štiepené pomocou *Xba*I, hybridizované sondou obsahujúcou kódujúcu sekvenciu *cp4 epsps*. Pružok veľkosti 4,0 kb v stĺpci 2 predstavuje fragment DNA, obsahujúci promótor P-FMV po fúzii s časťou genomickej DNA cukrovej repy. Dva pružky v stĺpci 4 predstavujú rovnaký fragment veľkosti 4,0 kb plus linearizovanú DNA veľkosti 8,6 kb plazmidu PV-BVGT08. Oba pruhy majú zhodnú intenzitu. Toto je jasnou indikáciou toho, že koncentrácia pridanej DNA plazmidu PV-BVGT08 je porovnateľná s koncentráciou kódujúcej sekvencie *cp4 epsps* v DNA cukrovej repy H7-1. Koncentrácia použitej plazmidovej DNA je ekvivalentná 0,5 kópiám. Ak by sa tu nachádzali významné sekvencie hlavného reťazca, integrované do genómu cukrovej repy H7-1, museli by sa ukázať jasné signály.



Obr. 7 Diagram sond hlavného reťazca plazmidu PV-BVGT08



Obr. 8 Southernova hybridizačná analýza cukrovej repy H7-1: analýza hlavného reťazca plazmidu PV-BVGT08. 10 µg genomickej DNA cukrovej repy H7-1, DNA negatívnej kontroly, a DNA PV-BVGT08 pridané ku genomickej DNA cukrovej repy H7-1 boli štiepené pomocou restriktívneho enzýmu *Xba*I. Hybridizačné membrány boli analyzované pomocou sond obsahujúcich celý hlavný reťazec plazmidu PV-BVGT08 značených ³²P (sondy 1 až 4, Obr.7). Jedna hybridizačná membrána bola sondovaná fragmentom kódujúcej sekvencie génu *cp4 epsps* značeným ³²P.

(v) *Súhrn molekulárnej analýzy cukrovej repy H7-1*

Molekulárne analýzy preukázali, že genóm cukrovej repy H7-1 obsahuje jediné vloženie DNA, pozostávajúce z jednoduchého kópie expresnej kazety génu *cp4 epsps*. Všetky prvky expresnej kazety *cp4 epsps* sú intaktné. Cukrová repa H7-1 neobsahuje žiadne zistiteľné sekvencie hlavného reťazca z plazmidu, použitého pre transformáciu. Osobitne je zrejmé, že počiatky replikácie (*ori-V* a *ori-322*) a gén *aadA* nie sú prítomné v geneticky transformovanej cukrovej repe H7-1.

2.12 Údaje o expresii vloženého dedičného materiálu

2.12.1 Miesto, kde dochádza v rastline k expresii vložených génov

Cukrová repa H7-1 obsahuje jednu funkčnú introdukovanú bielkovinu, CP4 EPSPS, zabezpečujúcu odolnosť voči glyfozátu. Hladiny proteínu CP4 EPSPS boli merané v pletivách cukrovej repy, zberanej v rokoch 1998 až 1999 na 16 lokalitách v Európskych krajinách. Výsledky analýzy potvrdili, že hladiny introdukovaných proteínov sú porovnateľné v rôznych agroklimatických podmienkach.

V rokoch 1998 a 1999 sa uskutočnili poľné skúšky na 10 (1998) a 6 (1999) lokalitách, rozmiestnených v hlavných pestovateľských oblastiach cukrovej repy v Európe. Počas zberu boli odoberané vzorky rastlín na všetkých lokalitách a boli zisťované hladiny proteínu CP4 EPSPS v extraktoch vzoriek pletív vrcholových listov („top”) a spracovaného (macerovaného) koreňa („brei“) použitím dvojitého sendvičového ELISA testu. Výsledky analýz sú zhrnuté v Tab. 4. Stupeň expresie proteínu CP4 EPSPS v pletivách listovej ružice cukrovej repy bola v priemere 0,172 (1998) a 0,161 (1999) µg/mg čerstvej hmotnosti. V macerovaných koreňoch bol priemer expresie CP4 EPSPS 0,053 a 0,181 µg/mg čerstvej hmotnosti v rokoch 1998 a 1999.

Je zrejmé, že hladiny proteínu CP4 EPSPS zistené vo vzorkách koreňov z poľných skúšok realizovaných v Európe v r. 1999 sú približne trojnásobne vyššie ako hladiny proteínu stanovené pre vzorky z poľných skúšok v Európe realizovaných v r. 1998. Toto trojnásobné zvýšenie hladiny proteínu CP4 EPSPS je pravdepodobne spôsobené odlišnými analytickými postupmi, používanými v laboratóriách Monsanto-Louvain-la-Neuve (vzorky z r. 1998) a Monsanto-St. Louis (vzorky z r. 1999). Analytické metódy, používané pracoviskom Monsanto-St. Louis boli v porovnaní s metódami používanými v Monsanto-Louvain-la-Neuve optimalizované, vrátane účinnosti extrakcie proteínu CP4 EPSPS (98.7%) z koreňovej matrice a použitím polyklonálnej sendvičovej analýzy ELISA s využitím monoklonálnych kozích protilátok.

Tab. 4 Sumárne výsledky analýzy stupňa expresie proteínu CP4 EPSPS v pletivách cukrovej repy H7-1, získanej z poľných skúšok vykonaných v rokoch 1998 a 1999 v Európe

Typ pletiva	1998		1999	
	CP4 EPSPS µg/mg fw (priemer) ³	CP4 EPSPS µg/mg fw (rozsah) ⁴	CP4 EPSPS µg/mg fw (priemer) ³	CP4 EPSPS µg/mg fw (rozsah) ⁴
Vrcholové listy (top) ¹	0.172	0.106 – 0.216	0.161	0.102 – 0.307
Macerované korene (brei) ²	0.053	0.033 – 0.077	0.181	0.116 – 0.233

¹ 1998: Na každej z 10 lokalít boli odoberané reprezentatívne vzorky listov zozbieraných vrcholových listov 30 rastlín cukrovej repy H7-1 ešte pred samotným zberom. Pre analýzu bola spracovaná kombinovaná vzorka z 30 rastlín. Pre zachovanie stability boli vzorky do vykonania analýzy okamžite zmrazené za pomoci suchého ľadu.

1999: Pre každú zo šiestich lokalít sa vykonal jeden experiment. Každý experiment bol rozdelený do troch subexperimentov. Pre každý subexperiment bola počas zberu pripravená kombinovaná vzorka (alebo opakovanie) z 25-30 náhodne vybraných rastlín (jeden list veľkosti cca 5-10 cm² na každú rastlinu) a táto vzorka bola spracovaná pre analýzu. Sumárne, z každej lokality sa odobrali tri kombinované vzorky (opakovania). Vzorky listov boli umiestnené do kónických skúmaviek a prenesené na suchom ľade do testovacieho laboratória.

² 1998: Počas zberu boli korene tých istých rastlín cukrovej repy H7-1 odoslané do Francúzska (francúzske laboratórium AGREN) na spracovanie drviny pomocou drviaceho zariadenia. Pre

analýzu bola spracovaná jedna kombinovaná vzorka z 30 rastlín. Vzorky boli okamžite zmrazené suchým ľadom pre zachovanie stability do vykonania analýzy.

1999: Pre každú zo šiestich lokalít sa vykonal jeden experiment. Každý experiment bol rozdelený do troch subexperimentov. Pre každý subexperiment bola počas zberu pripravená kombinovaná vzorka (alebo opakovanie) z tých istých 25-30 náhodne vybraných rastlín, použitých pre zber listov. Korene boli odoslané do Francúzska (francúzske laboratórium AGREN) na spracovanie drviny pomocou drviaceho zariadenia. Sumárne, z každej lokality sa odobrali tri kombinované vzorky (opakovania). Vzorky boli okamžite zmrazené suchým ľadom a následne uložené v mrazničke pri teplote -80°C do vykonania analýzy.

³ 1998: Priemer bol vypočítaný pre $n = 10$, kde každá z 10 lokalít poskytla samostatnú vzorku pre analýzu. Každá vzorka bola analyzovaná dvakrát.

1999: Priemer bol vypočítaný z analýz troch opakovaní rastlinných vzoriek pre každú poľnú lokalitu.

⁴ 1998: Hodnoty minima a maxima pre analýzy vzoriek zo všetkých lokalít.

1999: Hodnoty minima a maxima pre analýzy vzoriek zo všetkých lokalít.

Expresia kódujúcej sekvencie *cp4 epsps* je riadená promótorom 35S, odvodeným od modifikovaného vírusu mozaiky krtičníka (FMV), ktorý je konštitutívne aktívny v rastlinných bunkách (Kay *et al.*, 1987; Odell *et al.*, 1985; Zhong *et al.*, 1996). Z toho dôvodu sa očakáva, že proteín CP4 EPSPS sa bude tvoriť vo všetkých pletivách transgénnych rastlín. Toto očakávanie je potvrdené analýzou expresie bielkovín pomocou ELISA testu vo vzorkách z listov (top) a koreňov (brei), ktoré spoločne vytvárajú celistvú rastlinu cukrovej repy.

2.12.2 Zmeny expresie v závislosti na životnom cykle rastliny

Údaje zmenách expresie vloženého dedičného materiálu v závislosti od životného cyklu rastlín cukrovej repy H7-1 sú uvedené v [bode 2.12.1](#).

2.12.3 Stabilita expresie

Údaje stability expresie vloženého dedičného materiálu v rastlinách cukrovej repy H7-1 sú uvedené v [bode 2.12.1](#).

Molekulárne analýzy ukázali, že geneticky transformovaná cukrová repa H7-1 obsahuje jedno vloženie (inzerť) dedičného materiálu a toto inzerčné miesto obsahuje jednu kópiu expresnej kazety génu *cp4 epsps* a že tento inzerť bol stabilne integrovaný do rastlinného jadrového genómu. Okrem toho, na základe spôsobu dedičnosti vnesených znakov a vlastností po samoopelení alebo hybridizácii s inými rastlinami cukrovej repy bolo potvrdené, že vlastnosť tolerancie ku glyfozátu segreguje podľa Mendelových pravidiel dedičnosti. To tiež indikuje, že inzerť bol stabilne zabudovaný do jadrového genómu.

2.12.4 Metódy použité pre charakterizáciu expresie

Úroveň expresie bielkoviny CP4 EPSPS, produkovanej v transgénnej línii H7-1 cukrovej repy bola stanovená dvojitou sendvičovou ELISA analýzou v rôznych pletivách rastlín, reprezentujúcich celú rastlinu. Výsledky týchto analýz sú sumarizované vyššie (viď [bod 2.12.1](#)).

2.13 Údaje umožňujúce jednoznačnú identifikáciu geneticky modifikovanej vyššej rastliny

2.13.1 Popis časti zmenenej DNA

Molekulárne analýzy potvrdzujú, že geneticky transformovaná cukrová repa H7-1 nesie jednu plne funkčnú a intaktnú expresnú kazetu kódujúcu bielkovinu CP4 EPSPS,

zabezpečujúcu rastlinám cukrovej repy toleranciu ku glyfozátu (N-[fosfonometyl] glycín), aktívnej zložke herbicídov, napr. Roundup®. Iba DNA potrebná pre zabezpečenie fenotypu tolerancie ku glyfozátu bola vnesená a zabudovaná v jednom lokuse genómu cukrovej repy. Na charakterizáciu oblasti zabudovanej DNA s príslušnými genomickými sekvenciami DNA cukrovej repy boli použité metódy molekulárnej analýzy (PCR a Southernova hybridizačná analýza). Southernova hybridizačná analýza potvrdila prítomnosť jedného jednoduchého inzertu vnášanej DNA, pozostávajúcej z jednej kópie expresnej kazety génu *cp4 epsps*. Molekulárne analýzy tiež potvrdzujú že zabudovaná expresná kazeta a jej zložky (viď Tab. 1) sú v cukrovej repe H7-1 intaktné a genóm cukrovej repy neobsahuje žiadne detekovateľné sekvencie plazmidu mimo T-DNA („backbone sequences“) (viď časť 2.11). Tak jedinými introdukovanými genetickými elementmi pochádzajúcimi z plazmidu PV-BVGT08 prítomnými v geneticky transformovanej cukrovej repe H7-1 sú sekvencie promotora *P-FMV*, génu *cp4 epsps* (vrátane sekvencie pre chloroplastový tranzitový peptid *CTP2*) a *E9* 3' polyadenylačného miesta.

2.13.2 Metódy detekcie a identifikácie geneticky modifikovanej vyššej rastliny a ich overená metodika

Cukrová repa H7-1 obsahuje úplnú funkčnú a intaktnú kópiu génu *cp4 epsps* kódujúceho bielkovinu CP4 EPSPS, zabezpečujúcej toleranciu ku glyfozátu.

Sekvencie nukleotidov génu *cp4 epsps* ako aj ostatných genetických elementov inzertu sú detekovateľné pomocou Southern blot analýzy. Špecifickou metódou ELISA bola vyvinutá a môže byť použitá na identifikáciu exprimovanej bielkoviny CP4 EPSPS v individuálnych rastlinách. Ako alternatívu je možné použiť skúšky citlivosti rastlín na postrek herbicídmi na báze glyfozátu.

Geneticky modifikované rastliny cukrovej repy H7-1 a F1 hybridy vzniknuté krížením rastlín cukrovej repy H7-1 s konvenčnými líniami cukrovej repy môžu byť identifikované rôznymi technikami:

- v rastlinnej explantátovej kultúre budú explantáty regenerovať na živných médiách obsahujúcich glyfozát,
- metódy polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) alebo genomická Southernova hybridizácia môžu byť použité na dôkaz prítomnosti inkorporovanej DNA inzertu a jej komponentov,
- metódy analýzy proteínov (Western blot analýza alebo ELISA) môžu byť použité na detekciu funkčnosti a expresie vneseného génu.

Boli vyvinuté aj pre transgénnu udalosť špecifické metódy detekcie transgénu v rastlinách cukrovej repy H7-1 a z nej odvodených hybridov, ktoré boli poskytnuté DG JRC-CRL na validáciu. Správa o validácii metódy založenej na metóde PCR bola publikovaná 31 januára 2006. Validovaný protokol na báze RT-PCR bol zverejnený na stránke JRC (Joint Research Centre), ktorý funguje ako Referenčné laboratórium Európskeho spoločenstva, v roku 2008 a je dostupný na URL stránke <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/H7-1-Protocol%20Validated%20-%20corrected%20version%201.pdf> (EC/CRL: Event-specific method for the quantitation of sugarbeet line H7-1 using real-time PCR. 2008).

2.14 Správanie sa vložených génov

2.14.1 Pri hybridizácii s rovnakým druhom

Segregačné dáta vnesenej vlastnosti (tolerancie ku glyfozátu) ukazujú pri cukrovej repe H7-1 heritabilitu podľa Mendelových zákonov dedičnosti. To znamená, že vložený gén (*cp4*

epsps) sa pri hybridizácii tejto línie s rovnakým druhom správaj rovnako ako ostatné gény cukrovej repy. Rovnaká dedičnosť sa predpokladá a očakáva aj pri F1 hybridoch cukrovej repy vzniknutých krížením cukrovej repy H7-1 s konvenčnými udržiavateľmi sterility typu O fy SESVanDerHave.

2.14.2 Pri hybridizácii so vzdialenými druhmi

Je možné predpokladať, že správanie sa inzeru v cukrovej repe H7-1 ako aj v F1 hybridoch vzniknutých krížením cukrovej repy H7-1 s konvenčnými udržiavateľmi sterility typu O fy SESVanDerHave bude pri hybridizácii so vzdialenými druhmi podobné ako pri hybridizácii v rámci rovnakého druhu.

Voľne žijúci príbuzní cukrovej repy pochádzajú z Malej Ázie, niektoré formy sú však pomerne rozšírené v celej oblasti Stredozemného mora. V oblasti poľnej skúšky (Borovce) sa však nenachádzajú žiadne príbuzné druhy ani voľne žijúca repa.

2.15 Jednoznačné údaje o tom, v čom sa geneticky modifikované vyššie rastliny líšia od príjemcu alebo rodičovského organizmu

- *spôsob a rýchlosť rozmnožovania*
- *šírenie v prostredí*
- *schopnosť prežiť*
- *účinky na zdravie ľudí, zvierat a životné prostredie*
- *iné*

Cukrová repa sa v Európe intenzívne pestuje takmer 200 rokov. Pestované odrody cukrovej repy nie sú ani perzistentné, ani invazívne a iba zriedkavo sa nájdu medzi inými plodinami alebo na prirodzených stanovištiach. Pestovanie cukrovej repy sa nepovažuje za problém z hľadiska zaburinenia poľnohospodárskych plôch, a na prirodzených stanovištiach prežíva iba v prípade veľmi slabej konkurencie ostatných druhov. Okrem toho kódujúca sekvencia génu *cp4 epsps* integrovaná do genómu cukrovej repy H7-1 kóduje proteín CP4 EPSPS, ktorý vyvoláva toleranciu ku glyfozátu, od ktorej sa neočakáva, že by bola schopná pozmeniť fenotypové charakteristiky cukrovej repy.

V rokoch 1998 a 1999 fy KWS realizovala poľné štúdie a skleníkové testy, zamerané na zistenie morfológických a vývojových čít a vlastností kvitnutia cukrovej repy H7-1 v porovnaní s konvenčnou odrodou cukrovej repy s podobným genetickým pozadím ako má cukrová repa H7-1 (t.j. kontrola).

Rastliny, vypestované z rôznych šarží semena cukrovej repy H7-1 boli porovnané s kontrolou a s 28 konvenčnými, autorskými právami chránenými, šľachtiteľskými líniami fy KWS. Semená boli vyprodukované samotnou fy KWS v Nemecku alebo v Taliansku. Šľachtitelia posúdili rôzne typy charakteristík vrátane vývoja a kvitnutia, ktoré by mohli mať vplyv na kondíciu rastlín a schopnosť prežívania rastlín cukrovej repy.

Ako je to obvyklé pri skúškach inbredných líní, variabilita sa môže vyskytnúť nakoľko línie sú mimoriadne citlivé na faktory ako sú klimatické a environmentálne podmienky, spracovanie semien po zbere a podmienky a načasovanie výsevu. Vzhľadom na množstvo získaných údajov a obmedzenia spôsobené variabilitou bolo konštatované, že nejestvujú žiadne biologicky významné rozdiely morfológických a vývojových charakteristík a

vlastností kvitnutia medzi cukrovou repou H7-1 a konvenčnými pestovateľskými líniami cukrovej repy.

Nedostatok významných rozdielov na základe pozorovaní počas uvedených skúšok vzhľadom na morfológiu, vitalitu, zdravotný stav rastlín a citlivosť na škodce výrazne signalizujú, že celková biologická kondícia a charakteristiky prežívania cukrovej repy H7-1 neboli genetickou modifikáciou pozmenené. Je preto vysoko nepravdepodobné, že by cukrová repa H7-1 bola perzistentnejšia vo vnútri či mimo poľa ako bežná cukrová repa, alebo že by mohla mať vyššiu schopnosť prežívania, potenciál zaburinenia alebo invazivitu do prirodzeného prostredia.

Na záver je možné konštatovať, že z fenotypového a pestovateľského hľadiska je cukrová repa H7-1 totožná s konvenčnými odrodami s výnimkou charakteristiky tolerancie ku glyfozátu. Výsledky navyše nepoukazujú na selektívnu výhodu, ktorá by mohla byť spojená so zvýšeným potenciálom zaburinenia cukrovej repy H7-1 v porovnaní s bežnou cukrovou repou. Preto sa neočakáva nijaký rozdiel v spôsobe alebo intenzite reprodukcie, rozširovaní alebo schopnosti prežívania.

2.16 Fenotypová stabilita geneticky modifikovanej vyššej rastliny

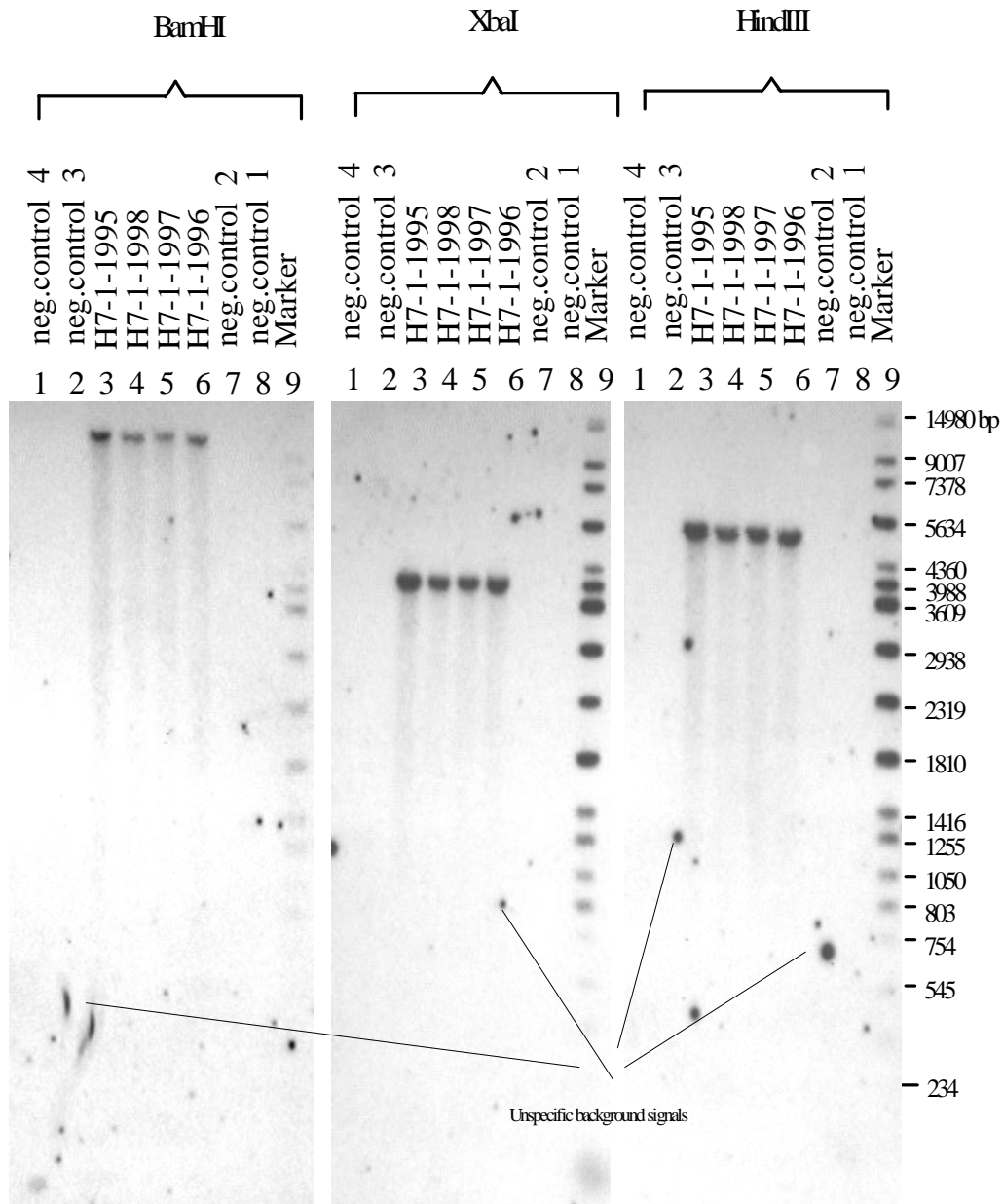
Vlastnosť tolerancie ku glyfozátu sa dedí a segreguje normálnym Mendelovským spôsobom. Toto naznačuje, že vložené sekvencie sa integrovali do jadrového genómu a nenachádzajú sa v mitochondriách ani chloroplastoch.

Na potvrdenie toho, že inzert DNA v cukrovej repe H7-1 je stabilne zabudovaný do rastlinného genómu boli uskutočnené Southernove hybridizačné analýzy na genomickej DNA, extrahovanej z cukrovej repy H7-1 a jej potomstiev počas troch následných generácií. Pôvodná šľachtiteľská línia cukrovej repy H7-1 (6401VH) bola porovnaná s tromi potomstvami (64801H, 74922H a 83002S), vzniknutými samoopelením alebo krížením pôvodnej šľachtiteľskej línie cukrovej repy H7-1 6401VH s konvenčnými líniami cukrovej repy (Obr. 9).

Ako kontrola boli analyzované štyri rôzne konvenčné línie cukrovej repy: 5R7150 ako kontrola 1, 8K1180 ako kontrola 2, 6S0085 ako kontrola 3 a 3S0057 ako kontrola 4 (Obr. 9). DNA všetkých vzoriek bola rozložená restriktívnymi enzýmami *Xba*I, *Hind*III a *Bam*HI a hybridizovaná s fragmentom *cp4 epsps* značeným ³²P. V prípade stabilnej integrácie inzertu do rastlinného genómu všetky potomstvá cukrovej repy H7-1 po štiepení tým istým restriktívnym enzýmom musia vykazovať prúžok presne tej istej veľkosti.

DNA potomstiev cukrovej repy H7-1 (Obr. 9, stĺpec 3 až 6) dali vznik očakávaným fragmentom: DNA štiepená enzýmom *Bam*HI vytvorila prúžok veľkosti cca 11,0 kb, štiepenie pomocou *Xba*I vytvorilo fragment veľkosti 4,0 kb a reštrikcia pomocou *Hind*III dala prúžok veľkosti 5,2 kb. Všetky hybridizačné prúžky z toho istého štiepenia, ale z rôznych potomstiev mali totožnú molekulovú hmotnosť i mobilitu, demonštrujú, že inzert DNA je stabilne integrovaný do rastlinného genómu. Žiadna z línii negatívnych kontrol nevykazovala signál (stĺpce 1, 2, 7 a 8).

Medzi DNA extrahovanými zo všetkých generácií cukrovej repy H7-1 neboli pozorované nijaké rozdiely v rozložení prúžkov. Tieto výsledky poukazujú na genetickú stabilitu vlozenej DNA v rámci troch generácií.



Obr. 9 Southernova hybridizačná analýza cukrovej repy H7-1: analýza genetickej stability. 10 µg genomickej DNA pôvodnej rodičovskej cukrovej repy H7-1 a troch následných generácií spolu s DNA negatívnej kontroly z rôznych odrôd cukrovej repy bolo štiepených pomocou *Bam*HI, *Xba*I a *Hind*III. Hybridizačná membrána bola analyzovaná pomocou sondy kódovacej frekvencie *cp4 epsps* značenej 32 P (bp 447 až 1555 plazmidu PV-BVGT08).

Pri iných komerčných plodinách odolných voči glyfozátu (napr. Roundup Ready sója, Roundup Ready repka olejná a Roundup Ready bavlník) sa tolerancia ku glyfozátu dedí Mendelovským spôsobom ako dominantná vlastnosť.

Pri cukrovej repe bol uskutočnený veľký počet hybridných krížení a multiplikácií (použitím konvenčných šľachtiteľských techník) s cukrovou repou H7-1. Prenos vlozenej DNA na ďalšie generácie pri týchto kríženíach a multiplikáciách bol monitorovaný fenotypovo na úrovni celých rastlín vo vývojovom štádiu dvoch listov aplikáciou glyfozátu v skleníkových pokusoch.

Údaje z týchto analýz poskytujú ďalšie dôkazy o počte lokusov, ako aj o stabilite vlozenej DNA. Výsledky analýzy spôsobu dedičnosti cukrovej repy H7-1 sú uvedené v Tab. 5. Spôsob dedičnosti pozorovaný pri cukrovej repe H7-1 v rôznych šľachtiteľských experimentoch, predstavujúcich štyri generácie, nepreukázali žiadnu štatistickú významnosť (stanovenú pomocou *chi*-kvadrát testu), s výnimkou troch prípadov. V prvom generačnom šľachtiteľskom experimente (64038G) nebola segregáčny pomer 1:1 ako sa očakávalo, čo však bolo možné pripísať malej populácii testovaných rastlín.

Analogicky v druhom generačnom šľachtiteľskom experimente (74906H) bol zistený štatisticky významný rozdiel v segregáčnych údajoch oproti očakávaným, ktorý bol pravdepodobne spôsobený nízkym počtom opelovačov rastlín zaradených do krížení. Napokon v treťom generačnom šľachtiteľskom experimente (80507A) bola významnosť rozdielov analýzy pomocou *chi*-kvadrát testu prisúdená nie optimálnemu načasovaniu opelujúcich rastlín použitých v šľachtení. Napriek týmto trom štatisticky významným hodnotám *chi*-kvadrát testu nejstávajú trendy v rámci počas viacerých generácií a analýza *chi*-kvadrát testu poukazuje na to, že iba jeden inzert DNA sa integroval do jadrového genómu cukrovej repy H7-1 a tento je dedený v po sebe nasledujúcich generáciách stabilne a ako samostatný lokus, podľa zákonitostí jednolokusového modelu Mendelistickej dedičnosti.

Ďalší dôkaz o tom, že inzert je stabilne dedený bol poskytnutý analýzou komerčných línií, ktoré boli krížené s cukrovou repou H7-1. Tolerancia ku glyfozátu sa na potomstvo týchto krížení prenášal normálnym Mendelovským spôsobom, poukazujúc tak na to, že inzert je stabilne zabudovaný do jadrového genómu.

Testovanie viacerých generácií cukrovej repy H7-1 na toleranciu voči glyfozátu v rámci poľných pokusov, trvajúcich štyri roky (od roku 1996) v siedmich európskych krajinách potvrdilo, že expresná kazeta génu *cp4 epsps* sa dedí stabilne, nakoľko úroveň tolerancie bola vo všetkých lokalitách a generáciách zhodná. Okrem toho bola úroveň tolerancie ku glyfozátu vždy komerčne prijateľná a odporúčanú dávku glyfosátu bolo možné aplikovať bez poškodenia repy (Tab. 5).

Záverom je možné konštatovať, že všetky uskutočnené pozorovania vrátane Southernových hybridizačných analýz, fenotypových poľných pozorovaní a údajov o expresii proteínu sú v súlade s Mendelovským spôsobom dedičnosti tolerancie ku glyfozátu a demonštrujú skutočnosť, že DNA vložená do cukrovej repy H7-1 sa stabilne dedí a trvalo prejavuje v nasledujúcich generáciách.

Tab. 5 Spôsob dedičnosti tolerancie ku glyfozátu pri cukrovej repe H7-1

Generácia	Produkčný rok	Identifikátor	Pedigree				Počet rastlín	% Tolerantných rastlín ²		χ^2 test		Poznámka
			Samiči ¹		Samčiči			Pozorované	Očakávané ⁴	Hodnota χ^2	Sign. ³	
1	1996	64037G	3A0047	MO	6401VH	H7-1	62	51.6	50	0.1	NS	
1	1996	64038G	3A0064	MO	6401VH	H7-1	44	63.6	50	7.4	*	Nízky počet testovaných rastlín
1	1996	64801H	6401VH	H7-1	6401VH	H7-1	77	67.5	75	3	NS	
2	1997	74022G	4E0006	MO	64801H	H7-1	300	63	67	0.72	NS	
2	1997	74401G	4E0006	MO	64801H	H7-1	400	65.3	67	0.13	NS	
2	1997	74901H	64801H	H7-1	64801H	H7-1	1052	84.1	87	0.74	NS	
2	1997	74906H	64801H	H7-1	64801H	H7-1	470	94.7	87	5.24	*	Nízky počet opelujúcich rastlín
2	1997	74908H	64801H	H7-1	64801H	H7-1	65	81.5	87	2.67	NS	
2	1997	74922H	64801H	H7-1	64801H	H7-1	2640	83.1	87	1.34	NS	
2	1997	74922H	64801H	H7-1	64801H	H7-1	7508	37.5 ⁵	42	0.83	NS	Homozygotné rastliny selektované pomocou PCR
3	1998	84507G	2A0011	MO	74901H	H7-1	462	48.7	50	0.07	NS	Homozygotná + heterozygotná H7-1
3	1998	80501A	6E0077	MO	74922H	H7-1	460	65.2	67	0.15	NS	Homozygotná + heterozygotná H7-1
3	1998	80502A	6A3971	MO	74922H	H7-1	461	61.6	67	1.32	NS	Homozygotná + heterozygotná H7-1
3	1998	80503A	6J0006	MO	74922H	H7-1	460	65.7	67	0.08	NS	Homozygotná + heterozygotná H7-1
3	1998	80504A	5J9101	MO	74922H	H7-1	459	66.4	67	0.02	NS	Homozygotná + heterozygotná H7-1
3	1998	80505A	6J0059	MO	74922H	H7-1	462	68.2	67	0.07	NS	Homozygotná + heterozygotná H7-1
3	1998	80506A	7A3774	MO	74922H	H7-1	459	59.1	67	2.82	NS	Homozygotná + heterozygotná H7-1

Generácia	Produkčný rok	Identifikátor	Pedigree				Počet rastlín	% Tolerantných rastlín ²		χ ² test		Poznámka
			Samiči ¹		Samčí			Pozorované	Očakávané ⁴	Hodnota χ ²	Sign. ³	
3	1998	80507A	6A2695	MO	74922H	H7-1	449	54.1	67	7.53	*	Homozygotná + heterozygotná Cudzoopelenie ⁶ v dôsledku nezhody období kvitnutia
4	1999	94901H	74922H	H7-1	74922H	H7-1	616	76.3 ⁵	75	0.09	NS	po selekcii heterozygotných rastlín
4	1999	90106J	6J0006	MO	74922H	H7-1	616	53.1	50	0.38	NS	
4	1999	90107J	8J0029	MO	74922H	H7-1	616	52.6	50	0.27	NS	
4	1999	90539A	6A3973	MO	74922H	H7-1	616	55.2	50	1.08	NS	
4	1999	90540A	8A3871	MO	74922H	H7-1	616	52.1	50	0.18	NS	
4	1999	90541A	8J0023	MO	74922H	H7-1	616	51.3	50	0.07	NS	
4	1999	90542A	5J9101	MO	74922H	H7-1	616	54.9	50	0.95	NS	
4	1999	90543A	6J0042	MO	74922H	H7-1	616	47.7	50	0.21	NS	
4	1999	90544A	6E0076	MO	74922H	H7-1	616	46.4	50	0.51	NS	
4	1999	90545A	7J0047	MO	74922H	H7-1	616	49.5	50	0.01	NS	

¹ MO: Monogermný (jednosemenný) materiál z cukrovej repy.

² Selekcia rastlín vykonaná aplikáciou glyfozátu v dávke 12 l/ha v skleníku. Boli selektované homozygotné a heterozygotné rastliny odolné voči glyfozátu, okrem poznámky⁵.

³ NS: štatisticky nevýznamné; *: významné na hladine pravdepodobnosti $p = 0.95$; stupne voľnosti = 1. Tabuľková hodnota pre jeden stupeň voľnosti a 5% hladine významnosti = 3.84

⁴ Očakávané frekvencie odolných rastlín boli vypočítané podľa vzorca: $rs = (r - sr^2)/(1 - sr^2)$, kde s = intenzita selekcie = 0.9; r = frekvencia recesívneho génu v populácii; rs = frekvencia rastlín citlivých na herbicíd (Falconer, 1984).

⁵ Selekcia homozygotných / heterozygotných rastlín s PCR markermi.

⁶ Výsledky cudzoopelenia z hľadiska neúplnej sterility materského komponentu, a nedostatočná koincidencia fázy kvitnutia medzi materským rodičom a opel'ovačom cukrovej repy H7-1.

2.17 Akákoľvek zmena schopnosti geneticky modifikovanej vyššej rastliny prenášať genetický materiál na iné organizmy v dôsledku genetickej modifikácie

2.17.1 Prenos z rastliny do baktérie

Žiadny z genetických elementov, o ktorých je známe že sa zúčastňujú na mobilite DNA, nebol vložený do genómu cukrovej repy H7-1. Preto sa v porovnaní s konvenčnou cukrovou repou neočakávajú žiadne zmeny schopnosti cukrovej repy H7-1 vymieňať si genetický materiál s baktériami.

2.17.2 Prenos génov z rastliny na rastlinu

Je všeobecne známe, že medzi pestovanými formami *Beta vulgaris* a medzi *Beta vulgaris* a niektorými voľne žijúcimi alebo burinnými formami repy zo sekcie *Beta* dochádza k prirodzenej hybridizácii. Cukrová repa H7-1 má rovnaké charakteristiky ako bežná (konvenčná) cukrová repa s výnimkou tolerancie ku glyfozátu, vrátane potenciálu vzdialeného kríženia. Vzdialené kríženie sa však vyskytuje ojedinele, pretože cukrová repa sa pestuje predovšetkým pre získavanie vegetatívneho koreňa, a jej životný cyklus počas poľnohospodárskej produkcie je obmedzený na vegetatívne štádium. Ak sa cukrová repa pestuje pre semenárske účely (množenie semena), bežne sa aplikujú rôzne postupy na obmedzenie potenciálu prenosu génov z rastliny na rastlinu.

2.18 Informácie o každom možnom škodlivom účinku geneticky modifikovanej vyššej rastliny na zdravie ľudí spôsobenom genetickej modifikáciou

Skupina enzýmov 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázy (EPSPS: EC 2.5.1.19) je bežne prítomná v rastlinách a mikroorganizmoch, vrátane plodín, hubových a mikrobiálnych zdrojov potravín. Proteíny EPSPS boli izolované z oboch horeuvedených zdrojov a ich vlastnosti sú podrobne preštudované (Haslam, 1993; Klee *et al.*, 1987; Schonbrunn *et al.*, 2001; Steinrücken a Amrhein, 1984). Šikimátová metabolická dráha a proteíny EPSPS sa nenachádzajú u cicavcov, vtákov, plazov a hmyzu (Alibhai a Stallings, 2001). Bakteriálne a rastlinné enzýmy sú monofunkčné, s molekulovou hmotnosťou 44-48 kDa (Kishore *et al.*, 1988). Proteíny EPSPS katalyzujú transfer enolpyruvylovej skupiny z fosfoenolpyruvátu (PEP) na 5-hydroxylovú skupinu šikimát-3-fosfátu (S3P), za vzniku anorganického fosfátu a 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátu (EPSP) (Alibhai and Stallings, 2001). Vďaka špecificite EPSPS k svojim substrátom je jediným známym vznikajúcim katalytickým produktom práve EPSP ako predposledný produkt biosyntetickej dráhy kyseliny šikimovej. Kyselina šikimová je substrátom pre biosyntézu aromatických aminokyselín (fenylalanínu, tryptofánu a tyrozínu) a ďalších aromatických molekúl. Odhaduje sa, že všetky aromatické molekuly, odvodené od kyseliny šikimovej predstavujú 35% alebo viac suchej hmotnosti rastliny.

Kódujúca sekvencia génu *cp4 epsps* pri cukrovej repy H7-1 kóduje proteín EPSPS, pochádzajúci z kmeňa CP4 baktérie *Agrobacterium* sp. Proteín CP4 EPSPS má molekulovú hmotnosť 47,6 kDa a pozostáva z jednoduchého polypeptidu so 455 aminokyselinami (Padgett *et al.*, 1993). Štrukturálne sa podobá a funkčne je zhodný s endogénnymi rastlinnými enzýmami EPSPS, má však značne zredukovanú afinitu ku glyfozátu v porovnaní s endogénnym rastlinným EPSPS (Padgett *et al.*, 1993). Pri bežných rastlinách sa glyfozát viaže na endogénny rastlinný enzým EPSPS a blokuje biosyntézu S3P, čím pripravuje rastliny o esenciálne aminokyseliny (Haslam, 1993; Steinrücken and Amrhein, 1980). Pri glyfozát-tolerantných rastlinách sa potreby aromatických aminokyselín a ďalších metabolitov naplňujú

pokračujúcou činnosťou enzýmu CP4 EPSPS za prítomnosti glyfozátu (Padgett *et al.*, 1996b).

Podobnosť proteínu CP4 EPSPS s EPSPS v množstve potravín svedčí o intenzívnej konzumácii skupiny proteínov EPSPS ľudskou populáciou za absencie obáv o zdravotnú bezpečnosť. Okrem toho všadeprítomnosť homologických enzýmov EPSPS v plodinách a v bežných mikroorganizmoch naznačuje, že proteíny EPSPS a ich enzymatické aktivity nepredstavujú žiadne riziko pri konzumácii ľuďmi či živočíchmi.

Výsledky niektorých štúdií ďalej potvrdzujú, že zavedenie proteínu CP4 EPSPS má zanedbateľný potenciál spôsobiť škodlivé účinky na ľudské zdravie či zdravie živočíchov. Toto bolo preukázané na základe (a) jeho obširnej charakterizácie, (b) jeho prítomnosti v zanedbateľných množstvách v potravinách a krmovinách pripravených z cukrovej repy H7-1, (c) neprítomnosti akútnej toxicity v štúdiách akútnej toxicity po podaní sondou (angl. „*acute oral gavage study*“), (d) rýchleho odbúravania proteínu CP4 EPSPS v simulovanom prostredí žalúdočných štiav človeka, a (e) neprítomnosti akejkoľvek významnej štruktúrálnej homológie so známymi alergénmi alebo proteínovými toxínmi.

Posúdenie bezpečnosti cukrovej repy H7-1 zahŕňa porovnávacie štúdie zloženia cukrovej repy H7-1 a bežnej cukrovej repy. Boli vykonané intenzívne analýzy zloženia vzoriek z pletív koreňa a listov cukrovej repy H7-1, získaných z 11 poľných lokalít v r. 1998 a z piatich lokalít v r. 1999. V r. 1998 bola vytvorená jedna kombinovaná vzorka z každej lokality, kým v r. 1999 sa pre každú lokalitu vytvorili tri opakovania. Všetky poľné skúšky sa realizovali v Európe v rozličných miestach geografického zastúpenia pestovateľských oblastí cukrovej repy. Analýzy obsahovali stanovenie najbližších hodnôt (hrubý popol, hrubá vláknina, hrubý tuk, hrubé bielkoviny a sušina) v koreňoch a vrcholových listoch. Obsah uhlíhydrátov bol stanovený výpočtom. Boli stanovené kvalitatívne parametre koreňov, vrátane obsahu cukru, sodíka, draslíka, alfa-amino dusíka a inverzného cukru. Okrem toho boli vo vzorkách drvinu koreňa („*brei*“) a vrcholových listov („*top*“) stanovené saponíny, ktoré predstavujú základný antinutrient *B. vulgaris*, a 18 aminokyselín.

V poľných pokusoch bola cukrová repa H7-1 porovnávaná s kontrolou (konvenčná odroda cukrovej repy s genetickým pozadím podobným cukrovej repe H7-1) a s komerčnými odrodami cukrovej repy v súčasnosti dostupnými na trhu. V súlade so zásadami podstatnej zhody (OECD, 1993) sa uskutočnilo aj porovnanie s referenčnými hodnotami komponentov cukrovej repy, ak sú dostupné v literatúre. Celkovo sa pre posúdenie zhody zloženia cukrovej repy H7-1 a bežnej cukrovej repy analyzovalo 55 komponentov. Koreňové pletivá boli pred analýzou spracované na drvinu („*brei*“).

Výsledky štatistickej analýzy ukazujú, že hladiny kľúčových živín a ostatných nutrične dôležitých komponentov cukrovej repy H7-1 sú zhodné so zložením vrcholových listov a koreňov („*brei*“) blízko-izogénnej kontroly a ostatných konvenčných odrôd cukrovej repy. Minoritné štatisticky významné rozdiely, zaznamenané v tejto analýze zloženia sú pravdepodobne biologicky nevýznamné, takže sa konštatuje, že vrcholové listy a koreň cukrovej repy H7-1 sú zložením totožné so zložením konvenčnej cukrovej repy.

Záverom je možné konštatovať, že podrobné posúdenie bezpečnosti proteínu CP4 EPSPS a porovnávací analýza cukrovej repy H7-1 s konvenčnou cukrovou repou ukazuje na vysokú nepravdepodobnosť vyvolania akýchkoľvek toxických, alergických či iných škodlivých účinkov zavedeného proteínu na zdravie ľudí či živočíchov. Neprítomnosť škodlivých zdravotných účinkov, vyplývajúcich z konzumácie rôznych geneticky modifikovaných rastlín obsahujúcich proteín CP4 EPSPS v priebehu mnohých rokov potvrdzuje bezpečnosť cukrovej repy H7-1.

Okrem toho boli plodiny obsahujúce CP4 EPSPS uvedené na trh a konzumované ako potraviny a krmoviny už od ich prvého zavedenia v r. 1996. Proteín CP4 EPSPS sa exprimuje vo viacerých tzv. Roundup Ready plodinách Roundup Ready, ktoré sú primárne používané ako zdroje potravy či krmovín, napr. Roundup Ready sója 40-3-2, Roundup Ready kukurica NK603, Roundup Ready repka olejná a Roundup Ready bavlník. Tieto Roundup Ready plodiny sa v r. 2005 pestovali na ploche väčšej ako 71,4 milióna hektárov po celom svete, buď ako rastliny s vlastnosťou Roundup Ready alebo ako plodiny s kombináciou vlastností (James, 2005).

2.19 Údaje o bezpečnosti geneticky modifikovanej vyššej rastliny pre zdravie zvierat najmä s ohľadom na akékoľvek škodlivé účinky spôsobené genetickou modifikáciou, pokiaľ má byť geneticky modifikovaná vyššia rastlina použitá ako krmivo

Bezpečnosť cukrovej repy H7-1 a exprimovaného proteínu CP4 EPSPS pre zdravie živočíchov bola súčasťou posúdenia zdravotnej bezpečnosti pre ľudí v časti 2.18.

Hybridy geneticky modifikovanej cukrovej repy H7-1 nebudú použité ako bežné krmivo. Vyprodukované rastliny a časti rastlín, budú po ukončení poľných pokusov a analýz zlikvidované.

2.20 Mechanizmus interakcie medzi geneticky modifikovanou vyššou rastlinou a cieľovým organizmom, pokiaľ cieľový organizmus existuje

Neboli identifikované žiadne charakteristiky, ktoré by mohli vyvolať škodlivé účinky na životné prostredie. Nakoľko cukrová repa H7-1 ako aj jej hybridy sú odolné voči herbicídum, tieto nemajú žiadne cieľové organizmy s ktorými by mohli vstúpiť do interakcie, a to priamej alebo nepriamej.

2.21 Možné zmeny v interakciách geneticky modifikovanej vyššej rastliny s necieľovými organizmami plynúce z genetickej modifikácie

Rovnako ako o ostatných rastlinách, aj o cukrovej repe je známe, že v prostredí dochádza k jej interakciám s množstvom organizmov, vrátane mikroorganizmov, voľne žijúcich druhov a početnými pôdou a listy obývajúcimi bezstavovcami. Okrem toho je o cukrovej repe známe, že je náchylná na množstvo hubových a vírusových ochorení, k poškodeniam spôsobeným nematódami a hmyzom, proti ktorým musí pestovateľ tradične bojovať aplikáciou prostriedkov na ochranu rastlín alebo inými poľnohospodárskymi praktikami, napr. rotáciou plodín. Sú možné aj interakcie s voľne žijúcimi stavovcami vrátane vtákov a cicavcov, ktoré sídlia alebo hľadajú potravu v blízkosti alebo priamo na poľnohospodárskych plochách či okrajoch polí, v živých plotoch alebo priekopách.

Nakoľko bolo preukázané, že cukrová repa H7-1 je agronomicky aj fenotypovo ekvivalentná s konvenčnou cukrovou repou s výnimkou introdukovanej vlastnosti tolerancie ku glyfozátu, jej základné interakcie s inými organizmami prostredia sa nepovažujú za odlišné oproti konvenčnej cukrovej repe okrem priamej expozície proteínu CP4 EPSPS, ktorý sa novo prejavuje v tejto rastline. Prostredníctvom trofického prenosu a procesom dekompozície môžu byť určitým veľmi nízkym úrovňam tohto proteínu vystavené aj ďalšie organizmy, ako sú predátory a dravé druhy škodcov cukrovej repy.

Na záver je možné konštatovať, že interakcie cukrovej repy H7-1 a necieľových organizmov v poľnohospodárskom a prírodnom prostredí sa nelíši od konvenčných odrôd cukrovej repy. Cukrová repa H7-1 sa vo svojich fenotypových a agronomických charakteristikách zhoduje s konvenčnou cukrovou repou (viď časť 2.15). Okrem toho potenciálna expozícia necieľových organizmov zavedenému proteínu CP4 EPSPS, exprimovanému v cukrovej repy H7-1 nepredstavuje opodstatnený mechanizmus, ktorý by vzhľadom na svoje vlastnosti vyvolal škodlivé účinky pre prostredie. Na základe prirodzeného výskytu a histórie expozície necieľových organizmov proteínu CP4 EPSPS a súvisiacich enzýmov EPSPS, ktoré sú známe ako skupina bezpečných proteínov bez akýchkoľvek očakávateľných mechanizmov biologickej aktivity smerom k iným organizmom nejestvuje *a priori* dôvod očakávať, že by proteín CP4 EPSPS mohol byť škodlivý pre necieľové organizmy. Následne by aj vyššie trofické interakcie medzi necieľovými organizmami mali ostať nedotknuté. Preto akékoľvek riziká významných nepriamych účinkov na úrovni populácií necieľových organizmov v prijímajúcom prostredí alebo ich fungovania v podzemných či nadzemných ekosystémoch susediacich s plodinou budú tiež rovnako zanedbateľné.

2.22 Možné interakcie geneticky modifikovanej vyššej rastliny s neživými zložkami životného prostredia

Podobne ako o iných rastlinách, aj o cukrovej repy je známe, že interaguje s abiotickým prostredím (pôda, voda a ovzdušie), napr. tvorbou koreňov v pôde, príjmom živín a vody a výmenou plynov. O produkcii cukrovej repy sa všeobecne vie, že má nepriamy dopad na biofyzikálne a biogeochemické procesy v pôde prostredníctvom orby, aplikácie hnojív, a aplikácie pesticídov, čo je aj prípad akýchkoľvek iných plodín. Všetky poľnohospodárske postupy, ktoré sa v súčasnosti používajú pri pestovaní cukrovej repy v krajinách EÚ, sú platné aj pre pestovanie cukrovej repy H7-1 (ako aj pre hybridy od nej odvodené) a nie sú potrebné žiadne špecifické metódy pestovania, obrábania alebo zberu.

Nakoľko bolo preukázané, že cukrová repa H7-1 je z hľadiska jej zloženia, fenotypových a agronomických charakteristík podstatne zhodná s bežnou cukrovou repou (s výnimkou introdukovanej vlastnosti tolerancie ku glyfozátu), nejestvuje dôkaz, že by sa táto cukrová repa akokoľvek líšila od bežnej cukrovej repy z hľadiska jej základných interakcií s abiotickým prostredím.

Aj keď je bielkovina CP4 EPSPS v cukrovej repy H7-1 novo exprimovaná, nie je to nový proteín v životnom prostredí. Proteín CP4 EPSPS je v cukrovej repy neškodný, nakoľko reprezentuje jeden z mnohých rôznych proteínov EPSPS, vyskytujúcich sa v prírode. Skupina proteínov EPSPS nevykazuje žiadne známe negatívne interakcie s abiotickým prostredím, a bolo preukázané, že proteín CP4 EPSPS sa rýchlo rozkladá v priebehu niekoľkých dní, keď sa dostane do pôdy (Dubelman *et al.*, 2005).

Preto sa neočakávajú žiadne škodlivé účinky cukrovej repy H7-1 a od nej odvodených hybridov na abiotické prostredie ako výsledok používania týchto produktov v rámci EÚ.

3. Údaje o množstve geneticky modifikovaných vyšších rastlín, ktoré majú byť použité, a o celkovej rozlohe pozemkov

3.1 Približné množstvo geneticky modifikovaných vyšších rastlín, ktoré má byť zavádzané do životného prostredia

V r. 2010 sa plánuje uskutočnenie jednej poľnej skúšky výnosu pre SESVanderHave s použitím hybridov cukrovej repy odvodených od línie H7-1 na jednej lokalite na Slovensku. Pre uvoľnenie bola vybraná lokalita v regióne Borovce pri Piešťanoch (VÚC Trnava). Podobne zostavené skúšky sa plánujú pre rovnaké ročné obdobia počas nasledujúcich dvoch rokov (2011 a 2012).

Skúška bude v r. 2010 realizovaná v rámci niekoľkohektárového poľa jačmeňa. Oblasť skúšky bude mať plochu maximálne 2000 m² na jednu lokalitu.

Ak sa do skúšky zapojí maximálny počet objektov (7, päť hybridov cukrovej repy odolných voči glyfozátu plus dve kontrolné geneticky nemodifikované odrody, vid' časť 3.2) a budú sa porovnávať dva druhy ošetrovania, skúška bude pozostávať maximálne z cca 5600 kusov repy, z nich okolo 4000 budú geneticky modifikované jedince cukrovej repy tolerantné ku glyfozátu. Na každom mieste uvoľnenia do životného prostredia bude hustota rastlín rovnaká ako pri použití miestnych agrotechnických postupov pre konvenčnú cukrovú repu a hustota rastlín bude okolo 9 - 10 rastlín/m² (90-100 koreňov na políčko veľkosti 10 m²).

SESVanderHave má licenciu na používanie geneticky transformovanej línie H7-1 cukrovej repy a získal F1 hybridné rastliny krížením GM línie H7-1 s vlastnými (SESVanderHave) konvenčnými udržiavateľmi sterility cukrovej repy línií typu O. Zo spätných s líniami typu O sa môže vnesená vlastnosť kombinovať a fixovať do materského komponentu pre tvorbu línií so samčnou sterilitou a homozygotnou z hľadiska vlastnosti tolerancie ku glyfozátu. Takéto línie so samčou sterilitou hrížené s konvenčnými diploidnými opeľovačmi sú používané na produkciu finálnych hybridných kombinácií, ktoré budú predmetom posudzovania v navrhovanej poľnej skúške.

Všetky spätné kríženia sa uskutočnili v posledných rokoch v skleníkoch belgického pracoviska SESVanderHave, ktorý je na to určený a osivo hybridov bolo vyprodukované v USA, kde je línia H7-1 deregulovaná a komercializovaná od r. 2008.

3.2 Celková rozloha plochy, na ktorých majú byť geneticky modifikované vyššie rastliny pestované

Skúška bude v r. 2010 realizovaná v rámci niekoľkohektárového poľa jačmeňa. Oblasť skúšky bude mať plochu maximálne 2000 m² na jednu lokalitu. ktorej sa bude testovať päť (5) hybridov cukrovej repy odolnej voči glyfozátu v obvyklej štruktúre pozostávajúcej z políčok veľkosti 10 m², s výsadbou štyroch (4) opakovaní pre každý hybrid. Súčasťou pokusu budú dve (2) kontrolné odrody geneticky nemodifikované. V prípade porovnania dvoch spôsobov ošetrovania bude cukrová repa skúšaná maximálne na 56 políčkach. Celková plocha poľnej skúšky na jednej lokalite bude zahŕňať všetky plochy, chodníky medzi opakovaniami a chodníky medzi plochami, ako aj všetky okrajové riadky.

Skúšobná plocha bude ohraničená pásom neosiatej pôdy o šírke 5 m, na ktorej sa nebude nachádzať žiadna repa.

4. Pracoviská a pozemky, na ktorých bude zavádzanie do životného prostredia prebiehať

Havarijný plán podľa § 16 zákona (zhrnutie obsahu)

Žiadateľ, Centrum výskumu rastlinnej výroby – Výskumný ústav rastlinnej výroby Piešťany, ktorý bude zodpovedať za vlastnú realizáciu pokusov, plánuje zavádzanie hybridov GM cukrovej repy odvodených konvenčným šľachtením z geneticky modifikovanej línie H7-1 do životného prostredia v spolupráci so spoločnosťou SESVanderHave, ktorá bude nakladať

s predmetným GMO v režime dovozu, distribúcie, výsevu eventuálne vývozu GM semien (pre analýzy) a zberu vegetatívnych častí rastlín v prvom vegetačnom roku.

Nakoľko spôsoby nakladania s GM materiálmi počas všetkých etáp poľnej skúšky, ako aj lokalite uvoľnenia GMO pred, počas a po uvoľnení rieši plán dohľadu, havarijný plán je zameraný na riešenie akejkoľvek neočakávanej udalosti, ktorá sa môže vyskytnúť počas uvoľnenia a počas monitorovacieho obdobia po uvoľnení.

Havarijný plán vzťahujúci sa na všetky aktivity spojené s pestovaním GM cukrovej repy predkladaný ministerstvu v rámci tejto žiadosti CVRV -VÚRV Piešťany obsahuje okrem základných údajov opis ochranných opatrení pre prevenciu havárie, opis okamžitých opatrení v prípade havárie a opis priebehu nápravných opatrení v prípade havárie. Tiež obsahuje povinnosť informovať príslušné orgány o vzniku tejto havárie. Havarijný plán pre lokalitu Borovce je samostatnou prílohou tejto žiadosti.

Je plánované, že zavádzanie do životného prostredia bude prebiehať na pozemkoch zabezpečovaných CVRV - VÚRV a to na tejto lokalite:

- **Borovce**

Informácie o umiestnení pozemkov, ako aj opisy ekosystémov jednotlivých lokalít sú súčasťou tejto žiadosti.

Vplyv geneticky modifikovanej cukrovej repy na uznané biotopy alebo chránené územia nie je odlišný od vplyvu či pôsobenia geneticky nemodifikovanej cukrovej repy na tieto územia.

4.1 Lokalita Borovce

4.1.1. Opis umiestnenia a rozsahu zavedenia

VÚC - Trnavský

Obec - Borovce

Názov katastrálneho územia a číslo parcely – Borovce, 299/24 ([Príloha č. 1](#)).

Identifikačné číslo pôdneho bloku, prípadne časti pôdneho bloku, ak je pozemok predmetom evidencie využitia poľnohospodárskej pôdy podľa zvláštného právneho predpisu – 299/24.

Veľkosť plochy (m²) pestovania geneticky modifikovanej vyššej rastliny na pozemku – Rozloha plochy pokusných parcel, na ktorých majú byť pestované rastliny GM cukrovej repy je odhadovaná na max. 560 m² na jednu lokalitu. Celková rozloha plochy, tj., pokusných parcel, vrátane ciest medzi opakovaniami, ciest medzi parcelami a obsevom, bez ochranného obsevu je odhadovaná na 2 000 m² na jednu lokalitu.

Veľkosť (m²) a spôsob využitia izolačného pásma okolo plochy pestovania geneticky modifikovanej vyššej rastliny (vyznačiť v plánu) - Minimálne 3 riadky ne-GM cukrovej + 5 m voľnej (neobsiatej) plochy okolo celého pokusu. Obsev bude zničený po zbere pokusu zadiskovaním do pôdy alebo iba zadiskovaním podľa aktuálnych vlhových podmienok.

Rastlinám cukrovej repy v skúške nebude umožnené kvitnutie a všetky identifikované vybehlice budú pred rozkvitnutím odstránené. Pravidelné návštevy miesta skúšky skúsenými pracovníkmi zabezpečia včasné zistenie všetkých vybehlic. V prípade výskytu vybehlic na skúšobných políčkach sa uplatnia postupy na likvidáciu vybiehajúcich rastlín oddelením kvetnej byle od koreňa, dostatočne dlho pred obdobím kvitnutia. Tieto opatrenia zamedzujú možnosť

rozširovania sa transgénu prostredníctvom peľu, preto sa neuvažuje o izolačných vzdialenostiach od konvenčnej cukrovej repy.

4.1.2. Opis ekosystému a miesta zavádzania vrátane opisu podnebia, rastlinstva a živočíšstva

Typ pôdy – hlinitá degradovaná černoziem na spraši

Klimatické podmienky – kukuričná výrobná oblasť, klimatický región KT 2 (veľmi teplý a mierne suchý)

Flóra vrátane poľnohospodárskych plodín – kultúrne plodiny pestované na ornej pôde, krovinaté spoločenstvá bylín a drevín

Fauna vrátane hospodárskych a migrujúcich zvierat – hovädzí dobytok (farma), srnčia a bažantia zver, zajace

4.1.3. Údaje o prítomnosti pohlavne zlučiteľných voľne žijúcich príbuzných, alebo kultivovaných rastlinných druhoch

Žiadny voľne žijúci ani kultivovaný príbuzný pohlavne zlučiteľný druh cukrovej repy sa v oblasti pokusnej lokality nevyskytuje. Nemôže preto dochádzať k výmene génov so žiadnym voľne žijúcim ani kultivovaným príbuzným druhom. Voľne žijúce druhy rodu *Beta* rastú ako buriny na poliach a neobrábanej pôde mnohých oblastí Stredomoria.

4.1.4. Údaje o príbuzenstve vo vzťahu k uznaným biotopom a chráneným oblastiam, ktoré by mohli zavedené geneticky modifikované rastliny ovplyvniť

Vplyv geneticky modifikovaných hybridov cukrovej repy H7-1 na uznané biotopy alebo chránené územia nie je odlišný od vplyvu či pôsobenia geneticky nemodifikovanej cukrovej repy na tieto územia. V blízkosti skúšobnej plochy sa nenachádzajú žiadne chránené územia.

4.8 Účel zavádzania do životného prostredia (vrátane všetkých relevantných informácií dostupných v tejto fáze), ako napríklad agronomické účely, skúšky hybridizácie, zmena schopnosti prežitia alebo šírenia, zisťovanie účinkov na cieľové alebo necieľové organizmy

Predmetom tejto žiadosti je udelenie povolenia k zavádzaniu hybridov odvodených z geneticky modifikovanej (GM) cukrovej repy H7-1 do životného prostredia v Slovenskej republike za účelom realizácie poľných štúdií týkajúcich sa agronomickej výkonnosti uvedených hybridov GM cukrovej repy a ich odolnosti k herbicídum obsahujúcim glyfozát. Realizácia poľných štúdií s geneticky modifikovanou cukrovou repou bude vykonaná na základe úlohy: „Poľná skúška na posúdenie línií a hybridov cukrovej repy (*Beta vulgaris*), odvodených z geneticky transformovanej línie H7-1 odolnej voči herbicídu glyfozát“.

Tento typ skúšok výnosu a pozorovania je súčasťou štandardného šľachtiteľského programu, v ktorom sa línie a hybridy intenzívne testujú pre tvorbu optimálnych odrôd, vyhovujúcich komerčným požiadavkám slovenského trhu, s dôrazom na zistenie takých potrieb pestovateľa ohľadne vysoko výnosných odrôd pre oblasť strednej Európy ako sú vysoký výnos, extrahovateľnosť bieleho cukru, nízka prítomnosť hliny na repe, tolerancia k hubovým a vírusovým chorobám.

Cieľmi poľného testovania geneticky modifikovanej cukrovej repy bude

- získať údaje o výnose geneticky transformovanej cukrovej repy "Round'Up Ready", ošetrenej herbicídmi Roundup alebo konvenčnými herbicídmi,
- získať údaje o výnosoch GM cukrovej repy ak sa použije ako herbicíd Roundup,
- zistiť dopady použitia herbicídu Roundup na zdravotný stav rastlín cukrovej repy a
- preukázať odolnosť hybridov Round'Up Ready cukrovej repy a flexibilitu pre užívateľa.

Počas riešenia projektu budú sledované nasledovné ukazovatele pre každú plochu

- úroda koreňa
- obsah cukru
- čistota šťavy

ako aj fenotypové pozorovania cukrovej repy ošetrenej herbicídmi Roundup počas rastovej sezóny v porovnaní s cukrovou repou

Všetka repa v tejto skúške výnosu ostane vegetatívna. Pravidelné kontrolovanie skúšky skúsenými pracovníkmi najmenej jedenkrát za dva týždne umožnia odhaliť všetky vybiehajúce rastliny. Ak sa vybiehajúca rastlina, budú nasledovať opatrenia na likvidáciu vybehlic pred tým, ako bytieto mohli rozkvitnúť.

4.9 Relevantné údaje týkajúce sa predchádzajúcich prípadov zavádzania do životného prostredia rovnakej geneticky modifikovanej vyššej rastliny, pokiaľ existujú, najmä vo vzťahu k možným vplyvom na zdravie ľudí a zvierat, životné prostredie a biologickú rozmanitosť

Cukrová repa H7-1 bola od r. 1995 uvoľnená pre poľné skúšky na niekoľkých lokalitách v USA, Kanade, Rusku, Čile a krajinách EÚ-27 (viď Tab. 1, kap. 8). Tieto poľné pokusy boli realizované pre získanie materiálu pre rozhodovacie štúdie a pre posúdenie agronomických vlastností (účinnosť, selektivita, posúdenie výnosu).

Po prísnom posúdení pre rozhodovacie účely bola získaná environmentálna autorizácia pre cukrovú repu H7-1 v USA (2005), Kanade (2005) a v Japonsku (2007).

Výsledky uvoľnenia v uvedených krajinách neposkytli žiadne dôkazy o tom, že by cukrová repa H7-1 mohla spôsobiť akékoľvek škodlivé účinky na zdravie človeka či živočíchov alebo na životné prostredie.

5. Opis nakladania s geneticky modifikovanými vyššími rastlinami

5.1 Nakladanie s geneticky modifikovanými vyššími rastlinami pred ich uvádzaním do životného prostredia (preprava)

Nakladanie s geneticky modifikovanou cukrovou repou pred jej zavádzaním do životného prostredia sa vzťahuje iba na dovoz osiva GM cukrovej repy do SR a jeho prevoz na CVRV-VÚRV Piešťany, resp. priamo na miesto zavádzania do životného prostredia (Borovce, VÚC Trnava). Dovozy osiva môže prebehnúť až po získaní povolenia k zavádzaniu GM cukrovej repy do životného prostredia. Preprava osiva bude realizovaná letecky alebo po ceste (dovoz do SR v období január až máj daného roku – 2010, 2011 a 2012), v prípade dovozu z tretích krajín bude použitý hraničný prechod Bratislava-letisko), prevoz na SCPV-VÚRV v Piešťanoch, resp. priamo na miesto zavádzania do životného prostredia (Borovce, VÚC

Trnava) potom osobným automobilom. Dovoz osiva na pole k sejbe zabezpečuje a realizuje spoločnosť SESVanderHave. Po vyzdvihnutí GM osiva od prepravcu, ktorý ho dovezie do SR, bude osivo prevezené do SCPV - VÚRV v Piešťanoch, resp. priamo na miesto zavádzania do životného prostredia (Borovce, VÚC Trnava).

Prevážanie GM rastlín a semien je riadené samostatným procesom, ktorý vyžaduje schválenie a sledovateľnosť transportu. Prevoz materiálu sa týka presunu GM materiálu v rámci spoločnosti (SESVanderHave a pobočky), alebo medzi spoločnosťou SESVanderHave a tretími stranami.

- Pre každý transport GM materiálu sa vyplní MTF (Formulár sledovateľnosti prevozu) a pred odoslaním sa schvaľuje podpisom; príjemca podpisuje jeho prijatie, a potvrdzuje ho odosielateľovi.

- Transport medzi lokalitami alebo smerom k tretím stranám alebo medzi lokalitami vyžaduje príslušnú dokumentáciu (EMTF v prípade presunu smerom k tretím stranám, IMTF v prípade presunu medzi lokalitami).

- Všetky MTF generujú záznam v záznamníku JIT MTF.

Všetky presuny budú predmetom dohľadu vedeckých pracovníkov spoločnosti SESVanderHave, ako aj príslušných pracovníkov CVRV-VÚRV Piešťany tak, ako bude potrebné pre zabezpečenie uchovania záznamov v na to určených databázach v súlade s procesom schvaľovania v prípade, ak bude plánovaný presun GM materiálu.

5.2 Postup, ktorým budú geneticky modifikované vyššie rastliny zavádzané do životného prostredia

Geneticky modifikované línie a hybridy a geneticky nemodifikované kontroly zaradené do poľnej skúšky budú vysiate priamo na pole.

Ako pri každej šľachtiteľskej skúške výnosu bude hustota výsevu vyššia ako sa bežne používa pri pestovaní cukrovej repy, po vyklíčení a dosiahnutí štádia štyroch listov preto budú všetky skúšobné plochy manuálne pretriedené so zachovaním 90-100 rastlín na každú plochu 10m². Toto je obvyklá prax pri skúškach výnosu spoločnosti SESVanderHave, ktorou sa udržiava homogénna hustota rastlín na maloparcelkách. Nadbytočné rastliny budú zničené ich rozptýlením a zaoraním priamo na pokusnom pozemku.

Sejacie zariadenie použité na výsev bude po ukončení sejby a predtým, ako opustí lokalitu priamo na mieste zavádzania do životného prostredia dôkladne vyčistené podľa štandardných čistiacich postupov spoločnosti SESVanderHave, aby boli odstránené všetky zostávajúce semená cukrovej repy. Zostávajúce semená budú umiestnené do označených obalov, ktoré budú dôkladne uzatvorené a odoslané do SESVanderHave v Tienen (Belgicko) podľa pracovných inštrukcií Spoločnosti SESVanderHave. Všetky údaje budú zapísané do poľného záznamníka.

5.3 Približný počet geneticky modifikovaných vyšších rastlín na m²

Ak sa do skúšky zapojí maximálny počet objektov (7) a budú sa porovnávať dva druhy ošetrovania, skúška bude pozostávať maximálne z cca 5600 kusov repy, z nich okolo 4000 budú geneticky modifikované jedince cukrovej repy tolerantné na glyfosát.

5.4 Príprava a spôsob úpravy pozemku pred pestovaním geneticky modifikovaných vyšších rastlín

Lokalita zavádzania GM cukrovej repy bude pripravená rovnakým spôsobom, ako pri konvenčnej cukrovej repe. Lokalitu na výsev pripravujú pracovníci garantujúceho pracoviska CVRV-VÚRV Piešťany podľa zaužívej praxe pre realizáciu skúšok v rámci pestovateľského programu cukrovej repy spoločnosti SESVanderHave.

Osivo cukrovej repy bude vysiate priamo na skúšobné plochy. Sejacie zariadenie bude vyčistené na mieste skúšky, a všetky zostávajúce semená budú doručené späť do sídla spoločnosti SESVanderHave, kde budú bezpečne uskladnené, alebo budú prevezené do biotechnologického oddelenia v sídle vedenia spoločnosti (Tienen, Belgicko) pre zodpovedajúce zneškodnenie. Balenie a transport budú v súlade s požiadavkami pracovných postupov spoločnosti SESVanderHave, čím bude zabezpečená potrebná sledovateľnosť a minimalizované akékoľvek riziko rozšírenia.

5.5 Spôsob dopravy geneticky modifikovaných vyšších rastlín

Doprava osiva GM cukrovej repy na pozemok (miesto zavádzania do životného prostredia) bude zabezpečený osobným automobilom.

5.6 Spôsob kultivácie geneticky modifikovaných vyšších rastlín na pozemku

Ako každá cukrová repa, pestovaná pre produkciu koreňa, bude aj repa v skúške udržiavaná vo vegetatívnej fáze rastu. Dvakrát v priebehu vegetačného obdobia sa vykoná hodnotenie počtu rastlín cukrovej repy (po vzídení – počet vyklíčených rastlín, a po jednotení - zistenia skutočného stavu populácie na jednotlivých plochách).

Geneticky modifikované hybridy cukrovej repy budú ošetrené herbicídmi Round'Up podľa protokolu spoločnosti Monsanto, pozostávajúceho z dvoch aplikácií 2,4l/ha Round'Up (450g glyfozátu/l): prvá aplikácia sa vykoná keď rastliny repy dosiahnu 4-6 listové štádium, druhá aplikácia sa vykoná keď budú mať rastliny repy 12 až 14 listov. Konvenčnými herbicídmi a fungicídmi môžu byť rastliny ošetrené v súlade s lokálnymi odporúčaniami a v závislosti na poľných podmienkach. Aplikácia herbicídov a fungicídov sa bežne používa u kultúr repy na zabezpečenie optimálneho rastu rastlín.

Počas vegetačnej doby budú vykonávané fenotypové hodnotenia s cieľom pozorovať rast geneticky transformovanej cukrovej repy v prírodných agronomických podmienkach. Osobitná pozornosť sa bude venovať všetkým vývojovým štádiám (farba, tvar a čerstvosť listov, morfológia rastlín, stabilita fenotypu počas celej sezóny, rast koreňa) a zaznamenávať sa budú všetky abnormality či odlišné prejavy. Pre navrhovanú demonštračnú poľnú skúšku bude dôležité tiež zhodnotenie počtu burín. Dôležitým fenotypovým pozorovaním bude tvorba listov a vyhodnotenie sfarbenia listov.

Lokalita bude pravidelne navštevovaná skúsenými technickými pracovníkmi spoločnosti SESVanderHave ako aj pracovníkmi CVRV-VÚRV Piešťany na to určenými. Navštevy sa uskutočnia pravidelne počas celej sezóny rastu. Fenotypové kvalitatívne a kvantitatívne údaje budú zbierané tak, ako sa vo vegetačnom období požaduje. Všetky úkony, realizované v rámci skúšky, budú zaznamenané v poľnom záznamníku.

Rastlinám v skúške nebude umožnené kvitnutie a všetky identifikované vybehlice budú pred rozkvitnutím odstránené. Pravidelné návštevy miesta skúšky skúsenými pracovníkmi zabezpečia včasné zistenie všetkých vybehlic. V prípade výskytu vybehlic na skúšobných políčkach sa uplatnia postupy na likvidáciu vybiehajúcich rastlín oddelením kvetnej byle od koreňa, dostatočne dlho pred obdobím kvitnutia.

Skúška bude počas celej dĺžky trvania predmetom návštev minimálne jedenkrát za dva týždne. Akonáhle sa v rámci skúšky objavia vybehlice, budú odstránené a kvetná byť bude oddelená od koreňa. Od okamihu objavenie vybehlic sa zavedie týždenný monitoring, zameraný na zneškodnenie vybehlic v rámci skúšky a na okolitých pestovateľských plochách.

Všetky údaje týkajúce sa ošetrov s uvedením prípravkov a aplikovaných množstiev, rastového štádia rastlín, relevantných pozorovaní týkajúcich sa aplikácií, vyhodnotenia, počty a poznámky, aktivity monitoringu a osobitne objavenie (a zneškodnenie) vybehlic budú zapísané do poľného záznamníka.

5.7 Spôsob zberu geneticky modifikovaných vyšších rastlín

Na konci experimentu bude repa mechanicky zozbieraná pomocou mobilného zberacieho zariadenia. Listy budú odstránené, korene pozbierané, opláchnuté a zvážené. Korene sa nasekajú a odoberú sa vzorky drene, ktoré sa hlboko zamrazia v uzatvorených plastových skúmavkách. Všetky tieto úkony sa vykonajú na mieste skúšky. Zmrazené vzorky drene sa odošlú do SESVanderHave so sídlom v Tienen (Belgicko), kde sa podrobia obvyklým analýzám ako je stanovenie obsahu cukru a ostatné kvalitatívne ukazovatele.

Po zbere sa listy a kúsky koreňov ponechajú na mieste skúšky. Pred zapracovaním do pôdy sa zničia rozrušením rotačným kultivátorom. Stroje ako aj všetka použitá technika bude predtým, ako opustí miesto skúšky preverená a dôkladne vyčistená priamo na mieste skúšky. Všetky činnosti vykonané na mieste skúšky budú dozorované technickými pracovníkmi SESVanderHave.

Podrobný protokol, opisujúci všetky aktivity a činnosti potrebné pre realizáciu skúšky, a všetky podrobnosti budú pred samotným uvoľnením GM cukrovej repy konzultované s technickými pracovníkmi a zamestnancami SESVanderHave, zodpovednými za menežment skúšky. Protokol popisuje všetky úkony, ktoré sa majú na skúšobných plochách uskutočniť, osobitne špecifické opatrenia a pokyny, vzťahujúce sa na poľný pokus s geneticky modifikovanou cukrovou repou a manipuláciu s GMO vo všeobecnosti. Zodpovedný technický personál bude používať pre zaznamenávanie všetkých vykonaných úkonov na skúšobných plochách skúšobný záznamník. Tento záznamník bude overený pracovníkom, zodpovedným za menežment skúšky.

5.8 Opis ďalšieho nakladania s geneticky modifikovanými vyššími rastlinami

Ďalšie nakladanie s materiálmi GM cukrovej repy po zbere je obmedzené na odber vzoriek a ich prevoz k analýzám v zahraničí (viď časť 5.7 sekcie C), alebo na iné pracoviská (s autorizáciou pre prácu s predmetným GMO). Za ďalšie nakladanie možno považovať potenciálne uskladnenie vzoriek vegetatívnych častí rastlín cukrovej repy na pracoviskách autorizovaných na túto činnosť, alebo likvidáciu zberaného rastlinného materiálu, vrátane odobraných vzoriek z koreňa či iných častí rastlín.

5.9 Termín a spôsob vyhodnotenia zavádzania geneticky modifikovaných vyšších rastlín do životného prostredia

Ukončením zavedenia do životného prostredia bude zber listov a koreňov (buliev) cukrovej repy a zaoranie zvyškov rastlín.

Za odpady spojené s nakladaním s geneticky modifikovanými rastlinami cukrovej repy môžu byť považované zvyšky osiva, pozbierané listy a korene vrátane vzoriek, alebo zvyšky

rastlín. Zvyšky osiva budú umiestnené do označených obalov, ktoré budú dôkladne uzatvorené a odoslané do SESVanderHave v Tienen podľa pracovných inštrukcií Spoločnosti (WI 03.b TE-SK a WI 04 TE-SK) v súlade tak s metodickými pokynmi, ako aj s podmienkami povolenia vydaného na základe tejto žiadosti.

Zvyšky rastlín môžu byť zničené rozptýlením a zaoraním priamo na pokusnom pozemku, prípadne spálené v spaľovni komunálneho odpadu ako biologický odpad. Nakladanie s odpadmi vrátane likvidácie materiálu geneticky modifikovanej cukrovej repy bude riadne evidované.

Pracovisko CVRV-VÚRV Piešťany, ktoré by malo manipulovať s GM cukrovou repou, má mnoholeté skúsenosti v oblasti poľného pokusníctva a od r. 2006 taktiež skúsenosti s pestovaním GM kukurice MON 810 a poľným skúšaním rôznych línií a hybridov GM kukurice. To sú všetko faktory, ktoré by mali významne prispieť k bezproblémovej realizácii navrhovaného projektu poľného skúšania línií a hybridov cukrovej repy (*B. vulgaris*), odvodených z geneticky transformovanej línie H7-1 odolnej voči herbicídu glyfozát.

6. Opatrenia na ochranu zdravia ľudí, zvierat, životného prostredia a biologickej rozmanitosti a nakladanie s odpadom

6.1 Vzďialenosť plochy pestovania geneticky modifikovaných vyšších rastlín od planých alebo pestovaných sexuálne kompatibilných druhov rastlín

Skúška sa uskutoční v r. 2010 v rámci niekoľkohektárového poľa jačmeňa, kde sa pestovať v rámci osevného postupu aj iné plodiny. Miesto skúšky bude ohraničená 5 m širokým pásom neosiatej pôdy, tak ako sa odporúča v pracovných postupoch spoločnosti SESVanderHave. Podobne zostavené skúšky sa plánujú pre rovnaké ročné obdobia počas nasledujúcich dvoch rokov (2011 a 2012).

Rastlinám cukrovej repy v rámci skúšky, ani rastlinám rovnakého druhu v okolí poľa nebude umožnené kvitnutie. Za normálnych klimatických podmienok všetky rastliny repy v skúške výnosu ostávajú vo vegetatívnom štádiu.

Pravidelné návštevy miesta skúšky skúsenými pracovníkmi zabezpečia včasné zistenie všetkých vybiehajúcich rastlín. Ak sa zistia akékoľvek príznaky vybiehania, operatívne sa uplatnia primerané postupy na zničenie vybehlic a to dostatočne dlho pred obdobím ich možného kvitnutia. Tým sa nevytvorí žiadna možnosť prenosu genetického materiálu (peľom) z rastlín GM cukrovej repy v skúške na okolité plochy pestovania cukrovej repy alebo iné skúšky.

6.2 Opatrenia pre zníženie alebo zabránenie úletu peľu alebo semien, ak sú použité

V dobe výsevu, ešte pred prevozom osiva na pole, budú semená obalené do uzatvorených vreciek a tieto vrecká budú umiestnené v uzavretom kontajneri tak, ako je to požadované pracovnými postupmi spoločnosti SESVanderHave. Počas výsevu priamo na poli budú vrecká vybraté z kontajnera, otvorené na mieste a nasypané do sejacieho zariadenia. Po výseve sa sejacie zariadenie vyčistí podľa osobitných predpisov. Všetko zostávajúce semeno bude umiestnené v uzatvorených vreckách a prevezené späť do sídla SESVanderHave (Tienen, Belgicko) pre bezpečné uskladnenie. Dôležitým opatrením zamedzujúcim šírenie semien je riadne vyčistenie mechanizácie (sejací stroj) po ukončení sejby.

V tejto skúške výnosu, rovnako ako vo všetkých podobných skúškach, ako už bolo spomenuté ostanú rastliny vo vegetatívnom štádiu a nebude im umožnené kvitnutie. Pravidelné návštevy skúšky a okolitých polí skúsenými pracovníkmi, a to týždenné medzi koncom júna a

polovicou augusta a dvojtýždenné od výsevu do konca júna a od polovice augusta do zberu zabezpečia včasné zistenie všetkých vybehlíc. Ak sa spozoruje akýkoľvek príznak výskytu vybehlíc na ploche skúšky alebo na okolitých plochách pestovania cukrovej repy, uplatnia sa postupy na zničenie vybehlíc v dostatočnom predstihu pred ich rozkvitnutím.

Lokalita skúšky bude počas zámerného uvoľnenia a počas obdobia monitoringu po zavedení do životného prostredia pravidelne kontrolovaná vyškolenými pracovníkmi s cieľom zneškodniť burinne rastúce rastliny cukrovej repy, prípadne vybehlice dostatočne dlho pred ich rozkvitnutím a uvoľnením peľu, čím sa je potreba izolačných vzdialeností bezpredmetná.

6.3 Opis metód pre úpravu pozemku po skončení pokusu

Po zbere rastlín zo skúšky výnosu budú zvyšky rastlín a odpadová voda z mobilného zberacieho zariadenia rozptýlené na lokalite skúšky a zapracované do pôdy pomocou rotavátora. Po skončení pokusu (zbere) bude pokusná plocha zaoraná.

Lokalita nebude použitá na pestovanie cukrovej repy v ďalších dvoch rokoch, počas ktorých bude všetka burinne rastúca repa, ktorá by sa mohla objaviť zneškodnená v rámci monitoringu skúsenými pracovníkmi. Počas týchto dvoch rokov po zavedení budú jedinými dovolenými plodinami tie, u ktorých sa používajú herbicídy letálne pre geneticky modifikovanú repu tolerantnú ku glyfozátu (napr. obilniny).

Lokalita skúšky bude počas dvoch rokov po uvoľnení navštevovaná skúsenými technickými pracovníkmi CVRV-VÚRV v Piešťanoch ako aj pracovníkmi spoločnosti SESVanderHave.

6.4 Popis metód pre dopravu a spracovanie geneticky modifikovaných vyšších rastlín

Doprava osiva alebo zrna geneticky modifikovanej cukrovej repy bude realizovaná v pevných, riadne uzavretých a označených obaloch (semená obalené do uzatvorených vreciek a tieto vrecká umiestnené v uzavretom kontajneri). Doprava môže zahŕňať prevoz osiva, alebo vzoriek na rozbery. Každá doprava GM materiálu bude evidovaná, napr. o pohybe osiva budú vedené protokolárne zápisy. Dovoz osiva na pole na sejbu je zabezpečovaný osobným automobilom. Po ukončení pokusov bude pozberaný rastlinný materiál zlikvidovaný, s výnimkou vzorky zaslaných na analýzy na pracovisko spoločnosti SESVanderHave do Tienen (Belgicko). Evidencia nakladania s pozberaným rastlinným materiálom bude vedené protokolárne.

V prípade potreby všetky materiály GM cukrovej repy, tj., osivo, vzorky a iný rastlinný materiál budú prevážané v uzavretých, dostatočne pevných obaloch (napr. jutové vrecia, alebo viacvrstvové papierové sáčky) s označením určeným pre geneticky modifikované organizmy.

Spoločnosť SESVanderHave vyvinula kód pre jasnú identifikáciu všetkého GMO materiálu (semien, rastlín či akýchkoľvek ich častí). Prítomnosť jednoduchej etikety umožňuje okamžitú identifikáciu obalov či priestorov, obsahujúcich GMO.

Označovanie v rámci spoločnosti SESVanderHave pozostáva z čierneho trojuholníka (Obr. 10), vyobrazeného na každom obale alebo kontajneri, obsahujúcom GMO materiál, minimálne na dvoch protiľahlých stranách obalu.

Obr. 10: Označenie obalov a kontajnerov obsahujúcich GMO



Rastlinný materiál, ako napr. osivo, má určené kódovacie pravidlá, umožňujúce ľahké vyhľadávanie a získavanie údajov z databázy, ako aj rýchlu identifikáciu GMO semena alebo rastlinného materiálu.

Materiál GMO cukrovej repy je identifikovaný kódom, pozostávajúcim z :

- Kódu genetickej transformácie spoločnosti SESVanderHave: jednoznačný a nezameniteľný kód pre každú genetickú transformáciu, a
- Kódu hybridu spoločnosti SESVanderHave: určený kódovacím systémom spoločnosti SESVanderHave, obsahujúcim písmeno G.

V rámci SR bude označenie prevedené nasledujúcim spôsobom:

GENETICKY MODIFIKOVANÝ ORGANIZMUS

Kód genetickej transformácie

Kódu hybridu

Pozemky, kde sa bude manipulovať s geneticky modifikovanou cukrovou repou, budú označené vo všetkých rohoch viditeľnými tabuľami s nápisom:

**POZOR ! GENETICKY MODIFIKOVANÝ ORGANIZMUS ! NEVSTUPOVAŤ !
NESKRMOVAŤ ! CHEMICKY OŠETRENÉ !**

Nakladanie s geneticky modifikovanými hybridmi cukrovej repy bude prebiehať za prísnych podmienok vylučujúcich únik transgénov do okolitého prostredia. Možnosť rozširovania geneticky modifikovanej cukrovej repy peľom bude zamedzená vyhľadávaním a likvidáciou vybehlic v porastoch GM cukrovej repy, ako aj v porastoch konvenčnej cukrovej repy v okolí miesta skúšky. Rozširovaniu GM cukrovej repy prostredníctvom semien bude zabránené dôkladným vyčistením použitej mechanizácie, vrátane transportu cukrovej repy v pevných a uzavretých obaloch. Pozberaný rastlinný materiál vrátane odpadu bude zlikvidovaný alebo v prípade vzoriek zaslaný na analýzy do na to určených laboratórií (viď časť 5.7 sekcie C). Akýkoľvek pohyb materiálov GM cukrovej repy spojený s realizáciou pokusov bude evidovaný, takže bude možné materiál dohľadať v akejkolvek fáze nakladania s geneticky modifikovanou cukrovou repou.

6.5 Kontroly a monitorovanie výskytu a účinkov geneticky modifikovaných vyšších rastlín

Environmentálne riziká geneticky modifikovanej cukrovej repy H7-1 sú vyhodnotené ako zanedbateľné. Z tohto dôvodu by stratégie pre menežment rizika mohli byť rovnaké ako pre konvenčnú cukrovú repu. Vzhľadom na plánované agronomické hodnotenia a pozorovania pokusných parciel, budú pokusy kontrolované pravidelne počas celého priebehu zavádzania GM cukrovej repy do životného prostredia i z pohľadu potenciálneho výskytu priamych alebo nepriamych negatívnych účinkov na životné prostredie. V prípade objavenia sa akýchkoľvek nežiadúcich účinkov vyplývajúcich zo zavádzania hybridov GM cukrovej repy H7-1 do životného prostredia budú tieto okamžite nahlásené ministerstvu a príslušným úradom. Zároveň, v súlade so zákonom o GMO č.151/2002 Z. z. v platnom znení, vždy po ukončení pokusov bude ministerstvu predaná kompletná správa o manipulácii s GM cukrovou repou. Monitorovanie výskytu burinne rastúcich rastlín repy po ukončení pokusov prebehne počas

celého vegetačného obdobia nasledujúceho roku. Všetky vzídené rastliny cukrovej repy budú likvidované a ponechané na pokusnej ploche.

6.5.1 Metódy zisťovania prítomnosti geneticky modifikovaných vyšších rastlín a monitorovanie ich účinkov na ekosystém

Prítomnosť geneticky modifikovaných rastlín cukrovej repy môže byť zistená vysoko špecifickými metódami PCR pre detekciu sekvencií DNA vnesených génov transgénnej udalosti H7-1 (viď časť 2.13).

6.5.2 Špecifická metóda identifikácie geneticky modifikovaných vyšších rastlín a odlíšenie geneticky modifikovaných rastlín od darcovského organizmu, príjemcu, prípadne rodičovského organizmu, citlivosť a spoľahlivosť týchto metód

Prítomnosť geneticky modifikovaných rastlín cukrovej repy môže byť zistená vysoko špecifickými metódami PCR pre detekciu sekvencií DNA vnesených génov transgénnej udalosti H7-1. (podrobnejšie viď časť 2.13). Ak je potrebné, geneticky modifikovaný materiál môže byť identifikovaný aj pomocou:

- špecifickej genomickej hybridizačnej analýzy podľa Southerna, ktorá preukáže prítomnosť vlozenej DNA a
- herbicídového testu založeného na tom, že geneticky modifikované rastliny prežijú aplikáciu glyfozátu, zatiaľ čo nemodifikované rastliny uhynú (preukáže expresiu vloženého transgénu).

6.5.3 Techniky (metódy) detekcie prenosu vloženého dedičného materiálu na ďalšie organizmy

Potenciálnu prítomnosť dedičného materiálu vloženého do GM cukrovej repy H7-1 v iných organizmoch vzniknutých prenosom tohto dedičného materiálu je možné detekovať vysoko špecifickými metódami PCR pre detekciu sekvencií DNA vnesených genetických elementov v transgénnej línii H7-1. (viď časť 2.13).

6.5.4 Plocha, na ktorej bude monitoring vykonávaný

Monitoring bude realizovaný na pokusných plochách, kde prebieha, alebo prebiehalo pestovanie GM cukrovej repy. V dobe realizácie pokusov budú sledované všetky neštandardné situácie v rámci plánovaného agronomického hodnotenia, po zbere bude pokusná plocha monitorovaná pre výskyt možného výskytu burinne rastúcich rastlín repy počas celého vegetačného obdobia (aspoň 3 návštevy počas vegetácie) nasledujúceho roku.

6.5.5 Doba trvania monitoringu

Lokalita skúšky bude monitorovaná počas dvoch rokov po zbere, aby sa identifikovali a zneškodnili všetky rastliny cukrovej repy, nájdené v oblasti skúšky. Odporúčajú sa najmenej tri návštevy ročne, ktoré zabezpečia identifikáciu rastlín pred ich rozkvitnutím. Počas každej návštevy skúšky budú zabezpečené fotografie lokality. Všetky aktivity monitoringu po uvoľnení budú zaznamenané do poľného záznamníka.

6.5.6 Častot' monitoringu

V období realizácie pokusov je sledovanie robené vždy v rámci plánovaných agronomických hodnotení, po zbere pokusov v nasledujúcom roku vždy raz za mesiac počas vegetačného obdobia (najmenej tri návštevy ročne).

6.6 Nakladanie s odpadmi vrátane likvidácie geneticky modifikovaných, vyšších rastlín

Za odpady spojené s nakladaním s hybridmi geneticky modifikovanej cukrovej repy H7-1 môžu byť považované zvyšky osiva po sejbe, odpad s obsahom semien po čistení techniky, náradia a oblečenia, odpady z monitorovacích aktivít (vybehlice, kvetné byle vybehlic) zvyšky rastlín a odpadová voda z odberu vzoriek a rastlinný materiál (listy a korene) po ukončení poľnej skúšky.

Zvyšky osiva po sejbe sa spracujú ako odpad, alebo sa prebalia na spätné odoslanie v označených a riadne uzatvorených obaloch do laboratórií SESVanderHave v Tienen (Belgicko) podľa pracovných inštrukcií vydaných Spoločnosťou SESVanderHave.

Odpad z čistenia techniky, náradia a oblečenia s obsahom semien alebo materiálu so schopnosťou regenerácie sa zozbiera a spracuje ako odpad, alebo v prípade semien sa prebalí a transportuje späť do Tienen (Belgicko) spolu s príslušnou sprievodnou dokumentáciou (EMTF). Materiál so schopnosťou regenerácie (krčky a vrcholové listy repy so zbytkami koreňa) sa zlikviduje rozptýlením a zaoraním priamo na pokusnom pozemku.

Odpad z monitorovacích aktivít, ako vybehlice a burinné rastliny repy, sa likviduje po mechanickom zneškodnení rozptýlením a zaoraním priamo na pokusnom pozemku. Ak je potrebné, môže sa tento odpad zneškodniť aj chemicky použitím vhodného herbicídu. V prípade málo pravdepodobného výskytu rastlín nesúcich semená sa tieto umiestnia do jám hlbokých 50 cm, spália sa a prikryjú zeminou.

Zvyšky rastlín a odpadová voda z odberu vzoriek počas zberu sa rozptýlia na ploche a zapracujú do pôdy na mieste zámerného uvoľnenia.

Odpad pri ukončení skúšky (po zbere), t.j. korene a vrcholové listy cukrovej repy sa likvidujú mechanickým rozrušením diskovaním a zaoraním priamo na pokusnom pozemku.

Nakladanie s odpadmi vrátane likvidácie materiálu geneticky modifikovanej cukrovej repy bude riadne evidované.

6.7 Zhrnutie ochranných opatrení

Všetko nakladanie s geneticky modifikovanou cukrovou repou odvodenou z línie H7-1 bude prebiehať za prísnych podmienok vylučujúcich únik transgénov do okolitého životného prostredia. Možnosť rozširovania geneticky modifikovanej cukrovej repy peľom bude zamedzená vyhladávaním a likvidáciou vybehlic v porastoch GM cukrovej repy počas roku skúšania ako aj počas monitorovacej periódy, a to aj v porastoch konvenčnej cukrovej repy v okolí miesta skúšky. Rozširovaniu GM cukrovej repy prostredníctvom semien bude zabránené dôkladným vyčistením použitej mechanizácie, vrátane transportu cukrovej repy v pevných a uzavretých obaloch. Pozberaný rastlinný materiál vrátane odpadu bude zlikvidovaný alebo v prípade vzoriek zaslaný na analýzy do na to určených laboratórií (viď časť 5.7 sekcie C). Akýkoľvek pohyb materiálov GM cukrovej repy spojený s realizáciou pokusov bude evidovaný, takže bude možné materiál dohľadať v akejkolvek fáze nakladania s geneticky modifikovanou cukrovou repou.

CVRV – VÚRV Piešťany, ktorý by mal nakladať s touto GM cukrovou repou, má mnohoročné skúsenosti v oblasti poľného pokusníctva a od r. 2006 tiež skúsenosti s pestovaním GM kukurice v režime zavádzania do životného prostredia. To sú všetko faktory, ktoré by mali významne prispieť k bezproblémovej realizácii poľných štúdií v rámci navrhovaného projektu poľná skúšky na agronomické posúdenie línií a hybridov cukrovej repy (*Beta vulgaris*), odvodených z geneticky transformovanej línie H7-1 odolnej voči herbicídu glyfozát.

7. Zhrnutie informácií o plánovaných poľných pokusoch uskutočňovaných za účelom získania nových údajov o vplyve zavádzania geneticky modifikovaných vyšších rastlín do životného prostredia na zdravie ľudí, zvierat a životné prostredie

Súhrnný ohlasovací informačný formát

Predmetom predkladanej žiadosti je udelenie povolenia k zavádzaniu geneticky modifikovaných hybridov cukrovej repy odvodených z geneticky transformovanej línie H7-1 do životného prostredia v Slovenskej republike za účelom realizácie poľných štúdií týkajúcich sa agronomickej výkonnosti uvedených GM cukrových riep a ich tolerancie k herbicídom obsahujúcim ako aktívnu zložku glyfozát.

Pravdepodobnosť nezamýšľaného rozširovania hybridov GM cukrovej repy H7-1 do nepoľnohospodárskeho prostredia je zanedbateľná. V porovnaní s konvenčnou cukrovou repou, nie je perzistencia týchto riep v poľných podmienkach a jej invazívna schopnosť do okolitého prostredia zmenená. Ak by došlo v dôsledku uskutočnených poľných skúšok k rastu rastlín cukrovej repy v prírodných podmienkach, čo je veľmi nepravdepodobné, tak by tolerancia týchto rastlín ku glyfozátu mohla znamenať len obmedzenú krátkodobú selekčnú výhodu, ktorá by však nespôsobila tomuto prostrediu žiadne negatívne následky. Táto selekčná výhoda by platila len v prípade, keby sa v tomto prostredí aplikovali herbicídy na báze glyfozátu. Preto aj riziko neúmyselného rozširovania sa cukrovej repy H7-1, resp. Jej hybridov, cestou jej zburinenia je zanedbateľné.

Cukrová repa H7-1 je z hľadiska bezpečnosti pre životné prostredie, ľudí a živočíchy rovnako bezpečná ako konvenčná cukrová repa. Tento záver vychádza z podstatnej zhody cukrovej repy H7-1 s jej konvenčným náprotivkom a tiež z intenzívnej charakterizácie jedinej novej introdukovanej vlastnosti, t.j. tolerancie k herbicídu Roundup, ktorej aktívnou zložkou je glyfozát. Vlastnosť tolerancie ku glyfozátu získala GM cukrová repa H7-1 expresiou enzýmu CP4 EPSPS, kódovanej genetickou transformáciou vloženou cudzorodou DNA.

Na základe podrobnej molekulárnej charakterizácie genetickej modifikácie, podrobnej charakterizácie exprimovaného enzýmu CP4 EPSPS, histórie bezpečného využívania skupiny proteínov EPSPS a hostiteľskej rastliny cukrovej repy, agronomickej, fenotypovej, kompozičnej a nutričnej totožnosti cukrovej repy H7-1 s konvenčnou cukrovou repou, ako aj absencie toxicity pre živočíchy je na záver možné konštatovať, že environmentálne či zdravotné riziko spojené so zámerným uvoľnením cukrovej repy H7-1, obsahujúcej vložený úsek génu *cp4 epsps* z baktérie *Agrobacterium* sp., do životného prostredia s cieľom realizovať poľné skúšky je zanedbateľné a nijako sa nelíši od rizika spojeného s pestovaním akejkoľvek inej konvenčnej cukrovej repy.

Dátum, podpis žiadateľa

V Piešťanoch, dňa 7.12.2009

.....
Doc. RNDr. Ján Kraic, PhD.
riaditeľ CVRV – VÚRV Piešťany

Literatúra

Tu je uvedený rozsiahly prehľad literatúry, ktorý môže slúžiť pre prípadné ďalšie štúdium problematiky. Text dokumentu neodkazuje na všetky tu uvádzané citácie, čo by nemalo byť považované za nedostatok, ale za výber z prehľadu literatúry relevantnej pre zostavenie dokumentu. Prehľad literatúry obsahuje 73 referencií.

- Abe, J., Yoshikawa, J.A.H. and Tsuda, C. (1986) Reproductive barriers in sugar beet and its wild relatives of the section *vulgaris*, the gene *Beta*. *Journal of faculty Hokkaido University*, **63**, 40-48.
- Alibhai, M.F. and Stallings, W.C. (2001) Closing down on glyphosate inhibition - with a new structure for drug discovery. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 2944-2946.
- Artschwager, E. and Starrett, R.C. (1933) The time factor in fertilization and embryo development in the sugar beet. *J. Agric. Res.*, **47**, 823-843.
- Barker, R.F., Idler, K.B., Thompson, D.V. and Kemp, J.D. (1983) Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octapine Ti Plasmid pTi15955. *Plant. Mol. Biol.*, **2**, 335-350.
- Bartsch, D., Lehnen, M., Clegg, J., Pohl-Orf, M., Schuphan, I. and Ellstrand, N.C. (1999) Impact of gene flow from cultivated beet on genetic diversity of wild sea beet populations. *Mol Ecol*, **8**, 1733-41.
- Bennett, R., Phipps, R. and Strange, A. (2006) An application of life-cycle assessment for environmental planning and management: the potential environmental and human health impacts of growing genetically modified herbicide-tolerant sugar beet. *Journal of Environmental Planning and Management*, **49**, 59-74.
- Bennett, R., Phipps, R., Strange, A. and Grey, P. (2004) Environmental and human health impacts of growing genetically modified herbicide-tolerant sugar beet: a life-cycle assessment. *Plant Biotechnology Journal*, **2**, 1-6.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L. and Boyer, H.W. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, **2**, 95-113.
- Bosemark, N. O. (2006) Genetics and Breeding. In: Draycott, A. P. (ed.) *Sugar Beet*. Blackwell Publishing, pp. 50-88.
- Boudry, P., Mörchen, M., Saumitou-Laprade, P., Vernet, P. and Van Dijk, H. (1993) The origin and the evolution of weed beets: consequences for the breeding and release of herbicide resistant transgenic sugar beets. *Theor. Appl. Genet.*, **87**, 471-478.
- Brickley, R.S., Lawrence, R.L., Miller, P.R. and Battogtokh, N. (2006) Predicting tillage practices and agricultural soil disturbance in north central Montana with Landsat imagery. *Agriculture, Ecosystem and Environment*, **114**, 210-216.
- Brouwer, W. (1976) Handbuch des speziellen Pflanzenbaues Band II. , **Parey Verlag Berlin**
- Cesareni, G., Muesing, M.A. and Polisky, B. (1982) Control of CoIE1 DNA replication: the *rop* gene product negatively affects transcription from the replication primer promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**, 6313-6317.
- CETIOM. (1999) Impact du développement des plantes transgéniques dans les systèmes de culture. Rapport final. *ACTA N°96/15-B*, 1-41.
- Cooke, D.A. and Scott, R.K. (1993) The sugar beet crop.

- Coruzzi, G., Broglie, R., Edwards, C. and Chua, N. (1984) Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *EMBO J*, **3**, 1671-1679.
- Dark, S.O.S. (1971) Experiments on the cross-pollination of sugar beet in the field. *Journal of the National Institute of Agricultural Botany*, **12**, 242-266.
- De Bock, T.S.M. (1986) The genus beta: domestication, taxonomy and interspecific hybridization for plant breeding. *Acta Horticult*, **182**, 335-343.
- Della-Cioppa, G., Bauer, S.C., Klein, B.K., Shah, D.M., Frayley, R.T. and Kishore, G.M. (1986) Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 6873-6877.
- Della-Cioppa, G., Bauer, S.C., Taylor, M.T., Rochester, D.E., Klein, B.K., Shah, D.M., Frayley, R.T. and Kishore, G.M. (1987) Targeting a herbicide-resistant enzyme from *Escherichia coli* to chloroplasts of higher plants. *Bio/Technology*, **5**, 579-584.
- Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. and Goodman, H.M. (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**, 561-573.
- Dubelman, S., Ayden, B.R., Dudin, Y.A., Bookout, J.T. and Jiang, C. (2005) Aerobic Soil Degradation of the CP4 EPSPS Protein. *Monsanto Technical Report*, **MSL-19332**
- Eastham, K. and Sweet, J. (2002) Genetically modified organisms (GMOs): the significance of gene flow through pollen transfer, *European Environment Agency*, 1-75.
- Elmegaard, N. and Pedersen, M.B. (2001) Flora and fauna in Roundup tolerant sugar beet fields. *National Environmental Research Institute (NERI)*, **Technical Report 349**, 40.
- Falconer, D.S. (1984) Einführung in die quantitative Genetik. *Ulmer Verlag Stuttgart*
- Fehr, W.R., Fehr, E.L. and Jessen, H.J. (1987) Principles of cultivar development. *Crop species*, **2**
- Fling, M.E., Kopf, J. and Richards, C. (1985) Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 7095-7106.
- Gowda, S., Wu, F.C. and Shepard, R.J. (1989) Identification of promoter sequences for the major RNA transcripts of figwort mosaic and peanut chlorotic streak viruses (Caulimovirus group). *J. Cell Biochem*, **13D**, 301.
- Halldén, C., Lind, C., Sall, T., Bosemark, N.O. and Bengtsson, B.O. (1990) Cytoplasmic male sterility in beta is associated with structural rearrangements of the mitochondrial DNA and is not due to interspecific organelle transfer. *J Mol Evol*, **31**, 365-72.
- Haslam, E. (1974) The shikimate-pathway. John Wiley and sons, New York
- Haslam, E. (1993) Shikimic acid: metabolism and metabolites. Wiley, J. and Sons, Chichester, England
- Herrmann, K.M. (1983) The common aromatic biosynthetic pathway. In: Herrmann, K.M. and Somerville, R.L. (eds.), *Amino acids: biosynthesis and genetic regulation*. Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts, pp. 301-322.
- James, C. (2005) Global status of commercialized biotech/GM crops: 2005. *ISAAA*, **Brief 34**
- Jensen, I. and Bogh, H. (1942) Om forhold der haf inflydelse paa krydningsfaren hos vindbestövende kulturplanter. *Tidsskrift for planteavl*, **46**, 38-66.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M. and McPherson, J. (1987) Duplication of CaMV 35S Promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science*, **236**, 1299-1302.
- Kishore, G., Shah, D., Padgett, S., Della-Cioppa, G., Gasser, C., Re, D., Hironaka, C., Taylor, M., Wibbenmeyer, J., Eichholtz, D., Hayford, M., Hoffmann, N., Delannay, X.,

- Horsch, R., Klee, H., Rogers, S., Rochester, D., Brundage, L., Sanders, P. and Fraley, R.T. (1988) 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase: from biochemistry to genetic engineering of glyphosate-tolerance. In: Hollingworth, R.M. (ed.) *Biotechnology for crop protection*. American Chemical Society, pp. 37-48.
- Klee, H.J., Muskopf, Y.M. and Gasser, C.S. (1987) Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate- 3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Mol. Gen. Genet.*, **210**, 437-42.
- Larsen, K. (1977a) Pseudo-compatibility in *Beta vulgaris* L. A quantitative character, dependant on the degree of S-gene heterozygosity. *Incompatibility Newsletter*, **8**, 48-51.
- Larsen, K. (1977b) Self-incompatibility in *Beta vulgaris* L. I. four gametophytic, complementary S-loci in sugar beet. *Hereditas*, **85**, 227-248.
- Le Cohec, F. and Soreau, P. (1989) Mode d'action des gènes et hétérosis pour le caractère montée à raines dans le croisement de deux lignées fixées de betterave à sucre (*Beta Vulgaris* L.). *Agronomie*, **9**, 585-590.
- Lysgaard, C.P. (1991) Froalderens indflydelse på spireevne, spiringsenergi, platevækst og det endelige udbytte hos bederoe og kälroe samt på anden generation af kälroe. *Tidsskrift for planteavl*, **95**, 367-374.
- May, M.J., Champion, G.T., Dewar, A.M., Qi, A. and Pidgeon, J.D. (2004) Management of genetically modified herbicide tolerant sugar beet for spring and autumn environmental benefits. *Proceedings of the Royal Society*, **B 272**, 111-119.
- McFarlane, J.S., Price, C. and Owen, F.V. (1949) Strains of sugar beets extremely resistant to bolting. *Proceedings of the American Society of Sugar Beet Technologists*, **5**, 154-155.
- Milford, G. F. J. (2006) Plant structure and crop physiology. In: Draycott, A. P. (ed.) *Sugar Beet*. Blackwell Publishing, pp. 30-49.
- Morrelli, G., Nagy, F., Fraley, R.T., Rogers, S.G. and Chua, N. (1985) A short conserved sequence is involved in the light-inducibility of a gene encoding ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit of pea. *Nature*, **315**, 200-204.
- Odell, J.T., Nagy, F. and Chua, N.H. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, **313**, 810-812.
- OECD. (1993) Food safety and biotechnology: concepts and principles. *Safety evaluations of food derived by modern biotechnology: concepts and principles: OECD publications*
- OECD. (2000) OECD scheme for the varietal certification of sugar beet and fodder beet seed moving in the international trade. *OECD publications*
- OECD. (2001) Consensus document on the biology of *Beta vulgaris* L. (sugar beet). *OECD, ENV/JM/MONO(2001)11*
- Owen, F.V. (1945) Cytoplasmically inherited male-sterility in sugar beets. *Journal of agriculture research*, **71**, 423-440.
- Owen, F.V. (1948) Utilisation of male-sterility in breeding superior yielding sugar beet. *Proceedings of the American society of sugar beet technologists*, **5**, 156-161.
- Padgett, S.R., Barry, G.F., Re, D.B., Eichholtz, D.A., Weldon, M., Kolacz, K. and Kishore, G.M. (1993) Purification, cloning and characterization of a highly glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4. *Monsanto Technical Report*, **MSL 12738**
- Padgett, S.R., Kolacz, K.H., Delannay, X., Re, D.B., La Vallee, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Barry, G.F., Eichholtz, D.A., Peschke, V.M., Nida, D.L., Taylor, N.B. and Kishore, G.M. (1995) Development, identification and characterisation of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop science*, **35**, 1451-1461.

- Padgett, S.R., Re, D.B., Barry, G.F., Eichholtz, D.E., Delannay, X., Fuchs, R.L., Kishore, G.M. and Fraley, R.T. (1996a) New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup Ready gene. *CRC Handbook*, **4**, 53-84.
- Padgett, S.R., Taylor, N.B., Nida, D.L., Bailey, M.R., MacDonald, J., Holden, L.R. and Fuchs, R.L. (1996b) The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. *J Nutr*, **126**, 702-16.
- Petersen, J. and Röver, A. (2005) Comparison of sugar beet cropping systems with dead and living mulch using a glyphosate resistant hybrid. *Journal of Agronomy and Crop Science*, **191**, 55-63.
- Powling, A. (1982) Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from sugarbeet with normal and male-sterile cytoplasms. *Heredity*, **49**, 117-120.
- Richins, R.D., Scholthof, H.B. and Shepherd, R.J. (1987) Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). *Nucleic Acids Res*, **15**, 8451-66.
- Rogers, S.G., Klee, H., Horsch, R. and Fraley, R.T. (1987) Improved vectors for plant transformation: Expression cassette vectors and new selectable markers. *Meth. Enzymol.*, **153**, 253-277.
- Sanger, M., Daubert, S. and Goodman, R.M. (1990) Characteristics of a strong promoter from Figwort Mosaic Virus: comparison with the analogous 35S promoter from Cauliflower Mosaic Virus and the regulated mannopine synthase promoter. *Plant Mol. Biol.*, **14**, 433-443.
- Savitsky, V.F. (1954) Self-sterility and self-sterility in monogerm beet. *Proceedings of the American society of beet technologists*, **8**, 29-33.
- Schonbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W.A., Schloss, J.V., Amrhein, N., Evans, J.N.S. and Kabsch, W. (2001) Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme EPSP synthase in atomic detail. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 1376-1380.
- Scott, R.K. and Longden, P.C. (1970) Pollen release by diploid tetraploid sugar beet plants. *Ann. Appl. Biol.*, **66**, 129-135.
- Shepherd, R.J., Richins, J.F., Duffus, J.F. and Handley, M.K. (1987) Figwort mosaic virus: properties of the virus and its adaptation to a new host. *The American Phytopathology society*, **77**, 1668-1673.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517.
- Steinrücken, H.C. and Amrhein, N. (1980) The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, **94**, 1207-1212.
- Steinrücken, H.C. and Amrhein, N. (1984) 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae*. *Eur. J. Biochem.*, **143**, 351-357.
- Strandberg, B. and Pedersen, B.M. (2002) Biodiversity in glyphosate tolerant sugar beet fields. *National Environmental Research Institute (NERI), Technical Report 410*
- Sutcliffe, J.G. (1979) Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **43**, 77-90.
- Timko, M.P., Herdies, L., de Alameida, E., Cashmore, A.R., Leemans, J. and Krebbers, E. (1988) Genetic engineering of nuclear-encoded components of the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis*. In: Phillips, M., Shoemaker, S.P., Middlekauff, R.D. and Ottenbrite, R.M. (eds.), *The impact of chemistry on biotechnology - a multidisciplinary discussion*. ACS Books, Washington DC, pp. 279-295.

- Van Geyt, J.P.C., Lange, W., Oleo, M. and De Bock, T.S.M. (1990) Natural variation within the genus *Beta* and its possible use for breeding sugar beet: a review. *Euphytica*, **49**, 57-76.
- Vigouroux, Y., Darmency, H., Gestat de Garambe, T. and Richard-Molard, M. (1999) Gene flow between sugar beet and weed beet. , *BCPC Symposium Proceedings. Gene flow and agriculture: relevance for transgenic crops*, **72**, 83_88.
- Zhong, H., Sun, B., Warkentin, D., Zhang, S., Wu, R., Wu, T. and Sticklen, M.B. (1996) The competence of maize shoot meristems for integrative transformation and inherited expression of transgenes. *Plant Physiol.*, **110**, 1097-1107.