

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Geneticky modifikované organizmy v akvakultuře

Bakalářská práce

Adam Brázda

Akvakultura a péče o vodní ekosystémy

Vedoucí práce Ing. Miloslav Petrtýl, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Geneticky modifikované organizmy v akvakultuře" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 19.4. 2023

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Miloslavovi Petrtýlovi, Ph.D. za konstruktivní rady a za odborný a přátelský přístup k vedení práce. Dále bych chtěl poděkovat své rodině za bezmeznou podporu nejen při psaní této bakalářské práce.

Geneticky modifikované organizmy v akvakultuře

Souhrn

Tato práce je literární rešerší zabývající se geneticky modifikovanými rybami. Je kladen důraz na genetické úpravy s účelem zlepšení okolností v produkčním chovu.

Při výzkumu transgenních ryb byla v minulosti často využívána mikroinjekce, díky své relativní jednoduchosti. Nyní, po objevení CRISPR-Cas9 je studium genetických úprav snadnější a dostupnější než kdy předtím. Genetickými úpravami lze dosáhnout delece či inaktivace genu, pokud jeho projev není v produkci přínosný. Či je naopak možné nové geny vložit a introdukovat tak do organismu nové vlastnosti či zlepšit ty dočasné. Při produkci transgenních ryb pro užití v akvakultuře je stěžejní navýšení produkce růstového hormonu, který urychluje samotný růst, často velmi razantně. Dále je užíváno zlepšení tolerance vůči nízkým teplotám introdukcí genů pro tvorbu „antifreeze“ proteinů či zlepšení rezistenci vůči patogenům.

Je ale nutné naprosté zamezení úniku těchto ryb z chovných zařízení. Například kombinací fyzických a biologických metod. Tím je zabráněno přenosu genetické informace z modifikovaných ryb na divoké.

Negativní vliv konzumace masa z transgenních ryb nebyl pozorován, což potvrzuje například dlouhodobé používání transgenního lososa AquAdvantage (*Salmo salar*, Linnaeus 1758) v Severní Americe. Losos AquAdvantage je vůbec prvním živočichem s uměle upraveným genotypem, který byl schválen pro lidskou spotřebu.

Klíčová slova: transgeneze, *Salmo salar*, AquAdvantage, růstový hormon, posouzení rizik

Geneticky modifikované organizmy v akvakultuře

Summary

This bachelor's thesis is a review of genetically modified fish. It focuses on genetic modifications whose intent is to improve aspects of production.

In the beginning, transgenic fish were created with the use of microinjection, thanks to its relative ease. Now, with the discovery of CRISPR-Cas9, genetic modification research is easier than ever. Genetic modification can result in a deletion or an inactivation of a gene of interest when the transcription of said gene is unfavorable. It is also possible to introduce new genes which will bring new characteristics or emphasize the current ones. When it comes to the use of transgenic fish in aquaculture, the increase in the production of growth hormone is of great interest. Other characteristics, like cold tolerance, with the introduction of anti-freeze protein genes, or disease resistance, are also used. However it is necessary to prevent the escape of transgenic fish with the use of physical and biological barriers. For the transgenic modifications must not be introduced into the wild populations.

No adverse impact linked to the consumption of transgenic fish was found. This can be also supported by the long-term use of AquaAdvantage salmon (*Salmo salar*, Linnaeus 1758) in North America. AquaAdvantage salmon is the very first transgenic animal, that was approved for human consumption.

Keywords: transgenesis, *Salmo salar*, AquaAdvantage, growth hormone, risk assessment

1 Obsah

2 Úvod.....	8
3 Cíl práce.....	9
3.1 Co jsou to geneticky modifikované organizmy.....	10
3.1.1 Genetické Inženýrství a geneticky modifikované organizmy (GMO)	11
3.2 První GMO v akvakultuře.....	12
3.2.1 První transgenní ryba	12
3.2.2 První komerčně produkováná transgenní ryba	14
3.3 Přehled metod produkce transgenních ryb	19
3.3.1 Mikroinjekce	20
3.3.2 Elektroporace.....	21
3.3.3 Přenos genů spermiemi	22
3.3.4 ZFN	23
3.3.5 TALEN	24
3.3.6 CRISPR-Cas9	25
3.4 Praktické dopady GMO.....	26
3.4.1 Zlepšení produkce	26
3.4.2 Imunita vůči patogenům.....	28
3.4.3 Antifreeze protein.....	31
3.5 Rizika spojená s použitím GMO.....	33
3.5.1 Vliv konzumace GM ryb na zdraví člověka	33
3.5.2 Únik GMO do přírody.....	34
3.6 Kontroverze GMO	37
3.6.1 Rozdílný přístup USA a EU	37
3.6.2 Názor veřejnosti.....	39
4 Závěr	41
5 Literatura.....	42

2 Úvod

Produkce světového rybolovu za posledních 30 let stagnuje. Akvakultura ale zažívá nevídaný růst. V roce 1950 byl podíl akvakultury ve světové produkci ryb pouhých 5 %. V současnosti tato hodnota dosahuje 49 % a dále roste (FAO 2022). Efektivnost akvakultur je možné dále umocnit užitím genetického inženýrství.

První studie o geneticky upravených rybách pochází z Číny (Zhu et al. 1985). Užití geneticky modifikovaných v praxi na sebe nechalo dlouho čekat, a to až do roku 2015, kdy americký Ústav pro kontrolu potravin a léčiv schválil produkci transgenního lososa. Tímto aktem byla poprvé překročena hranice mezi užitím geneticky modifikovaných rostlin a geneticky modifikovaných živočichů pro produkční účely.

Ačkoli je užití genetických úprav značně kontroverzním tématem, jeho potenciální příspěvek je nesmírný. Správným zasažením do genomu organismů je možné nežádostivé geny deaktivovat, anebo naopak vnést geny nové. Použití metod pro genetické úpravy navíc obchází přirozené bariéry pro mezidruhové křížení. A tak je možné pracovat s geny bez ohledu na to, ze kterého druhu pocházejí. Lze tak vytvořit ryby, které rostou několikrát rychleji, spotřebují méně krmiva, jsou imunní vůči nemocem, přežijí ve vodách na bodu mrazu nebo světélkují.

3 Cíl práce

Cílem práce byla tvorba souboru informací týkajících se geneticky modifikovaných organismů v akvakultuře. Práce má uvést příklady prvních pokusů o produkci transgenních ryb. Dále má být v rešerši zpracován přehled metod produkce transgenních ryb a cílů, kvůli kterým je transgeneze vytvářena. Dalšími cíli bylo stanovení a zhodnocení možných rizik spojených s užitím transgenních ryb. Následně byl zhodnocen přístup k problematice GMO z hlediska USA, EU a obecné veřejnosti.

3.1 Co jsou to geneticky modifikované organizmy

Lidé upravují genom organismů přes více než 30 000 let (Zimmer 2013). Lidé žijící v této době samozřejmě poněti o tom, co je to genom či DNA, neměli. Jednu věc ale věděli, a to že zkřížením dvou rostlin či zvířat vzniknou potomci, kteří se různou mírou podobají rodičům. Například jedna z rostlin měla velké plody, a tak zaseli právě její semena. Další generace tak měla plody obecně větší, a takto to pokračovalo dále. Objevili totiž proces, kterému dnes říkáme cílené šlechtění (selective breeding).

Prvními šlechtěnými organismy byly právě rostliny. Dávní předchůdci obilovin se dnešním zástupcům podobali jen z malé části. Tyto divoké trávy pouštějí svá zrna při dozrání, což pomáhá disperzi semen po okolí, ale pro sklizeň tyto vlastnosti moc vhodné nejsou. Šťastnou náhodou se ale mohl vyskytnout jedinec s mutací ve svém genomu, která způsobila ponechání zrn v klasu po celou dobu dozrávání. Po vysetí těchto zrn se frekvence rostlin, které zrna nepouštějí, zvýšila. Domestikace rostlin postupem času akumulovala kladné vlastnosti a přetvořila divoké rostliny v produktivní plodiny, které známe dnes (Lee 2016).

Šlechtění má také své nedostatky. Prvním problémem je časová náročnost. Jednotlivé generace musejí dosáhnout pohlavní dospělosti, aby bylo možné v procesu šlechtění pokračovat. Druhý problém představuje náhodnost rekombinace genů při vzniku gamet. Po splynutí těchto gamet vzniká zygota, ze které vyroste nový jedinec. Každý jedinec v generaci tedy obsahuje nový a jedinečný genotyp, který pro naše užití může být více či méně vhodný. V klasickém šlechtitelství nikdy nelze dosáhnout 100% úspěšnosti. Přesto s pomocí nových nástrojů a metod, jako jsou umělé oplodnění a embryotransfer, růst genetického zisku neustále zrychluje (Van Eenennaam 2017).

Nyní se ale lidstvu nabízí nástroj, který veškeré nevýhody klasického šlechtění obchází a tím je genetické inženýrství.

3.1.1 Genetické inženýrství a geneticky modifikované organizmy (GMO)

Genetické inženýrství je technologie založená na předpokladu, že genetická informace, zakódovaná v DNA a uspořádaná do formy genů je zdroj, se kterým lze manipulovat. Tím lze dosáhnout určitých cílů. Mezi tyto cíle lze zařadit výzkum struktury genů a jejich funkcí a tvorbu transgenních organizmů, zejména rostlin a zvířat. Dále je genetické inženýrství používáno k produkci užitečných proteinů, lékařské diagnóze a léčbě a analýze genomu (Nicholl 2012). Tyto oblasti ale již přesahují rozsah této práce.

Definice geneticky modifikovaných organizmů (zkráceně GMO) je značně variabilní. V potravinářském zákoníku Codex Alimentarius zavedeném Organizací pro výživu a zemědělství Spojených národů (FAO) a Světovou zdravotnickou organizací (WHO) jsou GMO pojmenovány jako „organizmy s rekombinovanou DNA“ a definovány jako organizmy, ve kterých byl genetický materiál pozměněn použitím *in vitro* metod nukleových kyselin, včetně rDNA a přímé injekce nukleových kyselin do buněk či organel.

Cartagenský protokol o biologické bezpečnosti zabývající se mimo jiné zacházením s GMO a jejich transportem pojmenovává GMO jako „žijící modifikované organizmy“ (LMO) a definuje je jako jakékoli živé organizmy, vlastnící novou kombinaci genetického materiálu, získanou použitím moderní biotechnologie.

Evropská unie definuje GMO ve směrnici 2001/18/EC jako organizmus, s výjimkou lidí, jehož genetický materiál byl pozměněn jinak, než je přirozeně možné pářením a přirozenou rekombinací. Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) poté definuje „genetically engineered (GE) animals“ jako živočichy pozměněné rDNA metodami, včetně celého potomstva obsahující danou změnu (Van Eenennaam 2017).

3.2 První GMO v akvakultuře

3.2.1 První transgenní ryba

První zmínka o úspěšné produkci geneticky modifikované ryby pochází, stejně jako akvakultura samotná, z Číny. Jde o výzkum z roku 1985, kdy Zuoyan Zhu et al. vytvořili žijící transgenní jedince druhu karas zlatý *Carrassius auratus* (Linnaeus, 1758). V pokusu bylo do více než 3000 oplozených jiker vpraveno 1–2 nl roztoku DNA metodou mikroinjekce.

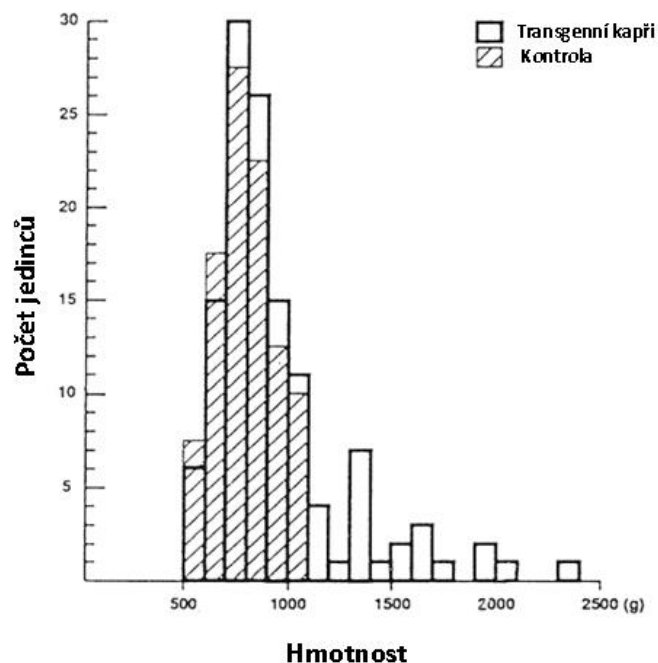
Roztok obsahoval promotor, který byl tvořen geny pro myši metallothionein. Na ten byly navázány geny lidského somatotropinu. Celkem bylo do vajíčka injektováno 7×10^6 molekul DNA. Somatotropin je lidským růstovým hormonem.

Replikace nového genu začala již při rýhování vajíčka a nejintenzivnější byla od pozdního stádia blastuly do raného stádia neuruly. Poté ale začala cizorodá DNA postupně degradovat. Z 6 náhodně vybraných 50 dnů starých ryb, které se vylíhly z těchto jiker, byly transgenní 3. Vyskytoval se také mosaicismus. Cizorodá DNA se sice začala vázat do genomu buněk jedince již v brzkých stádiích vývoje, ne vždy ale rovnoměrně. Výsledkem je poté embryo, které obsahuje jak buňky a potažmo tkáně s transgenní genetickou informací, tak oblasti zcela nedotčené genetickou úpravou. Jedinec je tedy z části transgenní a z části zcela obyčejný. Transgenní části těla poté utváří mozaiku. V současnosti je možné tento jev sledovat s použitím takzvaných „reporter genes“, které produkcí například jiného zbarvení ukážou, které části těla byly úspěšně modifikovány a které ne.

Dalším problémem byl způsob integrace transgenu a jeho následná exprese. Někteří transgenní jedinci rostli značně rychleji než kontrola, další pak nevykazovali větší míru produkce růstového hormonu, a tedy ani rychlejší růst. Vyskytly se i případy, kdy transgen působil toxicky. Jedinci dorůstali menších rozměrů oproti kontrole a jejich těla byla deformována. Proto byly tyto způsoby integrace vědeckým týmem rozděleny do tří kategorií. Integrace funkční, tedy s významným zrychlením růstu. Integrace tichá, kdy jedinci byly transgenní, ale nevykazovali žádné známky zlepšení růstu oproti geneticky neupraveným jedincům. A integrace toxická, která narušuje normální průběh ontogeneze (Zhu et al. 1989 citovaní dle Wu et al. 2003).

Na tuto práci Zhu et al. navázali v roce 1993. V tomto pokusu byla opět zvolena kombinace promotoru z genů pro myši metallothionein a geny pro produkci lidského růstového hormonu. Pro přenos těchto genů byly použity metody mikroinjekce, elektroporace a přenos genů zprostředkovaný spermii. Testovanými druhy byly karas obecný (*Carrasius auratus*, Linnaeus 1758), piskoř dálnovýchodní (*Misgurnus anguillicaudatus*, Cantor, 1842) a kapr obecný (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758). Poměr integrace transgenů dosahoval 40–80 %. Při křížení dvou těchto transgenních jedinců obsahovalo v F₂ generaci gen pro lidský růstový hormon 12 jedinců z 18 testovaných, tedy 66.6 %. Transgenní jedinci se dorůstali až dvojnásobné hmotnosti, rychlost růstu byla například u piskoře zrychlena 3.1–4.6×. Distribuce hmotností kapra obecného je zobrazena na Obrázku 1 (Zhu 1993).

Obrázek 1 Distribuce hmotnosti 263 dní starého transgenního kapra v porovnání s kontrolou. Upraveno podle Zhu (1993).



Pro využití této technologie bylo nezbytné vytvořit nový konstrukt, který neobsahuje geny z myšičího a lidského genomu. Pro rybí produkci není vhodné užití genů kódujících lidské proteiny, s ohledem na etiku a biologickou bezpečnost. Došlo tedy k sestavení nového konstrukt, tvořeného pouze rybími geny. Jako promotor byl použit β -aktin z kapra obecného. Geny pro tvorbu růstového hormonu byly izolovány z amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*, Valenciennes 1844) z důvodu jeho rychlého růstu (Zhu 1992 citovaný dle Wu 2003).

Tento nový rybí transgen byl injektován do uměle oplozených jiker kapra, ještě před prvním dělením zygoty. V experimentu bylo pozorováno 324 transgenních ryb a 359 ryb kontrolních, bez umělého zásahu do genetické informace. Geneticky modifikovaní kapři po vykulení vykazovali dramatické zrychlení růstu. Ve věku 4 měsíců transgenní dosahovali kapři hmotnosti 2,75 kilogramu. Největší kapr z kontrolní skupiny vážil 1,4 kilogramu. V 17 měsících jeden z transgenních kaprů vážil 7,65 kilogramů a hmotnost kontrolních kaprů tak překonal více než dvojnásobně. Část transgenních kaprů na druhou stranu měla růstové abnormality v oblasti očí a páteře. Toto byl pravděpodobně důsledek mechanického poškození zárodku při mikroinjekci nebo došlo k výše zmíněnému toxickému vlivu integrace transgenů (Wu 2003).

V současnosti je tento transgenní kapr testován Čínským národním centrem pro bezpečnost potravin (China National Center for Food Safety Risk Assessment). „Ryba

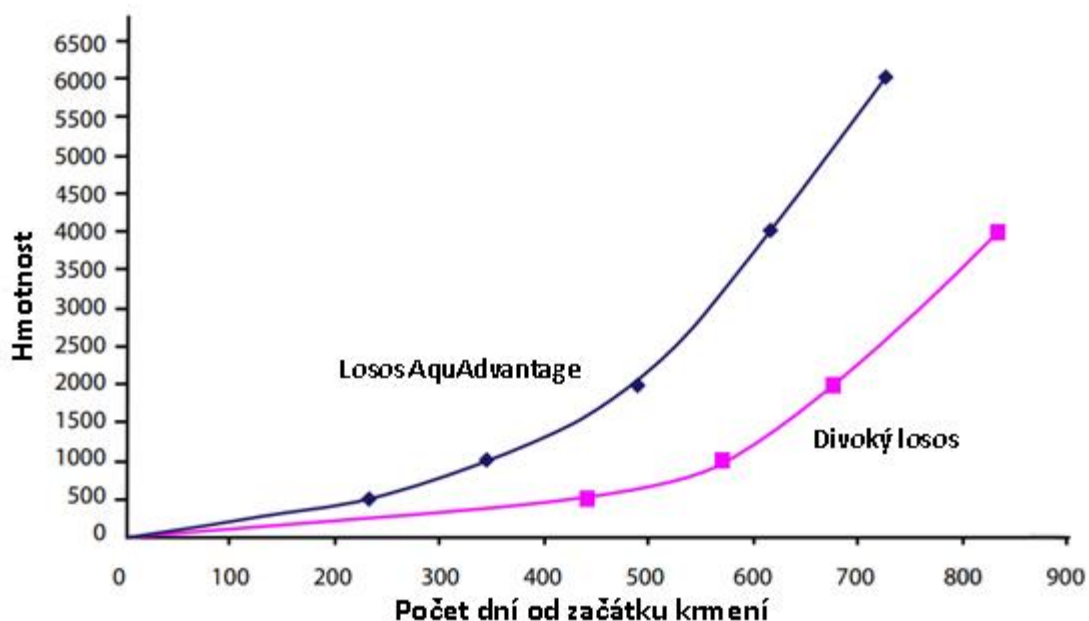
splňuje veškeré doposud provedené testy z hlediska výživy, toxikologie, možných alergických reakcí. V současnosti podstupuje ekologické testy pro zjištění interakcí s ostatními druhy v přírodě a testy komerční produkce“ (www.china.org.cn, leden 2023). Wang, jeden z vedoucích výzkumu, očekával využití tohoto v chovu kapra pro konzumaci v horizontu 2 až 5 let (údaj k roku 2017). Informace o schválení toho kapra se na stránkách stále neobjevila. Navíc jsou nadále zveřejňovány nové studie o výše zmíněném transgenním kaprovi. Lze tedy usoudit, že je stále příliš brzy na povolení produkce a konzumace.

3.2.2 První komerčně produkováná transgenní ryba

3.2.2.1 Losos AquAdvantage

V 90. letech minulého století vědci Garth Fletcher, Peter Davies a Choy Hew z Memorial University of Newfoundland vytvořili genový konstrukt pro vytvoření transgenního lososa obecného (*Salmo salar*, Linnaeus 1758), který nyní nese název AquAdvantage. Tento DNA konstrukt se skládal z promotoru ze slimule americké *Zoarces americanus* (Bloch & Schneider 1801). Tento gen kóduje produkci takzvaného antifreeze proteinu. Ve slimuli tento gen produkuje proteiny, které zabraňují mrznutí tekutin a tkání a dovolují jí tak přežít v arktických vodách. AquAdvantage lososovi toto umožňuje produkci růstového hormonu i v zimních měsících (Trump et al. 2020). Dále konstrukt obsahuje sekvenci kódující produkci růstového hormonu z lososa čavýči *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum, 1792). Zatímco losos obecný běžně roste na severní polokouli pouze od dubna do září, tyto transgenní lososi mohou růst po celý rok. To znamená, že se dorostou prodejní velikosti již v 18 měsících. Běžní lososi stejné velikosti dorostou za více než 30 měsíců (Lawson & Charnley 2015). Při porovnání růstu plůdku AquAdvantage lososa s běžným diploidním lososem, dosahoval transgenní losos po 2700 denních stupních Celsia hmotnosti od 16,9 g do 426,3 g, s průměrnou hmotností 261 g. Oproti tomu běžný losos dosahoval hmotnosti od 11 g do 118 g, s průměrnou hmotností 72,6 g. Růstové křivky jsou zobrazeny na obrázku 2. Samotní lososy jsou zobrazeny na obrázku 3.

Růstové křivky



Obrázek 2 Růstové křivky transgenního a kontrolního lososa. Upraveno dle Lievens et al. (2015).

V roce 1996 byl ve Spojených státech amerických schválen patent 5,545,808 s názvem „Transgenní lososovité ryby exprimující exogenní lososový růstový hormon“. Vývojem této licencované technologie, nesoucí název AquaAdvantage losos, firma AquaBounty strávila více než deset let a investovala do něj desítky milionů dolarů (Fox 2010).



Obrázek 3 (Nordrum 2020)

3.2.2.2 Patent a povolení

Povolení lososa AquaAdvantage prošlo komplikovaným vývojem. Časová osa tohoto povolení je spracována v Tabulce 1.

Tabulka 1 Upraveno podle biofortified.org (accessed January 2023).

1989	Počátek vývoje GMO lososa
1992	Ustálení linie AquaAdvantage lososa
1995	Aquabounty podává žádost na Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA), oddělení veterinární medicíny, pro pokračování ve vývoji AquaAdvantage lososa
2003	AquaBounty předkládá první studii úřadu FDA. Žádost pro povolení Aquadvantage lososa je řešena jako léčivý přípravek pro zvířata.
2008	FDA provádí inspekci AquaBounty líhně na Ostrově prince Edwarda, jakožto autorizovaného místa pro produkci jiker AquaAdvantage lososa. Nebyly zjištěny žádné nežádoucí skutečnosti. AquaBounty zahajuje výstavbu akvakulturního zařízení v Panamě.
2009	AquaBounty předkládá poslední studii FDA. FDA vydává Guidance 187, obsahující pokyny pro evaluaci GMO. FDA provádí inspekci akvakultury v Panamě. Nebyly nalezeny žádné nežádoucí skutečnosti.
2010	FDA svolává veřejné zasedání poradního výboru pro veterinární medicínu. Výbor dospěl závěru, že GMO losos je k nerozeznání od běžného lososa obecného. Je také bezpečný ke konzumaci a nepředstavuje žádné riziko pro životní prostředí. FDA také pořádá veřejné slyšení, kde reaguje na připomínky veřejnosti.
2011	FDA konzultuje s Národní službou mořského rybolovu (NOAA) a Správou Spojených států pro ryby, planě rostoucí rostliny a volně žijící živočichy (U.S. Fish and Wildlife Service). Obě agentury potvrzují, že AquaAdvantage losos nepředstavuje hrozbu pro životní prostředí. Enviromentální skupiny odevzdávají petici na FDA. Požadují zpomalení a nebo zastavení povolení geneticky upravených lososů. FDA tuto petici později zamítá.
2012	FDA vydává návrh na posouzení vlivu na životní prostředí s předběžným závěrem o neexistenci významných vlivů. Začíná 60 denní lhůta pro vyjádření veřejnosti, později je tato lhůta prodloužena na 120 dní. FDA provádí inspekci líhně na Ostrově Prince Edwarda v Kanadě, nebyly nalezeny žádné nežádoucí skutečnosti. Aquabounty žádá kanadské orgány o povolení prodeje AquaAdvantage lososa v Kanadě.
2013	Kanadský sekretariát pro vědecké poradenství (CSAS) vydává posouzení ohledně vlivů na prostředí a na lidské zdraví. AquaAdvantage losos podle CSAS nepředstavuje hrozbu pro prostředí. Kanada povoluje firmě AquaBounty produkci jiker za účelem prodeje.
2014	AquaBounty podává FDA vzor etiket na posouzení.
2015	Enviromentální skupiny odevzávají petici na FDA. Petice žádá, aby FDA určilo GMO lososa jako nebezpečnou potravinářskou látku. FDA odmítá.
	FDA schvaluje etikety. FDA schvaluje GMO lososa jako jídlo a krmivo, s podmínkami kde a jak bude tento losos chován.
2016	Kanada povoluje AquaAdvantage lososa pro lidskou spotřebu a jako krmivo pro zvířata.
	FDA vydává upozornění na import a zamezuje tak dovozu jiker a ryb z jiných států. Toto zabraňuje komercializaci GMO lososa v USA.
2017	AquaBounty žádá o povolení chovu GMO lososa v Indianě. Aquabounty prodává 5 tun filet z GMO lososa v Kanadě.
2018	FDA povoluje chov GMO lososa v Indianě
2019	FDA deaktivuje upozornění na import z roku 2016. Nyní může AquaBounty prodávat již povolené AquaAdvantage lososy v USA. Importovat jikry z Kanady a chovat lososi v Indianě.

3.2.2.3 Proces produkce

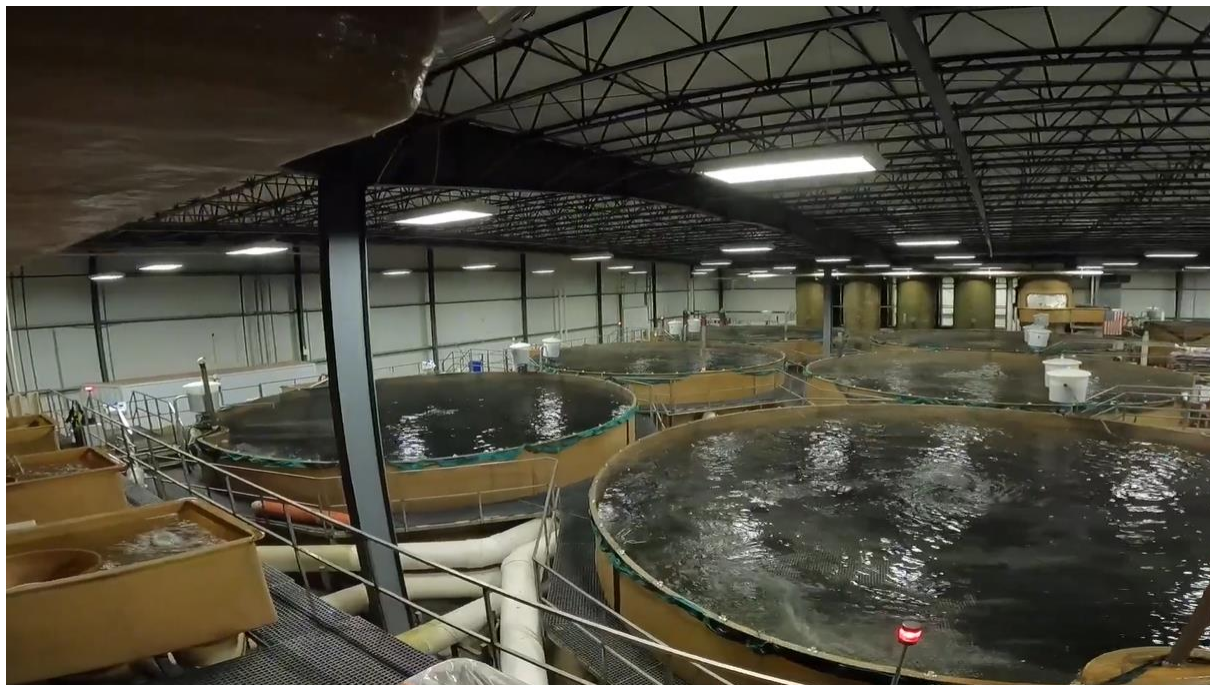
AquAdvantage lososi jsou chováni v halách v Indianě a v Kanadě, dosavadní plocha farem dosahuje téměř 2 hektarů. Ve výstavbě je další objekt v Ohio o rozloze přibližně 4,5 hektaru. V uzavřených halách platí striktní opatření proti úniku těchto lososů do přírody. Například recirkulační systém, ve kterém je voda čištěna pomocí biofiltrů a poté je vracena zpět do nádrží s rybami. Díky tomuto systému je ušetřeno až 95 % vody. Tyto filtry odstraňují z vody dusíkaté a další odpadní látky a vodu tím udržují nezávadnou pro zdraví ryb. Odpadní látky nejsou vyhazovány, ale jsou poskytovány místním zemědělcům, kteří je upotřebovávají v rostlinné produkci jako hnojivo.

Vše ale začíná v Kanadě na Ostrově prince Eduarda, kde se chovají otcovské a mateřské populace. Tyto jikernačky nejsou transgenní, ale pocházejí z běžných komerčních chovů lososů. Důraz je však kladen na co nejlepší růstové schopnosti. Mlíčáci transgenní jsou. (aquabounty.com accessed January 2023). Jelikož je transgen permanentně zakomponován do genomu, potomstvo ho přirozeně zdědí po otcích. Ze samic jsou masáží vypuzeny neoplozené jikry, které jsou poté smíchány s mlíčem transgenních samců. Na oplozené jikry je následně působeno tlakovým šokem, který u nich způsobí sterilitu tím, že se z nich stanou triploidní jedinci. Navíc jsou veškeré jikry samičí (fda.gov accessed January 2023). Jikry jsou dále umístěny do inkubátorů, kde se vyvíjejí až do stádia očních bodů (obrázek 4). Nyní jsou jikry připraveny na přepravu do USA, kde dorostou do prodejní velikosti.



Obrázek 4 (aquabounty.com accessed February 2023)

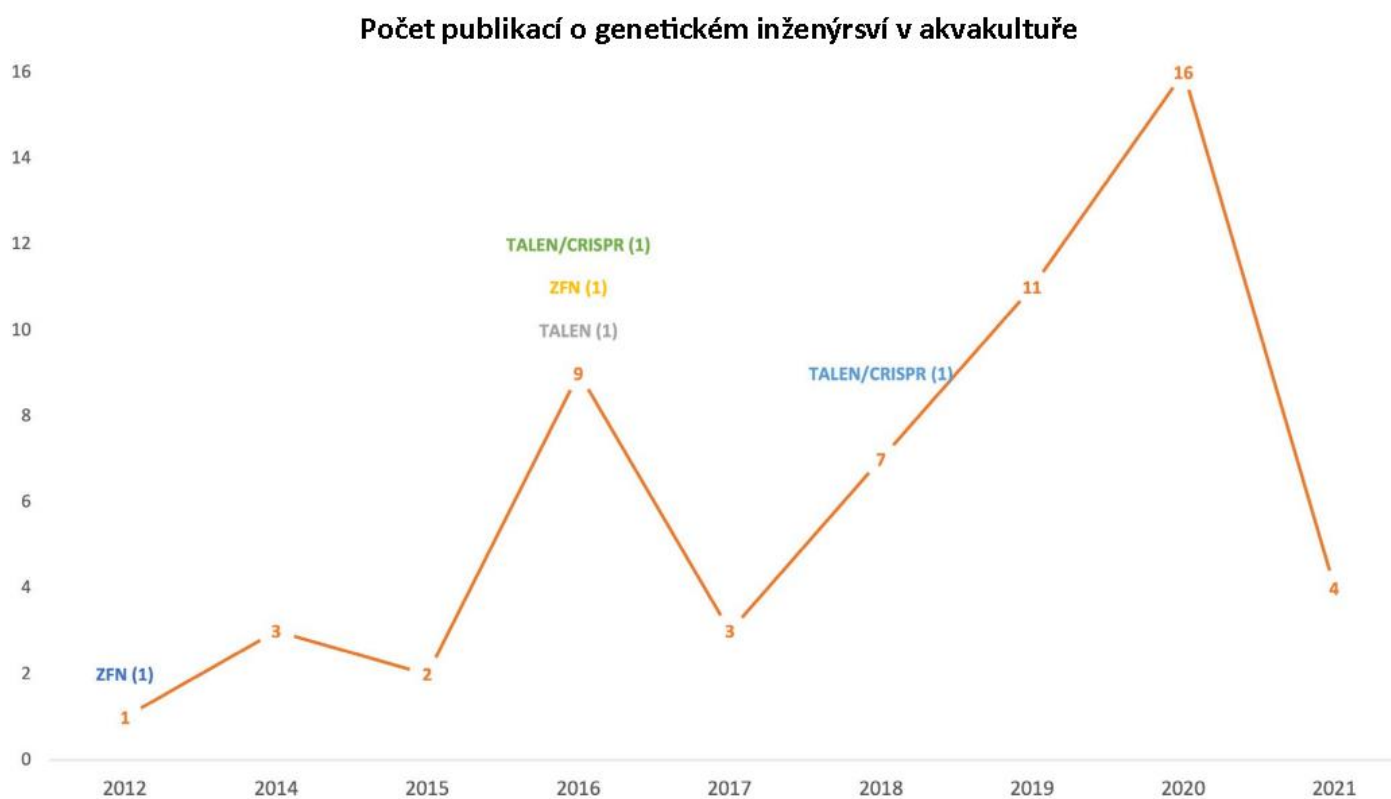
Po převozu do Indiany jsou jikry umístěny do líhně do vykulení. Plůdek je přemístěn do menších nádrží a je krměn speciální starter dietou do 50 až 150 gramů tělesné hmotnosti. Poté je plůdek přerozdělen a opět přemístěn do větších nádrží (obrázek 5). Po dosažení 500 gramů jsou naposledy přemístěny, tentokrát do největších nádrží, kde dorostou prodejní velikosti (aquabounty.com, únor 2023)



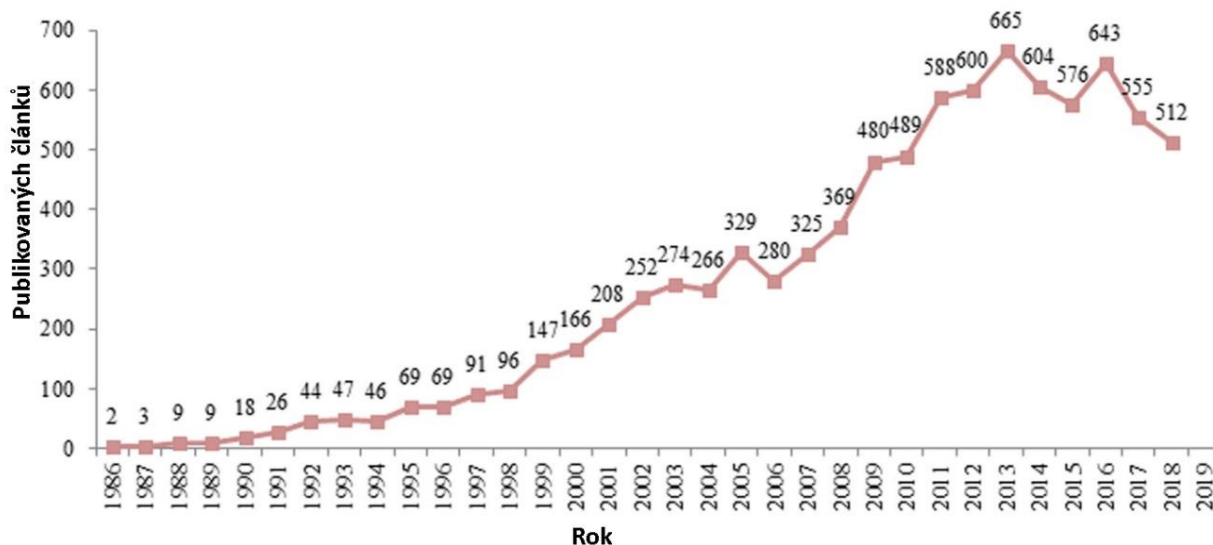
Obrázek 5 (aquabounty.com accessed February 2023)

3.3 Přehled metod produkce transgenních ryb

Princip genetických úprav závisí na přerušení dvoušroubovice DNA na cílovém místě genomu. Dále je spoléháno na mechanismy opravy DNA, které provedou požadovanou změnu. Buďto tyto mechanismy provedou nehomologní spojování konců DNA (non-homologous end joining či NHEJ) nebo homologně řízené opravy (homology-directed repair či HDR), (Wang et al. 2021). NHEJ rapidně a efektivně naváže konce DNA v místě přerušení, s občasným získáním nebo ztrátou genetické informace. Může tak být použito k vložení anebo deleci. Delece může být důsledkem narušení daného genu a jeho následnému vypnutí (Urnov et al. 2010). HDR oproti tomu vede k vložení transgenního genu (Auer & Del Bene 2014). Níže je uveden přehled metod, užívaných k těmto úpravám, jejich četnost (obrázek 6) a celkový počet studií týkajících se transgenních ryb (obrázek 7).



Obrázek 6 Publikace pouze s užitím metody CRISPR-Cas9, pokud není uvedeno jinak. Upraveno dle Blix et al. (2021).



Obrázek 7 Počet publikací týkajících se geneticky upravených ryb. Upraveno dle Wang et al. (2021).

3.3.1 Mikroinjekce

První metodou pro tvorbu geneticky modifikovaných ryb pro akvakulturu byla právě mikroinjekce.

Mikroinjekce byla objevena ve dvacátém století a později se adaptovala pro užití v kombinaci s DNA, RNA, enzymy, proteiny, metabolity, ionty, a i samotnými organelami. Pro samotný výzkum mikroinjekce byly z velké části užívána vajíčka drápatek (*Xenopus sp.*, Wagler 1827), kvůli jejich velikosti. Vajíčka drápatek totiž měří v průměru kolem 1,3 mm, a dobře se s nimi pracuje.

Mikroinjekcí jsme schopni vpravit do buňky látky fyzickým narušením buněčných membrán. K tomu jsou používány velmi tenké jehly. Tyto jehly mají tloušťku špičky kolem 10-30 mikrometrů (news-medical.net leden 2023). Výhodou mikroinjekce je přesnost dávky a načasování. Látka je nejčastěji vpravována do cytosolu anebo do jádra. Pokud je do buněk injektován i marker, je buňka později snadno identifikovatelná. V porovnání s elektroporací mikroinjekce vyžaduje mnohem méně preparátu proteinu. To je velmi důležité při experimentování se vzácnými, drahými, či pracně syntetizovanými proteiny (Zhang & Yu 2008).

Mezi hlavní nevýhody lze zařadit náročnost provedení. Pracovníci musejí mít osvojenou samotnou techniku mikroinjekce. Dále je mikroinjekce časově náročná, protože roztok DNA aplikujete pouze do jednotlivých buněk (Zhang & Yu 2008). Při vpichu navíc existuje riziko mechanického poškození buňky, vedoucí ke zvýšení mortality (Dunham et al. 1987). U ryb je mikroinjekce navíc komplikována přítomností chorionu, který brání v inserci mikropipety (Inoue et al. 1990).

Jedním z prvních využití této metody v akvakultuře k produkci GMO byl již zmíněný experiment ohledně produkce transgenních kaprů (Zhu et al. 1985). Dalšími průkopníky jsou Chaurrou et al 1986 a Dunham et al 1987. Chaurrou vpravil lidský růstový hormon do lososa duhového (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792). Dunham použili také lidský růstový hormon, ale u druhu *Ictalurus punctatus* (Rafinesque, 1818).

Kvůli své zdlouhavosti byla mikroinjekce později nahrazena novějšími metodami, které jsou schopné produkovat větší množství transgenních jedinců ve stejném časovém úseku (Dunham 2011).

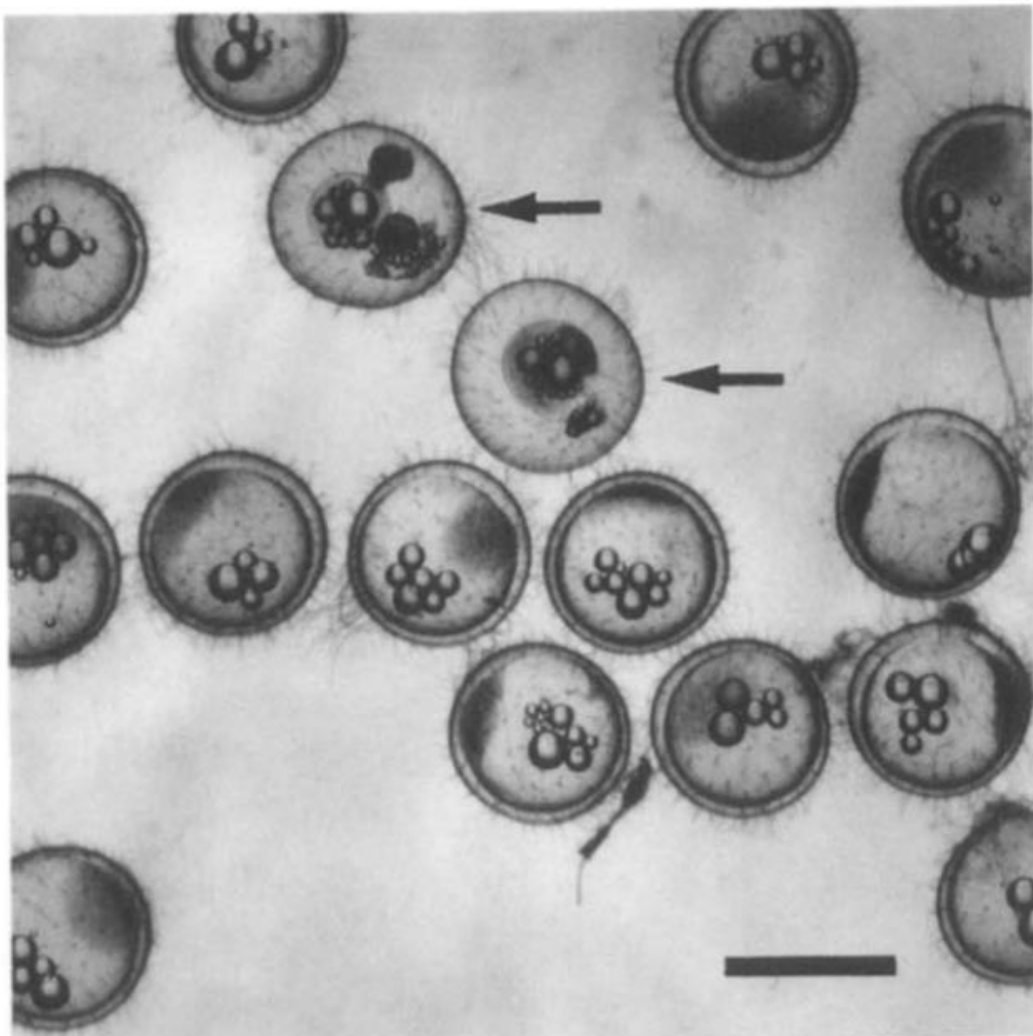
3.3.2 Elektroporace

Elektroporace spočívá v umístění buněk do roztoku s obsahem molekul DNA, které chceme do genomů vložit. Poté je na roztok s buňkami působeno krátkými elektrickými pulzy, které vytvářejí v buněčných membránách dočasné póry. Těmito póry pak proniká cizorodá DNA z roztoku do vnitřního prostředí buněk. Tam pak může docházet k zakomponování transgenní DNA do genomu. Efektivnost elektroporace je závislá na více faktorech, jako jsou napětí, počet pulzů a jejich frekvence (Dunham 2011).

První úspěšný pokus o produkci transgenních ryb s použitím elektroporace byl proveden v roce 1990 (Inoue et al. 1990). Cílem bylo použít novou metodou, která obchází komplikace spojené s mikroinjekcí. Úspěšnost tvorby transgenních jedinců elektroporací byla pouze 4%. 10 % jiker zahynulo ihned po působení elektrických pulzů v důsledku poškození elektrickým napětím. Poškozené jikry jsou zobrazeny na obrázku 8. Z přeživších jiker se vykulilo

25

%.



Obrázek 8 Lososí jikry 5 hodin po aplikaci elektroporace. Šipkou jsou vyznačeny poškozené jikry. Upraveno dle Inoue et al. (1990).

V porovnání s mikroinjekcí, která byla také součástí tohoto pokusu, byla úspěšnost 27%. Toto negativum ale částečně vyvažuje skutečnost, že elektroporací lze působit na vysoké množství jiker v krátkém časovém rozmezí (v tomto experimentu 3109 jiker). Nutné je ale přihlídnout k tomu, že se jednalo o první experiment, a tak bylo spoustu prostoru pro zlepšení. V pozdějších případech dosahovala míra integrace 30–100 % (Powers et al. 1992 v Dunham 2011). Roli také hraje velikost DNA konstruktů, který se snažíme do buněk vložit. Dlouhé DNA konstrukty, například o délce 20 kb, snižují životaschopnost transgenních jedinců. Oproti tomu jsou kratší konstrukty, jako jsou například geny pro produkci růstového hormonu (5.2 kb), méně rizikové (Dunham 2011).

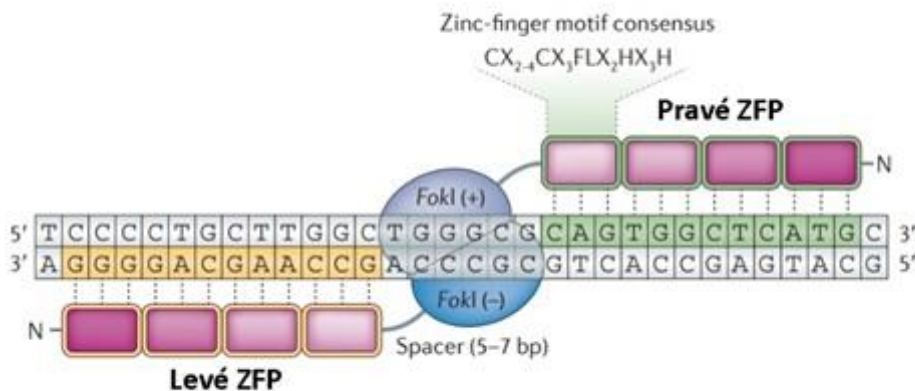
3.3.3 Přenos genů spermii

První zmínka o možnosti přenosu cizí DNA savčími spermii pochází z roku 1971 (Brackett et al. 1971), studii ale nebylo věnováno příliš pozornosti (Lavitrano et al. 2013). To se změnilo v roce 1989, kdy došlo k zásadnímu objevu, při kterém Lavitrano et al. zjistili, že myší spermie je možné použít jako vektor cizorodého DNA. Spermie byly inkubovány v izotonickém roztoku s naklonovanými kopiemi DNA. Experiment ukázal, že spermie zachytávají molekuly DNA již v prvních 10–15 minutách vystavení. Hrubé kalkulace naznačovaly, že po 30 minutách vystavení každá spermie byla nositelem asi $1.5\text{--}4 \times 10^3$ molekul transgenní DNA. Do tohoto počtu však spadá jak DNA integrovaná do hlavičky spermii, tak i DNA na jejím povrchu. Tyto spermie byly poté použity k umělému oplození myších vajíček a embrya byla transferována do vejcovodů samic. Úspěšnost produkce transgenních potomků byla kolem 30 % (Lavitrano et al. 1989).

Při použití SMGT je nutné oddělit spermie od semenné plazmy, která obsahuje enzymy nukleázy (Lavitrano et al. 2013). Nukleázy jsou totiž schopné štěpit nukleové kyseliny rozkladem fosfodiesterové vazby. Pro optimalizaci výsledků je také nutné použít kvalitní spermie, jako při klasickém šlechtění (Lavitrano et al. 2013).

3.3.4 ZFN

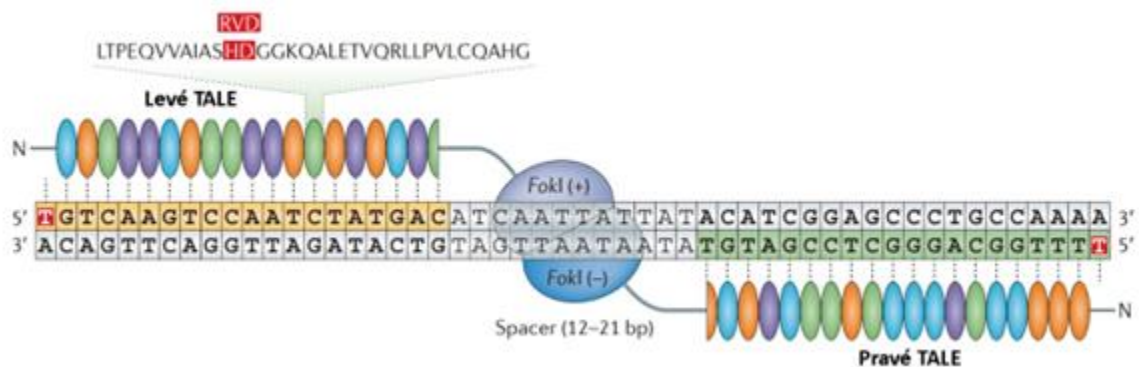
Zinc-finger nukleázy (obrázek 9) jsou proteiny schopné štěpit DNA, které používáné jako nástroje pro genetické modifikace. ZFN mají specifické domény pro navázání na DNA a také jeho stříhání. Dle Kim et al. každý „finger“ interaguje s určitým tripletem uvnitř DNA substrátu. Tyto fingery je možné propojit společně do peptidu, který se pak naváže na predeterminované místo v DNA. Teoreticky je tak možné vytvořit zinc finger pro každý z 64 možných kodonů. Jejich kombinací tak lze dosáhnout specifické sekvence, která bude upravována (Kim et al. 1996). Zinc finger proteiny v komplexu slouží k navázání na sekvenci DNA, a doména FokI je restriční enzym, tím se kombinují jejich kladné vlastnosti (Urnov et al. 2010). Pro úspěšné stříhání genomu je nutné, aby FokI vytvořily dimer, jako monomer jsou nefunkční (Bitinaite et al. 1998). Tento požadavek na dimerizaci navíc zdvojnásobuje rozpoznávací úsek, a tak zvyšuje specifitu ZFN. Jelikož se každý zinc finger protein váže na jeden kodon, závisí míra specifity na jejich počtu. Například při použití monomeru s 3-6 ZFP je specifita tohoto monomeru v rozsahu 9–18 bp délky (Kim & Kim 2014). V případě dimeru je dvojnásobná. Tento rozsah je dostatečně velký pro přiblížení se specifitě až na 68 miliard bp v DNA (Gaj et al. 2013). Pro srovnání, délka lidského genomu je mezi 6,27 a 6,37 miliardami bp (Piovesan et al. 2019), kapří genom je dlouhý přibližně 1,46 miliard bp (ncbi.nlm.nih.gov březen 2023). Produkce ZFN s vysokou aktivitou a nízkou cytotoxicitou je ovšem náročná (Kim & Kim 2014).



Obrázek 9 Schématické zobrazení páru ZFN. Upraveno podle Kim & Kim (2014).

3.3.5 TALEN

TALEN (obrázek 10) jsou jakýmisi nástupci ZFN a v mnoha ohledech si jsou podobné. Také používají dimer domény Fok1 pro stříhání genetické informace. Část rozpoznávající úsek DNA je ale nahrazena proteiny, podle kterých dostala metoda jméno, tedy „transcription activator-like effectors“ (TALE). Tyto proteiny byly získány z bakterií rodu *Xanthomonas* (Dowson 1939), které jsou patogeny rostlin (Boch & Bonas 2010). TALE se skládají z tandemových (za sebou se opakujících) sekvencí o délce 33–35 aminokyselin. Přičemž se každá sekvence specificky váže na dvojici nukleotidů v řetězci DNA. Nukleotidová specifita je určena dvěma aminokyselinami na pozici 12 a 13. (Boch et al. 2009) Ty se nazývají „repeat variable diresidues“ (RVD). Nejpoužívanějšími RVD jsou Asn-Asn, Asn-Ile, His-Asp a Asn-Gly, které se váží v daném pořadí na guanin, adenin, cytosin a thymin (Kim & Kim 2014).



Obrázek 10 Schématické zobrazení páru TALE. Upraveno podle Kim & Kim (2014).

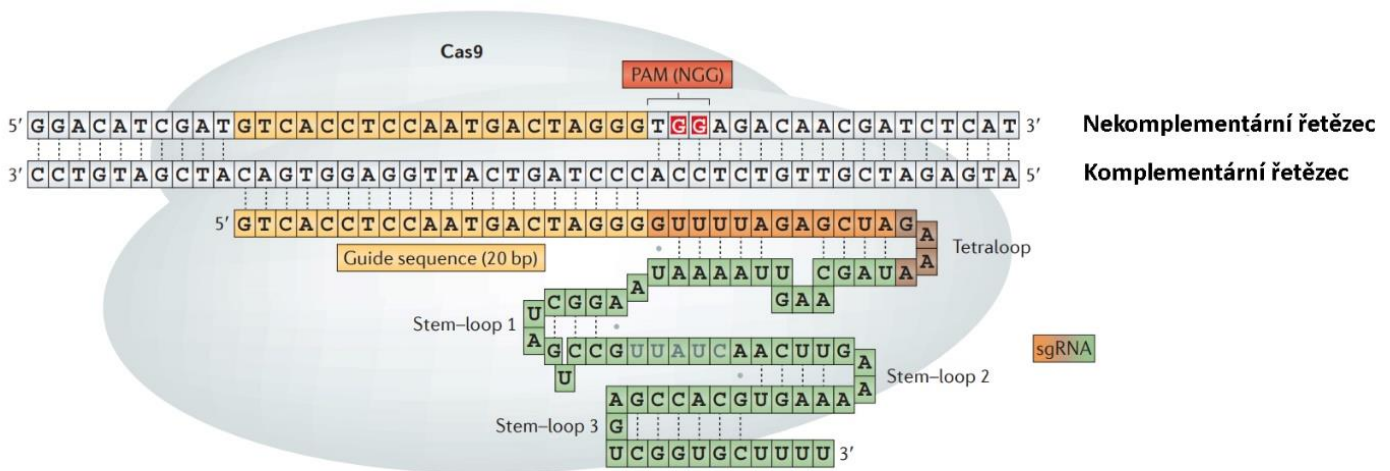
TALEN mohou být designovány tak, aby cílily téměř na jakoukoli sekvenci DNA, což je rozhodující výhodou oproti ostatním typům nukleáz (například při použití na malé řetězce) (Kim & Kim 2014). Výhodou oproti ZFN je relativně jednoduchá produkce, dále jsou TALEN vysoce efektivní a přesné (Becker & Boch 2021). (Kim & Kim 2014) se s tímto názorem neshoduje a uvádí, že jejich konstrukce může být obtížná a také časově náročná. Ani jedna z výše zmíněných metod se ale jednoduchostí designu a produkce nevyrovná metodě CRISPR-Cas9 (Kim & Kim 2014).

3.3.6 CRISPR-Cas9

Metoda CRISPR neboli Clutered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (obrázek 11) byla objevena v roce 2011, kdy Emmanuelle Charpentier studovala bakterie druhu *Streptococcus pyogenes* (Rosenbach 1884). V této bakterii objevila předtím neznámou molekulu, tracrRNA. Ve stejném roce začala spolupracovat s Jennifer Doudna. O rok později společně objevili genetické nůžky CRISPR-Cas9. Za tento objev jim byla v roce 2020 udělena Nobelova cena za chemii (nobelprize.org accessed March 2023).

V mnoha bakteriích a většině archea je CRISPR-Cas9 součástí imunitního systému. Buňky chrání proti infekci bakteriofágy a přenosu plazmidů (Jiang & Doudna 2017). Tento imunitní systém má dvě fáze (Marraffini 2015). V první fázi dochází k integraci virálního genomu do systému CRISPR. Tím je hostitelská buňka imunizována. V druhé fázi je specifická imunita aktivní. CRISPR je transkribován a generuje krátké úseky RNA s kopiemi virálního genomu. Tyto kopie (sgRNA) jsou poté použity jako vzor pro Cas endonukleázy. Při nalezení shodné (v tomto případě virové) genetické informace ji Cas9 endonukleázy rozštěpí (Marraffini 2015).

Pokud změním vzor, podle kterého Cas9 hledají místo pro „střih“, můžeme systém CRISPR/Cas9 přesměrovat. Cílit pak můžeme na téměř jakoukoli sekvenci DNA (Gaj et al. 2013). Velikou výhodou CRISPR-Cas9 je jeho relativní jednoduchost jak na produkci, tak použití. Tím byly zastíněny metody ZFN a TALEN (Waryah et al. 2018).



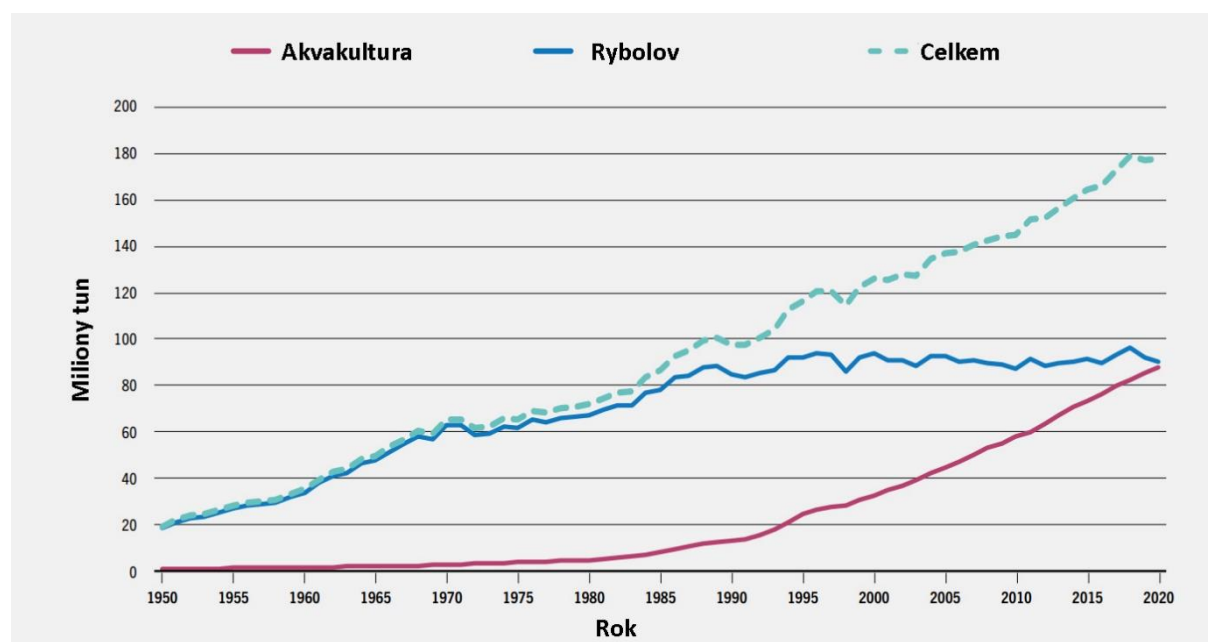
Obrázek 11 Schématické zobrazení komplexu CRISPR-Cas9. Upraveno podle Kim & Kim (2014).

3.4 Praktické dopady GMO

3.4.1 Zlepšení produkce

Celková produkce rybolovu dosahovala v roce 2020 90,3 miliónů tun. V porovnání s předešlými třemi lety výnos mořského rybolovu poklesl o 4 %. Vnitrozemní produkce rybolovu poklesla o 5,1 %. Rybářské zdroje nadále klesají v důsledku nadměrného lovu ryb, znečištění, špatného managementu a dalších. Produkce akvakultury oproti tomu vzrostla mezi lety 2019 a 2020 o 2,7 % na 87,5 milionů tun vodních živočichů.

Konzumace vodních živočichů také dlouhodobě roste a to o 3 % ročně (FAO 2022)



Obrázek 12 Vývoj světové produkce ryb. Upraveno podle FAO 2022.

Při použití transgeneze by se produkce ryb v akvakulturních systémech mohla dále zintenzivnit, a to zrychlením růstu rybí obsádky. Důsledkem by vznikly potenciální ekonomické a enviromentální benefity, jako jsou snížené plýtvání krmivem a produkce menšího objemu odpadních vod. Také by se zkrátila doba obratu jednotlivých ryb jakožto produktu (Wakchaure & Ganguly 2015). To může mít za následek pokles nákladů pro chov ryb do tržní velikosti a také rychlejší obrat. Jak ukazují studie například u druhů piskoř dálnovýchodní, zrychlení růstu 3,1–4,6× (Zhu 1993), tilápie nilská 4x (Rahman et al. 2001). Dále u lososa obecný 6× (Du et al. 1992), je nutné zmínit, že měřeny byly pouze ryby staré do 4 měsíců. Co se týče AquAdvantage lososa obecného, ten dosahuje v porovnání s obyčejným lososem obecným prodejní velikosti (4–5 kg) 1,6× rychleji. Navíc jsou v konverzi krmiva v živou hmotu o 25 % efektivnější (aquabouty.com únor 2023).

Rychlost růstu je z genetického hlediska dána produkcí růstového hormonu. Růstový hormon je pluripotentním hormonem. V kostnatých rybách je produkován hypofýzou, stejně jako u ostatních obratlovců. Účinku nastává ve chvíli navázání tohoto hormonu na receptor v cílové tkáni (Reinecke et al. 2005). U ryb se růstový hormon účastní téměř všech hlavních fyziologických procesů, jako jsou regulace iontové a osmotické rovnováhy, metabolismu tuků, bílkovin a sacharidů, růstu kostí a měkkých tkání, reprodukce a také imunity (Reinecke et al. 2005). Zvýšené hladiny růstového hormonu mohou mít různé další kladné i záporné účinky.

Zhu (1993) pozoroval při produkci transgenních jedinců výskyt deformovaných embryí. Tato deformovaná embrya obsahovala 2,9× více růstového hormonu než ostatní transgenní ryby v experimentu. Lidský růstový hormon zde funkčně nahrazuje svou rybí, endogenní obdobu a zajišťuje rybám lineární růst (Cui 1991 citovaný dle Zhu 1993). Při jiném pokusu některé transgenní ryby byly i přes vyšší obsah růstového hormonu menší. Také došlo k výskytu morfologických deformací (Zhu et al. 1989; Wei et al. 1992 citovaní dle Wu et al. 2003).

Dle studie růstu a hospodaření s energií se prokázalo, že transgenní kapři s vyšší produkcí hormonu růstu směřují méně své energie do metabolismu a více do syntézy bílkovin. Při porovnání s kontrolními jedinci, F2 transgenní kapři dosahovali větší hmotnosti a byli efektivnější v konverzi krmiva. Navíc využívali o 6,62 % více energie pro syntézu. Tento efekt byl pojmenován „fast-growing and less-eating“ (Cui et al. 1996 citovaní dle Wu et al. 2003).

V experimentu s transgenními lososi došlo k ojedinělému výskytu jedinců, kteří dosahovali velmi nadprůměrných velikostí v porovnání s dalšími stejně starými geneticky upravenými lososi. Fenotypově ale vykazovali abnormality hlavy, ploutví, čelistí a skřelí pravděpodobně kvůli nadměrnému růstu chrupavek a kostí. Dvěma rybám chrupavčitá tkáň přerostla natolik, že měli problémy s příjmem potravy a viděním. Z počátku rostli nejlépe, po 15 měsících života se jejich růst oproti ostatním začínal zhoršovat a nakonec uhynuli ještě před dosažením dospělosti (Devlin et al. 1995). V jiné studii Devlin popsal vyšší žravost u geneticky modifikovaných lososů kisuč (*Oncorhynchus kisutch*, Walbaum 1792), která byla téměř trojnásobná (Devlin et al. 1999).

Hormon růstu zvyšuje retenci a absorpci proteinu, a tedy by měl snižovat produkci dusíku v odpadních látkách těla ryb (Kobayashi et al. 2007). To Kobayashi prokázal při testech na transgenních tilápiích, které produkovaly nadměrné množství hormonu růstu. Tyto tilápie dorůstaly do hmotností 4× těžších než jejich netransgenní sourozenci v 1 měsíci věku, 7× v 4 měsících. Transgenní samci staří 16 měsíců byli 3,4× těžší a stejně staré transgenní samice byly 6,6× těžší oproti kontrole (viz obrázek 13). Navíc transgenní ryby produkovaly o 31 % méně amoniaku a v konverzi krmiva byly o 35 % efektivnější (Kobayashi et al. 2007).



Obrázek 13 Porovnání transgenních tilápií a jejich netransgenních sourozenců. Pravítko = 50 cm. Upraveno podle Kobayashi et al. (2007).

3.4.2 Imunita vůči patogenům

Akvakultura se stává koncentrovanější. Farem sice ubývá, ale jsou mnohem větší. Infekční onemocnění jsou vždy rizikem, mohou způsobovat vysoké škody na hejnech ryb a tak zhoršují welfare. Co se týče chovu lososa obecného, přímé i nepřímé ztráty dosahují částek v milionech amerických dolarů (Fletcher et al. 2011). V globálním měřítku, nehledě na druh ryb, tato hodnota přesahuje 10 miliard amerických dolarů a odhadem je až 10 % živočichů chovaných v akvakultuře ztraceno vlivem nakažlivých onemocnění (Evensen 2016).

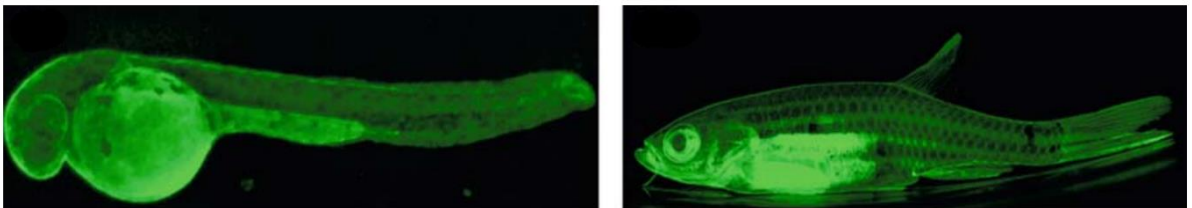
Intenzifikace akvakultury vedla k rostoucím problémům s bakteriálními onemocněními, jejichž léčba vyžaduje intenzivní použití antimikrobiotik (Romero et al. 2012). Ryby stresované a chované ve vysokých hustotách jsou více náchylné k bakteriálním infekcím (Montet & Ray 2017). Používání široké škály antibiotik ve velkých množstvích má za důsledek zaprvé únik těchto látek do životního prostředí, kde mohou také působit. Zadruhé toto počínání může vést ke vzniku rezistentních bakterií. Použitá antibiotika v kombinaci s krmivem mohou také přetrvávat v mase ryb a vytvářet rezidua (Cabello 2006), která jsou nežádoucí vzhledem k následné konzumaci těchto ryb lidmi. Pokrok v rezistenci ryb vůči patogenům je jedním z nejdůležitějších cílů v rybím průmyslu. Biotechnologické metody tomuto otevírají nové možnosti (Zbikowska 2003).

Hew et al. se po předešlých úspěších v produkci transgenních ryb se zvýšenou produkcí růstového hormonu a antifreeze proteinů pokusili i o produkci ryb odolných k onemocněním. K tomu použili lysozomy. Lysozomy jsou obsaženy v krvi, hlenu, ledvinách, v kostní dřeni a lymfě. V rybách hrají významnou roli jakožto nespecifické antibakteriální enzymy z důvodu jinak méně vyvinutého imunitního systému. U lososovitých ryb je jasná korelace mezi množstvím lysozymu a odolností proti nemocem (Hew et al. 1995). Pstruzi duhový například obsahují 10× až 20× vyšší množství lysozymu než lososi obecní, a jsou tak více odolní. Proto studovali transgenní lososy obsahujících pstruží gen pro produkci lysozymu v kombinaci s promotorem ze slimule. V roce 1994 tento genetický konstrukt injektovali do lososích jiker. Po získání lososů, kteří prokazatelně provádí expresi tohoto genu, je měli vystavit bakteriálním patogenům pro test jejich odolnosti (Hew et al. 1995).

Výsledky byly zveřejněny o patnáct let později v navazující studii (Fletcher et al. 2011). Na podzim roku 1995 injektovali tuto cizorodou DNA do 2000 oplozených jiker. Protože fenotypová exprese tohoto genu není na první pohled patrná, tak jako to je u GH transgenů (kde je snadné rozeznat malé ryby od velkých), byl proveden screening pro transgen, až když dosáhla generace P0 pohlavní dospělosti. Poté byla sledována míra dědičnosti na dalších generacích. V generaci F1, po spáření GMO jikernačky s divokým mlíčákem obsahovaly pouze 2 % potomstva daný transgen. V F2 generaci, po spáření GMO mlíčáka s divokou jikernačkou, obsahovalo 53 % potomstva transgen. V F3 generaci obsahovalo 50 % potomstva transgen. Z tohoto lze odvodit, že transgen se úspěšně zakomponoval do jednoho z chromozomů. Sekvencování F2 generace ukázalo, že transgen se v genotypu nachází v neporušené kopii (Fletcher et al. 2011). Také bylo prokázáno, že transgenní lososi obsahovali transgen pro lysozym ve většině jejich tkání, zejména ve filamentech žaber, slezině a ledvinách.

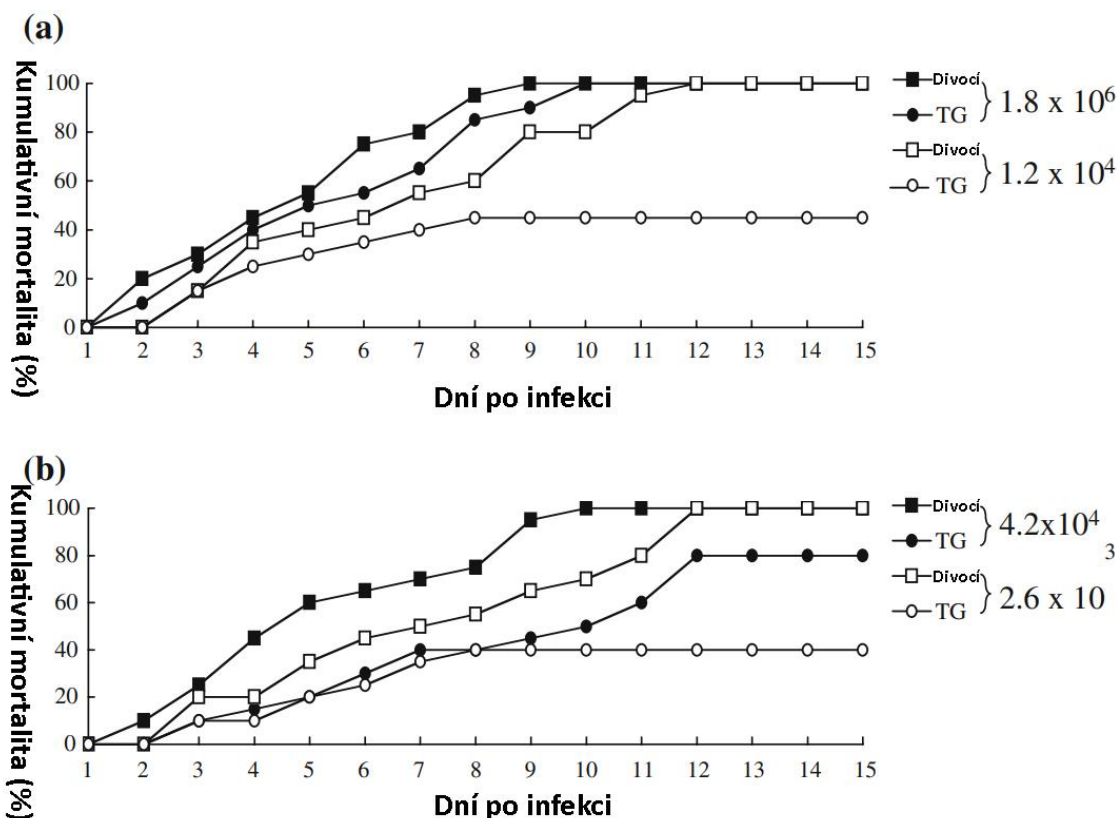
Přes výše zmíněnou korelaci mezi hladinou lysozymů a odolnosti vůči onemocněním u pstruhů duhových a lososů obecných, není možné uvažovat o této přímé úměrnosti jako o univerzální pro všechny rybí druhy. Tato korelace může být naopak i negativní. Zřejmě jsou lysozymy jen jedním z aspektů rybiho imunitního systému (Fletcher et al. 2011). Nicméně v této studii neprovedli Fletcher et al. testy, o kterých psali v roce 1995. Transgenní lososi nebyli vystaveni žádným patogenům a nebyla na nich testována jejich odolnost. Důvodem byly nedostatečné prostory potřebné k provedení experimentu.

Slibných výsledků se podařilo dosáhnout ve výzkumu z roku 2006 na transgenních dániích pruhovaných (*Danio rerio*, Hamilton 1822). Skupině vědců Yazawa et al. se podařilo do genomu dánií zakomponovat gen pro slepičí lysozym v bílku (HEW) a gen pro produkci zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) (viz obrázek 14). Promotor pocházel z *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel, 1846), ve které kóduje tvorbu keratinu. GFP zde sloužil jako marker. Umožnil tak identifikaci úspěšného začlenění do genomu a úspěšné exprese. V F2 generaci byla silná exprese GFP, zejména v epitelových tkáních, játrech a žábrech od embrya po dospělé.



Obrázek 14 *Danio rerio* exprimující zelený fluorescenční protein. Upraveno podle Yazawa et al. (2006).

Trangenní i divocí jedinci byli vystaveni patogenům *Aeromonas hydrophila* (Chester, 1901), *Edwardsiella tarda* (Ewing et al. 1965), *Flavobacterium columnare* (Bernardet & Grimont 1989) a *Vibrio anguillarum* (Bergman 1909). Pro infekci *Flavobacterium* byly ryby ponořeny do roztoku s obsahem těchto bakterií, zbývající tři druhy byly vpraveny do těla dáníí intramuskulárně. Ukázalo se, že *A. hydrophila* a *V. anguillarum* nebyly virulentní ani pro transgenní jedince ani pro divoké. Na druhou stranu *E. tarda* a *F. columnare* virulentní byly. Z transgenních F2 ryb přežilo nákazu *F. columnare* 65 % jedinců, nákazu *E. tarda* přežilo 60 % jedinců. Co se týče divokých ryb, u nich dosáhla mortalita v obou případech 100 % (viz obrázek 15),(Yazawa et al. 2006).



Obrázek 15 Kumulativní mortalita *Flavobacterium columnare* (a) a *Edwardsiella tarda* (b). V pravé části je uveden počet cfu. Upraveno podle Yazawa et al. (2006).

Jakožto další úspěšné produkce transgenních ryb, za účelem zvýšení rezistence vůči patogenům, lze zmínit pstruhy duhové s genem pro produkci peptidu cecropin P1. Tím byla zvýšena rezistence vůči *Aeromonas salmonicida* (Lehmann & Neumann, 1896) a infekční hematopoetické nekróze. K produkci byla použita metoda sperm-mediated gene transfer (Chiou et al. 2014). Dále byly například studováni amuři s transgenem pro lidský laktoferin, který se podílí na nespecifické imunitě. Tyto ryby byly oproti kontrole rezistentnější k *A. hydrophila*. K produkci byla použita metoda sperm-mediated gene transfer (Weifeng et al. 2004).

3.4.3 Antifreeze protein

Antifreeze proteiny (AFPs) jsou unikátní skupinou proteinů, které přes značné odlišnosti v jejich struktuře sdílejí schopnost rozeznat a navázat se na krystaly ledu a zastavit jejich další růst. Vyskytují se v tělech některých studenokrevných organismů adaptovaných na mráz. Nejvíce potentní AFPs jsou schopny zabránit zamrznutí i v teplotách 10 °C pod bodem mrazu. Při dalším snižování této teploty ale nastane moment, kdy tyto proteiny přestanou fungovat a krystaly ledu začnou rapidně růst (Ramløv & Friis 2020). Důsledkem toho pak může být poškození buněk potažmo tkání.

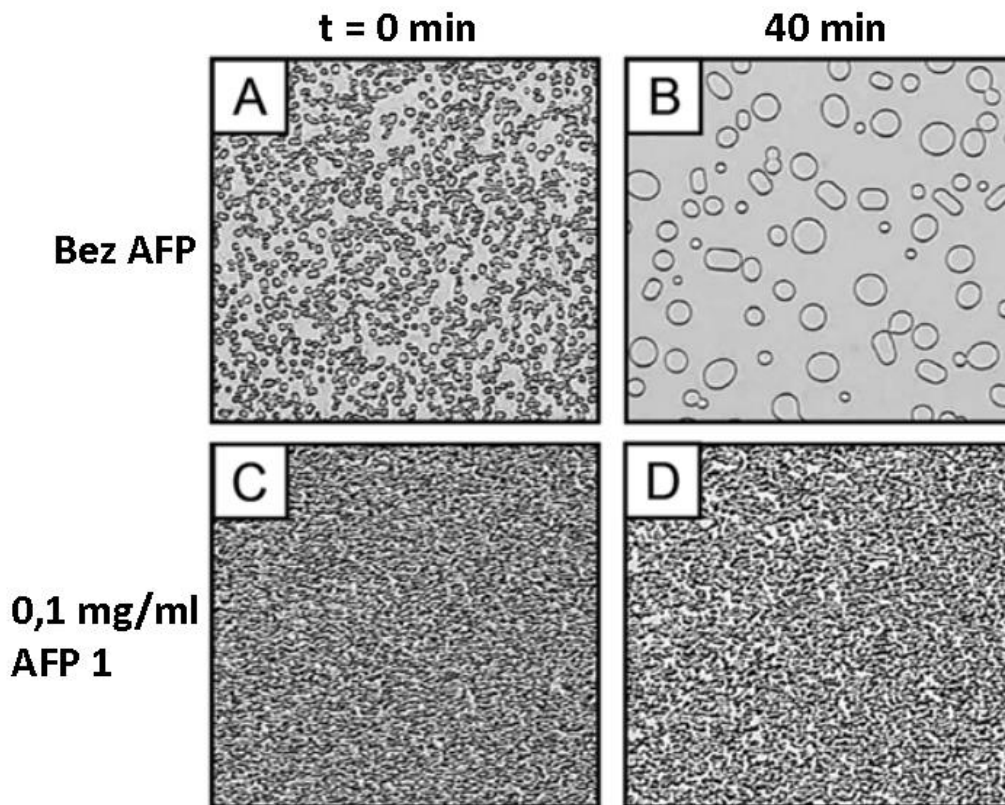
Antifreeze proteiny se vyskytují v široké škále organismů žijících v chladných oblastech. Jako jsou ryby, hmyz, bakterie, rostliny a další (Ramløv & Friis 2020). Co se týče ryb, AFPs byly nalezeny například u zástupců rodů jako jsou platýsi, korušky, sledi a špičatičky (Stevens 2020).

Vytvoření transgenních lososů nebo jiných druhů odolných proti mrazu zakomponováním genu pro tvorbu AFPs by výrazně rozšířilo severní oblasti, ve kterých je možné ryby chovat (Zbikowska 2003). Losos obecný umrzne, pokud přijde do kontaktu s ledem a vodou o teplotě pod -0,7 °C (Fletcher et al. 1988). Zimní teploty severního Atlantického oceánu se mohou v severních oblastech přiblížit až -2 °C. Případný chov lososů v moři je tedy nemožný.

Některé studie se pokoušely vytvořit transgenního lososa, který by v těchto podmínkách mohl přežít a růst. V roce 1988 Fletcher et al. vpravili do jiker lososa obecného geny pro tvorbu AFPs z platýse amerického (*Pseudopleuronectes americanus*, Walbaum 1792) ve snaze zvýšit jeho odolnost k mrazu. Oplozené jikry byly geneticky upraveny mikroinjekcí. Gen se podařilo zakomponovat do genomu lososů u 6 % jedinců.

Hew et al. v roce 1999 pozoroval také lososy s geny pro AFPs z platýse amerického. Na studii se podílel pan doktor Fletcher z předešlého zmíněného experimentu. Lososi byli chováni až do generace F3. Prokázali, že AFP transgeny jsou stabilně navázány v genomu lososů a jsou předávány až po sledovanou F3 generaci. Zakomponována byla pouze jedna kopie toho genu. Ta je sama o sobě nedostatečná pro poskytnutí mrazuvzdornosti. Platýs americký má těchto kopií několik a produkuje AFPs v koncentraci 5–10 mg/ml. Lososi produkovali v průměru 250 µg/ml (Hew et al. 1999). Zvýšení počtu kopií transgenu nebo použití konstruktů s jinými AFP, s vyšší protimrazovou aktivitou, by mohlo být užitečné pro úspěšné zvýšení odolnosti vůči mrazu v chovech (Zbikowska 2003).

Rekrystalizace a rozpínání rostoucích ledových krystalů fyzicky ničí strukturu materiálů, které obsahují vodu. Jako je tomu v cyklu zmrazování a rozmrazování. AFPs a další látky z nich derivované mohou zastavit tento proces rekrystalizace již při velmi malých koncentracích (například desetínách miligramu na mililitr). Fotografie ledových krystalů v závislosti na obsahu AFP je zobrazena na obrázku 16.



Obrázek 16 Fotografie krystalů ledu v absenci AFP (A a B) a v přítomnosti AFP (C a D). Upraveno podle Ramløw & Friis (2020).

Použití těchto látek by mohlo mít obrovský význam v produkci mražených potravin. To se týká již zmíněných zmrzlin, mraženého masa, těst, zeleniny a dalších. Účinek AFPs může zlepšit kvalitu a snížit energetické nároky spojené s mražením (Eskandari et al. 2020), pomoci v kryomedicině a při přechovávání orgánů pro transplantaci. Kryoprezervace tkání a buněk, zejména těch pohlavních, je také velmi podstatná (Mahatabuddin & Tsuda 2018), (Eskandari et al. 2020).

V roce 1999 požádal nizozemský potravinový gigant Unilever o patent, užívající právě nemrznoucí proteiny pocházející z ryb. Do roku 2004 požádali FDA o povolení pro užití těchto proteinů ve zmrzlinách jako geneticky modifikované nemrznoucí činidlo. Unilever použil AFPs ze slimule a upravil ho pro vložení do genomu kvasinek. Tyto GM kvasinky pak samy produkují daný rybí protein. Při správném použití v produkci zmrzlin mohou tyto látky zpomalit jejich tání a poskytují příjemnější pocit v ústech při konzumaci. Nemrznoucí látky totiž způsobují formaci menších krystalků ledu, a tak je produkt jemnější. To je užitečné zejména při produkci zmrzlin s nízkým obsahem tuku.

V roce 2006 FDA použití těchto látek povolilo a na trhu se objevili produkty s jejich obsahem (Stevens 2020).

3.5 Rizika spojená s použitím GMO

3.5.1 Vliv konzumace GM ryb na zdraví člověka

Vliv konzumace GMO na zdraví člověka, je stejně tak jako samotné použití GMO, značně kontroverzní. Rozpory jsou vedeny jak na vědecké úrovni, tak i na té laické.

Pravděpodobně nejpodstatnějším rizikem GMO vzhledem k bezpečnosti konzumace je možnost alergenicity (Dunham 2011). Ta je hodnocena na principu zvaném „substantial equivalence“, zavedeným organizacemi OECD a FAO/WHO. V principu jde o srovnávání nově vytvořených produktů (GMO potravin) s jejich tradičními předchůdci. Například tedy porovnávání GMO lososa s nonGMO lososem. Tradiční produkt je díky dlouhé historii používání a požívání považován za bezpečný. Použití tohoto konceptu není hodnocení zdravotní nezávadnosti GMO produktu jako takové, ale spíše jde o porovnávání rozdílů mezi produkty, které jsou pak dále zkoumány například v rámci toxikologického dopadu (Kuiper et al. 2002).

V roce 1999 byl proveden test vlivu konzumace transgenní tilápie na dobrovolníky. Studie se účastnilo 22 lidí ve věku mezi 24 a 46 lety. Polovině byly po dobu 5 dní podávány dva chody připraveny z GMO tilápií, druhé polovině z nonGMO tilápií. Poté byli dobrovolníci podrobeni zdravotní prohlídce a odběru krve. Nebyl pozorován žádný dopad na zdraví dobrovolníků. Transgenní tilápie byla dokonce lépe hodnocena z hlediska chuťových vlastností ve slepém testu (Guillén et al. 1999).

Při porovnání obsahu hlavního rybího alergenu parvalbuminu a také rybího kolagenu a jejich účinku v GMO a nonGMO lososech bylo zjištěno, že k expresi těchto bílkovin docházelo u GM lososů v menší nebo stejné míře a mezi proteiny samotnými nebyl žádný rozdíl (Nakamura et al. 2009).

Co geneticky modifikované ryby od těch běžných odlišuje, je obsah hormonu růstu, na který je při genetických úpravách cíleno. Hormony růstu se sice běžně vyskytují v potravinách jako jsou mléko, maso a vejce, obsah rybího GH může ale v mase transgenních ryb dosahovat násobků desítek. A to se může zdát rizikové. Pro neobeznámené spotřebitele jistě znamená vysoký obsah hormonů v mase mínus. Není tomu ale tak. Hlavním důvodem je, že rybí hormon růstu se liší od toho lidského, a tak k účinku nedochází. Kdyby čistě z hypotetického hlediska k účinku dojít mohlo, tyto hormony jsou při vaření rozkládány v procesu denaturace. Některé ryby se ale jedí syrové, například ve formě sushi. I v tomto případě dochází k denaturaci, a to v samotném žaludku spotřebitele vlivem nízkého pH (Dunham 2011).

I v teoretickém případě, kdy by nedošlo k žádné denaturalizaci a všechen zkonsumovaný GH byl bioaktivní, při konzumaci obrovské 600g porce by byla dávka GH 19400 ng GH při sněžení masa i kůže nebo 1400 ng bez kůže. Ve variantě s kůží by to znamenalo asi 1.9–19 % denní produkce hormonu růstu u lidí, ve variantě bez kůže 0.1–1 % (Dunham 2011).

Rybí hormon růstu ale degraduje, u lidí bioaktivní není, jeho rezidua nejsou toxická a ani ve vysokých dávkách nepředstavuje jeho konzumace hrozbu. Tudíž vysoké koncentrace hormonů růstu jsou u GM ryb zcela bezpečné.

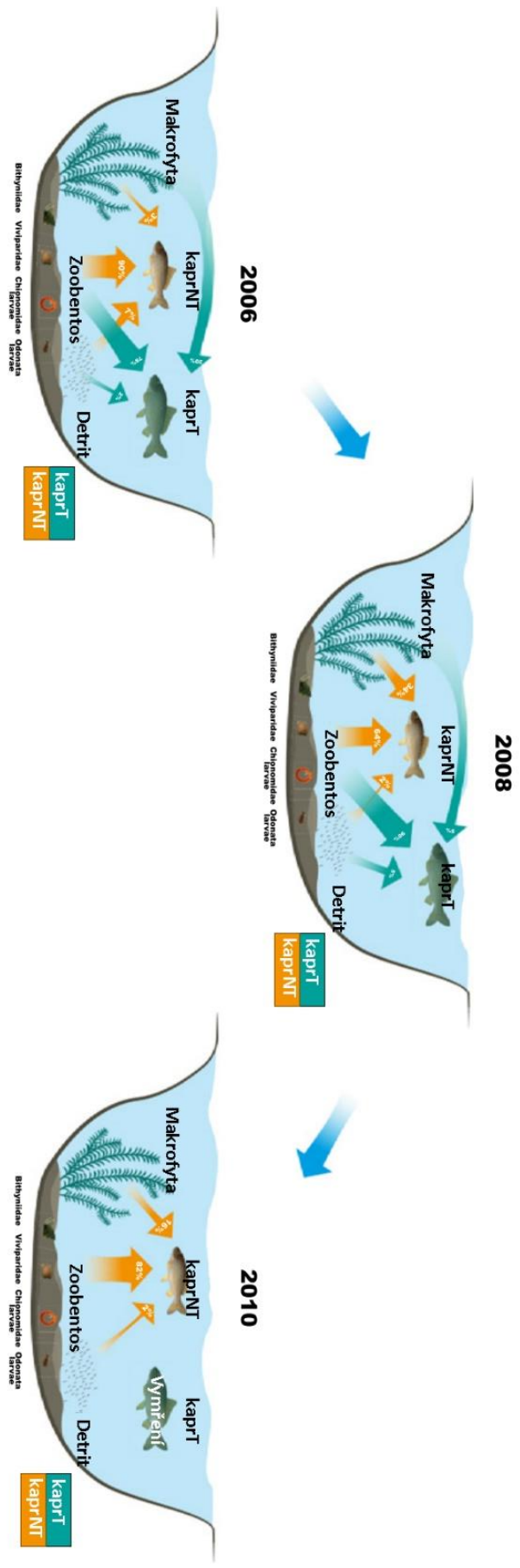
3.5.2 Únik GMO do přírody

Je nadmíru podstatné vyvíjet metody a technologie, které zabraňují úniku geneticky modifikovaných jedinců do přírody. To s sebou nese jistá rizika a obavy. Dle Negowetti (2017) jsou dvěma primárními riziky, co se týče výše zmíněného lososa, jsou křížení geneticky modifikovaného lososa s divokými populacemi ryb a případná kompetice a konkurence o přírodní zdroje s divoce žijícími rybami. Obdobně je tomu tak i u ostatních druhů geneticky modifikovaných ryb, nicméně právě onen losos je díky jeho povolení a použití v praxi skloňován nejvíce.

V případě křížení by uniklé geneticky modifikované ryby mohly vnést svůj transgen do genofondu divokých populací (Rasmussen & Morrissey 2007). Zda by důsledky byly negativní, neutrální či dokonce pozitivní by poté zaleželo na míře fitness nových genotypů v přírodě (Dunham 2011). Inserce transgenů by mohla mít negativní pleiotropní účinky. Dále mohou být použité transgeny nedokonale izolovány, což by mohlo vést k inserci bakteriálních nebo plasmidových sekvencí z preparátů a následné mutagenezi (Dunham 2011). Dále Dunham projevuje obavy z použití virálních vektorů, které by se mohly horizontálně přenášet na jiné druhy a například vytvářet nové, antibiotikům rezistentní patogeny. Největší riziko pro něj ovšem představují genetické modifikace, které by v případě úniku rozšířily geografický areál daného druhu. To by zvětšilo prostor pro vznik biologických invazí. Jako příklad uvádí lososi či tilápie nesoucí gen pro produkci antifreeze proteinů. Tyto ryby by se mohly šířit do studenějších oblastí, než kde by přirozeně přežily, a tam mít dopad na místní biotu (Dunham 2011).

Pokud by se AquAdvantage losos nedopatřením dostal do přírody, mohl by se rychle šířit a bylo by obtížné mu v tom zabránit. Mohl by také soupeřit s divokými lososi o potravu a útočiště. Z důvodu jeho rychlejšího růstu by v těchto ohledech měl mít transgenní losos výhodu (Negowetti 2017). Proponenti biotechnologií naopak tvrdí, že v případě úniku by GM ryby měly šanci na přežití nižší. Zejména kvůli tomu, že vyrostly v umělých zařízeních, kde se nenaučily se vyhýbat predátorům (Upton & Cowan 2015).

Wang et. al. studovali interakce mezi transgenními kapry s nadprodukcí růstového hormonu a jejich netransgenními sourozenci (viz obrázek 17). Studie se odehrála mezi lety 2006 a 2010 v umělém vodním díle o rozloze 6,7 hektarů. Tento vodní areál měl co nejlépe simulovat přirozené prostředí těchto kaprů. Ještě před introdukcí kaprů byly do rybníka vysazeny jiné druhy ryb, s kterými by tyto kapři v přírodě přišli do styku. Také byl rybník osázen makrofyty. Dno bylo značně členité, o různých hloubkách. Na dno byl také vyset jílek (*Lolium sp.*), který měl rapidně navýšit bioproduktivitu rybníku. Tato testovací nádrž nemohla mít přítok ani odtok, aby se zamezilo možnému nechtěnému úniku transgenních kaprů. Voda, která unikla například výparem byla doplňována ponorným čerpadlem s filtry (Wang et al. 2021).



Obrázek 17 Schéma studie kompetice transgenného kapra vůči netransgennímu. Upraveno podle Wang et al. (2021).

Ukázalo se, že transgenní kapři preferovali živočišnou potravu, producenty prvního řádu. To jim bylo umožněno kvůli jejich rychlejšímu růstu oproti netransgenním kaprům. Transgenní kapři tak byli nuceni rozšířit svou potravní základnu o méně hodnotné zdroje potravy, zejména o ponořené rostliny. Postupem času došlo k posunu těchto nik. Primární bentičtí producenti se stali více dostupnými pro geneticky neupravené ryby. Vysoké koncentrace GH s sebou totiž nesly negativní důsledky, jako jsou snížená schopnost pohybu, menší snaživost, menší opatrnost vůči predátorům a také sníženou flexibilitu ve využívání jiných potravních zdrojů. Postupem času tak jeho počty klesali, a v roce 2010 se v rybníce již žádný transgenní kapr nevyskytoval. Na základě výsledků této studie se tak lze domnívat, že v případě úniku tohoto transgenního kapra do přírody nebude schopen kompletně obsadit niku netransgenního kapra a ani ho z prostředí nevyhubí, naopak si postupem času běžní kapři získají kompetitivní výhodu (Wang et al. 2021). Ovšem není možné označit transgenní ryby za bezpečné na základě jedné studie. Rizika je tedy nutné dále a podrobně zkoumat.

Jednou z možných prevencí těchto rizik je produkce sterilních populací, určených k chovu v akvakulturních zařízeních. Tak se zamezí křížení. Sterility lze dosáhnout například polyploidii nebo zamezením vývoje pohlavních orgánů disrupcí pohlavních hormonů (Hu et al. 2006). Triploidní jedinci se nejčastěji tvoří tlakovým nebo tepelným šokem krátce po oplození vajíčka. Šok zabrání vyloučení druhého polárního tělíska a zygota je poté (po oplození spermií) triploidní (Hu et al. 2006). Jejich neplodnost je způsobena narušením gametogeneze. Triploidní jedince lze také získat křížením tetraploidů a diploidů.

V případě AquAdvantage lososa je také využito chovu triploidních jedinců. Kromě biologických metod prevence úniku těchto ryb jsou uvedeny v praxi i metody fyzické, zejména v podobě bariér. Nejčastěji se jedná o sítě v s oky menšími než 1 milimetr až po necelých 13 milimetrů. Ty jsou tak 10× až 100× užší než průměr šířky ryb v různých stádiích vývoje. Nádrže s rybami jsou také kryty sítěmi, které rybám zamezí vyskočení. Přepad vody z nádrže také protéká přes sítě. Aby se zabránilo v úniku potrubím, jsou v něm permanentně umístěna síta. Potrubí vedou do uzavřeného septiku. V odtoku jsou používány tablety chloru, které by případné uniklé jedince usmrtily. Mezi chovnými nádržemi a výpustí filtrované vody je vždy minimálně 5–7 bariér.

Samotná poloha chovných hal je také opatřením proti úniku. Prostředí kolem těchto zařízení je pro lososy nehostinné. V okolí se ani jiní salmonidé nevyskytují. Co se týče zařízení pro chov jiker a mladých ryb v Kanadě, to je umístěno blízko estuáru. V brakické vodě by jikry ani juvenilové nepřezili. Teploty jsou příliš nízké a v některých obdobích voda dosahuje teploty blízké se 0 °C, případně i teplotám nižším. Zařízení v Indianě také obklopují podmínky, ve kterých je dlouhodobé přežití lososů nemožné. A jelikož toky z Indiany ústí do mexického zálivu, AquAdvantage lososi by museli urazit tisíce kilometrů, aby vůbec přišli do kontaktu s divokými lososi. I v tomto extrémně nepravděpodobném scénáři by se ale lososi nemuseli rozmnožit, protože jsou triploidní, tedy sterilní (fda.gov accessed March 2023). Na základě těchto preventivních opatření FDA rozhodlo, že produkce AquAdvantage lososů nepředstavuje hrozbu pro životní prostředí.

3.6 Kontroverze GMO

Geneticky modifikované organizmy jsou jednou z nejkontroverznějších oblastí vědy. Postoj k tomuto tématu je ovlivněn mnoha faktory a výsledky. Názory se liší mezi jednotlivými zeměmi a oblastmi. Někteří autoři uvádějí, že postoj neovlivňuje míra dosaženého vzdělání (Rzymiski & Królczyk 2016), v jiných studiích je rozdíl mezi pozitivním přístupem ke GMO mezi veřejností a vědeckou komunitou zásadní (Rainie & Funk 2015).

3.6.1 Rozdílný přístup USA a EU

Různé státy světa přistupují k povolení a následnému použití geneticky modifikovaných organismů v produkci s vyšší či nižší mírou konzervatismu. Čím se ale příliš neliší je, že regulace a legislativa stojí na posuzování rizik transgenních plodin či živočichů. Mezi tyto rizika patří zejména negativní vliv na zdraví lidí a na životní prostředí (Okoli et al. 2022). Hloubka studií posuzujících tato rizika ovšem není vždy stejná (Hilbeck et al. 2020). Zde jsou uvedeny některé způsoby těchto regulací v USA a Evropě, které tvoří jakési protipóly.

3.6.1.1 Spojené státy americké

V USA podléhá regulace GMO třem agenturám, které vzájemně spolupracují. Těmito agenturami jsou Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA), Agentura pro ochranu životního prostředí (EPA) a Americké ministerstvo zemědělství (USDA). FDA zajišťuje, že geneticky modifikované potraviny nebo potraviny s GM přísadami splňují veškeré bezpečnostní požadavky, stejně tak jako ostatní potraviny. FDA stanovuje a vymáhá standardy bezpečnosti potravin, které musí být následovány všemi subjekty od produkce potravin, přes její zpracování a skladování až po její prodej. EPA je odpovědná za ochranu lidského zdraví a prostředí, například sleduje bezpečnost sloučenin, které chrání GMO plodiny před škůdci. USDA ochraňuje zemědělství před škůdci a nákazami a také nastavuje omezení, k zajištění bezpečnosti GMO plodin vůči nonGMO plodinám (fda.gov, březen 2023).

Jak již bylo zmíněno, USA posuzuje GMO dle konceptu „substanční ekvivalence“, který porovnává chemické složení modifikovaných plodin a jejich nemodifikovaných obdob. Ovšem klasicky šlechtěné odrůdy rostlin tomuto posudku nepodléhají. Tím pádem jsou GMO a nonGMO potraviny posuzovány jinak (Hilbeck et al. 2020). Hilbeck et al. také americkému přístupu vyčítají skutečnost, že debata ohledně GMO byla omezena pouze na uzavřené skupiny expertů.

3.6.1.2 Evropská unie

Evropská unie přistupuje ke GM potravinám daleko konzervativněji. Evropská unie vytvořila právní rámec pro zajištění bezpečného vývoje moderních biotechnologií. Cíle tohoto rámce jsou ochrana lidského a zvířecího zdraví a životního prostředí, zavedení postupů pro posouzení rizik, jasné značení na trhu a dohledatelnost produktů z GMO. Stavebními bloky toho rámce jsou (food.ec.europa.eu, březen 2023):

- 12. března 2001 o záměrném uvolňování GMO do životního prostředí, nařízení (ES) č. 1829/2003 o geneticky modifikovaných potravinách a krmivech
- směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/412 ze dne 11. března 2015, kterou se mění směrnice 2001/18/ES, pokud jde o možnost členských států omezit či zakázat pěstování geneticky modifikovaných organismů (GMO) na svém území
- nařízení (ES) č. 1830/2003 ze dne 22. září 2003 o sledovatelnosti a označování geneticky modifikovaných organismů a sledovatelnosti potravin a krmiv vyrobených z geneticky modifikovaných organismů a o změně směrnice 2001/18/ES
- směrnice Evropského parlamentu a Rady 2009/41/ES ze dne 6. května 2009 o uzavřeném nakládání s geneticky modifikovanými mikroorganismy
- nařízení (ES) č. 1946/2003 – přeshraniční pohyby geneticky modifikovaných organismů

Rizika geneticky modifikovaných organismů v potravinách a krmivech jsou posuzovány Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA). V roce 2013 vydala EFSA pokyny pro hodnocení rizik GM zvířat, který zohledňuje také jejich zdraví a welfare. Bezpečnost bude posuzována na základě porovnání nonGM produktů a GM produktů. Doposud ale žádná GM zvířata, a ani produkty z nich, na evropském trhu nejsou.

V porovnání s USA debata v Evropské unii přesáhla mimo uzavřené skupiny expertů a zapojena je i veřejnost s nezávislými vědci. Veřejnost stála zásadně proti americkému přístupu, který považovala za ovlivněný vidinou komerčních zisků (Hilbeck et al. 2020).

3.6.2 Názor veřejnosti

Již zmíněná polská studie ukázala, že nejlídněji k problematice GMO přistupovali studenti přírodních věd, nejkritičtější byli zdravotní pracovníci (Rzymiski & Królczyk 2016).

V Lakomý et al. (2018) bylo zjištěno, že dotázaní, kteří se více zajímali o tuto problematiku, více podporovali všechna užití genetických úprav, s rostoucím zájmem o přírodní vědy ale rostly také obavy z užití genetických úprav. Názory veřejnosti (ohledně genetických úprav) také ovlivňují masová média (Tosun & Schaub 2017) a přístup vlády (Sendhil et al. 2022).

Například v USA je 57 % veřejnosti přesvědčeno, že použití GMO je nebezpečné, oproti tomu je 88 % amerických vědců přesvědčeno, že GM potraviny jsou bezpečné (Rainie & Funk 2015). V České republice považovalo 80 % dotázaných GM potraviny za problém a 26 % by si je raději vůbec nekupovalo (Brosig et al. 2019). V Rusku by více než 80 % dotázaných podpořilo zákaz GMO (Brosig et al. 2019).

V Číně podporovalo užití GMO pouze 11,9 % dotázaných, 46,7 % zaujímal neutrální postoj a 41,4 % bylo proti (Cui & Shoemaker 2018).

Názor veřejnosti je jedním ze stovebních bloků vývoje biotechnologií, zejména pak v Evropské unii. Lidé by měli být kvalitně informováni o rizicích a možnostech genetického inženýrství. Zejména pak o možnostech, které řeší jejich stávající sociální, ekonomické či environmentální problémy (Woźniak et al. 2021). Rozsáhlé a neucelené informace ale mohou způsobit zmatek, a tak je nutné, aby vědecky podložené informace byly sdělovány chovatelům, pěstitelům a prodejcům. Tím v návaznosti dojde ke zlepšení informovanosti spotřebitelů (Woźniak et al. 2021).

Argumentů pro a proti užití genetických úprav existuje celá řada. Jejich důležitost pro lidi je různá. Obecně je kladně vnímáno použití GMO ve zdravotnictví, jako je prevence a léčba nejruznějších nemocí a postižení, či transplantace orgánů (Rzymiski & Królczyk 2016; Cui & Shoemaker 2018; Woźniak et al. 2021). Jako méně podstatná je vnímána produkce GM produktů, zejména z GM rostlin (Woźniak et al. 2021). Oponenti GMO mají tendenci k vyvolávání negativních emocí a znehodnocování vědeckých důkazů, proponenti se naopak o vědu opírají (Tosun & Schaub 2017). Níže jsou uvedeny příklady pro i proti argumentů. Je nutné konstatovat, že se v tabulce vyskytují i vědecky nepodložené informace. Nicméně v diskusi ohledně GMO se objevují, a tak je vhodné je uvést.

Argumenty PROTI

- Produkce transgenních organismů není přirozená
- Vliv dlouhodobé konzumace geneticky modifikovaných potravin není možné zjistit
- Bezpečnost konzumace GMO není vědecky podložena
- Vědecké testy zkoumající bezpečnost konzumace GMO jsou příliš krátkodobé
- Umělým zasažením do genotypu organismů může dojít k nepředvídatelným změnám
- Genetické úpravy mohou vést k tvorbě nových alergenů
- Genetická úprava může vést k toxicitě produktu
- Vznik tolerance k antibiotikům
- GMO potraviny jsou méně výživné
- Zvýšené množství GH v mase může mít negativní dopad na spotřebitele

Argumenty PRO

- GMO potraviny jsou bezpečné, stejně jako jejich nonGMO obdoby
- Použití GMO vede k snížení užití chemických látek
- GMO potraviny mohou být výživnější než nonGMO obdoby
- Přenos potenciálních alergenů není doporučován
- Doposud žádný alergenní efekt GMO nenalezen
- GMO technologie necílí na rezistenci vůči antibiotikům
- Každá GM potravina uvedená na trh je samostatně posuzována pro zdravotní nezávadnost
- Všechny GM potraviny na trhu prošly testy bezpečnosti
- Žádný negativní účinek konzumace GMO ve státech, kde jsou povoleny, nebyl dosud pozorován
- Snížení nákladů na produkci

4 Závěr

Tato bakalářská práce měla čtenáři přinést ucelený vhled do problematiky užití geneticky modifikovaných ryb v akvakultuře. Stanovené cíle byly splněny. Důraz byl kladen zejména na praktické dopady a rizika spojená s produkcí.

Užití geneticky modifikovaných organismů pro produkci v akvakultuře se zdá jako nevyužitý zdroj, ze kterého by mohlo vzejít mnoho dobrého. Správným užitím genetických úprav je možné zvýšit produkci a minimalizovat ztráty. V globálním měřítku by tak mohlo dojít k zisku v řádech desítek miliard dolarů ročně. Vzhledem k tomu, že konzumace ryb celosvětově roste, by mohl být trh sycen právě geneticky modifikovanými rybami z akvakulturních zařízení. Při snížení nákladů na produkci, by se mohly ryby stát dostupnějším artiklem. Dále by jejich užití v chudších oblastech světa mohlo být významným zdrojem bílkovin.

Vědecké studie naznačují, že konzumace geneticky upravených potravin je stejně bezpečná, jako konzumace jejich běžných obdob. Produkce geneticky modifikovaných ryb je ale ekologičtější. Produkcí ryb v akvakulturách by se dramaticky snížil nápor na již poškozené divoké vodní ekosystémy. Například poklesem lovu mořských ryb. Nicméně chované ryby potřebují krmivo, které je nejčastěji získáváno právě z ryb mořských. Proto by bylo vhodné dále zkoumat alternativy tohoto krmiva, například hmyz a rostliny, v kombinaci s užitím GM ryb. Dále by bylo možné redukovat odpadní látky vytékající z akvakulturních zařízení do přírody. Užití GMO v praxi ale závisí na postoji veřejnosti k této problematice. Pokud lidé nebudou z různých důvodů ochotni zakupovat GM produkty, jejich užití nebude možné.

Přes všechna pozitiva s sebou užití geneticky modifikovaných ryb nese určitá rizika. Jako ta nejpodstatnější bylo nutné zmínit vliv konzumace na zdraví člověka a možnost úniku GMO do přírody. Další intenzivní zkoumání těchto rizik a jejich jasné stanovení je vhodné. Poté by bylo možné tato rizika minimalizovat, v nejlepším případě anulovat. Tím by se mohl změnit postoj veřejnosti. Anulace rizik a následné povolení produkce by otevřely pomyslné dveře užití GM ryb v globálním měřítku, z čehož by mohla společnost těžit na nejrůznějších úrovních.

5 Literatura

- AUER, Thomas a Filippo DEL BENE, 2014. CRISPR/Cas9 and TALEN-mediated knock-in approaches in zebrafish. *Methods [online]*. 69(2), 142-150 [cit. 2023-03-19]. ISSN 10462023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2014.03.027
- BECKER, Sebastian a Jens BOCH, 2021. TALE and TALEN genome editing technologies. *Gene and Genome Editing [online]*. 2 [cit. 2023-03-07]. ISSN 26663880. Dostupné z: doi:10.1016/j.ggedit.2021.100007
- BITINAITE, Jurate, David WAH, Aneel AGGARWAL a Ira SCHILDKRAUT, 1998. Fok I dimerization is required for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences [online]*. 95(18), 10570-10575 [cit. 2023-03-05]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.95.18.10570
- BLIX, Torill, Roy DALMO, Anna WARGELIUS a Anne MYHR, 2021. Genome editing on finfish: *Current status and implications for sustainability*. *Reviews in Aquaculture [online]*. 13(4), 2344-2363 [cit. 2022-09-10]. ISSN 1753-5123. Dostupné z: doi:10.1111/raq.12571
- BODNAR, A. 2019. AquaAdvantage Salmon Regulatory Timeline. Biology Fortified, Inc. Available from <https://biofortified.org/portfolio/aquadvantage-regulatory-timeline/> (accessed January 2023).
- BOCH, Jens a Ulla BONAS, 2010. Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. *Annual Review of Phytopathology [online]*. 48(1), 419-436 [cit. 2023-03-07]. ISSN 0066-4286. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081936
- BOCH, Jens, Heidi SCHOLZE, Sebastian SCHORNACK et al., 2009. Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science [online]*. 326(5959), 1509-1512 [cit. 2023-03-07]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1178811
- BRACKETT, B., W. BARANSKA, W. SAWICKI a H. KOPROWSKI, 1971. Uptake of Heterologous Genome by Mammalian Spermatozoa and Its Transfer to Ova through Fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences [online]*. 68(2), 353-357 [cit. 2023-02-26]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.68.2.353
- BROSIG, Stephan, Miroslava BAVOROVA a Luigi CEMBALO, 2019. Association of attitudes towards genetically modified food among *young adults and their* referent persons. *PLOS ONE [online]*. 14(2) [cit. 2023-03-26]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0211879
- CABELLO, Felipe C., 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology [online]*. 8(7), 1137-1144 [cit. 2023-01-29]. ISSN 1462-2912. Dostupné z: doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x
- CONLEY D. & BRANDEN L. 2016. AquaBounty Technologies. Fishfarming expert. Available from https://aquabounty.com/wp-content/uploads/2016/10/FFE_2016_EAS-Aquabounty.pdf (accessed January 2023).
- CUI, Kai a Sharon SHOEMAKER, 2018. Public perception of genetically-modified (GM) food: A Nationwide Chinese Consumer Study. *Npj Science of Food [online]*. 2(1) [cit. 2023-03-26]. ISSN 2396-8370. Dostupné z: doi:10.1038/s41538-018-0018-4
- DEVLIN, R., J. JOHANSSON, D. SMAILUS, C. BIAGI, E. JÖNSSON a B. BJÖRNSSON, 1999. Increased ability to compete for food by growth hormone-transgenic coho salmon *Oncorhynchus kisutch*

(Walbaum). *Aquaculture Research* [online]. **30**(7), 479-482 [cit. 2023-01-18]. ISSN 1355557X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2109.1999.00359.x

DEVLIN, Robert, Timothy YESAKI, Edward DONALDSON, Shao DU a Choy-Leong HEW, 1995. Production of germline transgenic *Pacific* salmonids with dramatically increased growth performance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* [online]. **52**(7), 1376-1384 [cit. 2023-01-18]. ISSN 0706-652X. Dostupné z: doi:10.1139/f95-133

DUNHAM, R. A., ed., 2011. *Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches* [online]. 2nd ed. UK: CABI [cit. 2022-09-10]. ISBN 9781845936518. Dostupné z: doi:10.1079/9781845936518.0000

DU, Shao, Zhiyuan GONG, Garth FLETCHER, Margaret SHEARS, Madonna KING, David IDLER a Choy HEW, 1992. Growth Enhancement in Transgenic Atlantic Salmon by the Use of an "All Fish" Chimeric Growth Hormone Gene Construct. *Nature Biotechnology* [online]. **10**(2), 176-181 [cit. 2023-01-17]. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt0292-176

ESKANDARI, Azadeh, Thean LEOW, Mohd RAHMAN a Siti OSLAN, 2020. Antifreeze Proteins and Their Practical Utilization in Industry, Medicine, and Agriculture. *Biomolecules* [online]. **10**(12) [cit. 2023-01-28]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom10121649

EVENSEN, Øystein, 2016. Development of Fish Vaccines: Focusing on Methods. In: ADAMS, Alexandra, ed., Alexandra ADAMS. *Fish Vaccines* [online]. Basel: Springer Basel, s. 53-74 [cit. 2023-01-29]. ISBN 978-3-0348-0978-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-0348-0980-1_3

FDA. 2022. U.S. Food and drug administration. How GMOS Are Regulated in the United States. FDA, Silver Spring. Available from <https://www.fda.gov/food/agricultural-biotechnology/how-gmos-are-regulated-united-states> (accessed January 2023).

FDA. 2023. U.S. Food and drug administration. QA on FDA's Approval of AquAdvantage Salmon. FDA, Silver Spring. Available from <https://www.fda.gov/animal-veterinary/aquadvantage-salmon/qa-fdas-approval-aquadvantage-salmon> (accessed January 2023).

FLETCHER, Garth, Margaret SHEARS, Madonna KING, Peter DAVIES a Choy HEW, 1988. Evidence for Antifreeze Protein *Gene Transfer in Atlantic Salmon (Salmo salar)*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* [online]. **45**(2), 352-357 [cit. 2023-01-24]. ISSN 0706-652X. Dostupné z: doi:10.1139/f88-042

FLETCHER, Garth, Rod HOBBS, Robert EVANS, Margaret SHEARS, Amy HAHN a Choy HEW, 2011. Lysozyme transgenic Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research* [online]. **42**(3), 427-440 [cit. 2023-01-29]. ISSN 1355557X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02637.x

FOX, Jeffrey L, 2010. Transgenic salmon inches toward finish line. *Nature Biotechnology* [online]. **28**(11), 1141-1142 [cit. 2022-12-22]. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt1110-1141a

GAJ, Thomas, Charles GERSBACH a Carlos BARBAS, 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology* [online]. **31**(7), 397-405 [cit. 2023-02-26]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.004

GUILLÉN, Isabel, Jorge BERLANGA, Carmen VALENZUELA et al., 1999. Safety Evaluation of Transgenic Tilapia with Accelerated Growth. *Marine Biotechnology* [online]. **1**(1), 2-14 [cit. 2023-02-21]. ISSN 1436-2228. Dostupné z: doi:10.1007/PL00011746

HEW, C., G. FLETCHER a P. DAVIES, 1995. Transgenic salmon: tailoring the genome for food production. *Journal of Fish Biology* [online]. **47**(1), 1-19 [cit. 2023-01-29]. ISSN 0022-1112. Dostupné z: doi:10.1111/j.1095-8649.1995.tb06040.x

HEW, Choy, Raymond POON, Fei XIONG, Sherry GAUTHIER, Margaret SHEARS, Madonna KING, Peter DAVIES a Garth FLETCHER, 1999. *Liver-specific and seasonal expression of transgenic Atlantic salmon harboring the winter flounder antifreeze protein gene*. *Transgenic Research* [online]. 8(6), 405-414 [cit. 2023-01-25]. ISSN 09628819. Dostupné z: doi:10.1023/A:1008900812864

HILBECK, Angelika, Hartmut MEYER, Brian WYNNE a Erik MILLSTONE, 2020. *GMO regulations and their interpretation: how EFSA's guidance on risk assessments of GMOs is bound to fail*. *Environmental Sciences Europe* [online]. 32(1) [cit. 2023-03-22]. ISSN 2190-4707. Dostupné z: doi:10.1186/s12302-020-00325-6

HU, Wei, Yaping WANG a Zuoyan ZHU, 2006. *A perspective on fish gonad manipulation for biotechnical applications*. *Chinese Science Bulletin* [online]. 51(1), 1-6 [cit. 2023-03-08]. ISSN 1001-6538. Dostupné z: doi:10.1007/s11434-005-1055-3

CHIOU, Pinwen, Maria CHEN, Chun-Mean LIN et al., 2014. *Production of Homozygous Transgenic Rainbow Trout with Enhanced Disease Resistance*. *Marine Biotechnology* [online]. 16(3), 299-308 [cit. 2023-01-30]. ISSN 1436-2228. Dostupné z: doi:10.1007/s10126-013-9550-z

INOUE, Koji, Shinya YAMASHITA, Jun-ichiro HATA, Shoko KABENO, Sachiko ASADA, Eizo NAGAHISA a Takao FUJITA, 1990. *Electroporation as a new technique for producing transgenic fish*. *Cell Differentiation and Development* [online]. 29(2), 123-128 [cit. 2023-02-08]. ISSN 09223371. Dostupné z: doi:10.1016/0922-3371(90)90030-Z

JIANG, Fuguo a Jennifer DOUDNA, 2017. *CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms*. *Annual Review of Biophysics* [online]. 46(1), 505-529 [cit. 2022-02-28]. ISSN 1936-122X. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-biophys-062215-010822

KIM, Hyongbum a Jin-Soo KIM, 2014. *A guide to genome engineering with programmable nucleases*. *Nature Reviews Genetics* [online]. 15(5), 321-334 [cit. 2023-03-07]. ISSN 1471-0056. Dostupné z: doi:10.1038/nrg3686

KIM, Hyongbum a Jin-Soo KIM, 2014. *A guide to genome engineering with programmable nucleases*. *Nature Reviews Genetics* [online]. 15(5), 321-334 [cit. 2023-04-05]. ISSN 1471-0056. Dostupné z: doi:10.1038/nrg3686

KIM, Y, J CHA a S CHANDRASEGARAN, 1996. *Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 93(3), 1156-1160 [cit. 2023-03-05]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.93.3.1156

KOBAYASHI, Snin-ichiro, ALIMUDDIN, Tetsuro MORITA, Misako MIWA, Jun LU, Masato ENDO, Toshio TAKEUCHI a Goro YOSHIZAKI, 2007. *Transgenic Nile tilapia (Oreochromis niloticus) over-expressing growth hormone show reduced ammonia excretion*. *Aquaculture* [online]. 270(1-4), 427-435 [cit. 2023-01-19]. ISSN 00448486. Dostupné z: doi:10.1016/j.aquaculture.2007.05.016

KUIPER, Harry, Gijs KLETER, Hub NOTEBORN a Esther KOK, 2002. *Substantial equivalence—an appropriate paradigm for the safety assessment of genetically modified foods?*. *Toxicology* [online]. 181-182, 427-431 [cit. 2023-02-21]. ISSN 0300483X. Dostupné z: doi:10.1016/S0300-483X(02)00488-2

LAVITRANO, Marialuisa, Antonella CAMAIONI, Vito FAZIO, Susanna DOLCI, Maria FARACE a Corrado SPADAFORA, 1989. *Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: Genetic transformation of mice*. *Cell* [online]. 57(5), 717-723 [cit. 2023-02-26]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(89)90787-3

LAVITRANO, Marialuisa, Roberto GIOVANNONI a Maria CERRITO, 2013. *Methods for Sperm-Mediated Gene Transfer*. In: CARRELL, Douglas T. a Kenneth I. ASTON, ed., Douglas CARRELL,

Kenneth ASTON. Spermatogenesis [online]. Totowa, NJ: Humana Press, s. 519-529 [cit. 2023-02-26]. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-62703-037-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-62703-038-0_44

LAKOM7, M., BOHLIN, G., HLAVOVÁ, R., MACHÁČKOVÁ, H., BERGMAN, M. & LINDHOLM, M. (2018). Public attitudes to life sciences research in six European countries (ORION project Deliverable No. 2.3). Stockholm: VA.

LAWSON, Charles a Berris CHARNLEY, 2015. Intellectual Property and Genetically Modified Organisms [online]. Routledge [cit. 2022-12-01]. ISBN 9781317115007. Dostupné z: doi:10.4324/9781315589114

LIEVENS, A., M. PETRILLO, M. QUERCI a A. PATAK, 2015. Genetically modified animals: Options and issues for traceability and enforcement. *Trends in Food Science & Technology* [online]. **44**(2), 159-176 [cit. 2022-09-10]. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2015.05.001

MAHATABUDDIN, Sheikh a Sakae TSUDA, 2018. Applications of Antifreeze Proteins: Practical Use of the Quality Products from Japanese Fishes. In: IWAYA-INOUE, Mari, Minoru SAKURAI a Matsuo UEMURA, ed., Mari IWAYA-INOUE, Minoru SAKURAI, Matsuo UEMURA. *Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation* [online]. Singapore: Springer Singapore, s. 321-337 [cit. 2023-01-28]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. ISBN 978-981-13-1243-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-13-1244-1_17

MARRAFFINI, Luciano A., 2015. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature* [online]. **526**(7571), 55-61 [cit. 2023-03-21]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature15386

MONTET, Didier a Ramesh RAY, 2017. *Aquaculture Microbiology and Biotechnology*. 1. CRC Press. ISBN 9780367807030.

NAKAMURA, Rika, Rie SATOH, Yukari NAKAJIMA, Nana KAWASAKI, Teruhide YAMAGUCHI, Jun-ichi SAWADA, Hiroyuki NAGOYA a Reiko TESHIMA, 2009. Comparative study of GH-transgenic and non-transgenic amago salmon (*Oncorhynchus masou ishikawae*) allergenicity and proteomic analysis of amago salmon allergens. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. **55**(3), 300-308 [cit. 2023-02-21]. ISSN 02732300. Dostupné z: doi:10.1016/j.yrtph.2009.08.002

NEGOWETTI, Nicole, 2017. Perspectives and Predicaments of GMO Salmon. In: STEIER, Gabriela a Kiran K. PATEL, ed., Gabriela STEIER, Kiran PATEL. *International Farm Animal, Wildlife and Food Safety Law* [online]. Cham: Springer International Publishing, s. 433-466 [cit. 2022-02-28]. ISBN 978-3-319-18001-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-18002-1_14

NICHOLL, Desmond S. T., 2012. *An Introduction to Genetic Engineering* [online]. Cambridge University Press [cit. 2022-09-17]. ISBN 9780521850063. Dostupné z: doi:10.1017/CBO9780511800986

OKOLI, Arinze, Torill BLIX, Anne MYHR, Wenteng XU a Xiaodong XU, 2022. Sustainable use of CRISPR/Cas in fish aquaculture: the biosafety perspective. *Transgenic Research* [online]. **31**(1), 1-21 [cit. 2023-03-22]. ISSN 0962-8819. Dostupné z: doi:10.1007/s11248-021-00274-7

PIOVESAN, Allison, Maria PELLERI, Francesca ANTONAROS, Pierluigi STRIPPOLI, Maria CARACAUSI a Lorenza VITALE, 2019. On *the length*, weight and GC content of the human genome. *BMC Research Notes* [online]. **12**(1) [cit. 2023-03-05]. ISSN 1756-0500. Dostupné z: doi:10.1186/s13104-019-4137-z

RAHMAN, M., A. RONYAI, B. ENGIDAW et al., 2001. Growth and nutritional trials on transgenic Nile tilapia containing *an* exogenous fish growth hormone gene. *Journal of Fish Biology* [online]. **59**(1), 62-78 [cit. 2023-01-17]. ISSN 0022-1112. Dostupné z: doi:10.1111/j.1095-8649.2001.tb02338.x

RAINIE, L. & FUNK, C. (2015). Public and Scientists' Views on Science and Society. Pew Research Centers Internet American Life Project.

RAMLØV, Hans a Dennis FRIIS, ed., 2020. Antifreeze Proteins Volume 1 [online]. Cham: Springer International Publishing [cit. 2023-01-24]. ISBN 978-3-030-41928-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-41929-5

RASMUSSEN, Rosalee a Michael MORRISSEY, 2007. Biotechnology in Aquaculture: Transgenics and Polyploidy. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. **6**(1), 2-16 [cit. 2022-09-10]. ISSN 1541-4337. Dostupné z: doi:10.1111/j.1541-4337.2007.00013.x

REINECKE, Manfred, Björn BJÖRNSSON, Walton DICKHOFF, Stephen MCCORMICK, Isabel NAVARRO, Deborah POWER a Joaquim GUTIÉRREZ, 2005. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: Where we are and where to go. *General and Comparative Endocrinology* [online]. **142**(1-2), 20-24 [cit. 2023-01-20]. ISSN 00166480. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygcen.2005.01.016

ROMERO, Jaime, Carmen GLORIA a Paola NAVARRETE, 2012. Antibiotics in Aquaculture – Use, Abuse and Alternatives. In: CARVALHO, Edmir, ed., Edmir CARVALHO. Health and Environment in Aquaculture [online]. InTech [cit. 2023-01-29]. ISBN 978-953-51-0497-1. Dostupné z: doi:10.5772/28157

RZYMSKI, Piotr a Aleksandra KRÓLCZYK, 2016. Attitudes toward genetically modified organisms in Poland: to GMO or not to GMO?. *Food Security* [online]. **8**(3), 689-697 [cit. 2023-03-26]. ISSN 1876-4517. Dostupné z: doi:10.1007/s12571-016-0572-z

SENDHIL, R, Nyika JOAN, Yadav SHEEL, Mackolil JOBY, Rama PRASHAT, Workie ENDASHAW, Ragupathy RAGUPATHYRAJA a P. RAMASUNDARAM, 2022. Genetically modified foods: bibliometric analysis on consumer perception and preference. *GM Crops & Food* [online]. **13**(1), 65-85 [cit. 2023-03-26]. ISSN 2164-5698. Dostupné z: doi:10.1080/21645698.2022.2038525

STEVENS, Hallam, 2020. Transfish: The Multiple Origins of Transgenic Salmon. In: TRUMP, Benjamin D., Christopher L. CUMMINGS, Jennifer KUZMA a Igor LINKOV, ed., Benjamin TRUMP, Christopher CUMMINGS, Jennifer KUZMA, Igor LINKOV. *Synthetic Biology 2020: Frontiers in Risk Analysis and Governance* [online]. Cham: Springer International Publishing, s. 51-63 [cit. 2023-01-24]. Risk, Systems and Decisions. ISBN 978-3-030-27263-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-27264-7_3

The State of World Fisheries and Aquaculture [online], 2022. FAO [cit. 2022-12-30]. ISBN 978-92-5-136364-5. Dostupné z: doi:10.4060/cc0461en

TOSUN, Jale a Simon SCHAUB, 2017. Mobilization in the European Public Sphere: The Struggle Over Genetically Modified Organisms. *Review of Policy Research* [online]. **34**(3), 310-330 [cit. 2023-03-26]. ISSN 1541132X. Dostupné z: doi:10.1111/ropr.12235

TRUMP, Benjamin, Christopher CUMMINGS, Jennifer KUZMA a Igor LINKOV, ed., 2020. *Synthetic Biology 2020: Frontiers in Risk Analysis and Governance* [online]. Cham: Springer International Publishing [cit. 2022-12-22]. Risk, Systems and Decisions. ISBN 978-3-030-27263-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-27264-7

URNOV, Fyodor, Edward REBAR, Michael HOLMES, H. ZHANG a Philip GREGORY, 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics* [online]. **11**(9), 636-646 [cit. 2023-03-05]. ISSN 1471-0056. Dostupné z: doi:10.1038/nrg2842

VAN EENENNAAM, Alison Louise, 2017. Genetic modification of food animals. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. **44**, 27-34 [cit. 2022-09-10]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2016.10.007

WAKCHAURE, Rajesh a Subha GANGULY, 2015. *Importance of Transgenic Fish to Global Aquaculture: A Review. Fisheries and Aquaculture Journal* [online]. **06**(04) [cit. 2023-03-07]. ISSN 21503508. Dostupné z: doi:10.4172/2150-3508.1000e124

WANG, Kang, Yongcui SHA, Jun XU, Tanglin ZHANG, Wei HU a Zuoyan ZHU, 2021. Do sympatric transgenic and non-transgenic common carps partition the trophic niche? A whole-lake manipulation study. *Science of The Total Environment* [online]. **787** [cit. 2023-03-12]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.147516

WANG, Yan, Naima HAMID, Pan-Pan JIA a De-Sheng PEI, 2021. A comprehensive review on genetically modified fish: key *techniques, applications* and future prospects. *Reviews in Aquaculture* [online]. **13**(3), 1635-1660 [cit. 2023-03-19]. ISSN 1753-5123. Dostupné z: doi:10.1111/raq.12538

WARYAH, Charlene, Colette MOSES, Mahira AROOJ a Pilar BLANCAFORT, 2018. Zinc Fingers, TALEs, and CRISPR Systems: *A Comparison of Tools for Epigenome Editing*. In: JELTSCH, Albert a Marianne G. ROTS, ed., Albert JELTSCH, Marianne ROTS. *Epigenome Editing* [online]. New York, NY: Springer New York, s. 19-63 [cit. 2023-03-22]. *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-4939-7773-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-7774-1_2

WEIFENG, Mao, Wang YAPING, Wang WENBO, Wu BO, Feng JIANXIN a Zhu ZUOYAN, 2004. Enhanced resistance to *Aeromonas hydrophila* infection *and enhanced phagocytic* activities in human lactoferrin-transgenic grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture* [online]. **242**(1-4), 93-103 [cit. 2023-01-30]. ISSN 00448486. Dostupné z: doi:10.1016/j.aquaculture.2004.07.020

WOŹNIAK, E., A. TYCZEWSKA a T. TWARDOWSKI, 2021. A Shift Towards Biotechnology: *Social Opinion* in the EU. *Trends in Biotechnology* [online]. **39**(3), 214-218 [cit. 2023-03-26]. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2020.08.001

WU, G, 2003. Growth hormone gene transfer in common carp. *Aquatic Living Resources* [online]. **16**(5), 416-420 [cit. 2023-01-17]. ISSN 09907440. Dostupné z: doi:10.1016/S0990-7440(03)00087-1

YAZAWA, Ryosuke, Ikuo HIRONO a Takashi AOKI, 2006. Transgenic Zebrafish Expressing Chicken Lysozyme Show Resistance against Bacterial Diseases. *Transgenic Research* [online]. **15**(3), 385-391 [cit. 2023-01-30]. ISSN 0962-8819. Dostupné z: doi:10.1007/s11248-006-0009-0

ZBIKOWSKA, Halina M., 2003. Fish can be first-advances in fish transgenesis for commercial applications. *Transgenic Research* [online]. **12**(4), 379-389 [cit. 2023-01-24]. ISSN 09628819. Dostupné z: doi:10.1023/A:1024267416522

ZHANG, Yan a Long-Chuan YU, 2008. Microinjection as a tool of mechanical delivery. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. **19**(5), 506-510 [cit. 2022-12-30]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2008.07.005

ZHU, Z., L. HE a S. CHEN, 1985. Novel gene transfer into the fertilized eggs of gold fish (*Carassius auratus L. 1758*). *Journal of Applied Ichthyology* [online]. **1**(1), 31-34 [cit. 2022-10-06]. ISSN 0175-8659. Dostupné z: doi:10.1111/j.1439-0426.1985.tb00408.x

ZHU, Zuoyan, 1993. Growth Hormone Gene and the Transgenic Fish. In: YOU, Chongbiao, Zhangliang CHEN a Yong DING, ed., *Chongbiao YOU, Zhangliang CHEN, Yong DING. Biotechnology in Agriculture* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, s. 145-155 [cit. 2023-01-17]. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*. ISBN 978-94-010-4782-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-011-1779-1_19

ZIMMER, Carl. From fearsome predator to man's best friend. *New York Times*, 2013, 230. Lee 2016 Available from: <https://www.kew.org/read-and-watch/savage-cabbag>

