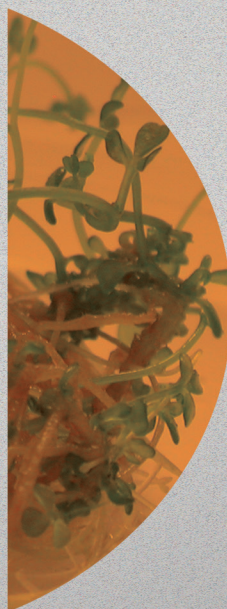


GENETIČKI MODIFIKOVANE BILJKE

Biološke osnove
Biotehnoške perspektive

Mirjana Nešković
Slavica Ninković
Jovanka Miljuš Đukić



Mirjana Nešković
Slavica Ninković
Jovanka Miljuš Đukić

Genetički modifikovane biljke

Biološke osnove – Biotehnološke perspektive



Beograd 2022

Naslov:

**GENETIČKI MODIFIKOVANE BILJKE:
Biološke osnove – Biotehnološke perspektive**

Autori:

Prof. dr Mirjana Nešković, Katedra za fiziologiju biljaka, Institut za botaniku i Botanička bašta „Jevremovac“, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu; Odeljenje za fiziologiju biljaka, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Dr Slavica Ninković, naučni savetnik, Odeljenje za fiziologiju biljaka, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Dr Jovanka Miljuš Đukić, naučni savetnik, Laboratorija za molekularnu biologiju biljaka, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Izdavač:

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Za izdavača: Dr Mirjana Mihailović

Recenzenti:

Prof. dr Ljubiša Topisirović, naučni savetnik, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Svetlana Radović, naučni savetnik, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Biljana Stojković, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Snežana Zdravković Korać, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Dr Aleksej Tarasjev, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Dr Ana Simonović, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Lektura i korektura: Marija Lazović

Ilustracije u knjizi: Jovana Perišić, Dimitrije Ninković, Marija Stojisavljević

Dizajn i priprema za štampu: Vladimir Sokolović

Štampa:

JP “Službeni glasnik”, Beograd

Tiraž: 100

ISBN: 978-86-80335-18-6



©2022 Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

UVODNA REČ AUTORA

Otkriće molekularne strukture dezoksiribonukleinske kiseline, najvećeg molekula u ćeliji i nosioca naslednih osobina jedinke, doprinelo je razvoju molekularno bioloških nauka, a istovremeno i razvoju metoda koje su omogućile manipulisanje ovim molekulom, što je vrlo brzo donelo brojne izazove pred čovečanstvo.

Jedan od izazova, oko kojeg se već duže vreme diže velika prašina, jesu genetički modifikovani organizmi (GMO), u prvom redu GM biljke, što je i tema ove knjige. Početna ideja o dobijanju GM biljaka proistekla je iz potrebe da se poveća proizvodnja hrane u svetu i da se smanji korišćenje hemijskih sredstava u poljoprivredi i time zaštiti i očuva zdravija životna sredina. Da li će GM žitarice i druge kulturne biljke smanjiti glad u svetu, da li će njihova upotreba smanjiti korišćenje hemijskih sredstava? Nadamo se da hoće, jer je njihov potencijal zaista veliki. Nažalost, u mnogim zemljama GM biljke nisu dobrodošle. U većini zemalja sveta javnost je negativno raspoložena prema GMO, biljkama i hrani koja u sebi sadrži GMO, ili je poreklom od GMO. Najveći broj zemalja, a u tome prednjače evropske zemlje, zabranjuje gajenje i korišćenje GM biljaka u ishrani ljudi, iako za to nema naučnog opravdanja.

Autori ove knjige žele da razbiju predrasude koje okružuju GMO, da ukazu na neopravdanost zabrana i netačnost argumenata koje navode protivnici GM biljaka. Žele da pokažu da genetičke modifikacije i genetički inženjering nisu izmišljeni u svrhe „imitiranja Tvorca“ kako neki tvrde, već su samo uočeni i primenjeni prirodni postupci kojima su se ćelije menjale i evoluirale hiljadama godina.

Prikazom evolutivnog razvoja života na Zemlji, autori žele da istaknu zajedničko poreklo svih živih bića i njihove sličnosti na osnovnom ćelijskom nivou, nasuprot velikim fenotipskim razlikama koje su lako uočljive. U knjizi su date osnovne informacije o naslednom materijalu ćelije, procesu

deoba ćelija i razviću, kao i glavne osobine biljaka koje ih razlikuju od životinjskog sveta. Detaljno su opisane metode transformacije ćelija i primeri koji pokazuju koliko nam GM biljke mogu biti korisne u poljoprivredi, proizvodnji hrane, ali i drugim granama privrede.

Knjiga je namenjena ne samo studentima biologije, molekularne biologije, ekologije, biohemije, hemije, biofizike, poljoprivrede, farmacije već i svima onima koji žele da shvate „šta je taj GMO“ i da li nam je koristan? Autori su i sami molekularni biolozi koji se dugi niz godina bave genetičkim transformacijama biljaka, tako da im je ta tema bliska i žele da je na pravi način približe i objasne svima koji o njoj žele da saznaju nešto više.

Autori se nadaju da će knjiga naići na pozitivan odjek i doprineti odbacivanju predrasuda koje prate GM biljke.

Na kraju, autori žele da istaknu da veliku zahvalnost duguju recenzentima koji su svojim stručnim savetima i sugestijama umnogome pomogli da knjiga dobije svoj konačni oblik.

Kratak sadržaj

- Poglavlje 1. Evolucija i genetičke modifikacije**
- Poglavlje 2. Osobine biljaka od značaja za genetičke modifikacije**
- Poglavlje 3. Osnovna znanja o genomu i genima**
- Poglavlje 4. Promenljivost genoma tokom evolucije, domestikacije i savremene selekcije**
- Poglavlje 5. Metode za dobijanje transgenih biljaka**
- Poglavlje 6. Genetički modifikovane biljke na tržištu**
- Poglavlje 7. Povećanje prinosa gajenih biljaka i poboljšanje kvaliteta biljnih proizvoda**
- Poglavlje 8. Za ili protiv GM biljaka: nada ili strah**

Sadržaj

1. Evolucija i genetičke modifikacije	17
MIRJANA NEŠKOVIĆ	
1.1. Hipoteze o prvim koracima evolucije	20
1.1.1. Univerzalni prethodnik života	20
1.1.2. Ugljenik i vodonik – gradivni elementi organskih jedinjenja	23
1.1.3. Postanak makromolekula u atmosferi?	28
1.2. Postanak prvih ćelija	29
1.2.1. Hipoteza o pre-ćelijama	30
1.2.2. Postanak jedra i ćelijskih organela	34
1.3. Kakvu vezu vidimo između postanka života i genetičkih modifikacija?	39
Sažetak	41
Literatura 1	43
2. Osobine biljaka od značaja za genetičke modifikacije.	47
MIRJANA NEŠKOVIĆ	
2.1. Strukturne osobine biljaka	48
2.1.1. Osnovne razlike između biljaka i životinja	48
2.1.2. Germinativna plazma i matične ćelije životinja	51
2.1.3. Embriogeneza i anatomska svojstva biljaka	52
2.1.4. Građa apikalnih meristema	54
2.1.5. Signali u regulaciji rasteanja i deoba matičnih ćelija	58
2.1.5.1. Hormonska regulacija matičnih ćelija.	59
2.1.6. Matične niše u uspostavljanju plastičnosti razvića	61
2.2. Kultura biljaka in vitro	63
2.2.1. Kultura kalusa, ćelija i protoplasta	63
2.2.1.1. Na osnovu čega je sve počelo?	64

2.2.1.2. Kulture tkiva	65
2.2.1.3. Suspenzija ćelija	65
2.2.1.4. Protoplasti	66
2.2.2. Organogeneza i embriogeneza.	67
2.2.2.1. Regeneracija pupoljaka i korenova u kulturi tkiva.	67
2.2.2.2. Somatska embriogeneza	69
2.2.2.3. Androgeneza i ginogeneza.	71
Sažetak	72
Literatura 2	72
3. Osnovna znanja o genomu i genima	75
MIRJANA NEŠKOVIĆ	
3.1. O genomu	75
3.1.1. Hemijski sastav i organizacija nukleinskih kiselina	75
3.1.2. Genomi plastida i mitohondrija	77
3.1.3. Utvrđivanje redosleda nukleotida	78
3.1.4. Model-biljka <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
3.1.5. Funkcionalna genomika	81
3.2. O genima.	82
3.2.1. Šta su geni?.	82
3.2.2. Ekspresija gena	84
3.2.3. Regulacija genske ekspresije: male regulatorne RNK	86
3.2.4. Rekombinacija gena.	89
3.2.5. Identifikacija gena.	94
Sažetak	96
Literatura 3	98

4. Promenljivost genoma tokom evolucije, domestikacije	
i savremene selekcije	101
MIRJANA NEŠKOVIĆ	
4.1. Evolucija C4 biljaka	106
4.1.1. Poreklo C4 biljaka	108
4.1.2. Evolucija fosfoenolpiruvatne karboksilaze (PEPC).	109
4.1.3. Faktori selekcije C4 biljaka	112
4.2. Promenljivost genotipa u toku domestikacije	113
4.2.1. Domestikacija kukuruza	114
4.3. Savremena genetika i „zelena revolucija“	119
4.3.1. Produktivnost kukuruza i heterozis.	120
4.3.2. Povećanje prinosa pšenice i pirinča	121
4.4. Genetičko inženjerstvo kao oblik genetičke modifikacije.	124
Sažetak	127
Literatura 4	128
5. Metode za dobijanje transgenih biljaka	131
MIRJANA NEŠKOVIĆ, JOVANKA MILJUŠ ĐUKIĆ,	
SLAVICA NINKOVIĆ	
5.1. Prirodni transfer DNK iz jednog organizma u drugi	132
5.1.1. Virusne sekvence ugrađene u biljni genom	132
5.1.2. <i>Agrobacterium</i> i neoplastično rastenje	133
5.1.3. Ti i Ri plazmidi	136
5.1.4. Prenos T-DNK u biljnu ćeliju	138
5.1.5. Ekspresija gena koje obuhvata T-DNK	141
5.2. <i>Agrobacterium</i> kao posrednik za prenos stranih gena.	144
5.2.1. <i>Agrobacterium</i> i njegovi derivati.	145
5.2.2. Transport T-DNK i integracija u biljni genom.	146
5.2.3. Transformacija <i>in planta</i>	146

5.3. Biolistička transformacija	147
5.4. Transformacija hloroplasta	151
5.4.1. Konstrukcija vektora	152
5.4.2. Selekcija transformisanih hloroplasta.	153
5.4.3. Razviće transplastomnih biljaka.	154
5.4.4. Prednosti i ograničenja transplastomnih biljaka	156
5.4.5. Mogući broj transgena i njihovih transkripata u ćeliji	156
5.4.6. Multigenaska transformacija	157
5.4.7. Uniparentalno nasleđivanje gena hloroplasta	157
5.4.8. Kompartimentacija proizvoda	158
5.4.9. Pozicioni efekat	159
5.5. Druge direktne metode transformacije	159
5.6. Zajednički postupci za više različitih metoda transformacije	160
5.6.1. Konstrukcija, kloniranje i ekspresija rekombinovane DNK	160
5.6.2. Promotori i terminatori	165
5.6.3. Selekcija transformisanih ćelija	168
5.6.4. Negativna selekcija	170
5.6.5. Dobijanje biljaka bez markera	171
5.6.6. Citokinini kao pozitivni selekcionni agensi	172
5.6.7. Manoza i drugi šećeri kao selekcionni agensi pri pozitivnoj selekciji	174
5.6.8. Provera genetičke transformacije	175
5.6.9. Provera prisustva „backbone“ vektora	179
5.7. Nove metode transformacije biljaka	179
5.7.1. Tehnologija nukleaza sa Zn-prstima ZFN-1, ZFN-2 i ZFN-3	181
5.7.2. Mutageneza putem oligonukleotida	183
5.7.3. Cisgeneza i intrageneza	183
5.7.4. Metilacija DNK zavisna od RNK	184
5.7.5. Kalemljenje na GM podloge	185
5.7.6. Reverzno ukrštanje	186

5.7.7. Agroinfiltracija	187
5.7.8. Editovanje genoma CRISPR/Cas9 sistemom	187
5.8. Kultura <i>in vitro</i> i genetičke transformacije	191
Sažetak	192
Literatura 5	192

6. Genetički modifikovane biljke na tržištu 199

SLAVICA NINKOVIĆ

6.1. Otpornost prema herbicidima	200
6.1.1. Istorija borbe sa korovima	200
6.1.2. Šta su herbicidi?	201
6.1.3. GM biljke otporne na totalne herbicide	203
6.1.3.1. Vrste HT biljaka	203
6.1.3.2. „Roundup Ready“ transgena linija – Otpornost prema glifosatu.	204
6.1.3.3. „LibertyLink“ transgena linija – Otpornost prema glufosinatu ili fosfinotricinu (PPT)	206
6.1.3.4. Nova generacija HT biljaka	209
6.1.3.5. Komercijalizacija i rasprostranjenje HT biljaka	212
6.1.4. Prednosti i nedostaci transgenih biljaka otpornih prema herbicidima.	214
6.1.4.1. Prednosti	214
6.1.4.2. Nedostaci?	215
6.2. Otpornost prema insektima	219
6.2.1. Kontrola insekata štetočina konvencionalnim metodama	220
6.2.1.1. Hemijska kontrola.	220
6.2.1.2. Biološka kontrola	221
6.2.1.3. Kombinovana kontrola	223
6.2.2. GM biljke otporne prema insektima – alternativni vid kontrole.	224

6.2.2.1. Bt transgene biljke	224
6.2.2.2. Alternativni insekticidni geni	227
6.2.3. Dobrobit od upotrebe Bt biljaka	228
6.2.4. Rizici vezani za upotrebu Bt biljaka.	229
6.2.5. Strategije za sprečavanje pojave rezistencije	230
6.2.6. Kontroverze i perspektive	232
6.3. Otpornost prema virusima	233
6.3.1. Građa i replikacija virusa.	234
6.3.2. Konvencionalne metode u borbi protiv virusa.	236
6.3.2.1. Kontrola prenosilaca virusa	236
6.3.2.2. Kultura meristema	236
6.3.2.3. Selekcija otpornih vrsta	237
6.3.2.4. Unakrsna zaštita	237
6.3.3. GM biljke otporne na viruse	238
6.3.4. Perspektiva odbrane od virusa.	240
6.3.5. Komercijalizacija GM biljaka otpornih na viruse	241
6.3.5.1. Transgena papaja	241
6.3.5.2. Transgene tikve i tikvice (<i>Cucurbita pepo L.</i>)	242
6.3.5.3. „NewLeaf“ krompir.	243
6.3.5.4. Prednosti GM biljaka rezistentnih na viruse.	243
6.3.6. Potencijalni rizici gajenja GM biljaka rezistentnih na viruse	244
6.3.6.1. Transkapsidacija (Hetero- ili transenkapsidacija)	244
6.3.6.2. Rekombinacija.	244
6.3.6.3. Virusni sinergizam	245
6.3.6.4. Prenos gena	245
6.4. Uloga transgenih biljaka u kontroli patogenih bakterija i gljiva	247
6.4.1. Bakterije	248
6.4.2. Gljive	250
6.4.3. Klasične metode borbe sa bolestima	252
6.4.3.1. Agrotehničke metode.	252

6.4.3.2. Hemijske metode	253
6.4.3.3. Selekcija rezistentnih varijeteta	254
6.4.4. Interakcija patogena sa biljkama.	255
6.4.5. Kako se biljke brane od patogena?.	256
6.4.5.1. Fitoaleksini.	257
6.4.5.2. Proteini povezani sa patogenezom (PR)	258
6.4.5.3. Interakcija specifična za domaćina i patogena	258
6.4.5.4. Hipersenzitivni odgovor	259
6.4.5.5. Sistemska stečena rezistencija	259
6.4.6. Genetičke modifikacije	261
6.4.7. Problemi i rešenja	263
6.4.8. Perspektive kontrole patogena	265
6.5. Transgene biljke i abiotički stresovi	266
6.5.1. Receptori	268
6.5.1.1. RLK receptori	269
6.5.1.2. HK receptori.	270
6.5.1.3. MAPK kinaze	270
6.5.2. Transkripcioni faktori	271
6.5.2.1. DREB transkripcioni faktori.	271
6.5.2.2. bZIP transkripcioni faktori	272
6.5.2.3. NAC familija transkripcionih faktora	272
6.5.2.4. MYB familija transkripcionih faktora	274
6.5.2.5. ERF transkripcioni faktori.	274
6.5.2.6. HSF transkripcioni faktori.	274
6.5.3. Metaboliti	275
6.5.4. Proteini efektori	277
6.5.5. Zaključak.	277
Sažetak	278
Literatura 6	279

7. Povećanje prinosa gajenih biljaka i poboljšanje kvaliteta biljnih proizvoda	291
MIRJANA NEŠKOVIĆ	
7.1. Povećanje prinosa: odnos fotosinteze i transpiracije	292
7.1.1. Da li se može povećati efikasnost apsorpcije CO ₂ ?	292
7.1.1.1. Za aktivniji Rubisco enzim	293
7.1.1.2. Uvođenje C4 enzima u C3 biljke	296
7.1.2. Da li se može poboljšati snabdevanje vodom?	300
7.1.2.1. Transport vode kroz biljku – akvaporini	301
7.1.2.2. Ekspresija gena za akvaporine i snabdevanje vodom	303
7.2. Poboljšanje hranljive vrednosti biljnih proizvoda	305
7.2.1. Modifikacije sastava biljnih proteina	306
7.2.1.1. Rezervni biljni proteini	306
7.2.2. Modifikacije u metabolizmu ugljenih hidrata	311
7.2.2.1. Rezervni polisaharidi	312
7.2.2.2. Transgene biljke sa povećanom količinom skroba	316
7.2.2.3. Odnos amiloze i amilopektina u skrobu	318
7.2.2.4. Biosinteza fruktana – proširenje na „skrobne“ biljke	320
7.2.3. Biosinteza vrlo dugačkih omega masnih kiselina sa poli-nezasićenim lancem	323
7.2.4. Biosinteza vitamina i akumulacija mikroelemenata	330
7.2.4.1. „Zlatni pirinač“	330
7.2.4.2. Metaboličko inženjerstvo: biosinteza vitamina E	338
Sažetak	347
Literatura 7	348

8. Za ili protiv GM biljaka: nada ili strah	357
JOVANKA MILJUŠ ĐUKIĆ	
8.1. Zakonska regulativa o GMO	358
8.1.1. Zakonska regulativa o GMO u Evropskoj uniji (EU)	358
8.1.2. Zakon o GMO u Srbiji	364
8.1.3. Zakon o GMO u Ruskoj Federaciji	366
8.1.4. Kakav je zakon o GMO u SAD?	366
8.1.5. Južna Amerika i GMO	367
8.1.6. Kako se to radi na Istoku u Japanu, Kini i Indiji?	368
8.2. Kako GM hrana utiče na zdravlje ljudi, životinja i životnu sredinu?	373
8.3. Primeri za druge primene genetičkog inženjerstva	380
8.4. Nada i/ili strah.	383
8.4.1. „Zlatni pirinač“	383
8.4.2. Šta se desi kad poljoprivredni proizvođači spontano prihvate GMO?	385
8.4.3. Kako reaguje javnost?.	387
Zaključak	388
Literatura 8	390
Prilozi	393

Evucija i genetičke modifikacije

Mirjana Nešković

Theodosius Dobzhansky [1] je svojevremeno napisao: „*Ako se posmatra u svetlu evolucije, biologija možda predstavlja intelektualno najpotpuniju i najinspirativniju nauku. Bez te svetlosti, ona sadrži mnoštvo činjenica, od kojih su neke zanimljive ili čudne, ali se iz njih ne može shvatiti smisljena slika celine.*“

Ako se posmatraju u svetlu evolucije, **genetičke modifikacije**, kojima su na određeni način podvrgnuta sva živa bića, mogu se u širem smislu shvatiti kao pojave koje su se dešavale u prirodi tokom cele organske evolucije, a dešavaju se i danas. One obuhvataju raznovrsne promene osobina – spontane ili izazvane spoljašnjim činiocima – od kojih zavisi dalji opstanak ne samo pojedinih vrsta biljaka i životinja nego i celih carstava. Charles Darwin je upotrebljavao termin **poreklo sa modifikacijama** za takve promene (prema [2]), mada nije mogao znati u čemu se modifikacije sastoje. Ipak, smatrao je da one mogu biti korisne ili štetne, i definisao je **prirodno odabiranje** kao objašnjenje za činjenicu da korisne promene obezbeđuju dalji opstanak i razmnožavanje vrste, a štetne imaju suprotne posledice. Tako su **varijabilnost osobinâ živih bića** i **prirodno odabiranje varijanata** prihvaćeni kao osnovni postulati Darwinove teorije.

Poznato je da je, tokom godina, ova teorija izazivala mnoga neslaganja, ali su dalji koraci u razvoju bioloških nauka samo potvrđivali njenu ispravnost.

Prihvatanju Darwinove teorije najviše je doprinela genetika, a kasnije i molekularna biologija, čija su dostignuća definitivno ukazala na način kojim se varijabilnost stiče, kao i na način kojim se korisne osobine održavaju i prenose na potomstvo. Iako se molekularna biologija sredinom 20. veka razvijala nezavisno od tekućih rasprava o teoriji evolucije, ona je pružila ključne dokaze za Darwinovu teoriju, dokaze koji su Darwinu, u njegovo vreme, bili nedostupni. Članak Theodosiusa Dobzhanskog, iz kojeg je uzet citat, ukazuje na dodirne tačke između teorije evolucije i molekularne biologije. Za razliku od faktora koji indukuju varijabilnost u prirodi, savremeni istraživači kreiraju genetičku raznovrsnost različitim eksperimentalnim putevima, a za verifikaciju postignutih rezultata, umesto prirodnog odabiranja, koriste sofisticirana tehnološka dostignuća prirodnih nauka. Pomoću takvih postupaka istraživači na veštački način dostižu rezultate kakve je donela i evolucija: oni doprinose poboljšanju osobina živih bića, koje su za čoveka – sa različitim aspektata – najkorisnije. Analiza koncepcije i dosadašnjih rezultata genetičkog inženjerstva (dobijeni **genetički modifikovani organizmi – GMO**) pokazuje da se ova grana nauke u svetlosti teorije evolucije potpuno uklapa u prirodni okvir bioloških pojava koje je opisao Darwin. Jedna od ideja koje se zastupaju u ovoj knjizi jeste ta da **genetičko inženjerstvo ne donosi konceptijski ništa novo što već nije u prirodi ostvareno**. Pritom se koriste sredstva i metode moderne nauke, kojima se željeni rezultati postižu sa mnogo većom preciznošću i za nemerljivo kraće vreme. Prema tome, genetičko inženjerstvo, pored svih mogućih nedostataka i potreba za usavršavanjem, nije potpuno nova naučna oblast koja u život ljudi i drugih živih bića unosi neprirodne, ili čak protivprirodne elemente, kao što se često tvrdi.

Jedna od činjenica koje izazivaju odbojnost ne-biologa jeste univerzalnost genetičkih modifikacija, odnosno mogućnost da se geni iz jednih organizama prenose u druge, sasvim različite, na primer u trouglu bakterije ↔ biljke ↔ životinje. Među biolozima ta činjenica ne izaziva otpor, jer imaju na umu zajedničko poreklo živih bića i sličnosti koje među svim organizmima postoje. Odbijanje ideje o zajedničkom poreklu može biti razumljivo ako se porede spoljašnji izgledi biljaka i životinja, ili oblici njihovih organa, ili načini života. Ako se, međutim, razmatranje usmeri na suštinske karakteristike života na molekularnom i ćelijskom nivou, naći će se među živim bićima znatno više sličnosti nego razlika. Ukoliko se više podataka otkriva o postanku života i prvim etapama evolucije, utoliko je prihvatljivija ideja o zajedničkom poreklu i o razlikama koje su rezultat kasnije divergencije tokom evolucije.

Smatra se da je planeta Zemlja stara oko četiri i po milijarde godina i da je nekoliko stotina miliona godina bilo potrebno da se ona ohladi. Tokom prvih 500–700 miliona, Zemlja je bila izložena jakim udarima nebeskih tela, što nisu bili povoljni uslovi za postanak i održanje života kakav mi danas poznajemo. Na osnovu podataka o biološkoj fiksaciji ugljen-dioksida, većina istraživača danas prihvata mišljenje da se prvim prethodnicima života mogu smatrati jedinjenja koja su bila izgrađena 3,8 milijardi godina pre današnjeg vremena. U njihov sastav ušli su elementi – sastojci Zemljine magme, okeana i atmosfere. O tome su održana tri značajna naučna skupa u Londonu, 2006, 2011. i 2013. godine, sa ciljem da se razmotre činjenice koje su utvrdili naučnici različitih disciplina, da se uporede prihvatljive hipoteze o sintezi biogenih neorganskih i organskih jedinjenja, odnosno jedinjenja koja su ušla u sastav „hemije života“, kao i o njihovoj tranziciji u primitivne forme života. Kao što je formulisao jedan od učesnika, ipak se nije postavljalo pitanje „Da li je to način kojim je nastao život?“, nego „Da li je život mogao nastati na taj način?“ Sa pozitivnim odgovorima na većinu

pojediniosti o tom procesu, opšte je mišljenje učesnika skupova da smo se približili objašnjenju kako je život nastao, mada se striktni dokazi verovatno neće skoro pronaći. Predavanja i diskusije objavljeni su u nizu članaka [3, 4, 5] iz kojih su podaci u ovom poglavlju naše knjige većinom preuzeti. Iz kasnijih članaka mnogih autora, koji su takođe prikazani, može se proceniti koliki je napredak za kratko vreme ostvaren.

1.1. Hipoteze o prvim koracima evolucije

1.1.1. Univerzalni prethodnik života

Na pitanje gde su se na Zemlji pojavili prekursori prvih biotičkih sistema, većina istraživača smatra da su geohemijsku nišu za takve procese činili posebni **alkalni hidrotermalni otvori** na dnu okeana (eng.: „hydrothermal vents“), na mestima gde magma nije bila na velikoj dubini ispod dna. Sastojci magme, koji su izlazili kroz te otvore, sjedinjavali su se sa vulkanskim isparenjima koja su bila rastvorena u okeanskoj vodi. Magma je imala temperaturu oko 100 °C, bila je vrlo bogata hemijskim elementima, sa alkalnom pH vrednošću (pH 9-11), ali je pri geološkim transformacijama (pojava serpentinita) ta sredina sticala i velike količine vodonika (H₂). Okean je imao oko 60 °C, sa pH vrednošću oko 6, usled visoke količine rastvorenog ugljen-dioksida (CO₂) i monoksida (CO), poreklom od vulkanskih isparenja. Kroz hidrotermalne otvore bio je uspostavljen **gradijent temperature, pH i redoks potencijala** između magme i okeana. Takva mesta na dnu okeana bila su daleko od gornjih slojeva planete, izloženih ultraljubičastom zračenju, kao i burnim temperaturnim promenama, uglavnom usled sudara planete sa meteoritima i asteroidima. Prema mišljenju mnogih naučnika [6, 7, 8], voda se zagrevala u blizini magme i rastvarala mnoga mineralna jedinjenja. Na izlazu iz toplih izvora, redukovane sumporne soli iz magme i oksidovano gvožđe (Fe II) iz okeanske vode gradili su precipitat, koji je imao poroznu

strukturu, sa šupljim odeljcima u obliku kanala i mehurova, veličine <1 do 100 μm . Unutrašnjost odeljaka postala je zaštićeno mesto za hemijske reakcije, a pregrade između njih sprečavale su izlazak reaktanata u okolnu vodu. Daljim nagomilavanjem sulfida gvožđa nastaje čvrsta struktura, za koju mnogi autori smatraju da je mesto u okviru koga su se pojavila prva organska jedinjenja. Taj period u razvoju Zemlje nazvan je **svet-gvožđa-i-sumpora** (eng.: „iron-sulphur-world“) [9], a struktura koja je time nastala označena je kao **pionirski organizam**. Pionirski organizam predstavlja neorgansku, prebiotsku **substrukturu**, nazvanu takođe i **univerzalni prethodnik života**. U njegovom sastavu nalazili su se, osim gvožđa, i centri drugih tranzicionih metala, kao nikla, zatim kobalta, mangana, molibdena, bakra, cinka – koji su još uvek rasprostranjeni kao katalizatori hemijskih reakcija u savremenim organizmima. Svi ovi procesi pripadaju **geohemijskoj fazi** u evoluciji Zemlje, u kojoj je izgrađena prebiotska osnova za postanak živih bića.

Prilog 1.1. Današnja znanja o podmorskim hidrotermalnim otvorima

Tragovi geohemijskih primarnih procesa i danas se mogu naći kao hidrotermalni otvori, slični onima koji su postojali u vreme kada je život nastao. Oni su geološki slični arhaičnim hidrotermalnim sistemima, ali se po hemijskom sastavu upadljivo razlikuju. Pošto su još uvek najvažniji izvori gasova i rastvorenih mineralnih soli u svim savremenim okeanima, oni čine stanište gustih kolonija različitih mikroorganizama. Na njih je, međutim, sa gledišta postanka života, prvi put obraćena pažnja oko 1980. godine. Neki od njih, okruženi magmom na 1200 °C, nazvani su „crni dimnjaci“ (eng.: „black smokers“); njihov izliv ima temperaturu ~ 350 °C, pH 1-2 i bogat je vodonik-sulfidom i metalima, ali sa vrlo malo vodonika. Na drugim mestima nađeni su „beli dimnjaci“ (eng.: „white smokers“), sa nešto nižom temperaturom

i različitim sastavom tečnosti koju izbacuju. Ali ni jedni ni drugi nisu mogli podržati formiranje „univerzalnog prethodnika života“ zbog visoke temperature i drugih nepovoljnih uslova [10].

Deborah Kelley i saradnici [11] su pored grebena Atlantskog okeana koji se pruža u pravcu sever–jug, na 30° severne geografske širine i na dubini od oko 800 m, opisali strukturu poznatu kao „Izgubljeni gradovi“ (eng.: „Lost Cities“). Kasnije je pronađeno oko 40 sličnih mesta na okeanskim grebenima u Atlantskom, Indijskom i Arktičkom okeanu. Oni nisu vulkanskog porekla i tlo ispod njih bilo je podvrgnuto različitim metamorfozama mineralnog sastava (npr. **serpentinizaciji**), koje su dovele do formiranja različitih vrsta stena [12]. Do serpentinizacije je dolazilo u vodi koja je sadržala veće koncentracije minerala **olivina**, koji se pretvarao u **serpentin**, a pritom je u znatnoj količini generisan vodonik. U isto vreme dolazilo je do mešanja tečnosti sa hladnijom vodom okeana i do velikog sniženja temperature i promene pH. U analizi tečnosti koju i danas izbacuje hidrotermalni sistem na serpentinitu blizu mesta Lost City, u alkalnom rastvoru je nađen vodonik, kao i proizvedeni metan, tragovi acetata, format, kratki ugljovodonici, i dr. Smatra se da su na toj specifičnoj geohemijskoj podlozi [13, 14] mogli nastati **alkalni hidrotermalni otvori**, koji su bili mesto postanka života. Reakcije za koje se pretpostavlja da su bile ključne u formiranju hidrotermalnih humki, moguće je ponoviti u simuliranim laboratorijskim uslovima [8].

Drugu fazu u evoluciji čini prelaz iz geohemijske u **biohemijsku fazu**. Okeanska voda sadržala je, osim ugljenikovih oksida, mnoga isparljiva jedinjenja koja su izlazila iz vulkana, kao što su sumpor, sumpor-vodonik, vodonik-peroksid, OH-jon, amonijak, metan, cijanovodonik, fosforni oksi-

di. Pomoću brojnih metalnih katalizatora unutar odeljaka, ligandi iz okeanske vode sjedinjavali su se sa jedinjenjima substrukture i izgradili **superstrukturu** pionirskog organizma. Na izgrađenoj superstrukturi, dolazilo je do **fiksacije ugljenika** iz okeana; ugljenični lanci su činili osnovu organskih biogenih jedinjenja male molekulske mase. To je bio oblik **pionirskog metabolizma**, proces u kome je redoks kapacitet substrukture korišćen za redukciju CO_2 , danas poznat kao **hemoautotrofija**. Stalnim protokom tople vode kroz hidrotermalne kanale, novonastala jedinjenja su **reprodukovana** pomoću autokatalitičkog mehanizma, što je izazivalo **uvećavanje** superstrukture. Najzad, u povratnim reakcijama dolazilo je prirodno do varijacija, što se može smatrati pretečom varijabilnosti na kojoj se zasniva biološka **evolucija**. I danas se smatra da su **metabolizam, rastenje, reprodukcija i evolucija** glavne karakteristike živih bića. Te karakteristike se, prema tome, mogu prepoznati već i na prebiotskoj strukturi, koja je, još uvek, daleko od slobodnih živih bića. S obzirom na to da su iz takve jedinствене tvorevine nastala **raznolika** živa bića, ona je nazvana **Poslednji univerzalni zajednički predak** (eng.: „Last Universal Common Ancestor – LUCA“) svih ćelija.

1.1.2. Ugljenik i vodonik – gradivni elementi organskih jedinjenja

Iz izlaganja u prethodnom odeljku proizlazi da su prva organska jedinjenja nastala spajanjem ugljen-dioksida i vodonika, koji su dolazili u kontakt kroz postojeći hidrotermalni sistem. Redukcija CO_2 pomoću elektrona iz H_2 sigurno nikoga nije začudila, jer je to i danas, putem fotosinteze ili hemosinteze, **jedini način konverzije neorganskog ugljenika u organski**. Ako je za sumpor i gvožđe rečeno da su osnovni elementi od kojih je nastala neorganska osnova živih bića, za ugljenik i vodonik se može reći da predstavljaju gradivne elemente organskih jedinjenja iz perioda nastanka

života na Zemlji. Ima više logičkih potvrda za te činjenice. Prvo, ugljenik je u obliku ugljen-dioksida i ugljen-monoksida bio najobilniji rastvoreni sastojak vulkanskih isparenja u primarnom okeanu – bilo ga je 1000 puta više nego danas – a vodonik je u sastavu serpentinita takođe bio vrlo obilan. Drugo, atomi ugljenika imaju sposobnost da lančanim povezivanjem izgrade kraću ili dužu strukturu, kakva čini osnovu svih organskih jedinjenja. Uz vodonik, koji je vezan za atome ugljenika, dalje se vezuju i elementi kao azot, fosfor, sumpor i drugi, koji su sastavni delovi mnogih važnih organskih jedinjenja neophodnih za život. Danas se u toj skupini nalazi još nekoliko elemenata, koji funkcionišu kao katalizatori ili kofaktori enzimskih reakcija. Odavno je postavljeno pitanje kako su sve te supstance dolazile u kontakt u okeanskoj vodi, u kojoj su činile vrlo razređen rastvor; većina istraživača daje odgovor da su one morale biti zatvorene i koncentrovane u nekim vrlo malim prostorima. To su **mogli biti odeljci LUCA**, univerzalnog prethodnika života, ograničeni ferosulfidnom „membranom“ kroz koju supstance nisu mogle izaći u okolnu vodu. U tom „hidrotermalnom reaktoru“ nakupljali su se gradivni blokovi jedinjenja, razni metaboliti, aminokiseline i saharidi do koncentracije dovoljne da se obrazuje sistem za polimerizaciju i autoreplikaciju. Postojanje takve „prebiotske supe“ prihvatili su mnogi istraživači 19. i sa početka 20. veka. Pomenućemo samo one istraživače i teorije koji su imali veći i presudniji uticaj na njihove sledbenike.

U skladu sa svojom teorijom o evoluciji živog sveta, Darwin je izražavao naučna shvatanja i o njegovom postanku [15], ali se nije time posebno bavio, jer za to nisu postojali uslovi u okvirima tadašnjeg naučnog znanja i tehnologije. Kao i mnogi drugi, Darwin je pretpostavio da je život nastao „u maloj, toploj bari“, koja je sadržala azotna i fosforna jedinjenja, a ulogu katalizatora je pripisao svetlosti ili električnim pražnjenjima u atmosferi. Na osnovu znatno boljeg poznavanja biohemije, Александр Опарин [16, 17] je

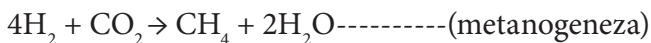
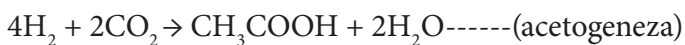
pretpostavio pojavu „koacervata“, koloidnih kapljica, u kojima se događao razvoj organskih materija sve do proteina, koji su mogli biti osnova za pojavu živih bića. Jasno je da je i njegova hipoteza imala krupnih nedostataka u odnosu na znanja savremene hemije, ali je ipak bila korak napred u odnosu na ranije istraživače, makar i time što je predložila racionalnu biohemijску i idejnu osnovu. Najzad, J.B.S. Haldane [18] je takođe pretpostavio formiranje primordijalne smeše u kojoj su od metana, amonijaka i vode, pod uticajem UV zračenja, proizvedene prve organske materije u okeanu. One su s vremenom postajale sve koncentrovane, dok se nisu formirali makromolekuli i na kraju partikule veličine virusa, sposobne za neku vrstu života. Iako su Stanley Miller i saradnici uspešno izveli u laboratorijskim uslovima simulaciju nekih hemijskih reakcija [19] koje su mogle biti uključene u postanak takvih jedinjenja, nedostatak svih sličnih hipoteza u tome je što ne sadrže rešenja za poreklo energije koja je neophodna za održavanje metabolizma. Ispitivane smeše bile su homogene u pogledu pH i redoks potencijala, drugim rečima bile su u termodinamičkoj ravnoteži, što nije moglo da podrži progres u sintetičkim procesima. Električno pražnjenje ili blesak munje kratkotrajne su pojave koje nisu mogle imati trajno dejstvo potrebno za održanje kontinuiteta života. Tako hipoteze o postanku organskih materija putem sinteze „iz primordijalne tople supe“ danas uglavnom imaju samo istorijski značaj i teško mogu biti prihvaćene.

U jednom od najnovijih radova [5] stoji napisano: „*Ako ništa u biologiji nema smisla osim u svetlu evolucije, ništa u evoluciji nema smisla osim u svetlu energetike*“. U svim životnim pojavama skopčani su **egzergoni procesi**, koji oslobađaju energiju, sa **endergonim**, koji tu energiju koriste. Svim živim bićima je za održanje života neophodan fluks energije. Jedna egzergona reakcija uključuje prenošenje elektrona sa H_2 na CO_2 , što predstavlja hemijski proces koji omogućava formiranje i razgradnju visokoenergetskih hemijskih veza u tioestrinima (acetyl-CoA) i u fosfatnim

anhidridima (ATP). Povezivanje transporta elektrona sa nekom drugom hemijskom reakcijom osnova je **hemiosmotske** teorije [20], po kojoj je u današnjim ćelijama **protonska motorna sila** glavni pokretač metaboličkih procesa. Po Mitchellu, oksidacioni procesi u ćeliji uspostavljaju gradijent protona na dvema stranama membrane, usled koga se ostvaruje sinteza adenzintrifosfata (ATP); pomoću enzima ATPaza, ATP se hidrolizuje na **adenozindifosfat** i **neorganski fosfat**, prema jednačini: $ATP \leftrightarrow ADP + Pi$. U tom procesu se oslobađa fosfat, a egzergona energija hidrolize koristi se kao „motorna pokretačka sila“ za druge reakcije kojima je potrebna.

Proces sličan hemiosmozi mogao se događati i u hidrotermalnim otvorima, u vreme nastanka života. Hidrotermalni otvori obezbeđuju stalni, održivi izvor hemijske energije, na osnovu H_2/CO_2 hemijskog potencijala. Ova dva molekula, međutim, ne stupaju u reakciju spontano, nego je za to potreban neki katalizator. U zidu odeljaka, u „ćelijama“ **LUCA**, nalaze se katalizatori koje gradi sumpor u strukturi sa metalima, najčešće sa niklom i gvožđem. Nick Lane i saradnici [14], kao i William Martin i Michael Russell [7] zastupaju mišljenje da je hemiosmoza ostvarena između kiselog okeana i alkalne sredine „ćelija“ **LUCA**. Velika je razlika, međutim, u tome, što današnje ćelije same sintetišu svoj ATP, a „ćelije“ **LUCA** su koristile vodonik **iz okolne vode** i prenosile elektrone na CO_2 .

Mogući procesi, u kojima je H_2 donor elektrona za redukciju CO_2 , jesu **acetogeneza** i **metanogeneza**. Ukupne formule reakcija su sledeće:



Mikroorganizmi koji koriste ove procese dele se na **acetogene** i **metanogene**. Acetat i metan su verovatno prva organska jedinjenja, a pri prenošenju elektrona sa vodonika na ugljen-dioksid oslobođena energija omogućava sintezu drugih jedinjenja. Po mišljenju Russella, u daljim fazama evolucije postali su različiti mikroorganizmi: acetatnim putem nastali su oni iz domena Bacteria, a metanogeni put vodi ka domenu Archaea. To bi bila prva bifurkacija u evoluciji, koja se desila još na prebiotskom stupnju.

Prilog 1.2. Wood-Ljungdahlov put

Među mogućim putevima redukcije CO₂, Martin i Russell [21] su skloni da prihvate Wood-Ljungdahlov put preko acetil-koenzima A (acetyl-CoA), otkrivenog kod nekih današnjih prokariota. Ima više razloga za to mišljenje: (a) Prema raspoloživim podacima, taj put je verovatno hronološki najstariji; on se nalazi kod anaeroba i ekstremofilnih mikroorganizama, zatim kod bakterija i arhea, što pokazuje da su ga oni morali naslediti od svog zajedničkog pretka. To su, pretpostavlja se, najstariji organizmi na Zemlji. (b) Tim putem se i danas katalizuje karboksilacija kod nekih prokariota, pomoću enzima ugljen-monoksid dehidrogenaze i acetyl-CoA sintaze, koji u sebi sadrže katalizatorske centre FeS i Fe₂NiS₅. Treba napomenuti da je kod današnjih bakterija glavni proizvod karboksilacije acetyl-CoA, dok su se kod prvobitnih „ćelija“ možda nalazili jednostavniji tioestri, ali ipak sposobni da oslobode energiju potrebnu za neki drugi proces. (c) Biohemijski razlog je taj što je reakcija visokoegzergona, pa ima više izgleda da se dogodi nego neke druge reakcije. Razlaganje tioestarske veze oslobađa energiju za sintezu ATP, što je glavna prednost Wood-Ljungdahlovog puta u odnosu na druge poznate puteve.

U već pomenutom članku [21] detaljno se razmatraju i procesi koji su se mogli dogoditi posle fiksacije CO₂ i formiranja acetil-CoA. Nema sigurnih dokaza da su biohemijski procesi prvih organizama bili istovetni današnjim; na primer, u ranoj biohemiji nisu postojali enzimi kao katalizatori, koji su uključeni u sinteze organskih jedinjenja. Tada su, međutim, bili obilni mnogi neorganski katalizatori, koji su bili znatno manje efikasni, ali su ipak posredovali u mnogim reakcijama. Treba uzeti u obzir i povišenu temperaturu i pritisak u hidrotermalnim sistemima, koji su mogli pozitivno uticati na hemijske procese. Prema današnjim saznanjima izgleda da opisani procesi počev od hidrotermalnih otvora do konverzije neorganskog ugljenika u organski, predstavljaju koherentnu moguću shemu o postanku života i o početku biohemijske faze evolucije.

1.1.3. Postanak makromolekula u atmosferi?

Za razliku od većine naučnika koji terestrijalnu hipotezu o hidrotermalnom sistemu – sa manjim ili većim izmenama – prihvataju, ima mišljenja da su prvobitne organske supstance mogle nastati i u atmosferi [22]. Interstelarni prostor sadrži više od 120 organskih jedinjenja. Zbog jednog poremećaja u kretanju Jupitera pretpostavlja se da je Zemlja sve do pre 3,8 milijardi godina bila izložena bombardovanju asteroida i meteorita, koji su u sudaru sa Zemljom uništavali sve prebiotske organske materije na njoj – ako su uopšte postojale. U sudarima su takođe izbacivani u orbitu oko Zemlje asteroidi sa organskim materijalom, koji je mogao opstati zamrznut u tom prostoru i do 10⁸ godina. Kada se tlo Zemlje smirilo, asteroidi su padali nazad usled gravitacije, gde su se našli pogodni uslovi za obnavljanje organskih jedinjenja. U tome je od najvećeg značaja bio **montmorilonit**, mineralni katalizator koji nastaje vlaženjem vulkanskog pepela. Montmorilonit je i danas obilan ne samo na Zemlji nego i na Marsu, a katalizira polimerizaciju nekih organskih jedinjenja; to su prven-

stveno nukleinske kiseline čiji polimeri, pod dejstvom montmorilonita, mogu sadržati od dva do 50 povezanih monomera. Ove ideje se ne mogu smatrati opšteprihvaćenim, ali ljudi razmišljaju o doprinosu atmosferskih padavina razvoju života na Zemlji. U vezi sa postankom makromolekula u atmosferi, ostaje otvoreno pitanje njihove koncentracije. Organske supstance koje su, eventualno, sa asteroidima padale na Zemlju, dospevale su u ogromni okean u kome su bile vrlo razređene, što je sasvim različito od uslova oko hidrotermalnih otvora na dnu okena.

Danas se sa sigurnošću tvrdi da su prvo nastali kompleksi ribonukleinskih kiselina (RNK), zbog čega se taj period naziva **RNK-svet** (svet ribonukleinskih kiselina), a zatim su nastali **proteini** i dezoksiribonukleinska kiselina (**DNK**). RNK su izgradile genetički kod; osim reprodukcije, RNK su imale i sposobnost katalizatora („ribozimi“) koji su doprineli izgradnji sličnih polimera. U kasnijoj evoluciji, RNK su prenele svojstva održavanja genetičkog koda na DNK, a preuzele funkciju izgradnje proteina.

1.2. Postanak prvih ćelija

Prve ćelije koje su slobodno živele nađene su u geološkim slojevima čija se starost procenjuje na oko tri i po milijarde godina. To su bili mikrofosili u naslagama serpentinita (npr. na Grenlandu). Ovi fosili su, razume se, bili bezjedarni, jednoćelijski i dugo su u biologiji klasifikovani samo kao **prokarioti**, za razliku od **eukariota**, koji imaju **jedro**. Kada su, međutim, sedamdesetih godina dvadesetog veka u istraživanjima „prokariota“ primenjene i metode molekularne biologije, koje uključuju, pre svega, sekvenciranje genoma [23], otkriveno je da se među današnjim naslednicima fosila iz ranog stadijuma evolucije razlikuju ne dve nego tri grupe organizama. Prema sada već uglavnom usvojenom predlogu [24] mnogi taksonomi ne koriste više termin „**carstva**“ (prokariota i eukariota) nego termin „**domeni**“. Po tom predlogu, dva prvobitna

domena su **Archaea (Archaeobacteria)** i **Bacteria (Eubacteria)**, a oba pripadaju prokariotima. Treći domen čine **Eukarya**, koji osim jednoćelijskih organizama, obuhvata višećelijske **gljive (Fungi)**, **biljke (Plantae)** i **životinje (Animalia)**, sve organizme do tada označene kao Eukaryota. Archaea i Bacteria se među sobom morfološki teško razlikuju, ali među njima postoje bitne razlike u metaboličkim procesima i u genetičkom aparatu.

Pitanje koje ni do danas nije dobilo pouzdan odgovor, odnosi se na način kojim su od odeljaka „univerzalnog prethodnika života“ postala živa bića. Pitanje je povezano i sa tim kakva je priroda prekursora od kojeg su ćelije postale. Po mišljenju verovatno većine naučnika, „poslednji univerzalni predak“ pod nazivom **LUCA**, nije bio skup živih ćelija, nego zajednica odeljaka, čija je aktivnost bila svedena na prebiotsku sintezu ćelijskih sastojaka. Mnogi naučnici, takođe, smatraju da su „ćelije“ **LUCA** najpre evoluirale u neki prelazni oblik, kao „pre-ćelije“ [25] ili „pro-genoti“ [26], koji su već tada bili diferencirani i proizveli pretke dva prokariotska domena. Pitanje ni do danas nije dobilo nespornan odgovor.

1.2.1. Hipoteza o pre-ćelijama

O prelazu između univerzalnog prekursora života i pravih ćelija interesantnu hipotezu je formulisao O. Kandler [25]. Po njegovom mišljenju, obrazovanje ferosulfidnih odeljaka predstavlja prvu fazu evolucije. U drugoj fazi, u kojoj su i odeljci evoluirali u pogledu svog sastava – na primer, izgradili su nukleinske kiseline i oligopeptide – on je za njih predložio naziv „**pre-ćelije**“ (eng.: „pre-cells“). Pre-ćelije je definisao kao „*metaboličke, samoreproducibilne entitete koji imaju većinu osnovnih svojstava ćelije, ali su nesposobni da ograniče čestu međusobnu razmenu svojih genetičkih informacija*“. Prema tome, one su nepotpune ćelije, pošto nemaju u današnjem smislu funkcionalnu, semipermeabilnu ćelijsku membranu.

Prilog 1.3. Izgradnja lipida

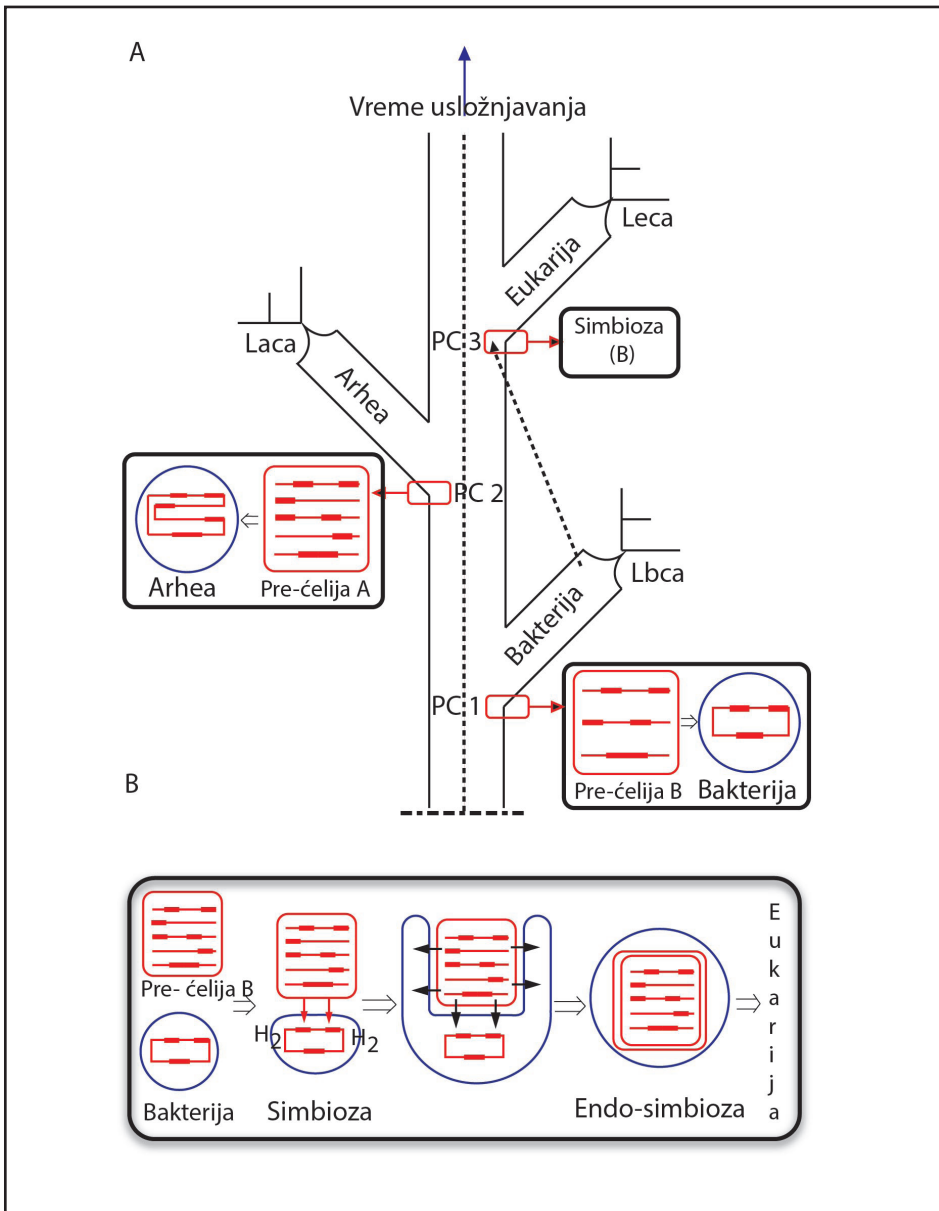
Pre-ćelije su stekle stabilnost kada su se u njima počeli izgrađivati **lipidi**. Slojevi lipida su zauzimali prostor oko sadržaja pre-ćelija, između njih i njihovog neorganskog zida. Opstajale su verovatno one pre-ćelije koje su imale kompatibilne sastavne delove i bile najbolje prilagođene za preživljavanje u određenoj sredini.

Lipidi koji su imali važnu ulogu u evoluciji, bili su vrlo slični lipidima današnjih biljaka. Svi su oni bili estri glicerol fosfata, koji nose dva hidrofobna lanca masnih kiselina [25]. Međutim, u domenima Bacteria i Eukarya nalazio se **glicerol-3-fosfat**, a u Archaea **glicerol-1-fosfat**; izuzetaka od ovog pravila uopšte nije bilo, a ni jedna linija nije imala obe varijante lipida. Osim toga, masne kiseline Bacteria i Eukarya izgrađene su putem acetil-CoA / CO₂, a masne kiseline Archaea su izoprenoidni derivati. Razlika između ove dve grupe lipida pojavljuje se već na prvom stupnju njihove sinteze i održava se do današnjih organizama; razlike su još učvršćene kada su formirani ćelijski zidovi, koji se takođe bitno razlikuju.

Naime, prvobitna populacija pre-ćelija bila je mozaičnog sastava. U njoj su se nalazile subpopulacije sa sasvim različitim, među sobom antagonističkim sistemima: na primer, subpopulacije su mogle biti autotrofne ili heterotrofne, anaerobne ili mikroaerofilne, proizvođači ili potrošači H₂ itd. One su, dakle, bile „**multifenotipske**“, a živele su ili na odvojenim staništima, ili su činile konglomerat. Među pre-ćelijama bile su vrlo česte fuzije i fisije, pri čemu je dolazilo do razmene funkcionalnih kompleksa, uključujući i razmenu genskih segmenata koji su te komplekse kodirali. Ako su pojedini segmenti imali suprotne, antagonističke funkcije, takva se pre-ćelija kao celina nije mogla održati. Razmena genskih segmenata

imala je vrlo važnu funkciju u evoluciji, a treba naglasiti da tu funkciju isto tako imaju i savremeni organizmi. Ta funkcija je u genetici označena kao **horizontalni (ili lateralni) transfer gena**.

Drugu fazu evolucije (posle formiranja odeljaka univerzalnog prethodnika) Kandler predstavlja u vidu „evolucionog stabla“ sastavljenog od pre-ćelija (**Slika 1.1**), od koga se tokom rastejanja stabla odvajaju, kao grane, tri posebna domena [25]. Na prvom stupnju (PC-1) odvojile su se pre-ćelije B, koje su izgradile karakterističnu lipidnu membranu sa glicerol-3-fosfatom i postale **prvi zajednički predak svih Bacteria** (proto-bacteria), a nastavile su da evoluiraju nezavisno od drugog pre-ćelijskog stabla (**Slika 1.1A**). Na drugom stupnju (PC-2) odvojile su se u posebnu granu A one pre-ćelije, kod kojih su se pojavili enzimi za sintezu lipida sa glicerol-1-fosfatom, i tako postale **prvi zajednički predak Archaea** (proto-archaea). Grane B i A nastavile su nezavisnu evoluciju, kao subpopulacija B i subpopulacija A. Kandler smatra da su tim načinom postali domeni Bacteria i Archaea. Daljim tokom evolucije kod organizama ovih domena razvili su se i metabolički sistemi među kojima postoje velike razlike, ali i sličnosti. Razlike su nastale tokom nezavisne evolucije dva prokariotska domena, a sličnosti su posledica zajedničkog porekla brojnih molekulskih interakcija u metaboličkim procesima, ali i horizontalnog transfera gena. Prema Kandleru, treći stupanj evolucije ćelije (PC-3) podrazumevao je fuziju između postojećih pre-ćelija i bakterija. On je smatrao da je iz te fuzije nastalo jedro nekog pre-eukariotskog ćelijskog sistema, od koga je nadalje evoluirao domen Eukarya (**Slika 1.1B**). Ovaj model nastanka eukariotske ćelije, u kome se simbioza dešava između bakterijske ćelije i nekog pre-ćelijskog oblika, podrazumeva da su eukarioti stekli jedro pre drugih ćelijskih organela, što još uvek nije prihvaćeno mišljenje.



Slika 1.1. Evoluciono stablo i nastanak Eukarya (modifikovano uz dozvolu autora prema *Wächtershäuser G, 2003 [25]*)

1.2.2. Postanak jedra i ćelijskih organela

Sve do postanka višćelijskih organizama, živi svet na Zemlji sastojao se od jednoćelijskih organizama tri domena. U okviru svakog domena došlo je do nastanka brojnih vrsta. Bacteria i Archaea su do danas ostali jednoćelijski, a Eukarya su jedini domen u kome su nastali i višćelijski organizmi. Osim jedra, Eukarya se odlikuju unutrašnjim endomembranskim sistemom u ćelijama i mnogim drugim osobinama, kao i prisustvom energetskih ćelijskih organela, **mitohondrija** i **plastida**.

Pošto organele Eukarya imaju sopstvenu DNK, još je početkom dvadesetog veka bila predložena ideja da su organele postale **endosimbiozom**, procesom pod kojim se podrazumeva sjedinjavanje dveju ćelija; u tom procesu ćelija-domaćin prima u sebe ćeliju-endosimbionta, i one nastavljaju da žive kao jedan organizam. Ta ideja je definitivno prihvaćena sedamdesetih godina [27]. U relativno jednostavnim ranim predstavama o tom procesu, smatralo se da su postojale dve simbioze u evoluciji. U prvoj, domaćini su bili neki pre-eukariotski organizmi, koji su stupili u simbiozu sa bakterijama koje su slične današnjim α -proteobakterijama. Tokom evolucije, endosimbionti su se razvili u ćelijske organele – **mitohondrije**, a organizmi sa ovim organelama stekli su sposobnost aerobnog disanja. U drugoj simbiozi sada već prave eukariotske ćelije, stupile su u simbiozu sa endosimbiontima **cijanobakterijama**; od cijanobakterija su postali **plastidi**, koji su domaćinu omogućili fotosintezu.

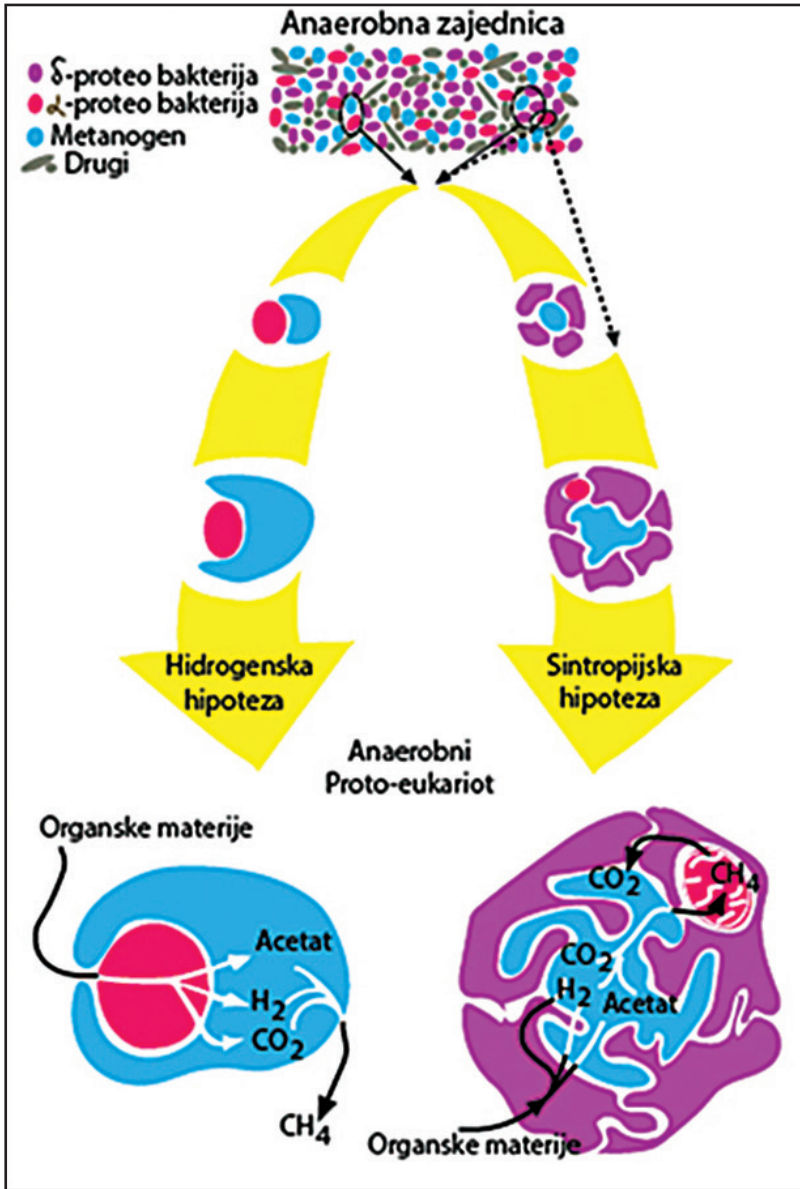
Razume se da su te predstave za četrdeset godina znatno izmenjene i proširene, zahvaljujući novim metodama molekularne biologije, genomike i drugih nauka. Što se tiče **mitohondrija**, iako je osnovna činjenica (simbioza) van svake sumnje tačna, još uvek su pod znakom pitanja identitet i domaćina i endosimbionta. Dileme su se javile na osnovu uporednih ispitivanja ćelijskog jedra, tj. genoma eukariota, sa odgovarajućim elemen-

tima genoma arhea sa jedne, i bakterija sa druge strane. Većina naučnika se slaže da je postanak jedra najzagonetniji događaj u evoluciji. Ne postoji ništa u ćelijama arhea ili bakterija što bi bilo homologno jedru kao celini, niti postoje intermedijerni tipovi ćelija koji bi ukazali na moguće poreklo jedra [28]. Utvrđeno je, međutim, da molekularne osobine informacionih gena eukariota (gena uključenih u replikaciju DNK, transkripciju i translaciju) i njihova ekspresija u opštim crtama mnogo više liči na odgovarajuće strukture arhea nego bakterija. To ukazuje na njihovo poreklo od arhea. S druge strane, operativni geni eukariota, koji su uključeni u metaboličke i biosintetičke procese, sličniji su bakterijskim sistemima, što opet ukazuje da oni potiču od bakterija. Opšte je mišljenje da su eukarioti nasledili i od jednog i od drugog domena prokariota setove različitih osobina, tj. gena.

U prilog takvom događaju zapažena je u poslednje vreme hipoteza o tome da je prva simbioza u evoluciji dovela do postanka ne samo mitohondrija nego istovremeno i jedra. Prema **hidrogenskoj hipotezi** [29] domaćin simbioze bila je arhea, striktno zavisna od vodonika i striktno autotrofna, a endosimbiont anaerobna bakterija (verovatno α -proteobakterija), koja je proizvodila vodonik kao otpadni produkt metabolizma. Ovakva **metabolička simbioza** (ili **sintrofija**) zasnivala se na tome što je ćelija-endosimbiont proizvodila supstancu (H_2) bez koje ćelija-domaćin nije mogla da opstane. S druge strane, domaćin je – kao autotrofna ćelija – proizvodio organska jedinjenja koja su poboljšavala život endosimbionta pod bilo kojim uslovima. To je bio princip na kome se zasnivala selekcija simbiotičke, prve eukariotske ćelije i na kome su eukarioti dalje evoluirali. Pretpostavljeno je da su u početnom stadijumu ove simbioze i endosimbiont i domaćin pretrpeli promene koje su omogućile adaptaciju na promenljive uslove sredine [29]. Bakterija-endosimbiont bila je potencijalno aerobna i počela je da koristi kiseonik za oksidaciju saharida, što je znatno povećalo

proizvodnju ATP. Horizontalnim transferom, tokom rekombinacije dva genoma, u genom domaćina – arhee prešli su bakterijski geni za sintezu membrana; od tih membrana, invaginacijom i vezikulizacijom, formiran je oko genetičkog materijala omotač budućeg jedra i endoplazmatični retikulum. Ovaj model objašnjava zašto eukarioti imaju informacijski aparat u jedru (tj. funkcije replikacije i transkripcije) arhealnog tipa, a membranski i metabolički sistem sličan bakterijskom tipu. U daljoj evoluciji izgrađene su kod eukariota i nove osobine, kojih nema ni kod bakterija ni kod arhea. Iako je hidrogenska hipoteza u prvi mah naišla na opštu pažnju, dalja istraživanja u istom pravcu donela su mnogo više nejasnoća nego objašnjenja. U jednom od radova [30] navodi se čak sedam hipoteza o postanku mitohondrija i jedra. Jedna od hipoteza u okviru sintrofnih modela pretpostavlja da je eukariotska ćelija nastala simbiozom δ -proteobakterija i metanogenih arhea. Za razliku od većine drugih hipoteza koje pretpostavljaju da je eukariotsko jedro formirano *de novo* u citoplazmi arhejskog domaćina (arhee), prema ovoj hipotezi [31] jedro bi bilo ostatak arhejskog partnera (**Slika 1.2**).

Ocenjeno je da o tom pitanju među naučnicima nema ni konsenzusa ni nesumnjivih dokaza koji bi bilo koju hipotezu potvrdili. Jedina vrlo značajna karakteristika mitohondrija s kojom se svi slažu jeste da je njihovo poreklo **monofiletsko**. To znači da potiču samo od jedne vrste endosimbionta čiji su potomci stekli sposobnost razmnožavanja zajedno sa ćelijama domaćinima kod svih današnjih protista, biljaka i životinja. U prilog tome govore podaci da su mitohondrije savremenih biljaka i životinja homologne, pošto sadrže vrlo slične ili identične proteine [32].



Slika 1.2. Dva hipotetička modela nastanka eukariota preko metaboličke simbioze; α - i δ -proteo bakterije pripadaju domenu Bacteria, a Metanogen je predstavnik domena Archaea (modifikovano uz dozvolu autora prema Lopez-Garcia P, Moreira D, 1999 [31])

U drugoj simbiozi, domaćini su bile eukariotske ćelije sa mitohondrijom. Endosimbionti su bile ćelije **cijanobakterija**, anaerobne, ali sa fotosintetičkim pigmentima. Od endosimbionata postali su plastidi **biljaka** sposobni da obavljaju **fotosintezu**. U postanku današnjih plastida nalaze se najmanje tri simbiotička događaja [33, 34]. **Primarna endosimbioza** bila je jedinstven događaj u jednoj liniji heterotrofnih eukariota, predaka **glaukofita, crvenih algi i zelenih algi**; glaukofite su imale samo hlorofil a, crvene alge hlorofil a i fikoeritrin, a zelene alge hlorofile a i b. Od zelenih algi postale su **mahovine, paprati i cvetnice**. Od cijanobakterijskog endosimbionta postali su **primarni plastidi**, koji imaju karakteristične dve membrane. Ćelija–domaćin je postala **autotrofna**. Mnogi istraživači smatraju da se primarna endosimbioza dogodila samo jedanput i da je poreklo ovog simbionta takođe monofiletsko. Sledeći događaj bila je **sekundarna (ili eukariotska) endosimbioza**. U njoj su eukariotske ćelije jedne crvene alge ili zelene alge postale endosimbionti neke druge eukariotske ćelije, noseći sa sobom i primarni plastid. Njihovi plastidi imaju tri ili četiri membrane. Od algi sa sekundarnim plastidima postale su mrke alge i nekoliko drugih evolucionih linija. Među njima se nalazila i jedna mala grupa dinoflagelata, koja je najpre izgubila svog endosimbionta, ali je i taj sekundarni proizvod ušao u treću heterotrofnu ćeliju, čime je ostvarena **tercijarna endosimbioza**. Dalja sudbina tih endosimbionata bila je različita. Od sekundarnih i tercijarnih endosimbionata postale su druge linije algi; njihovi plastidi prepoznaju se po tome što imaju tri ili četiri dodatne membrane. Neki od njih su izgubili hlorofil i vratili se heterotrofnom načinu života. Drugi su postali patogeni, kao na primer, uzročnik malarije.

1.3. Kakvu vezu vidimo između postanka života i genetičkih modifikacija?

Simbioze u kojima su nastale mitohondrije i plastidi sastoje se ne samo u fizičkom spajanju različitih ćelija nego i u njihovoj funkcionalnoj organizaciji u jedinstveni organizam. Preci životinja su u simbiozi stekli dva genoma, jedan od domaćina, a drugi od endosimbionta. Preci biljaka su stekli tri genoma, od kojih je jedan pripadao domaćinu, drugi aerobnom simbiontu, a treći cijanobakteriji. Time se u svakom organizmu pojavio povećan broj hromozoma od kojih su mnogi imali udvostručenu funkciju i postali nepotrebni. Zapaženo je kod svih mitohondrija i plastida da sadrže samo mali broj od gena koje su imali kao slobodne bakterije. Iako je broj gena redukovan, proteini koje su oni kodirali prisutni su i dalje, uglavnom u odgovarajućim organelama. To se objašnjava time što su mnogi geni preneti iz organela u jedro, u procesu koji je poznat kao **endosimbiotski transfer gena** [35]. U tom procesu se geni, koji su višak, kopiraju u organeli, zatim se jedna kopija prenosi u jedro. Tamo se ona ugrađuje u DNK jedra, proteini se sintetišu u citoplazmi i dodaje im se tranzitni peptid, koji ih upućuje natrag, u odgovarajuću organelu. U relativno malom broju slučajeva proteini jedne organele upućuju se u drugu, ili ostaju u citoplazmi. Kopija gena koja je ostala u organelama u njima se degeneriše i neki put se mogu zapaziti ostaci gena koji nisu funkcionalni. Sekvenciranje kompletnih genoma biljke *Arabidopsis thaliana*, cijanobakterije *Synechocystis* sp. i kvasca pokazalo je da se skoro svi geni koje su u ćeliju-domaćina uneli endosimbionti – preteče mitohondrija i plastida, nalaze na raznim mestima u genomu jedra. U svakom slučaju, taj proces je bio dugotrajan – smatra se da je trajao oko trista miliona godina – jer je ćelija sa simbiontom morala da izgradi sasvim nov mehanizam za transfer produkata gena unutar ćelije.

Endosimbiozom se u ćeliju-domaćina unosi ne samo genom simbionta nego ceo simbiont sada predstavlja i odeljak sa različitom unutrašnjom sredinom, što se često u razmatranju ovih pitanja zanemaruje [36]. Prenosom gena u drugu sredinu on se izlaže uticajima koji mogu smanjiti ili pojačati njegovu aktivnost. Smatra se da je kroz milione godina od uspostavljanja endosimbioze većina gena i proteina koji su ušli u ćeliju-domaćina „obišla“ oba genoma (kod protozoa i životinja), ili sva tri genoma (kod algi i biljaka), i zadržala se u onom u kom su uslovi za njihovu aktivnost bili odgovarajući. Takav transfer gena dešava se i danas. Najzad, i danas dve susedne ćelije često pokazuju fine razlike u činiocima unutrašnje sredine, usled čega isti enzim može biti manje ili više aktivan. U savremenoj literaturi postoje brojni primeri koji svedoče o transferu gena i o izmenjenim funkcijama gena istog porekla. Svi oni koji se danas užasavaju od ideje da se geni različitih organizama mogu prenositi iz jednih organizama u druge, potpuno ignorišu činjenicu da su u prošlosti geni već bili izmešani. **Svi današnji eukarioti u stvari su genetičke himere.** U njihovom genomu nalaze se tragovi evolucionih procesa kroz koje su prošli. Zato smatramo ne da genetičkim inženjerstvom remetimo prirodne zakone, nego da modifikacijom osobina biljaka unošenjem stranih gena na drugi način ponavljamo ono što se u prirodi već događalo, a događa se i danas. Time možemo doprineti menjanju osobina biljaka i životinja, kao što se to dešavalo i tokom evolucije.

Sažetak

Pod genetičkim modifikacijama podrazumevamo nasledne promene živih bića do kojih dolazi usled prenosa gena iz jednog organizma u genom drugog. One su se dešavale tokom čitave evolucione istorije života, a danas se mogu ostvariti i u laboratorijskim uslovima, pomoću savremene tehnologije genetičkog inženjerstva, kojom raspolažu prirodne nauke.

Prenos gena među organizmima moguć je zahvaljujući sličnosti osnovnih osobina svih živih bića na ćelijskom i molekularnom nivou. Ova sličnost ukazuje na njihovo zajedničko poreklo i na evoluciju tokom koje su nastali vrlo različiti organizmi u morfološkim osobinama i u načinu života.

Smatra se da su prve naznake budućeg života bila jedinjenja abiotski sintetisana na Zemlji pre oko 3,8 milijardi godina. Najverovatnije mesto njihovog postanka bili su alkalni hidrotermalni otvori na dnu okeana, kroz koje je proticao topli rastvor iz magme u hladniji okean.

Univerzalni prekursor živih sistema bila je struktura izgrađena u kontaktu vodonik-sulfida iz magme s jedinjenjem gvožđa (Fe II) u okeanu. On se sastojao od odeljaka u kojima su se pomoću mineralnih katalizatora u zidu odeljaka redukovane soli iz magme spajale s vulkanskim sastojcima okeana.

Kroz otvore hidrotermalnog sistema bio je uspostavljen gradijent temperature, pH vrednosti i redoks potencijala između magme i okeana. Termodinamička neravnoteža između dva kraja ovih otvora omogućila je redukciju ugljenikovih oksida iz vode pomoću vodonika iz okeanskog tla, pri čemu su postala prva organska jedinjenja.

Biohemijski procesi bili su sve složeniji; od poslednjeg zajedničkog pretka verovatno je postojao izvestan prelazni stadijum pre-ćelija B i A. Prvi ćelijski fosili pronađeni su pre oko tri i po milijarde godina. To su bili mikroorganizmi koji pripadaju domenima Bacteria i Archaea.

Endosimbiozom su postale ćelijske organele. Mitohondrije, a možda istovremeno i ćelijska jedra, postali su endosimbiozom arhee i bakterije. Simbionti su stekli aerobni način života i od njih su postali svi eukariotski organizmi – protisti, biljke i životinje.

Nastanak plastida povezuje se sa endosimbiozom između eukariotske ćelije, koja je imala mitohondrije, sa jednom cijanobakterijom. Od tih organizama postale su alge i biljke, sposobne da obavljaju fotosintezu.

Endosimbiotski transfer gena iz simbionata u genom domaćina dovodi do integracije ćelija sa dva ili tri genoma u jedinstvenu funkcionalnu celinu. Proteinski produkti tih gena sintetišu se u citoplazmi, ali su njihove funkcije veoma često i dalje povezane sa organelama iz kojih su potekli.

Neprestana relokacija gena i proteina između organela i jedra najverovatnije omogućava izbor najpovoljnije unutrašnje sredine za aktivnost enzima, što doprinosi poboljšanju prilagođenosti organizama na uslove sredine u kojoj funkcioniše.

Razmena genskih segmenata na nivou pre-ćelija i endosimbiotska relokacija gena i enzima koja i danas traje, ukazuje na to da su svi eukarioti genetičke himere. Prema tome, prenos gena iz jednog organizma u drugi – što je suština i genetičkih modifikacija – prirodna je pojava, od davnina imanentna svim živim bićima.

Literatura 1

1. Dobzhansky T (1973) Nothing in biology makes sense except in the light of evolution. *American Biology Teacher* 35: 125-129.
2. Stojković B, Tucić N (2009) *Darvinijana*. Službeni glasnik, Beograd.
3. Leach S, Smith WM, Cockell CS (2006) Introduction: conditions for the emergence of life on the early Earth. *Philosophical Transactions of the Royal Society B/Biological Sciences* 361: 1675-1679.
4. Lilley DMJ, Sutherland JD (2011) The chemical origin of life and its early evolution: an introduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B/Biological Sciences* 366: 2853-2856.
5. Lane N, Martin WF, Raven JA, Allen JF (2013) Energy, genes and evolution: introduction to an evolutionary synthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B/Biological Sciences* 368: 20120253.
6. Russel MJ, Hall AJ (1997) The emergence of life from iron monosulphide bubbles at a submarine hydrothermal redox and pH front. *Journal of the Geological Society* 154: 377-402.
7. Martin W, Russell MJ (2003) On the origin of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B/Biological Sciences* 358: 69-85.
8. Russell MJ (2006) First life. *American Scientist* 94: 32-39.
9. Wächtershäuser G (2006) From volcanic origins of chemoautotrophic life to Bacteria, Archaea and Eukarya. *Philosophical Transactions of the Royal Society B/Biological Sciences* 361: 1787-1808.
10. Baross JA, Hoffman SE (1985) Submarine hydrothermal vents and associated gradient environments as sites for the origin and evolution of life. *Origin of Life* 15: 327-345.

11. Kelley DS, Karson JA, Blackman DK, Früh-Green GL, Butterfield DA, Lilely MD, Olson EJ, Schrenk MO, Roe KK, Lebon GT, Rivizzigno P (2001) An off-axis hydrothermal vent field near the Mid-Atlantic ridge at 30° N. *Nature* 412: 145-149.
12. Sleep NH, Bird DK, Pope EC (2011) Serpentinite and the dawn of life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B/Biological Sciences* 366: 2857-2869.
13. Russell MJ, Hall AJ, Martin W (2010) Serpentinization as a source of energy at the origin of life. *Geobiology* 8: 355-371.
14. Lane N, Allen JF, Martin W (2010) How did LUCA make a living? Chemiosmosis in the origin of life. *BioAssays* 32: 271-280.
15. Darwin C. Citiranje prema [2].
16. Опарин АИ (1922) Возникновение жизни на Земле. Академии Наук СССР, Москва.
17. Опарин АИ (1947) Постапак живота на Земљи. Просвета, Београд.
18. Haldane JBS (1929) The origin of life. *Rationalist Annual* 3: 148-153.
19. Miller SL (1953) Production of amino acids under possible primitive earth conditions. *Science* 117: 528-529.
20. Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191: 144-148.
21. Martin W, Russell MJ (2007) On the origin of biochemistry at an alkaline hydrothermal vent. *Philosophical Transactions of the Royal Society B/Biological Sciences* 362: 1887-1925.
22. Ferris JP (2006) Montmorillonite-catalysed formation of RNA oligomers: The possible role of catalysis in the origin of life. *Phil. Trans. R. Soc. B/Biol. Sci.* 361: 1777-1786.
23. Reeve JN, Schmitz RA (2005) Biology, biochemistry and the molecular machinery of Archaea. *Current Opinion in Microbiology* 8: 627-629.

24. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eukarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87: 4576-4579.
25. Kandler O (1994) Citiranje prema Wächtershäuser G (2003) From pre-cells to Eukarya – a tale of two lipids. *Molecular Microbiology* 47: 13-22.
26. Woese C (1998) The universal ancestor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 6854-6859.
27. Margulis L (1970) *Origin of Eukaryotic Cells*. Yale University Press.
28. Martin W (2005) Archaeobacteria (Archaea) and the origin of the eukaryotic nucleus. *Current Opinion in Microbiology* 8: 630-637.
29. Martin W, Müller M (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392: 37-41.
30. Embley TM, Martin W (2006) Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* 440: 623-630.
31. Lopez-Garcia P, Moreira D (1999) Metabolic symbiosis at the origin of eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences* 24: 88-93.
32. Gray MW (1993) Origin and evolution of organelle genomes. *Current Opinion in Genetics & Development* 3: 884-890.
33. Gould SB, Waller RF, McFadden GI (2008) Plastid evolution. *Annual Review of Plant Biology* 59: 491-517.
34. Keeling PJ (2010) The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philosophical Transactions of the Royal Society B/Biological Sciences* 365: 729-748.
35. Martin W, Herrmann RG (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and why? *Plant Physiology* 118: 9-17.
36. Bogorad L (2008) Evolution of early eukaryotic cells: genomes, proteomes, and compartments. *Photosynthesis Research* 95: 11-21.

Osobine biljaka od značaja za genetičke modifikacije

Mirjana Nešković

U prvom poglavlju ove knjige istaknuto je da biljke i životinje, i pored sasvim različitog današnjeg izgleda i načina života, imaju zajedničke pretke, od kojih su nasledili izvesne opšte osobine, naročito upadljive na ćelij-skom i molekularnom nivou. Savremena poređenja sa životinjama obično definišu biljke kao sesilne organizme, autotrofne i sposobne da opstanu u potpuno neorganskom okruženju, koristeći svetlost kao izvor energije. Većina ljudi verovatno smatra da je obavljanje fotosinteze najvažnija osobina biljaka, a da su u svakom drugom pogledu biljke inferiorni, pasivni organizmi, podložni svim promenama spoljašnje sredine tokom celog svog razvojnog ciklusa. Neosporno je da su – u izbegavanju nepovoljnih uslova – životinje u velikoj prednosti, jer mogu migrirati na neko drugo mesto gde su uslovi povoljniji. I kod biljaka su, međutim, evoluirala brojna svojstva koja im omogućavaju preživljavanje u varijabilnim uslovima životne sredine. Sa morfološkog gledišta, inovacije u evolucionoj liniji biljaka sasvim su različite i originalne u odnosu na životinje i reflektuju se u **specifičnoj anatomskoj građi organizma** i u znatno većoj **fenotipskoj i genotipskoj plastičnosti**. Pored toga, mnoge reakcije biljaka prema ne-

povoljnim faktorima sredine zasnovane su na genetičkim i molekularnim mehanizmima, koji su – na nivou ćelije – pandan onima koje koriste životinje, i koji su verovatno već postojali kod njihovih zajedničkih predaka. U tom pogledu, biljke nisu ni manje kompleksni ni manje uspešni sistemi od životinja. Za nas je od interesa činjenica da je fleksibilnost biljaka tokom njihovog razvića osnova za uspešnost u izvođenju genetičkih modifikacija.

2.1. Strukturne osobine biljaka

2.1.1. Osnovne razlike između biljaka i životinja

Pretpostavlja se da su poslednji zajednički preci biljaka i životinja bili jednoćelijski organizmi i da su se dva carstva odvojila pre oko milijardu i šeststo miliona godina. Vidljive morfološke razlike nastale su tokom evolucije višećeličnosti. Počnimo ovo poređenje životinja i biljaka opštim pojavama u individualnom razviću, koje u krupnom planu ilustruju njihove sličnosti i razlike:

- U životnom ciklusu biljaka, **ontogeniji**, razlikuju se **vegetativna** i **reproduktivna** faza. Vegetativna faza razvića obuhvata **embriogenezu**, zatim kraću ili dužu **dormanciju** (mirovanje) **semena**, **klijanje semena** i razviće vegetativnih organa – **izdanaka** i **korenova**. Reproductivna faza počinje kada biljka formira **cvetne organe**, koji se posle oprašivanja i oplodjenja razvijaju u **plod** i **seme**. Kod **monokarpnih** biljaka ovaj ciklus razvića obavlja se jedanput; kod **polikarpnih** se svake godine ponavlja period rasteanja izdanaka i korena i formiraju se nove generacije reproduktivnih organa. Najzad, život pojedinačne biljke završava se **senescencijom** i **smrću**.
- Individualni život svake biljke ili životinje počinje fuzijom **muškog** i ženskog **gameta**, koji su **haploidni** i spajanjem proizvode **diploidni zigot**.

- Ontogenija životinja jeste celovit proces od oplodjenja do smrti, u kom se smenjuju različite faze kada se diferenciraju i rastu organi, začeti u embrionu. Kod životinja je program razvića u najvećoj meri genetički determinisan.
- Osim manjeg broja vrsta, životinje se razmnožavaju skoro isključivo polnim putem. Formiranje začetaka organa događa se samo u toku razvića embriona. Za razliku od toga, biljke se razmnožavaju i **vegetativnim (bespolnim) putem**, što isključuje fuziju gameta; u tom slučaju nove biljke mogu da se začinju na skoro svim vegetativnim organima, kao što su segmenti stabla, pupoljci, listovi ili koreni, koji imaju sposobnost **restitucije** organa koji nedostaju. Zatim, mnoge biljke obrazuju organe za prezimljavanje i razmnožavanje, kao što su krtole, lukovice, bulbile i rizomi, na kojima su formirani mirujući pupoljci. Na takvoj sposobnosti za vegetativno razmnožavanje zasniva se znatan deo praktičnih postupaka u hortikulturi, voćarstvu i šumarstvu, ali takođe i moderni oblici biotehnologije i kulture *in vitro* (videti odeljak 2.2). U svim ovim slučajevima, biljke, koje se razvijaju od segmenata jedne majke-biljke, po pravilu imaju nepromenjene genetičke osobine i smatraju se **vegetativnim klonovima**.
- Zigot životinja se razvija u jednu ili, ređe, mali broj jedinki i njegova ontogenija se time završava (uz period reprodukcije i formiranje potomstva). Nasuprot tome, zigot biljaka proizvodi jedinku od koje se može dobiti – bilo polnim bilo bespolnim putem – veliki broj biljaka, i to vrlo često genotipski ili fenotipski različitih. Ta se pojava naziva **otvorena ontogenija** i ima ogromnog značaja za evoluciju i razmnožavanje ovih genotipova.
- U životnom ciklusu biljaka, kao i kod svih drugih organizama, smenjuju se **diploidna** i **haploidna** faza kroz koje prolazi jedro. Razlika između te dve faze je u broju hromozoma: diploidne sadrže dva seta ho-

molognih hromozoma ($2n$), koji potiču od dveju roditeljskih biljaka, a haploidne imaju upola manji broj hromozoma (n), kao što je slučaj kod polnih elemenata, **gameta**. Prelaz iz haploidne faze u diploidnu dešava se pri **oplođenju (singamiji)**, kada se dva haploidna gameta spoje i obrazuju diploidni **zigot** ($n + n = 2n$). Ponovni prelaz iz diploidne u haploidnu fazu obavlja se u **redukcionoj deobi (mejozi)**. Do mejoze dolazi u specifičnim ćelijama **mejocitama**. Oplođenje i mejoza jesu događaji koji razgraničavaju dve faze u razviću. Mejoza kod biljaka može nastupiti odmah posle oplođenja, tako da je ceo organizam koji se razvija haploidan, što je slučaj sa većinom algi, ali se mejoza može javiti i posle različitih vremenskih razmaka u toku postzigotnog razvića, pa su i faze kroz koje jedro prolazi različite dužine. U razviću mahovina, paprati i cvetnica dužina haploidne faze – istim redosledom – opada. Kod mahovina je haploidna faza dominantna i predstavlja biljku koju poznajemo, a sporogon koji izrasta na njoj predstavlja diploidnu fazu i nije samostalna biljka. Kod cvetnica – to su biljke kakve poznajemo – dominantna je diploidna faza, a haploidna faza svedena je na mali broj ćelija koje nisu samostalni organizmi. Po tome što se haploidna faza završava obrazovanjem **gameta**, ona se zove **gametofit**. Diploidna faza, u kojoj se obrazuju **mejospore**, naziva se **sporofit**. Proizvodi mejoze imaju različitu sudbinu u ženskom i muškom gametofitu. Od arhesporijalne ćelije ženskog gametofita (u ovuli) obrazuju se četiri ćelije, od kojih se obično jedna (ali kod izvesnih biljaka do četiri) razvije u embrionovu kesicu sa jajnom ćelijom (ženskim gametom). Arhesporijalna ćelija muškog gametofita (u anteri) proizvodi unutrašnja tkiva antere i deli se na znatan broj majki-ćelija **mikrospora**, koje sve postaju polenova zrna sa muškim gametom, sposobnim za polinaciju.

- Kod životinja se ne javlja morfološki posebna haploidna faza, nego do oplodnje dolazi neposredno po sazrevanju gameta u polnim organima.

- I kod biljaka i kod životinja varijabilnost osobina jedan je od glavnih faktora evolucije, a normalni izvor varijabilnosti jeste **redukciona deoba**, ili **mejoza**. Zahvaljujući razmeni DNK segmenata između roditeljskih genoma (eng.: „crossing over“) u odrasloj jedinki, tokom gametogeneze, vrlo su velike mogućnosti za formiranje novih kombinacija gena u gametima. Kod životinja je broj mejoza ograničen brojem primarnih germinativnih ćelija, koje daju zrele gamete. Sasvim su različite mogućnosti za rekombinaciju osobina kod biljaka, jer se u jednom cvetu mogu obrazovati i muški i ženski gameti, pri čemu je broj muških izuzetno veliki [1]. Prema tome, prirodno odabiranje biljaka može biti veoma efikasno usled veće genetičke varijabilnosti i formiranja potencijalno adaptivnog genotipa koji je najbolje prilagođen datim uslovima.
- Kod većine životinja organizam se razvija po jasnom razvojnem programu i sastoji se od ćelija koje, tokom ontogenije, postaju visokospecijalizovane (diferencirane).

2.1.2. Germinativna plazma i matične ćelije životinja

Poznato je da se osobine sa roditelja prenose na potomke kombinovanjem njihovih gena prilikom spajanja gameta u oplodnju. U svim višćelijskim organizmima razlikuju se dva tipa ćelija: **somatske** (telesne), koje se diferenciraju u mnoštvo tipova ćelija u tkivima sa različitim funkcijama, i **germinativne** (polne), čija je funkcija prenošenje gena u organizam potomaka. Ćelije koje će formirati polne elemente – gamete – imaju bitno različit postanak i položaj kod biljaka i životinja. U animalnim organizmima se na vrlo ranom stupnju embrionalnog razvića izdvaja region (kod nekih vrsta se on i histološki opaža), koji je označen kao **primordijalna germinativna plazma (germplazma, klicina plazma)**; od njega postaje **linija germinativnih ćelija** koje se kreću kroz embrion i zauzimaju određen položaj **u gastruli** a potom se skupljaju u zoni u kojoj će se formirati **gonade**. U gonadama one nalaze

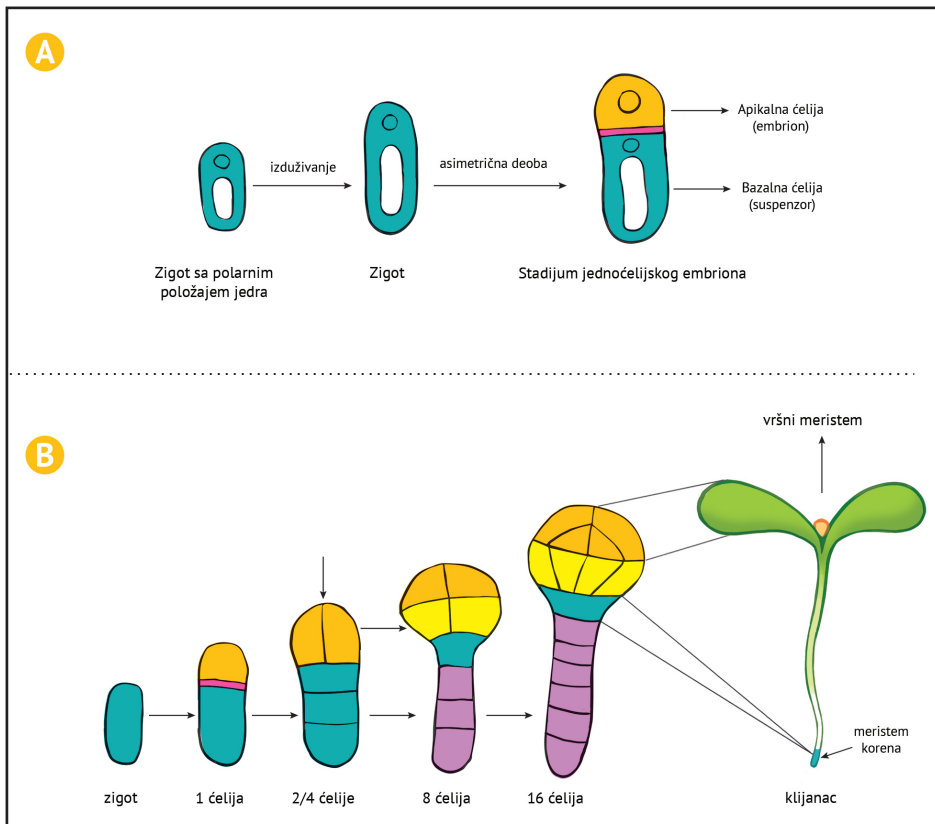
niše germinativnih matičnih ćelija, koje vode poreklo od **embrionalnog mezoderma**. Niše matičnih ćelija kod životinja i biljaka su, uopšteno, grupe ćelija u posebnoj mikrosredini, koje održavaju kontinuitet pojedinih ćelijskih linija; o nišama matičnih ćelija govori se u narednim odeljcima. Niše **germinativnih matičnih ćelija** nalaze se samo kod životinja. U kontaktu sa ćelijama u sastavu niše, od kojih dobijaju potrebne stimulatívne supstance, germinativne ćelije se dele asimetrično i proizvode dve ćelije: jedna ostaje germinativna i održava svojstvo germinativne linije, a druga se diferencira i kroz nekoliko deoba proizvodi ženski ili muški gamet (primer se odnosi na drozofilu) [2]. Osim germinativnih, životinje imaju i druge vrste niša, koje proizvode jedan ili više srodnih tipova ćelija kao što su hematopoetične, epitelijalne, endodermalne, neuralne. Posle oplodjenja ponovo se u ranom embrionu izdvaja germinativna plazma, zbog čega se slikovito kaže da se ona iz generacije u generaciju u kontinuitetu održava; to, razume se, ne znači da su pojedine ćelije „besmrtne“, nego da se ćelijska linija održava kontinuirano – kroz generacije, uz, naravno, transgeneracijsko kombinovanje gena.

Zigot životinja je **totipotentan**. Donedavno se smatralo da su u animalnim organizmima jedino zigoti totipotentne ili **pluripotentne** ćelije, tj. jedine od kojih mogu postati svi tipovi ćelija, novi organi i nova individua. Danas, sa prodorom znanja o **matičnim ćelijama**, shvatanja su se znatno izmenila [3]. Struktura i funkcija animalnih matičnih ćelija trenutno su u žiži istraživanja medicinskih nauka.

2.1.3. Embriogeneza i anatomska svojstva biljaka

Embrionalno razviće biljaka veoma se razlikuje od razvića animalnog embriona. Za razliku od životinja, biljke nemaju kontinualnu germinativnu liniju ćelija, nego se gameti formiraju *de novo* od meristemskih matičnih ćelija; to je moguće u apikalnom meristemu svakog stabla ili grane koji se razvijaju u cvet. Međocite se

kod biljaka javljaju relativno kasno u toku ontogenije, najčešće kada je biljka već završila vegetativni rast. Zigot i sve embrionalne ćelije kod biljaka nastavljaju da se dele posle oplodjenja, odmah posle prve, **inekvalne**, deobe zigota. Istovremeno rastu i druga tkiva semena i ploda. Inekvalnom deobom zigota postaju dve ćelije koje se po sadržaju među sobom bitno razlikuju. Donja ćelija, veća i bliža mikropili, sadrži krupnu vakuolu i manje ćelijskih organela (**Slika 2.1A**). Ona se deli samo poprečno i razvija u lančast organ, **suspensor**, kojim je embrion povezan sa tkivom ovule. Embrion se razvija od gornje, manje ćelije. Ona se simetrično deli, najpre uzdužno u dve, zatim poprečno u četiri, pa u osam ćelija, dok ne



Slika 2.1. Zigotska embriogeneza kod *Arabidopsis thaliana*: **A** – Prva, inekvalna deoba zigota, **B** – Stupnjevi zigotske embriogeneze

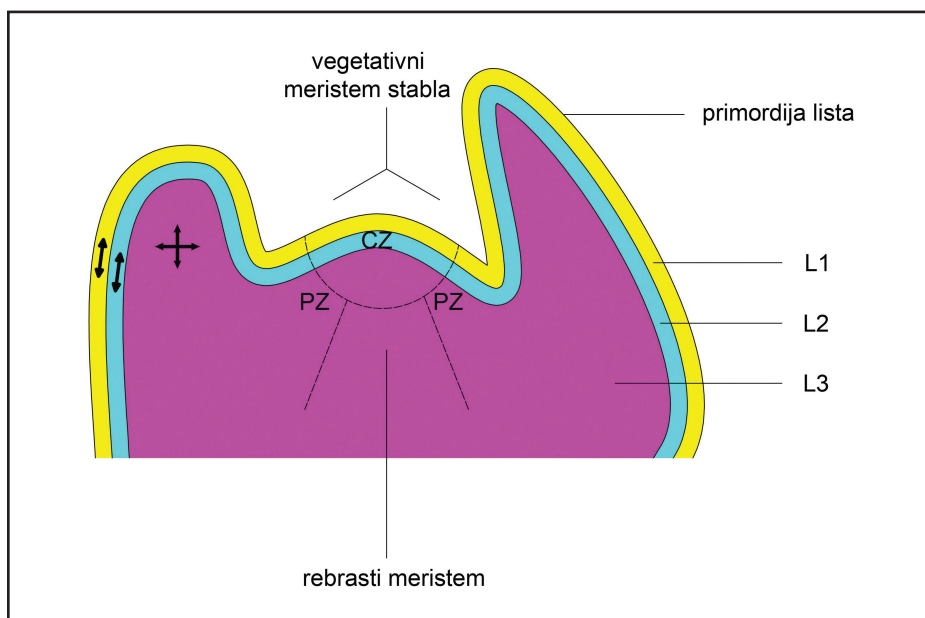
postane globularni embrion sa radijalnom simetrijom (**Slika 2.1B**). Sledećom deobom dodaje se još osam ćelija, čije su ravni deobe paralelne sa površinom. Samo najviša ćelija suspenzora, koja se zove **hipofiza**, pridružuje se globularnom embrionu i od nje postaje koren. Globularni embrion povećava se simetrično i u toku razvića na njemu se jasno razlikuje više anatomskih domena. Kod dobro proučenih vrsta, kao što je npr. *Arabidopsis thaliana*, potpuno je predvidivo od kojih će se domena razviti koren, kotiledoni, ili i pojedina tkiva [4], mada se inicijale nekih organa i tkiva razvijaju tek kad počne klijanje semena (**Slika 2.1B**). U embrionu, takođe, nema citoloških naznaka za ćelije koje će dati mejcite. Ono što karakteriše embrionalno razviće i ima presudan značaj za biljku jeste uspostavljanje **polariteta stablo-koren**, vidljivog još u prvoj deobi zigota, koji je od fundamentalnog značaja za sve morfološke i fiziološke aktivnosti biljke. Zreli biljni embrion (klica) sastoji se od začeta stabla (ili hipokotila), korena i kotiledona. Vršne ćelije stabla i korena zadržavaju sposobnost za neprekidnu deobu – one rastu **indeterminantno**. To su **apikalni meristemi** (tvorna tkiva) u kojima su smeštene **dve glavne niše matičnih ćelija**. One su spojene vrpcom izduženih ćelija, koje će dati **kambijalno meristemsko tkivo**, a sva tri zajedno čine **primarne meristeme** biljke. **Sekundarni meristemi** se razvijaju na određenim pozicijama i imaju posebne funkcije. Sve druge ćelije s vremenom prestaju da se dele i postepeno se diferenciraju u **somatske** ćelije (trajna tkiva), sa novim strukturnim osobinama i sposobnošću za obavljanje specifičnih funkcija.

2.1.4. Građa apikalnih meristema

Apikalni meristem stabla (**Slika 2.2**) sa spoljašnje je strane obavijen sa 2-3 sloja ćelija, označenih kao **L1, L2 i L3** (eng.: „Layer“). U L1 sloju deobe ćelija uvek su **antikline**, sa deobnim ćelijskim zidom upravnim na površinu meristema. Od njega postaje **epiderm**, koji je iz tog razloga uvek jednoslojan. Antikline deobe su uobičajene i u L2 sloju, izuzev u pojedinim ćelijama

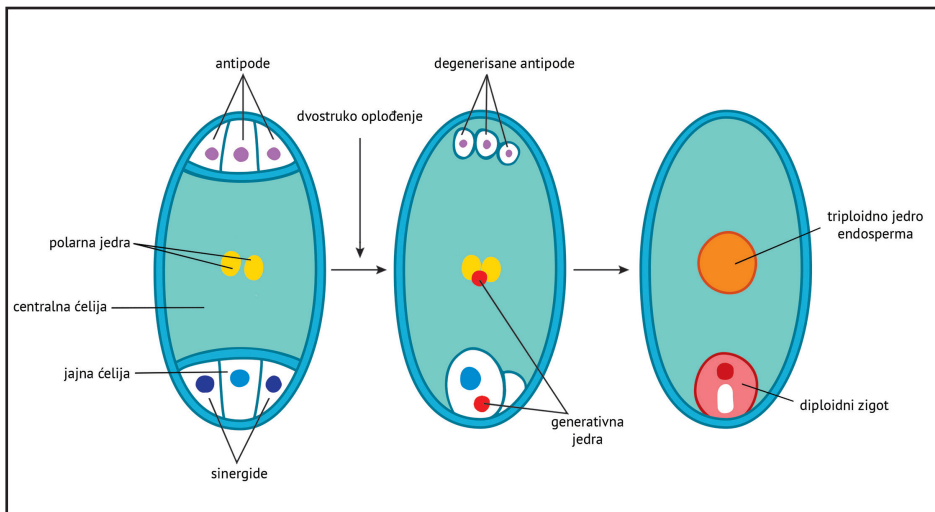
koje će se razviti u začetke listova, gde su deobe **perikline**, sa deobnom ravni paralelnom sa površinom. U L3 sloju deobne su ravni orijentisane u raznim pravcima i ćelije doprinose rasteњу listova i svih drugih tkiva stabla.

Apikalni meristem se može po drugačijem kriterijumu podeliti na funkcionalne zone: ćelije koje se dele antiklino (L1 i L2 sloj) čine **tuniku**, a ostale ulaze u sastav **korpusa** (Slika 2.2). Bez obzira na slojeve, u centru meristema nalazi se **centralna zona**, a oko nje je **periferijska**. Centralna zona zaobljenog dela apikalnog meristema čini **nišu matičnih ćelija**; ove ćelije se dele asimetrično, pri čemu spoljašnja ćerka-ćelija doprinosi rasteњу stabla, a unutrašnja ostaje matična ćelija. Ispod matičnih ćelija u centralnoj zoni nalazi se **centar organizacije**, koji reguliše njihovu deobu. U periferijskoj zoni se nalaze organogene ćelije, čija je funkcija da regulišu morfogenezu apeksa; u njoj se začinju listovi i bočni pupoljci. Ispod svih tih zona stablo je ispunjeno **rebrastim meristemom** (L3), od kojega nastaju sva ostala tkiva stabla.



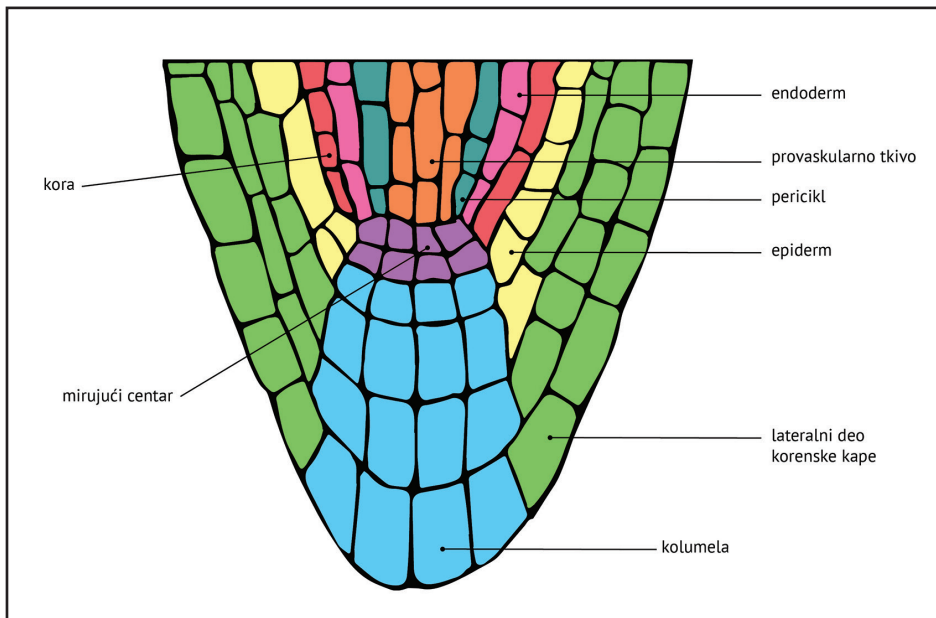
Slika 2.2. Organizacija vršnog meristema stabla. CZ – centralna zona; PZ – periferna zona; L1, L2 i L3 – slojevi ćelija. Strelice označavaju smer ćelijskih deoba u slojevima L1, L2 i L3

Ako pupoljak u periferijskoj zoni obrazuje cvet, umesto začetaka listova postaće organi cveta, raspoređeni u koncentričnim krugovima. Spoljašnja dva kruga su **perijant** (čашica i krunica), zatim dolazi jedan ili više krugova prašnika sa **anterama (andreceum)**, a u centru cveta su oplodni listići, **karpele (gineceum)**, najčešće srasle u **plodnik**. Organi lista i cveta uvek imaju začetak u ćelijama L2 sloja; u prašnicima i plodniku posebne ćelije obrazuju **arhesporijalno tkivo** i dele se putem mejoze. Od njih postaju **megaspore** u ovuli, a **mikrospore** u anteri, koje se razvijaju u ženski, odnosno muški gametofit. U ženskom gametofitu megaspore se deli mejozom i proizvodi jedno do četiri haploidna jedra, od kojih postaju ženski gameti (jajne ćelije). Polenova zrna, koja predstavljaju **muški gametofit**, dele se na jednu vegetativnu i jednu ili dve **generativne ćelije**. Jedna generativna ćelija ima funkciju muškog gameta i spaja se sa jajnom ćelijom, čime se obrazuje zigot. Druga se spaja sa slobodnim centralnim jedrom u ženskom gametofitu i od njih postaje triploidni **endosperm (Slika 2.3)**.



Slika 2.3. Spajanje muškog i ženskog gametofita kod biljaka

U meristemima korena takođe se nalazi **niša matičnih ćelija**. Kod *Arabidopsis thaliana*, matične ćelije se nalaze na vrhu korena; njihovu deobu reguliše **mirujući centar** (Slika 2.4). Matične ćelije deobom odvajaju ka spoljašnjoj strani ćelije korenske kape, a prema unutrašnjoj ćelije tkiva korena, koje leže u koncentričnim krugovima (pericikl, endoderm, korteks i epiderm) oko vaskularnog centralnog tkiva. Na periciklu se formiraju nove niše matičnih ćelija i od njih izrastaju bočni korenovi. Oni nemaju ćelije koje bi dale mejozite, izuzev ako se na korenu regeneriše stablo sa pupoljkom, što se javlja kod izvesnog broja biljaka i pod posebnim uslovima.



Slika 2.4. Vršni meristem korena

2.1.5. Signali u regulaciji rastenja i deoba matičnih ćelija

Već više puta pomenute matične ćelije jesu male grupe ćelija u organizmima životinja i biljaka koje se stalnim deobama obnavljaju, a takođe održavaju linije diferenciranih ćelija potrebnih za rasteenje i zamenu u pojedinim tkivima. Matične ćelije se održavaju samo u pojedinim regionima organizma koji se nazivaju **niše matičnih ćelija**. Osim matičnih ćelija, u sastav niše ulaze i ćelije **organizacionog centra**. U nišama je rasteenje i deoba ćelija regulisano supstancama – interćelijskim signalima; signali deluju na malim udaljenostima od ćelija koje ih proizvode, a granice do kojih dopiru u isto vreme su i granice niše. Čerke – ćelije koje se usled deobe udalje van te granice, počinju da se diferenciraju. Sve ćelije u biljci, koje su postale postembrionalno, proizvodi su matičnih niša u okviru apikalnih meristema stabla i korena. Oko matičnih ćelija niše, u perifериjskoj zoni, nalaze se njihovi neposredni potomci, sitnije ćelije koje se brže dele i obrazuju ćelije – prekursore organa, kao što su listovi.

Kapacitet nediferenciranih ćelija da proizvode sve vrste ćelija, tj. njihova **totipotencija**, bio je predviđen još 1902. godine [5], a smatralo se da je definitivno potvrđen u otkriću **somatske embriogeneze** [6], o čemu se detaljnije govori u odeljku 2.2. Od tada je zavladao mišljenje da su sve meristemske ćelije totipotentne i da se pod određenim uslovima od većine ćelija može razviti embrion i cela biljka. Konsekventno tome, neki istraživači su negirali postojanje matičnih ćelija kod biljaka, smatrajući ih „nepotrebnim“. Preciznija istraživanja su otkrila da među pojedinim meristemskim ćelijama postoje značajne molekularne razlike, koje proizlaze iz ekspresije specifičnih gena [2]. Specifični geni o kojima je reč kodiraju transkripcione faktore, koji regulišu deobu matičnih i drugih meristemskih ćelija. Za održavanje matičnih ćelija neophodni su proizvodi gena **WUSCHEL (WUS)**. Oni se pojavljuju prvi put u četiri subepidermalne ćelije, u ranom stadijumu

razvića embriona dok se on sastoji samo od 16 ćelija. To je prvi korak u indukciji matične niše meristema stabla. Od njih postaje **centar organizacije**, koji kasnije indukuje matične ćelije. U kasnijem meristemu ima 6-9 ćelija sa aktivnim *WUS* genom, po tri u svakom od histogenih slojeva (L1-L3) [7]. Iznad njih se nalaze matične ćelije. Proizvod *WUS* gena peptid *WUS* indukuje deobu matičnih ćelija. Veličina i okvir matične niše određeni su granicom do koje dopire uticaj *WUS* faktora. Sa svoje strane, matične ćelije eksprimiraju tri gena iz kompleksa **CLAVATA (CLV1,2,3)**, čiji proizvod **CLAVATA 3 (CLV3)** aktivira *CLAVATA* signalni put i ograničava sintezu *WUS* faktora, ukoliko se matične ćelije suviše razmnože. Prema tome, ćelije organizacionog centra i matične ćelije održavaju potreban balans između činilaca (*WUS/CLV3*) koji regulišu umnožavanje matičnih ćelija i diferencijaciju. Jedan od dokaza za funkciju faktora *WUS* jeste taj što se kod *wus* mutantata, koji ne sadrže *WUS* gen, matične ćelije ne dele, nego se diferenciraju. Matične ćelije se novim deobama udaljavaju od centralne zone; u prvoj fazi njihovo diferenciranje je reverzibilno, što održava gen **SHOOT MERISTEMLESS (STM)**. Kada se ćerke-ćelije posle nekoliko deoba udalje od matičnih ćelija, dele se znatno brže i označene su kao **tranzitne ćelije sa brzim razmnožavanjem**. One se nalaze na putu diferenciranja somatskih ćelija. U stablu su to začeci listova i začeci pazušnih pupoljaka.

2.1.5.1. Hormonska regulacija matičnih ćelija

Izvesni biljni hormoni takođe imaju značajnog udela u funkciji meristema. Hormoni u tkivima obično pokazuju dinamičan koncentracioni gradijent; osim toga, njihovi efekti se objašnjavaju različitim balansom u koncentraciji i interakcijama sa transkripcionim faktorima [8]. Oni se izgrađuju ili inaktiviraju u različitim ćelijama, pod regulacijom enzima koji njihovu sintezu stimulišu ili sprečavaju. Danas je to moguće utvrditi pomoću specifičnih metoda koje detektuju hormone na nivou malog broj

ćelija. Hormon iz grupe **auksina** (indolil-3-sirćetna kiselina, **IAA**) nalazi se u matičnim ćelijama u centralnoj zoni. Iz tih ćelija on se polarnim transportom, u kome učestvuju PIN proteini (smešteni polarno samo na bazalnim zidovima ćelija), prenosi u periferijsku zonu. Tu se nakuplja u proliferacijama od kojih postaju listovi. Smatra se da je auksin pozitivan regulator inicijacije listova. Visoka koncentracija **citokinina (CK)**, stimuliše deobu ćelija u meristemskim ćelijama centralnog regiona. U njima je aktivan **KNOX** transkripcioni faktor koji aktivira ključni enzim za sintezu citokinina (izopenteniltransferazu, **IPT**). Tako se u centralnoj zoni meristema uspostavlja balans auksin : citokinin u korist citokinina, što podstiče indeterminantnu deobu ćelija. U periferijskoj zoni balans je obrnut, u korist auksina, koji zajedno sa giberelinima stimulišu pojavu i rastenje lisnih primordija. **Giberelini (GA)** se sintetišu u začecima listova (enzim GA-20 oksidaza) i potrebni su za njihovo rastenje; njihovo dejstvo blokiraju **KNOX**-faktori, koji negativno regulišu GA-20 oksidazu. Tako se u zoni ćelijskih deoba smanjuje koncentracija GA, koja bi na deobe negativno uticala, a favorizovala organogenezu. Giberelini iz začetaka listova ne mogu da difunduju u zonu deoba, jer jedan drugi faktor iz **KNOX** grupe (**STM**) istovremeno aktivira enzim GA-2 oksidazu koji oksiduje i time inaktivira GA. On deluje u uskoj zoni tkiva na granici između zone deoba i začetaka lisnih primordija [9]. Ovaj model hormonalne regulacije apikalnog meristema stabla zasnovan je na opštim znanjima o dejstvu hormona, kao i na direktnim podacima. Ipak, ima osim toga još podataka o učešću etilena i brasinosteroida u funkcijama apikalnog regiona, kao i nekih epigenetskih faktora i malih miRNK, i model će verovatno biti dopunjen novim saznanjima. U svakom slučaju, sasvim je pogrešno ranije mišljenje o jednoličnosti ćelija meristema. Na molekularnom nivou te ćelije su vrlo raznovrsne. Bolje poznavanje njihovih osobenosti otvara mogućnosti da se upravlja razvićem meristema, a time i funkcijama biljke koja se istražuje.

2.1.6. Matične niše u uspostavljanju plastičnosti razvića

Ranije je bilo pomenuto da je promenljivost biljaka jedan od faktora diverziteta i da su glavni izvori promenljivosti rekombinacije tokom mejotičke deobe. S obzirom na to da mejotičke deobe nisu ograničene na germinativnu liniju ćelija, nego se mogu javiti u svakom apikalnom meristemu stabla ili bočne grane u kojima se razvija cvet, lako se može zamisliti koliko je time povećana mogućnost promene naslednih osobina. Ne treba ni naglašavati koliko to tek ima značaja za višegodišnje biljke. Tokom životnog ciklusa jedne biljne vrste, a naročito višegodišnje, spoljašnji uslovi mogu biti vrlo promenljivi. Meristemi koji se sukcesivno razvijaju podvrgnuti su različitim uticajima i promene genoma (mutacije) mogu znatno da izmene genetičke osobine novog pupoljka ili biljke. Razume se, ne moraju se svi apikalni meristemi razviti u cvetove, jer to zavisi od mnogih unutrašnjih i spoljašnjih uslova, ali taj broj ipak može biti ogroman. Pošto ne postoji fiksirana germplazma, genetičke promene su moguće i u somatskim ćelijama, koje se nalaze u stablu između dva pupoljka, tj. dve matične niše. Ukoliko ćelije koje su pogođene promenom kojim slučajem uđu u sastav narednog meristema, one će svoje osobine putem mejoze preneti ćelijama koje od njih postaju i mogu obrazovati novi organizam [10].

Genetičke promene koje mogu izmeniti početni genom biljke mogu se pojaviti na više načina:

- Kao klasične **germinativne mutacije**; u tom slučaju se promenjeni geni nasleđuju u potomstvu po Mendelovim pravilima.
- Kao **somatske mutacije** koje se ispoljavaju odmah i bez ulaska ćelije u mejozu. Na primer, kod biljaka koje su heterozigotne u jednom genu, mutacijom može biti oštećen dominantni alel; određena recesivna osobina će se putem mitoze proširiti na ceo sektor tkiva u kome će

ćelije pokazivati svojstva recesivnog alela. Ako takav događaj pogodi fotosintetičke pigmente, deo lista može biti albino ili na drugi način nesposoban da obavlja fotosintezu.

- Somatske mutacije mogu posle postanka ostati skrivene i pojaviti se kasnije ako se promene spoljašnji uslovi i ako oni favorizuju takve promene. Promene, recimo u sintezi neke supstance (fenoli, pigment i dr.) čija se akumulacija ispoljava postepeno, mogu postati vidljive tek posle određenog vremena.
- Promene osobina mogu biti **epigenetske**; one se ogledaju u metilaciji DNK ili histona, koje, jasno, menjaju ekspresiju gena. Epigenetske promene mogu da se održe kroz nekoliko generacija i bez novih sredinskih **indukcija**.
- Bilo kakve promene genoma izložene su prirodnoj selekciji. Štetne mogu biti odmah odstranjene, time što se oštećeni meristem neće dalje razmnožavati, ali korisne promene mogu preovladati u biljci i uticati na bolju prilagođenost na uslove života. U principu, slično je i kod životinja, ali je kod njih jedinica za odabiranje ceo organizam. Kod biljaka, jedinica koja je izložena selekciji može biti ne veća od jednog apikalnog pupoljka, koji se može razviti u celu biljku.
- Haploidna faza ima značajnu ulogu u selekciji biljnih vrsta. Zahvaljujući tome što se kod biljaka smenjuju haploidna i diploidna generacija, sve eventualno štetne promene alela biće odstranjene u haploidnom genomu na nivou haploidne generacije. Izuzetak čine samo mutacije gena koji kodiraju fotosintetički aparat, kao na primer geni za sintezu pigmenta ili fotosintetičkih proteina. Razlog tome je što haploidna generacija muške biljke ne obuhvata te gene.
- Sve što je rečeno o genetičkim promenama koje se kod biljaka mogu javiti tokom celog životnog ciklusa, važi i za genetički modifikovane biljke.

2.2. Kultura biljaka *in vitro*

Uspeh u gajenju genetički transformisanih biljaka krajem prošlog veka ostvaren je zahvaljujući metodama kulture biljnih ćelija, tkiva i organa *in vitro*, koje su prethodno već bile dobro razvijene. Zašto su ove metode od značaja za transformaciju? Genetička transformacija, kao unošenje stranog gena u biljku, jeste događaj koji se dešava na nivou ćelije. Samo pojedinačne ćelije primaju strani gen u svoj genom, a transformacija svake ćelije jeste događaj nezavisan od stanja okolnih ćelija. Nema podataka da strani gen može preći iz jedne transformisane ćelije u drugu susednu, kao što se širi npr. virusna infekcija. Razume se, nikad se u eksplantatu ne transformiše samo jedna ćelija, nego se strani geni unose u veći broj ćelija istovremeno; ako te ćelije imaju sposobnost da se dele ili da se u njima indukuje deoba ti će se geni preneti i na njihovo potomstvo. U prva dva odeljka čitaoci će se upoznati sa rezultatima u gajenju biljnih kultura *in vitro*, čijem su uspehu doprinela mnoga nova saznanja u oblasti fiziologije, a naročito otkriće biljnih hormona koji regulišu deobu, rastenje i diferenciranje biljnih ćelija. Kulture *in vitro* postale su nezamenljiv metod u daljem proučavanju fizioloških procesa na ćelijskom nivou, ali su takođe brzo našle puteve do primenjenih bioloških nauka, u oblasti koja je danas označena kao **biljna biotehnologija**.

2.2.1. Kultura kalusa, ćelija i protoplasta

Zavisno od mesta na kome se nalaze, ćelije su podvrgnute integraciji na nivou tkiva i organa; one su se na tim mestima diferencirale u različite tipove ćelija i specijalizovale su se za obavljanje različitih funkcija. Kod većine biljnih ćelija koje u tom procesu nisu izgubile jedro ili neke druge osnovne funkcije ta specijalizacija nije ireverzibilna. Ako se ćelije izoluju iz organizma, one su, pod određenim uslovima, sposobne za samostalan život, pa čak i za autorepro-

dukciju, čime postaju ekvivalentne jednoćelijskim organizmima. U kulturi *in vitro* ćelije gube svoje specifične odlike i obično se ne može razaznati od kojeg tkiva potiču. Međutim, pod određenim dejstvom fitohormona može doći i do obratnog procesa. U izolovanoj ćelijskoj masi pojavljuju se centri organizacije, iz kojih izrastaju ponovo organi, ili se regenerišu cele biljke. Na toj regenerativnoj sposobnosti, kao i na sposobnosti regenerisanih biljaka za vegetativno razmnožavanje, zasnivaju se skoro svi biotehnološki postupci.

2.2.1.1. Na osnovu čega je sve počelo?

Naučnici koji su tokom 19. i početkom 20. veka proučavali fiziološke procese u biljci, naročito razvojne procese, neminovno su kao objekat istraživanja uzimali celu biljku, ili u najboljem slučaju pojedine organe, mada je bilo jasno da su ćelije u stvari jedinice u kojima se odigravaju ti procesi. Ideja o tome da bi biljne ćelije trebalo proučavati pošto se izoluju iz organizma i oslobode korelativnih faktora, ponikla je pre više od sto godina. Nemački botaničar Haberlandt [5] među prvima je pokušavao da to ostvari, izolujući razne biljne ćelije; one su u kulturi živele neko vreme, ali se nisu delile. Danas je razlog za to poznat: Haberlandt je izolovao već visokodiferencirane ćelije koje se ni u biljci ne bi više delile, a sem toga hranljiva podloga koju je koristio bila je suviše oskudna i sadržala je samo mineralne soli i šećer, jer Haberlandt nije ništa ni mogao znati o raznim stimulativnim supstancama kao što su vitamini i hormoni. I pored toga što su eksperimenti bili neuspešni, Haberlandtove ideje imale su veliki uticaj na mlađe generacije botaničara i dodajući razne inovacije, mnogi su sledili njegov put. Ipak, trebalo je da prođe više od trideset godina pa da se prve kulture biljnih tkiva i ostvare. Tokom 1939. godine, gotovo istovremeno, objavljeni su rezultati trojice naučnika koji su opisali permanentno održavanje biljnih tkiva u kulturi *in vitro*. U Americi je White koristio tkivo jednog hibrida duvana [11], a u Francuskoj su Gautheret [12] i Nobécourt [13] iz korena šargarepe izolovali tkivo koje je obuhvatalo i kambijalne ćelije; izolovanim segmentima u podlogu je dodavan i auksin, tada jedini poznati hor-

mon. Kambijalne ćelije su se na veštačkoj hranljivoj podlozi delile, a deobe su zahvatale i okolne parenhimske ćelije. Posle 4-6 nedelja dobijeno je **kalusno tkivo** koje je bujno raslo; ono je tada sečeno na manje delove koji su prenošeni na sveže hranljive podloge. Takvim periodičnim pasažima, ili **subkulturama**, tkiva su održavana u životu praktično neograničeno. Uslov da se u kulturi dobiju kalusi bio je taj, da primarni eksplantat sadrži kambijalne ili meristem-ske ćelije, ili da se njegove ćelije mogu ponovo indukovati na deobu. Jedan od faktora indukcije bio je hormon **auksin**, a za ćelije koje nisu meristemske kasnije je pokazano da je potreban i jedan hormon iz grupe **citokinina**. Danas se smatra da ne postoji biljna vrsta iz čijih se fragmenata ne može dobiti kalusna kultura, uglavnom dodavanjem ova dva hormona. Time je pokazano da i biljne ćelije mogu biti „besmrtné“, u smislu u kome su besmrtni jednoćelijski organizmi, jer uvek izvestan broj ćelija preživljava prenošenje u novu subkulturu i održava vrstu. Razume se, biljne ćelije preživljavaju samo u eksperimentalnim uslovima.

2.2.1.2. Kulture tkiva

Izolovanje i održavanje u kulturi biljnih tkiva prilično je jednostavan postupak i ne zahteva suviše sofisticiranu laboratorijsku opremu. Jedan od uslova jeste da tkiva budu oslobođena svih mikroorganizama koji bi mogli da utiču na njihov razvoj, kao i da budu snabdevena svim sastojcima potrebnim za održanje života koje inače ta tkiva dobijaju od drugih delova biljke. Hranljive podloge imaju vrlo raznolik sastav, zavisno od vrste tkiva ili ciljeva rada. Sastav najčešće korišćenih hranljivih podloga opisan je detaljno u mnogim specijalnim knjigama i priručnicima [14, 15].

2.2.1.3. Suspenzija ćelija

Veza među ćelijama nekog tkiva nije uvek naročito čvrsta. Mnoga tkiva se u tečnom rastvoru raspadaju na sitnije grudvice, ili čak na pojedinačne ćelije.

Tome doprinosi mućkanje tkiva u tečnoj podlozi. To je način za dobijanje ćelijskih suspenzija koje imaju veliku primenu u biotehnologiji. Da bi ostale jednoćelijske, suspenzije se u određenim vremenskim razmacima filtriraju kroz filtre čije pore propuštaju samo pojedinačne ćelije. Od suspenzije ćelija ponovo se mogu obrazovati kalusi ako se one posle filtriranja razliju na površinu agarne podloge, pre nego što se ona sasvim stvrdne. Time se ćelije fiksiraju na različitim mestima i razvijaju u kaluse. Prednost ovih kalusa je u tome što se sa sigurnošću zna da je svaki od njih nastao deobama jedne ćelije, jer se pod mikroskopom i binokularnom lupom može pratiti njihovo razviće. To znači da je svaki takav kalus – **klon**, poreklom od jedne ćelije. Ćelije u kalusnom tkivu među sobom se mogu razlikovati morfološki, a to implicira i biohemijske razlike. Te razlike mogu biti **epigenetičke**, ako se radi o promeni aktivnosti pojedinih gena. U slučaju klona kalusno tkivo, ili ćelijska suspenzija ostaju genetički homogeni. Ali pod dejstvom podloge na kojoj se tkivo odnosno suspenzija gaji, a naročito usled primene jaćih doza fitohormona, može doći do spontanijh varijacija u sastavu gena (mutacija). Zatim, varijacije se mogu i namerno indukovati, pomoću hemijskih mutagenih sredstava, ili zraćenjem. Varijacije koje se na taj način uspostave prenose se na sve ćelije istog klona pri njihovoj deobi. Pošto u prvi mah ne može biti jasno da li su prolazne ili trajne, one su nazvane **somaklonalnim varijacijama**. Somaklonalne varijacije povećavaju raznolikost, koja može biti korisna u selekciji novih varijeteta ili promenjenijh metabolićkih puteva.

2.2.1.4. Protoplasti

Iz kulture tkiva i ćelija prirodno se razvila još jedna nova tehnika, **kultura protoplasta**. Pošto su biljne ćelije odvojene od spoljašnje sredine ćelijskim zidom, onemogućen je direktan kontakt sa ćelijskom membranom. Šezdesetih godina dvadesetog veka pronađen je način da se zid ukloni, a da u suspenziji ostanu protoplasti, obavijeni samo plazmalemom. U tom cilju se tkiva iz kulture, ili odseći lista, stabla, ili korena, prvo stave u hipertonićni rastvor, koji

izaziva plazmolizu, tj. odvajanje ćelijskog sadržaja od zidova ćelije. Zatim se na njih deluje enzimima koji degraduju ćelijske zidove između protoplasta. To su pektinaze, koje razlažu srednju lamelu između dveju ćelija, a zatim celulaze i hemicelulaze, koje razgrađuju polisaharidne makromolekule zida. Kada se ostaci zida stalože centrifugiranjem, u suspenziji ostaju protoplasti koji imaju loptast oblik. Nakon dva do tri dana na površini protoplasta počinje regeneracija novog ćelijskog zida, a kada se ona završi, uspostavlja se ponovo ćelijska suspenzija, čije se ćelije kod mnogih biljaka mogu deliti kao što je već opisano. Značaj ovog postupka u tome je što se u periodu dok ćelije nemaju zid sa njima mogu obavljati razna istraživanja. Protoplasti su korišćeni kao objekti za ispitivanje osobina ćelijske membrane, njenog sastava, propustljivosti i aktivnog transporta. Takođe se u protoplaste mogu unositi različite supstance, što se koristi u nekim biotehnološkim postupcima i u genetičkim transformacijama. Naročito je značajna upotreba protoplasta u somatskoj hibridizaciji, kao i u nekim genetičkim transformacijama.

2.2.2. Organogeneza i embriogeneza

2.2.2.1. Regeneracija pupoljaka i korenova u kulturi tkiva

Zanimljivo je da su prvi naučnici koji su se bavili kulturama tkiva i ćelija nastojali da ih što duže održe u neorganizovanom obliku i više su pažnje posvećivali teorijskim pitanjima nego praktičnim. Istina je da njima nisu ni bila dostupna mnoga znanja kojima se danas raspolaže. U podloge je tada stavljan jedini poznati fitohormon, auksin, pa se drugačiji rezultati nisu ni mogli očekivati. Ali uporedo sa otkrićem citokinina kao faktora ćelijske deobe, došlo je do otkrića njihove fundamentalne uloge u morfogenezi. Tokom šezdesetih godina objavljeni su rezultati Skooga i Millera [16] za koje nije nimalo preterano reći da predstavljaju jedno od najznačajnijih dostignuća u razvojnoj fiziologiji biljaka. Gajeći u kulturi tkivo izolovano iz

srži stabla jednog varijeteta duvana (*Nicotiana tabacum*, Wisconsin 38), ovi naučnici su pokazali da podloga sa auksinom i citokininom indukuje deobu inače inertnih ćelija, kao što se očekivalo, a da dalji pravac razvića dobijenog kalusa zavisi od balansa hormona. Ako se u podlogu doda relativno veća koncentracija citokinina nego auksina, iz meristemskih centara u tkivu razvijaju se pupoljci. Ukoliko je koncentracija auksina veća nego koncentracija citokinina, iz istih meristema razvijaju se korenovi. Najzad, izvesne srednje koncentracije oba hormona ne dopuštaju obrazovanje organa, nego tkivo zadržava oblik kalusa. Prema tome, u diferencijaciji organa, auksini i citokinini deluju kao antagonisti, iako su oba hormona neophodna za organogenezu. Ta fundamentalna razlika u njihovom dejstvu potvrđena je do danas na tkivima svih ispitivanih biljaka (Slika 2.5). Uostalom, i u intaktnoj biljci citokinini indukuju rastenje pupoljaka, npr. uspavanih ili pazušnih, a auksini stimulišu inicijaciju adventivnih korenova.



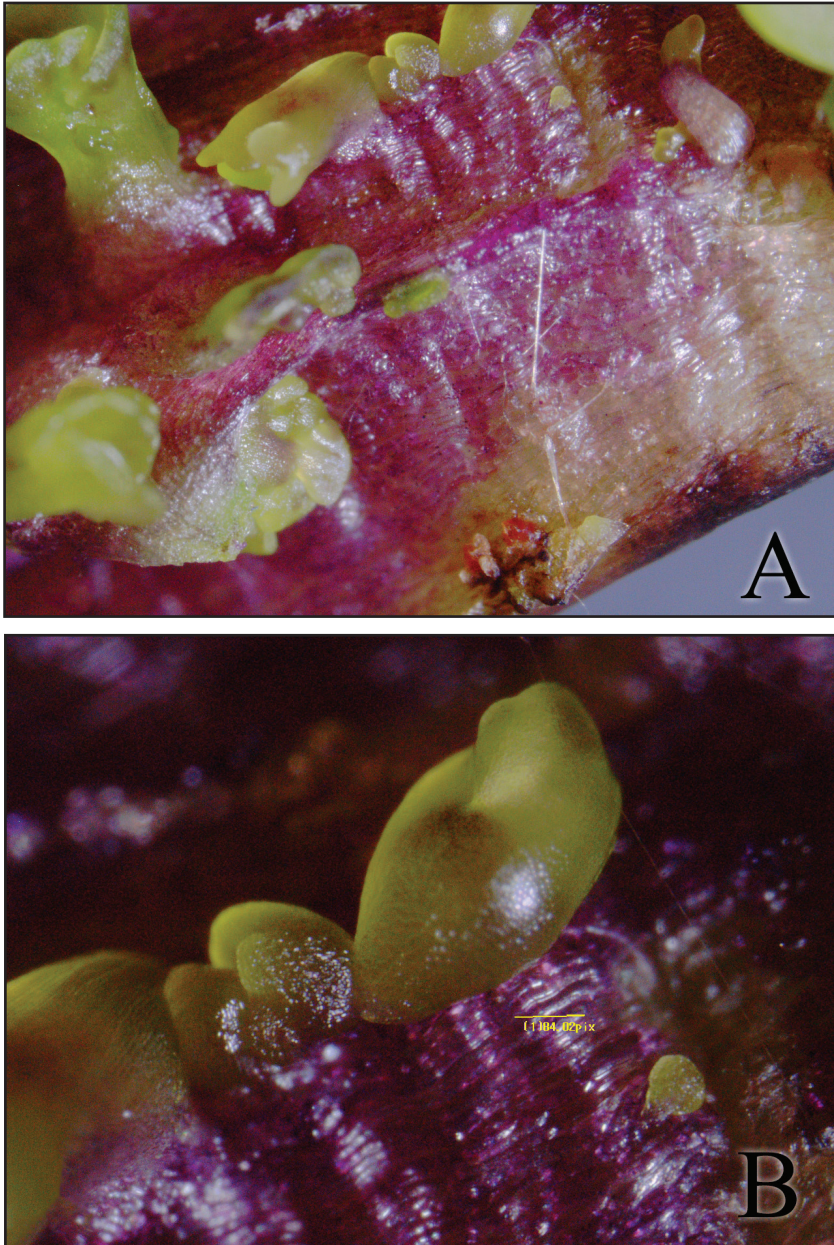
Slika 2.5. Indukcija pupoljaka na listovima lucerke u prisustvu veće koncentracije citokinina (TDZ-tidiazuron) u odnosu na auksin (NAA-naftil sirćetna kiselina). Foto: S. Ninković

Pupoljci na kalusnom tkivu razvijaju se u izdanke. Pošto podloga sadrži citokinine, izdanci se granaju i kulture obično izgledaju kao gusti žbunovi izdanaka, ali nemaju koren. Izdanci se na istoj podlozi mogu razmnožavati kroz veliki broj ciklusa, time što se pojedinačni izdanci izdvajaju i prenose na sveže podloge, na kojima se dalje granaju; kad se dostigne željeni broj izdanaka, oni se koriste za dobijanje biljaka. Ovi pupoljci se duže vreme mogu gotovo neograničeno razmnožavati. Opisani postupak se rutinski primenjuje i neizostavan je i u razmnožavanju genetički transformisanih biljaka.

2.2.2.2. Somatska embriogeneza

Iz prethodno rečenog može se zaključiti da diferencirane biljne ćelije imaju sposobnost da se vrate u meristemsko stanje, a da se zatim ponovo diferenciraju, najvećim delom u nekom sasvim različitom pravcu. Uvek je bilo intrigantno pitanje do kog je stepena unazad dediferencijacija moguća. Da li dediferencirane ćelije postaju slične primarnim meristemima ili mogu dostići i embrionalni stadijum?

Odgovor na to dalo je otkriće **somatske embriogeneze**. Krajem šezdesetih godina 20. veka, gajeći ćelije šargarepe u suspenziji, Steward i saradnici [17] zapazili su da iz pojedinih ćelija postaju viševićijske strukture koje podsećaju na stadijume razvića zigotskih embriona. Pregledom suspenzije, mogli su se videti oblici slični globularnom embrionu, zatim embrionima u stadijumu srca, torpeda i kotiledonarnom. Do danas je ta pojava opisana kod velikog broja biljnih vrsta. Smatra se da postoje genetički faktori od kojih zavisi kapacitet vrste za somatsku embriogenezu. U anatomskim studijama ovog procesa u većini slučajeva je pokazano da se ovi „adventivni embrioni“, kako su nazvani u prvi mah, razvijaju iz jedne ćelije. Prema tome, te embriogene ćelije su dediferencirane do stadijuma zigota. No pošto one nisu nastale fuzijom gameta, nego iz somatskih ćelija, pojava je naposljetku nazvana **somatska embriogeneza**. Ovo je takođe često upotrebljavan postupak za razmnožavanje genetički modifikovanih biljaka (**Slika 2.6**).



Slika 2.6. Somatska embriogeneza kod kelerabe. **A** – Indukcija somatskih embriona na površini izdanka kelerabe. **B** – Različiti stupnjevi razvoja somatskih embriona. Foto: S. Ninković

2.2.2.3. Androgeneza i ginogeneza

U razviću mahovina, paprati i viših biljaka smenjuju se diploidna i haploidna faza koje zauzimaju različit vremenski period, a i značaj u životnom ciklusu. Haploidne ćelije viših biljaka nisu izgubile sposobnost da se razvijaju kao i diploidne poreklom od zigota. Sedamdesetih godina 20. veka, u kulturi u kojoj su gajene antere tatule (*Datura stramonium*) sa ciljem da se ispita klijanje polena [18], zapaženo je da nezrela polenova zrna (mikrospore) ne kličaju nego se u njima razvijaju embrionima slične strukture od kojih dalje postaju biljčice. Ta je pojava nazvana **androgeneza**. Sposobnost biljnih vrsta i varijeteta za androgenezu genetički je determinisana, ali u njenoj pojavi veliku ulogu imaju uslovi pod kojima se majka-biljka gaji.

Biljke koje se razvijaju iz mikrospora mogu se dovesti do zrelosti, ali ne daju potomstvo, jer haploidni genom ne može da prođe kroz mejozu. Da bi se dobilo potomstvo, potrebno je da se udvoji hromozomski set, što se dešava ili spontano, ili pomoću sredstava kao što je kolhicin. **Spontana diploidizacija** se dešava putem **endomitoze**, pri kojoj se molekuli DNK repliciraju, ali se hromozomi ne razdvajaju. Pošto su u tom slučaju dva hromozoma potpuno identična, biljka je homozigotna. To je najbrži i najkraći postupak za dobijanje genetički čistih linija, koje se mogu koristiti u oplemenjivanju i selekciji biljaka. Da bi se istaklo njihovo poreklo, one se zovu **dihaploidi**.

Haploidne ćelije ženskog gametofita takođe mogu da se razviju u biljčice, ako se izolovani plodnici, ili još bolje, ovule, gaje na induktivnoj podlozi. Ta je pojava poznata kao **ginogeneza**. Smatra se da se haploidni embrioni dobijaju najčešće od jajne ćelije, a možda i sinergida. I u ovom slučaju mogu se dobiti **homozigotni dihaploidni embrioni**; no i njihova homozigotnost se mora proveriti. Zbog malog broja haploidnih ćelija u jednom plodniku, a vrlo velikog broja mikrospora u anteri, gajenje antera

je mnogo više korišćeno za dobijanje dihaploida. Ipak, to nije moguće kod varijeteta sa citoplazmatskom muškom sterilnošću ili u slučajevima kada se u kulturi antera razvija veliki procenat albino embriona. Tada ginogenezu može biti metod koji daje bolje rezultate.

Sažetak

Od značaja za predmet ove knjige je činjenica da se biotehnoški postupci primenjuju na genetički transformisane biljke isto kao i na ne-transformisane. I jedne i druge reaguju na fitohormone i spoljašnje uticaje na isti način.

Literatura 2

1. Bhatt AM, Canales C, Dickinson HG (2001) Plant meiosis: the means to 1N. *Trends in Plant Science* 6: 114–121.
2. Sablowski R (2004) Plant and animal stem cells: conceptually similar, molecularly distinct? *Trends in Plant Science* 14: 605-611.
3. Wylie C (1999) Germ cells. *The Cell* 96: 165-174.
4. Boscá S, Knauer S, Laux T (2011) Embryonic development in *Arabidopsis thaliana*: from the zygote division to the shoot meristem. *Frontiers in Plant Science* 2: 93.
5. Haberlandt G (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien. Math.-Naturwiss. Kl., Abt. J.* 111: 69–92.
6. Steward FC, Shantz EM (1959) The chemical regulation of growth (some substances and extracts which induce growth and morphogenesis). *Annual Review of Plant Physiology* 10: 379-404.
7. Bäurle I, Laux T (2003) Apical meristems: the plant's fountain of youth. *BioEssays* 25: 961-970.

8. Shani E, Yanai O, Ori N (2006) The role of hormones in shoot apical meristem function. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 484-489.
9. Jasinski S, Piazza P, Craft J, Hay A, Woolley L, Rieu I, Phillips A, Hedden P, Tsiantis M (2005) KNOX action in Arabidopsis is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Current Biology* 15: 1560-1565.
10. Walbot V (1996) Sources and consequences of phenotypic and genotypic plasticity in flowering plants. *Trends in Plant Science* 1: 27-32.
11. White PR (1939) Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *American Journal of Botany* 26: 59-64.
12. Gautheret R (1939) Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *Compt. Rendus Soc. Biol. Paris* 208: 118-120.
13. Nobécourt P (1939) Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *Compt. Rendus Soc. Biol. Lyon* 130: 1270-1271.
14. Vinterhalter D, Vinterhalter B (1996) Kultura *in vitro* i mikropropagacija biljaka. Axial, Beograd.
15. Radojević Lj (2016) Biotehnologija u hortikulturi - Drveće I. AGM knjiga, Beograd.
16. Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 11: 118-131.
17. Steward FC (1958) Growth and organized development of cultured cells. III. Interpretations of the growth from free cell to carrot plant. *American Journal of Botany* 45: 709-713.
18. Guha S, Maheshwari SC (1964) *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204: 497-498.

Poglavlje 3

Osnovna znanja o genomu i genima

Mirjana Nešković

Cilj genetičkog inženjerstva jeste da izazove promene DNK koje će prirodne osobine biljaka izmeniti tako da povećavaju njihovu adaptiranost na uslove životne sredine, ili ih poboljšati u kontekstu prohteva koje čovek može imati (npr. povećanje prinosa poljoprivrednih kultura). Izmene u strukturi nukleinskih kiselina (DNK i RNK) nisu uopšte nova pojava u prirodi; zadatak Poglavlja 3 jeste da izloži puteve kojima se genom prirodno menja. Ovo izlaganje treba da pokaže da nema suštinskih razlika između prirodnih promena genoma i eksperimentalnih postupaka kojima se to takođe može postići. Eksperimentalni postupci ne prevazilaze ono što se u prirodi dešava, osim po brzini, pouzdanosti i opsegu pojava u kojima su primenljivi.

3.1. O genomu

3.1.1. Hemijski sastav i organizacija nukleinskih kiselina

Nukleinske kiseline i **proteini** su glavni makromolekuli na kojima se bazira genetička organizacija i funkcionisanje živih sistema. U pogledu njihovog hemijskog sastava, nema suštinske razlike između biljaka, životinja,

gljiva i prokariota [1, 2, 3]. I jedni i drugi su izgrađeni od jedinstvenih gradivnih blokova. Nukleinske kiseline u svom sastavu imaju po četiri tipa nukleotida, a u sastavu proteina se može pronaći dvadeset aminokiselina. Azotne baze određuju tip nukleotida.

Sa izvesnim izuzecima, DNK je dvolančana; po dva njena lanca sparena su preko svojih baza, i to uvek adenin sa timinom i citozin sa guaninom. Pošto svakoj bazi uvek odgovara njen par u naspramnom lancu, to znači da lanci moraju imati isti redosled baza, samo u suprotnom smeru. Oni su **komplementarni i antiparalelni**.

Kod svih organizama DNK je sastavni deo **hromozoma** koji se kod eukariota nalaze u jedru, a kod prokariota u gušćem delu citoplazme, od koje nisu odvojeni posebnom membranom. U jedru eukariotskih organizama dvolančani DNK heliks nalazi se u kompleksu sa jedarnim proteinima, sa kojima izgrađuje **hromatin**. Među ovim proteinima razlikuje se pet glavnih vrsta **histona**, koji obiluju baznim aminokiselinama i čija je masa približno jednaka masi DNK. Histoni imaju strukturnu funkciju u izgradnji hromozoma, ali i presudnu ulogu u regulaciji ekspresije gena. Njihov raspored (aranžman) utiče na aktivnost DNK sa kojom su povezani. Druga grupa proteina jesu **nehistonski proteini** koji imaju većinom enzimsku, regulatornu funkciju. Zahvaljujući zajedničkim principima replikacije, transkripcije i translacije, genetička informacija sa DNK može biti prepisana i pročitana u svakom organizmu, bez obzira na evoluciono poreklo gena.

Svi organizmi se među sobom veoma razlikuju po količini DNK koju sadrže. Kao mera veličine genoma uzima se sadržaj DNK po jednoj haploidnoj ćeliji; on je označen kao **C-vrednost**, a izražava se kao broj baznih parova (bp), ili često u kilobazama (kb), tj. hiljadama baznih parova. Bakterije, a zatim gljive, imaju najmanje genome ($<10^7$ bp), dok su genomi biljaka i životinja znatno veći i sastoje se od 10^7 do 10^{11} baznih parova.

Najpoznatiji biljni genom, *Arabidopsis thaliana* ima 7×10^7 bp, a jedan od najvećih, *Fritillaria assyriaca* ima 1×10^{11} bp. Genomi svih ostalih biljaka nalaze se između ove dve vrednosti. Pritom, veličina genoma ne odražava taksonomsku i evolucionu bliskost vrsta. Na primer, C-vrednost za pirinač je 5×10^8 , za kukuruz $6,6 \times 10^9$, a za pšenicu $1,6 \times 10^{10}$ bp, iako sve ove vrste pripadaju porodici Poaceae. C-vrednost još manje ukazuje na kompleksnost organizama. Sve biljne vrste imaju iste osnovne funkcije, što znači i približno isti broj gena koji kodiraju enzimske i druge proteine. Nesaglasnost između veličine genoma i broja gena poznata je kao **paradoks C-vrednosti**.

3.1.2. Genomi plastida i mitohondrija

Treba na ovom mestu ponoviti da biljne ćelije sadrže tri genoma. Pored **jedarnog genoma**, još dve ćelijske organele sadrže DNK; to su **plastidi i mitohondrije čiji genomi plastom** odnosno **hondriom**, kodiraju ograničeni broj proteina, uglavnom od značaja za procese koji se obavljaju u ovim organelama. Prisustvo DNK u organelama jedan je od bitnih dokaza u prilog **endosimbiotske teorije**, po kojoj ćelijske organele vode poreklo od samostalnih bakterija, koje su tokom evolucije stupile u simbiozu sa heterotrofnim, anaerobnim jednoćelijskim organizmima (videti Poglavlje 1). Organizacija genoma plastida i mitohondrija otada je znatno evoluirala, ali je u mnogim osobinama ostala slična genomu predaka od kojih su postali.

Hloroplasti sadrže u stromi molekule cirkularne dvolančane DNK (ptDNK), koji širom biljnog sveta imaju sličnu građu. Oni su visokoploidni, pošto se u svakom hloroplastu nalazi više kopija genoma; u mezofilnim ćelijama duvana ima ih oko 100. Svaka ptDNK kopija sastoji se od 120 do 180 kb, koji obuhvataju oko 120 gena. Genom hloroplasta, slično genomu mnogih bakterija, vezan je za više proteinskih nosača, koji se zovu **nukleoidi**. U mezofilu duvana, koji je dobro proučen, nalazi se po

nekoliko (10-14) ptDNK kopija vezanih za **plastidne nukleotide**. Oni su ravnomerno raspoređeni u stromi između tilakoida. Ako ćelije mezofila sadrže oko 100 plastida, onda je broj ptDNK u ćeliji oko 10.000; to čini vrlo veliki broj matrica za transkripciju i dalju sintezu proteina. Hloroplasti sadrže ribosome na kojima se obavlja translacija. Verovatno se svi geni koji kodiraju ribozomalne RNK, zatim geni za transportne RNK, kao i geni za mnoge fotosintetičke i druge proteine nalaze u genomu hloroplasta. Postoji, međutim, još 2100 do 3600 proteina u hloroplastu čiji su geni smešteni u jedru; ovi proteini se sintetišu u citoplazmi i prenose u hloroplaste. Prema tome, hloroplasti nisu potpuno autonomni, nego je većina njihovih funkcija regulisana u jedru. Ribozomi pripadaju tipu 70S, kao i ribozomi svih bakterija, čime se bitno razlikuju od 80S ribozoma u citoplazmi eukariota. Istaknuta osobina genoma plastida jeste region od oko 25 kb, u kome je DNK duplirana u invertovanom položaju.

Genom mitohondrija kod biljaka je znatno raznovrsniji nego kod životinja, po veličini i po organizaciji. On sadrži cirkularne i linearne DNK (mtDNK). Veličina DNK je vrlo varijabilna; u proseku iznosi 200–500 kb, ali se taj broj kreće od 218 kb (kod vrste kupusa *Brassica hirta*), do 2400 kb kod dinje (*Cucumis melo*), jer sadrži veliku količinu nekodirajućih sekvenci. Kod životinja je svega oko 13 gena smešteno u mitohondrijama; kod biljaka je njihov broj varijabilan i znatno veći, a kod jedne mahovine jetrenjače nađena su čak 94 mitohondrijalna gena. S nekim mitohondrijalnim genima povezane su značajne agronomske osobine, kao što je citoplazmatska muška sterilnost.

3.1.3. Utvrđivanje redosleda nukleotida

Izuzetno značajna nova dostignuća u izučavanju genoma, koja su usledila posle objašnjenja procesa transkripcije i translacije kod eukariota, ticala su se utvrđivanja precizne strukture genoma i redosleda nukleotida, što

je bilo omogućeno razvojem tehnologija poznatih kao **sekvenciranje genoma**. Sredinom devedesetih godina 20. veka, sekvenciran je genom nekoliko vrsta bakterija, pre svega onih koje su izazivači nekih bolesti čoveka. Osim toga, sekvenciran je genom kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) i prvi put genom jedne fotosintetičke vrste, cijanobakterije *Synechocystis*. Redosled nukleotida pojedinih gena višćelijskih biljaka i životinja bio je samo delimično poznat; glavnu teškoću za sekvenciranje celog genoma u to vreme predstavljala je njegova veličina i obilno prisustvo nekodirajućih, repetitivnih sekvenci. Sa poboljšanjem metoda uspešno su sekvencirani genomi crva *Caenorhabditis elegans*, kao i vinske mušice, *Drosophila melanogaster*. Oba organizma su već bila dobro proučena kao modeli za mnoga ispitivanja u molekularnoj genetici. *Arabidopsis thaliana*, biljka iz familije Brassicaceae, bila je više godina pre toga u fokusu ispitivanja mnogih fiziologa i genetičara i zbog mnogih svojih osobina postala omiljena model-biljka za vrlo veliki broj laboratorija u svetu. U dogovoru naučnika nekoliko vodećih svetskih institucija odlučeno je da se pristupi sekvenciranju genoma pre svega ove biljke [4].

3.1.4. Model-biljka *Arabidopsis thaliana*

Po svojim botaničkim osobinama *A. thaliana* je poznata korovska vrsta; J. Pančić navodi više srpskih naziva (npr. uročnjak), ali se u laboratorijskim istraživanjima ne koriste biljke iz prirode, nego samo pojedini ekotipovi, čije su genetičke karakteristike precizno definisane. U ovoj knjizi se zato za te ekotipove koristi samo „prevedeno“ ime **arabidopsis**, bez punog latinskog naziva, eventualno sa nazivom ekotipa. U prirodi, biljka je visoka najčešće do 40 cm, retko do 70 cm, sa životnim ciklusom od svega šest nedelja. Veliki broj biljaka istovremeno se može gajiti u laboratoriji u sterilnoj sredini i u laboratorijskom posuđu. Posle klijanja semena, biljka prolazi kroz juvenilni period, u kome se listovi nalaze u rozeti, a stablo je

vrlo kratko. Biljke i u laboratoriji cvetaju i donose plod. Pre cvetanja stablo se izdužuje i nosi grozdastu ili prividno štitoliku cvast. Dugačak dan ubrzava cvetanje, mada biljka nije apsolutno zavisna od fotoperioda. Semena su spremna za klijanje odmah po sazrevanju, tako da se za kratko vreme može dobiti više generacija. Biljka je samooplodna, što olakšava selekciju i održavanje genetički čistih linija.

Velika prednost arabidopsisa jeste njegov mali genom; to je biljka sa skoro najmanjim poznatim genomom koji obuhvata svega oko 7×10^7 bp [5]. I pored toga, njoj ne nedostaje nijedna funkcija koju imaju i druge biljke. Ona sadrži oko 27.000 gena, kao i biljke koje imaju genom čak 10.000 puta veći. Arabidopsis ima pet hromozoma, što znači da je gustina gena u njima vrlo velika. Smatra se da svega oko 20% genoma ove biljke pripada umerenim i visokorepetitivnim sekvencama, a ostatak čine unikatne sekvence koje obuhvataju gene. Detaljna genska mapa bila je poznata već devedesetih godina 20. veka. Mutacije arabidopsisa relativno se lako izazivaju zračenjem ili hemijskim sredstvima. On se takođe može relativno lako genetički transformisati na klasičan način pomoću *Agrobacterium tumefaciens*, kao i metodom *in planta* (videti Poglavlje 5), što olakšava insercionu mutagenezu. Protokoli za gajenje arabidopsisa opšte su usvojeni, što omogućava komunikaciju među naučnicima i usklađivanje eksperimentalnih postupaka i rezultata.

U saradnji genetičara, molekularnih biologa i fiziologa zaključen je 1996. godine dogovor o osnivanju međunarodne grupe za sekvenciranje genoma arabidopsisa, što je završeno 2000, dve godine pre predviđenog roka [6]. Ukupno je određen redosled 115,4 Mb, među kojima se nalazi 27.416 gena, što je podatak TAIR-a (The Arabidopsis Information Resource) iz 2016. godine (www.arabidopsis.org/portals/genAnnotation, 16/12/2016). Koristeći iskustva i metode u ovom radu, druga grupa naučnika je 2002. godine završila sekvenciranje genoma pirinča *Oryza sa-*

tiva, a rad na genomima nekih drugih gajenih biljaka je u toku. Pirinač, čiji je genom samo 3,5 puta veći od genoma arabidopsisa, izabran je kao prva sledeća biljka za sekvenciranje, jer arabidopsis, kao dikotila, ne može u potpunosti da reprezentuje i genom monokotila. A osim toga, genom pirinča sličan je genomima pšenice, kukuruza i drugih žita, najvažnijih ratarskih biljaka. Sigurno je da sekvenciranje genoma ovih dveju biljaka, kao i mnogih drugih, koje je u toku, ima ne manjeg značaja za biljnu biologiju i poljoprivredu. U jednom članku iz 2008. godine naveden je podatak da je do tog vremena završeno sekvenciranje u okviru 77 eukariotskih genomskih projekata, dok se 2013. mogao naći podatak da je sekvenciran 181 genom Archea, 3762 bakterijska genoma i 183 genoma eukariota (sandwalk.blogspot.rs, 16/12/2016). Podaci iz septembra 2021. godine pokazuju da su samo biljni genomi koji su sekvencirani dostigli broj od 185.

3.1.5. Funkcionalna genomika

Svi uspešni rezultati na sekvenciranju genoma doveli su do definisanja nove naučne grane, **genomike**, pod kojom se podrazumeva korišćenje različitih tehnika za izučavanje svih gena jednog organizma. Osim sekvenciranja genoma, genomika izučava funkciju i ekspresiju gena. U izveštaju grupe naučnika [6] nalazi se podatak da je za 69% proteina koje sadrži arabidopsis moguće predvideti kakvu funkciju imaju, jer su slični poznatim proteinima drugih biljaka. Eksperimentalno je, međutim, dokazana funkcija za samo 9% tih proteina, a za oko 30% funkcija nije poznata. Utvrđivanje funkcije gena, tj. proteina koje oni kodiraju, od primarne je važnosti za razvoj genetičkog inženjerstva. Time se bavi funkcionalna genomika, iz koje su proizašle druge slične naučne discipline i tehnike. Danas postoje vrlo precizne metode za izučavanje ekspresije gena, koje ukazuju na to kada i gde se pojedini geni ekspimiraju i koji ih stimulusi aktiviraju. Kao što termin genom obuhvata sve gene jedne ćelije, uključujući nekodirajuće DNK

sekvence, skovan je termin **transkriptom**, pod kojim se podrazumevaju sve RNK koje se pod određenim uslovima sintetišu u ćeliji (u transkriptomu se nalaze iRNK i svi nekodirajući RNK molekuli sa regulatornim funkcijama). Saglasno tome, **transkriptomika** proučava sve transkripte, tj. RNK koji se mogu sintetisati na osnovu genoma jedne biljke. **Proteomika**, slično tome, proučava sve proteine koji se izgrađuju u jednoj biljci, a proteini koji u određenom trenutku odgovaraju transkriptomu, sačinjavaju **proteom**. **Metabolomika** je orijentisana na sve metabolite, odnosno **metabolom**, koji se u biljci, pod datim uslovima, sintetišu; ona ima najteži zadatak zbog raznovrsnosti metabolita i najmanje je odmakla u razvoju. Primenom svih ovih metoda i pristupa očekuje se da će proizaći sistemski pregled funkcija jedne biljke, koji će predstaviti ne opšte mogućnosti biljke, nego njeno stvarno stanje u različitim uslovima.

3.2. O genima

3.2.1. Šta su geni?

Prošlo je više od sto godina otkako je Johanssen [7] prvi upotrebio termin „gen“ za tada imaginarnu jedinicu koja prenosi nasledne osobine sa roditelja na potomke; prošlo je više od 60 godina otkako su Watson i Crick [8] utvrdili da su geni, fizički, sekvence DNK – a naučnici su se našli pred činjenicama zbog kojih su morali da većinu dotadašnjih shvatanja revidiraju i da redefinišu gene i njihove funkcije. Sekvenciranje genoma, kome se pristupilo krajem prošlog i početkom ovog veka, izmenilo je sliku o genima, naročito na osnovu dveju pojava koje su pri sekvenciranju otkrivene [9].

Prva pojava, **alternativno vezivanje egzona** (eng.: „alternative gene splicing“), pokazala je da se primarni transkript (pre-iRNK) mnogih gena kod viših eukariota može prevesti u veći broj zrelih iRNK, koje sadrže ra-

zličite kombinacije egzona i tako kodiraju za različite proteine. Znači jedan gen-više proteina. Drugo zapažanje tiče se činjenice da mnogi geni imaju više startnih mesta sa kojih se inicira transkripcija, odnosno imaju alternativne promotore. Oni takođe mogu imati više terminalnih mesta na kojima se završava transkripcija. To znači da jedan gen može da produkuje više od jedne vrste transkripata. Kada se tome doda i mogućnost alternativnog iskrajanja introna, jasno je da jedan genski lokus može da kodira veći broj iRNK i više proteina, umesto jednog, kako se ranije očekivalo. U humanom genomu geni za proteine u proseku daju 6,3 splajsovanih transkripata od kojih se 3,9 prevodi u proteine [10]. S druge strane otkriveno je mnogo gena koji kodiraju za raznovrsne RNK molekule koji se ne prevode u proteine, tzv. nekodirajuće RNK. Prema tome, postalo je jasno da pravilo „jedan gen – jedan protein“ više nije prihvatljivo. Viđenje organizacije gena u genomu takođe je promenjeno. Geni nisu linearno već modularno organizovani. Delovi jednog gena mogu biti razdvojeni i lokalizovani na različitim mestima u genomu, čak i na drugom hromozomu. iRNK se u tom slučaju dobija tzv. transsplajsovanjem. Takođe, sekvence pojedinih gena se **preklapaju**, tj. geni mogu deliti iste DNK sekvence u različitim okvirima čitanja.

Iz tog razloga teško se može govoriti o tačnom broju gena u jednoj ćeliji, ili organizmu, pa će sve dosadašnje procene možda biti promenjene. Ono što se nije promenilo jeste mišljenje da genotip određuje fenotip, a na molekularnom nivou to i dalje znači da DNK sekvence determinišu sekvence funkcionalnih molekula. S obzirom na to da genetičke modifikacije pretpostavljaju prenos gena iz jednog u drugi organizam, potrebna je nova, prihvatljiva definicija šta je to gen. Za sada, predloženo je da se kao gen prihvati „zajednica genomskih sekvenci, koja kodira koherentan set funkcionalnih produkata, koji se potencijalno preklapaju“ [11]. Drugi autori dopunjuju ovu definiciju ističući značaj fenotipa; oni predlažu da „gen čine sve one sekvence koje determinišu jednu fenotipsku osobinu“ [12].

3.2.2. Ekspresija gena

Meristemske ćelije, koje se više puta uzastopno dele, u svakom ćelijskom ciklusu prolaze kroz S fazu, u kojoj se replikacija DNK ponavlja, kao i kroz mitotičku fazu, u kojoj se hromozomi razdvajaju u dve nove ćelije. U svim fazama ćelijskog ciklusa osim u mitozu, geni su aktivni u sintezi RNK. U mitozu, sintezu RNK sprečavaju histoni, jer ne dopuštaju oslobađanje pojedinih sekvenci DNK iz visokokondenzovanog oblika. Tokom ćelijskog ciklusa, međutim, u ćeliji se sintetišu samo RNK i proteini koji su potrebni za metaboličke funkcije ćelije. Tek kada ćelija izađe iz deobe i počne da raste, započinje sinteza proteina koji određuju morfologiju i funkciju koju će ćelija imati u organizmu. To je proces diferencijacije ćelija, u kome se među ćelijama pojavljuju karakteristične strukturne i funkcionalne razlike. Termin **diferencijacija ćelije** na molekularnom nivou znači pojavu novih, specifičnih proteina.

Nisu svi geni neprestano aktivni. Među njima ima takvih koji se obavezno prevode u proteine u svakoj ćeliji. To su **konstitutivni geni** za strukturne proteine ili enzime, koji obavljaju osnovne funkcije i bez kojih održavanje života uopšte nije moguće. Ali mnogi geni se ispoljavaju samo u određenim vrstama ćelija i tkiva. Oni se tiču **tkivno specifičnih osobina**, po kojima se ćelije jedna od druge razlikuju. Na primer, u sasvim mladom začetku lista sve ćelije izgledaju jednake, ali se ubrzo među njima pojavljuju razlike. Sasvim je različit skup strukturnih proteina ili enzima u mezofilnim ćelijama koje će obavljati fotosintezu, od proteina u ćelijama koje će izgraditi ksilem i floem sa provodnom funkcijom, ili najzad od epiderma sa stomama, koji ima zaštitnu ulogu. Zatim, ni u jednom tkivu se sve potencijalne osobine ne pojavljuju istovremeno, nego po određenom vremenskom rasporedu. Tako ćelije meristema stabla u vegetativnoj fazi razvića formiraju listove i bočne pupoljke, a u reproduktivnoj, umesto njih, organe cveta. Razume se da se proteini

ovih sukcesivnih organa bitno razlikuju. Ta pojava ilustruje nivo **razvojnje kontrole** u sintezi proteina. Najzad, faktori spoljašnje sredine, među kojima su najvažniji svetlost, temperatura, gravitacija, patogeni organizmi, stresni uslovi i drugi, regulišu sintezu specifičnih proteina, što predstavlja spoljašnju, **sredinsku kontrolu** ekspresije gena. Svi činioci koji utiču na sintezu proteina jesu **signali** na koje biljka reaguje. U slučaju tkivne specifičnosti u sintezi proteina, signali potiču od okolnih ćelija i nova ćelija se diferencira u skladu sa **svojim položajem** u tkivu. U razvojnoj kontroli diferencijacije, najčešće posreduju **biljni hormoni**, pa ćelije u razvoju reaguju na kompleks hormona koji je prisutan. Spoljašnji faktori deluju preko odgovarajućih **receptora**, npr. svetlost preko fotomorfogenetskih pigmenata. Jedno od najaktuelnijih pitanja u savremenoj biologiji odnosi se na prijem signala i njihov prenos na ciljne ćelije, u kojima se izgrađuju specifični proteini.

Cis-regulatorni elementi jesu nekodirajuće sekvence DNK koje regulišu ekspresiju susednih gena (gena koji su na istom lancu DNK). *Trans*-regulatorni elementi jesu geni koji regulišu ekspresiju udaljenih gena, a kodiraju transkripcione faktore. Transkripcioni faktori prepoznaju *cis*-regulatorne sekvence i mogu se specifično vezivati za njih. Mnogi proteini, koje proizvode *trans*-elementi, kao i *cis*-regulatorni elementi su modularnog tipa, što znači da se mogu kombinovati na razne načine. To omogućava da jedan isti faktor deluje na različite gene, zavisno od drugih faktora sa kojima je u kombinaciji. Time se objašnjava višestruko dejstvo biljnih hormona i njihova interakcija sa svetlošću ili drugim faktorima, jer u jednoj kombinaciji aktiviraju jedne, a u drugoj druge gene.

Saznanja o brojnim nivoima regulacije ekspresije gena razrešila su jednu davnu dilemu u biologiji. Ranije se smatralo da ćelija koja se diferencira gubi neke od svojih gena i zato postaje različita. Danas je jasno da sve ćelije zadržavaju nasleđeni genom tokom celog života, ali da se pojedini geni različito eksprimiraju, što dovodi do pojave različitih proteina.

Za višestruko korišćenje ćelijskih genetičkih potencijala zaslužne su epigenetičke promene koje obuhvataju promene u strukturi hromatina, nastale metilovanjem DNK, modifikacijom N-krajeva histona i aktivnošću regulatornih molekula RNK. U svetlu novih saznanja o epigenetičkim promenama pokazalo se da promene ekspresije DNK, nastale pod dejstvom sredinskih činilaca, mogu da izlaze iz okvira koji je određen genetičkim programom razvića i da se nasleđuju kroz par generacija.

3.2.3. Regulacija genske ekspresije: male regulatorne RNK

Poslednja decenija 20. veka donela je i nova otkrića o posebnim vrstama ribonukleinskih kiselina, koje imaju različite i značajne funkcije u mnogim procesima u ćeliji, a naročito u kontroli ekspresije gena kod prokariota i eukariota. Ove vrste ribonukleinskih kiselina nazivaju se **regulatorni molekuli RNK** i dele se na **duge nekodirajuće RNK** (eng.: „long non-coding RNA“) i **male nekodirajuće RNK** (eng.: „small non-coding RNA“). Duge nekodirajuće RNK su duže od 200 nukleotida (nt) i uključene su u posttranskripcionu regulaciju ekspresije genoma. Male nekodirajuće RNK svrstane su u tri klase: (1) male interferirajuće RNK (eng.: „small interfering RNA – siRNA“), (2) mikro RNK (eng.: „micro RNA – miRNA“) i (3) RNK koje stupaju u interakciju sa proteinima PIWI (eng.: „PIWI-interacting RNA – piRNA“). **piRNK** su karakteristične samo za životinje, dok su **siRNK** i **miRNK** zastupljene i kod biljaka. Razlikuju se po poreklu i načinu obrade prekursorskog molekula, kao i po proteinima sa kojima interaguju.

Utišavanje ciljnih nukleinskih kiselina koje su komplementarne malim nekodirajućim RNK naziva se **RNK interferencija (RNKi)**. Postojanje RNKi je utvrđeno kod nematode *Caenorhabditis elegans* 1998. godine, ali su zatim vrlo brzo takvi mehanizmi otkriveni kod svih eukariotskih organizama kod kojih su traženi [13], a nedavno je sličan mehanizam ot-

kriven i kod prokariota. Kod biljaka se do takvih otkrića došlo čak desetak godina ranije, u vezi sa dva procesa: sa **ko-supresijom gena** i sa **unakrsnom zaštitom od virusne infekcije**. Ko-supresija je zapažena u nekim slučajevima posle genetičke transformacije, za koju je bilo očekivano da će pojačati boju cveta petunije (pomoću unošenja komplementarne kopije gena koji u sintezi pigmenata kruničnih listića ima ključnu ulogu) [14]. Ali umesto da se izazovu promene u sintezi flavonoida u cvetnim listićima, dobijeni su potpuno beli, ili šareni, belo-ljubičasti cvetovi, kao da je sinteza pigmenata potpuno sprečena. Što se tiče virusne infekcije, bilo je poznato da infekcija nekim blagim sojem virusa sprečava kasniju infekciju drugim, virulentnim sojem; tom prilikom je, takođe, pretpostavljeno da se dva lanca RNK spajaju i nekim putem sprečavaju dalju aktivnost virusa. To je čak i korišćeno u gajenju citrusa, gde su voćnjaci namerno inficirani slabim virusom, da bi biljke preživele jaču infekciju. Tek je u radu sa *C. elegans* nađeno objašnjenje koje je razjasnilo sve ovakve pojave u biljkama i životinjama.

Danas je sa sigurnošću potvrđeno da se u ovim, kao i mnogim drugim slučajevima, radi o pojavi malih nekodirajućih RNK, koje regulišu aktivnost iRNK. Pod uslovima kada se u biljci pojave dvolančane RNK, usled komplementarnog sparivanja transkriptata ili formiranja intralančanih ukosnica u okviru istog transkripta, stupa u dejstvo enzimski kompleks koji je nazvan **dajser** (eng.: „dicer“ = rezač). To je ribonukleaza tipa III, koja ima dva aktivna mesta pomoću kojih iz dvolančanih RNK prekursora iseca fragment od ~22 nt. Ovaj fragment se zatim odmotava u dva jednolančana (eng.: „single-stranded RNA – ssRNA“), od kojih se jedan vezuje za drugi enzimski kompleks, nazvan **kompleks za utišavanje indukovano pomoću RNK** (eng.: „RNA-Induced Silencing Complex – RISC“), a drugi se degraduje. Segment RNK služi kao vodič za RISC-kompleks i vezuje ga za homologne sekvence u sastavu iRNK koja mu je meta. Segment vezan za RISK-kompleks prenosi se na

ciljnu iRNK na dva moguća mesta: ili na neke nukleotide koji se nalaze u okviru 3' kraja iRNK, koji se inače u translaciji ne prevode, ili negde na sredini iRNK, gde se nalazi manji broj baza koje su komplementarne jednolančanom, vezanom segmentu. U prvom slučaju dolazi do **represije translacije iRNK**, a u drugom se na mestu vezivanja RISK-kompleksa **iRNK raskida**. U oba slučaja je informacija koju prenosi iRNK blokirana, a time i translacija sprečena. Do sinteze proteina ne dolazi i za gene se kaže da su **utišani** [15]. Za sve procese u kojima učestvuju male regulatorne RNK potrebni su **Argonaut (AGO)** proteini. Oni su glavna komponenta kompleksa za utišavanje. Pripadaju velikoj porodici proteina; samo kod *Arabidopsis thaliana* nađeno je 10 članova ove porodice [16].

Već je rečeno da **dajser** deluje samo na dvolančane RNK, pa se postavlja pitanje kako one u biljci postaju. Iz gornjih primera jasno je da one mogu biti indukovane spolja, kao što je slučaj sa unošenjem transgena (komplementarne kopije) ili sa virusnom infekcijom. Tome treba dodati da i transpozoni mogu biti izvor dsRNK. Od dvolančanih RNK indukovanih spoljašnjim uzrokom nastaju egzogene **male interferirajuće RNK**, **exo-siRNK**. Postoje i endogene **male interferirajuće RNK**, **endo-siRNK**, čiji dvolančani prekursori nastaju od dugih nekodirajućih RNK.

Druga grupa malih RNK, **miRNK**, različita je po poreklu. Nastaje od jednolančanih prekursora. Naime, od velikog značaja je otkriće da u okviru jedarne DNK postoje geni, koji nose informaciju za mikroRNK. U tom slučaju nije potreban nikakav spoljašnji uzrok da se dvolančane RNK pojave. **MikroRNK geni (MiR geni)** jesu sekvence koje se nalaze u genomu svih eukariota i kodiraju RNK od oko 1 kb i transkribuju se kao i svi ostali geni. Kod biljaka su nađeni na različitim hromozomima. Neki se nakupljaju u regionima između gena [17], nekih ima u intronima gena koji kodiraju proteine, ili oko ponovaka koji kodiraju 5S rRNK. Njihovi transkripti imaju sposobnost da se savijaju i komplementarno povezuju

praveći dvolančanu strukturu sličnu ukosnici. Enzimski kompleks vrlo sličan kompleksu **dajser**, uz učešće posebnih proteina, najpre skraćuje savijene krajeve; jedan od njih zadržava segment 21-25 nt i od njega postaje ssRNK koja vezuje RISC-kompleks i vodi ga do ciljne iRNK. Ako se znaju sekvence miRNK, može se predvideti koja je iRNK njen cilj, po tome što sadrži komplementarne regione.

Dva su moguća puta utišavanja molekulima RNK: transkripciono utišavanje gena formiranjem heterohromatina ili posttranskripciono utišavanje degradacijom iRNK ili inhibicijom translacije. Ima dalje podataka da miRNK i siRNK regulišu upravo sintezu transkripcionih faktora i time održavaju nivo određenih razvojnih procesa. Iako je prošlo kratko vreme od otkrića i razumevanja funkcija malih nekodirajućih RNK, očigledan je njihov veliki značaj u procesu kontrole ekspresije gena.

3.2.4. Rekombinacija gena

Već je rečeno da je za život ćelije i za ispunjenje životnog ciklusa svake pojedine biljke od velike važnosti održavanje stabilnosti njenog genoma, koja se postiže vernim prepisivanjem DNK pri replikaciji i otklanjanjem eventualnih grešaka putem reparacije. To ne znači da su sve biljke iste populacije ili vrste potpuno jednake, nego da razlike među njima ne prelaze granice određene genetičkim okvirom. Izvesne razlike su ipak značajne, jer omogućavaju prilagođavanje biljaka na promenljive spoljašnje činioce. Stvari izgledaju drugačije kada se posmatraju sa gledišta evolucije, koja traje hiljadama i stotinama hiljada godina. Kada bi genom biljaka bio nepromenljiv, većina vrsta ne bi mogla preživeti velike promene klimatskih i drugih uslova. Evolucija se zasniva na favorizovanom razmnožavanju onih genotipova, koji, zahvaljujući svojim izmenjenim osobinama, imaju sposobnost da prežive i da ostave potomstvo. Jedan od uzroka promene genotipa su

mutacije, ali su one relativno retke i ne predstavljaju dovoljno široku osnovu za evoluciju. Mnogo je značajnija u tom pogledu **rekombinacija DNK**, kojom se povećava individualna varijabilnost jedinki u populaciji. Pod rekombinacijom DNK podrazumeva se preraspodela segmenata u okviru jedne DNK, što se može preneti na potomstvo. Glavni oblici rekombinacije DNK su: **homologna rekombinacija DNK u mejozi**, **rekombinacija DNK u somatskim ćelijama** i **rekombinacija pomoću transpozona**.

Mejoza je proces u kome se dešava rekombinacija gena. Sve diploidne biljne ćelije sadrže dva seta hromozoma ($2n$), jedan poreklom od muške, a drugi od ženske polne ćelije. Parovi hromozoma jednog i drugog seta morfološki su jednaki – po mestu centromera i dužini krakova, tako da svaki hromozom jednog seta ima svoj homologni hromozom u drugom setu. To ne znači da su parovi hromozoma po sastavu baza potpuno identični; oni su najvećim delom slični i imaju istu gensku mapu. Razlike među njima potiču od mogućnosti da geni budu predstavljeni različitim **alelima**. Međutim, u pripremi za obrazovanje haploidnih polnih ćelija, u **mejozi**, dolazi do promena genskog sastava DNK molekula, označenih kao **mejotička rekombinacija DNK**. Mejoza se sastoji od dve uzastopne deobe (I i II), od kojih je prva redukciona, a druga slična mitozu [18, 19]. Ne ulazeći ovde u detaljan opis mejoze, koja se odvija po istom obrascu kod svih živih bića kod kojih je zastupljena, treba istaći samo osnovne karakteristike, koje se tiču rekombinacije DNK.

Pre nego što ćelija uđe u deobu, DNK sporocita se replikuje i hromozomi izlaze iz S faze kao dve hromatide, povezane centromerama. Profaza prve deobe (profaza I) sastoji se od pet stadijuma i znatno se razlikuje od druge (profaze II). U prvim stadijumima profaze I (**leptoten i zigoten**) hromozomi još nisu maksimalno spiralizovani; u trećem stadijumu (**pa-hiten**) se homologni hromozomi celom dužinom sparuju i grade tetrade od ukupno četiri hromatide, po dve vezane i dalje svojim centromerama.

Na kraju tog stadijuma i u sledećem (**diploten**), hromatide jednog para se ukrštaju sa hromatidama drugog, na jednom ili više mesta, koja se zovu **hijazme**. Na tim mestima se ukrštene hromatide raskidaju i razmenjuju segmente, koji leže između hijazmi. Time se menja sastav svake hromatide i dolazi do raznih mogućih kombinacija alela, koji se nalaze unutar razmenjenih segmenata, a pojava je poznata kao **krosingover**. Pošto su razmenjeni delovi hromatida celom dužinom homologni, mejotička rekombinacija spada u širu grupu **homolognih rekombinacija (HR)**. U poslednjem stadijumu profaze (**dijakineza**) iščezava nukleolus, jedrova membrana se fragmentiše, a hromozomi se postavljaju u metafaznu ekvatorijalnu ploču (metafaza I). Centromere homolognih hromozoma su po slučajnom rasporedu orijentisane prema jednom ili drugom budućem polu deobnog vretena i odnos „muških“ i „ženskih“ hromozoma (tj. onih koji su poreklom od majke ili oca) u bilo kom budućem jedru je varijabilan. U anafazi I se homologni hromozomi razdvajaju, a u telofazi I se obrazuju dva nova jedra i dve ćelije. Interfaza do mejoze II je kratka, hromozomi ostaju u znatnoj meri kondenzovani i posle kratke profaze, **bez ponovne replikacije DNK**, ulaze u metafazu II. Tek tada se dele i centromere, pa se u anafazi II razdvajaju hromatide i u telofazi II se obrazuju četiri haploidna jedra i četiri ćelije. Od njih postaju četiri **mikrospore** sa muškim generativnim ćelijama, odnosno jedna **makrospora** (ženska) – pošto tri kod većine vrsta degenerišu – koja se razvija u embrionovu kesicu sa jajnom ćelijom. Sve haploidne ćelije se genetički razlikuju među sobom, a takođe i od oba roditelja. Razlike nastaju usled razmene segmenata DNK u profazi I, kao i usled slučajnog grupisanja hromozoma u dva nova jedra u telofazi I. Kad se tome doda činjenica da se polne ćelije pri oplodnji spajaju među sobom po principu slučajnosti, onda je jasno da za nove kombinacije alela u sledećoj generaciji postoji ogroman broj mogućnosti. Ta genetička varijabilnost čini osnovu za prirodnu selekciju i evolucione promene.

Za razliku od životinja, kod biljaka se polni elementi diferenciraju i od somatskih ćelija, i to relativno kasno u razviću, prilikom formiranja cveta (videti Poglavlje 2). Stoga se može dogoditi da mutacije ili rekombinacije, koje su označene kao **somatske rekombinacije DNK**, uđu i u polne elemente i postanu nasledne. Za homologne rekombinacije – kao i u mejozi – neophodno je da u parovima DNK postoje duži homologni segmenti, koji se recipročno razmenjuju. Homologne rekombinacije su česte kod kvasaca i životinja, a znatno su ređe kod biljaka [20].

Od većeg su značaja za biljke modeli rekombinacije koji ne zahtevaju dugačke homologne sekvence, a obuhvaćeni su opštim nazivom **ilegitimne rekombinacije**, ili **ne-homologno spajanje krajeva** (eng.: „Non-Homologous End Joining – NHEJ“). Ovaj način rekombinacija javlja se kao posledica dvolančanih prekida DNK i čest je kod kvasaca i životinja. Kod ovih organizama koristi se vrlo uspešno za genetičke modifikacije. Tek nedavno je obraćena veća pažnja i na NHEJ kod biljaka, što je omogućilo korišćenje ovog modela rekombinacije za genetičke modifikacije biljaka. Stoga će ove pojave biti izložene u odgovarajućem kontekstu kasnije (videti Poglavlje 5).

Transpozoni su mobilni elementi, o kojima je pedesetih godina prošlog veka Barbara McClintock [21] objavila svoje značajne zaključke; ona je tvrdila da izvesni geni kukuruza migriraju u okviru genoma s mesta na mesto i da je time uslovljena promenljivost boje zrna. To je dočekano u naučnim krugovima sa nevericom, ako ne i sa podsmehom. Ona je te gene nazvala **mobilnim genetičkim elementima** i predvidela da će u budućnosti oni biti korišćeni za usmerenu promenu naslednih osobina. Desetak godina kasnije, mobilni elementi su nađeni kod bakterija, kvasaca, drugih biljaka, vinske mušice i čoveka. Nestale su sumnje u to da oni predstavljaju univerzalnu pojavu u živom svetu i da su, štaviše, dobro sačuvani kod svih organizama. Njihova zajednička osobina je da prilikom prenosa nose

sobom sve genetičke informacije koje mobilni segment obuhvata. Mobilni elementi se označavaju i kao **transpozoni**, a Barbara McClintock je 1983. godine nagrađena Nobelovom nagradom za fiziologiju i medicinu, zbog svojih dalekovidnih zaključaka i odbijanja da ih se odrekne, iako oni nisu bili u saglasnosti sa dominirajućim shvatanjima u genetici toga vremena.

Postoje dva osnovna tipa mobilnih elemenata. Oni koje je otkrila Barbara McClintock pripadaju tipu II, iako su prvi otkriveni. Oni se sastoje od dve vrste elemenata, koji čine *Ac/Ds* porodicu. Autonomni elementi (*Ac*) su segmenti DNK koji sadrže gen, čiji je produkt enzim **transpozaza**, neophodna za transpoziciju. Na krajevima su oni ograničeni inverznim ponovcima od oko 10 baznih parova. *Ds* elementi nemaju gen za transpozazu, ali imaju iste repetitivne sekvence na krajevima. *Ac* element je potreban da bi *Ds* element bio aktiviran. Naime, transpozaza (iz *Ac* elementa) raspoznaje repetitivne sekvence i na tim mestima iseca segment DNK (*Ds*), koji zatim prenosi na neko drugo mesto u genomu, gde ga ugrađuje u DNK lanac. Naknadno se može dogoditi da *Ds* segment bude ponovo odstranjen, ali izvesni nukleotidi ostaju na mestima u genomu odakle je transpozon iskrojen i po tome se može zaključivati o pozicijama mobilnih elemenata u evolucionoj prošlosti.

Mobilni elementi tipa I su **retrotranspozoni**. U procesu kopiranja i prenošenja retrotranspozona na različita mesta u genomu učestvuje enzim **reverzna transkriptaza**. Ovaj enzim sintetiše DNK molekul (tzv. cDNK) na osnovu RNK matrice, a potom se ovakva DNK ugrađuje na drugo mesto u genomu. Ako se to mesto nalazi usred nekog gena, funkcija tog gena može biti izmenjena ili, najčešće, blokirana [22]. Razume se da to može imati različite posledice za fenotip izmenjenih ćelija. Pomoću transpozona se mogu izazivati mutacije u biljci koja je primalac transpozona, što se razvilo kao široka oblast **transpozicione mutageneze**.

3.2.5. Identifikacija gena

Za dalji razvoj genetičkog inženjerstva potrebna su znanja o biljnim genima, koji mogu biti preneti u druge biljke. Do devedesetih godina 20. veka, bilo je izolovano vrlo malo biljnih gena, jer njihova struktura i mesto na hromozomima nisu bili poznati. Naučnici koji su se bavili genetičkim inženjerstvom uglavnom su se orijentisali na korišćenje gena izolovanih iz bakterija, koji su biljkama donosili otpornost prema herbicidima, patogenim organizmima ili metaboličkim inhibitorima. Oni su bili nezamenljivi u prvim fazama proučavanja, jer su olakšavali praćenje transformacije i proučavanje sudbine transgenih biljaka. Korisnost tih gena ni do danas nije umanjena, ali je ubrzo postalo jasno da genetičke transformacije mogu imati mnogo više domete. San svih naučnika bio je da osobine jedne biljke, koje su od ekonomskog interesa, prenesu u drugu biljku; međutim, većina tih osobina zavisi ne samo od jednog, nego od koordinirane aktivnosti više gena. O genima koji su nosioci tih osobina nije se mnogo znalo. Sekvenciranje genoma je bilo prvi korak da se svi geni jednog organizma identifikuju kao segmenti DNK, tako da se mogu izolovati i klonirati. Sledeći zadatak koji se nametnuo bilo je određivanje funkcije tih segmenata. Danas se geni kao segmenti DNK identifikuju pomoću **obeležavanja**. U genetici se odavno koriste mutanti, čiji je genotip izmenjen usled promene u sastavu ili redosledu nukleotida u DNK. Oni se prepoznaju po fenotipu, tj. po nekoj osobini koja je promenjena kod mutirane biljke. Ta promena predstavlja indikaciju da tu osobinu kontroliše mutirani gen. Prema mutiranom genu mutanti dobijaju svoj naziv, pomoću njega se određuje genski lokus mutacije na hromozomu i prati se mutacija u potomstvu. Sa sličnim ciljem se mutacije kod arabidopsisa i drugih biljaka izazivaju veštački, time što se u genom ugrade karakteristični segmenti strane DNK. Najčešće se za to koriste transpozoni kukuruza ili T-DNK iz plazmida *Agrobacterium* (videti Poglavlje 5). Semena arabidopsisa se

stavljaju u suspenziju koja sadrži transpozone ili DNK plazmida, koji se tada ugrađuju u DNK domaćina na različitim, slučajnim mestima. Transpozoni, odnosno DNK plazmida su ograničeni prepoznatljivim sekvencama i njihovo mesto se može detektovati. Ukoliko se mesto insercije nalazi u okviru nekog gena, onda taj gen postaje neaktivan, izbačen iz ukupne genske aktivnosti, pa se popularno naziva **nokaut gen**. Analizom sekvenci DNK, koje se nalaze oko transpozona odnosno T-DNK, ceo gen se može identifikovati molekularnim metodama. Ceo postupak se zove **inserciona mutageneza**. Radi provere postupka analiziraju se sukcesivne generacije. Ako mutirani gen ispolji svoj efekat i u drugoj samooplođenoj generaciji (F₂), znači da je on stabilizovan. Fenotip biljaka druge generacije tada ima ili nema izvesne osobine, za koje se može pretpostaviti da ih upravo inaktivirani gen određuje. Reverznom transkripcijom sekvenci toga gena mogu se dobiti njegove kopije (cDNK), koje se mogu klonirati i koristiti za izučavanje funkcije toga gena, kao i za genetičku transformaciju drugih biljaka. Individualne biljke arabidopsisa, sa različitim mutacijama, čine danas dragocenu kolekciju, „biblioteku“ iz koje se kopije gena mogu izolovati, klonirati i preneti u druge biljke.

Iako su opisani postupci zahvaljujući savremenim metodama sasvim izvodljivi, korišćenje nokaut gena nije do sada dalo očekivane rezultate. Teorijski je moguće izolovati nokaut linije za svaki gen iz DNK arabidopsisa. Ali od nekoliko stotina do sada izolovanih mutiranih linija, samo manje od 2% imaju fenotip sa informativnim, jasnim morfološkim i drugim promenama, dok ostale izgledaju uglavnom kao normalne biljke. Za tu pojavu postoji više mogućih objašnjenja. Prvo, za arabidopsis je karakteristično to da u svome genomu poseduje blizu 60% duplikata gena. Smatra se da je pre oko sto miliona godina, ova vrsta postala od tetraploidnog pretka, kao što se dogodilo i sa mnogim drugim biljnim vrstama u evoluciji [23]. Neki duplikati gena su se izgubili ili promenili

funkciju, ali je ipak najveći deo ostao i uklopio se u genom, tako da vrsta sada funkcioniše kao diploidna. Ako se jedan od dupliranih gena isključi mutacijom, drugi može biti dovoljan da preuzme njegovu funkciju. Smatra se da je tokom evolucije moglo doći do promene faktora regulacije pojedinih gena. Dva srodna gena su se možda pojedinačno specijalizovala da budu aktivirani samo u određenim organima i njihovim ćelijama. Drugi su možda stekli osetljivost prema nekom hemijskom stimulusu, kao što su fitohormoni, ili prema nekom spoljašnjem faktoru. Izostanak ekspresije takvih gena sa promenjenom regulacijom može biti maskiran proizvodi-ma srodnih gena, ili se ispoljiti samo pod specifičnim uslovima. Došlo je do situacije da se traži fenotip prema genotipu koji je poznat [24]. Razume se da ove okolnosti otežavaju identifikaciju gena, ali u isto vreme ukazuju i na nove mogućnosti koje se u ovom pravcu otvaraju. O tome će biti više podataka u poglavljima koja se bave genetičkim transformacijama.

Sažetak

Nukleinske kiseline i proteini su makromolekuli koji svojom aktivnošću održavaju i prenose šifru o naslednim osobinama živih bića. Šifra je ispisana u redosledu nukleotida u molekulima dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) i prenosi se iz ćelije u ćeliju pri razmnožavanju ćelija u jednom organizmu, kao i kroz gamete, iz generacije roditelja na generaciju potomstva. Genetička šifra je početni izvor informacija, koje se sa DNK prenose na ribonukleinske kiseline (RNK) u istoj ćeliji u procesu transkripcije, a zatim u translaciji prevode u sastav proteina. Proteini su molekuli koji u skladu sa genetičkim informacijama obezbeđuju ispoljavanje nasleđenih osobina tj. katalizuju sintezu jedinjenja, koja ulaze u strukturu ćelija i obavljaju ili regulišu metaboličke procese. U svim tim procesima razvijeni su mehanizmi koji obezbeđuju, u prvom redu,

stabilnost genetičkih informacija. To se ogleda prilikom replikacije DNK, čija je kopija verna originalu, a ukoliko se pritom ipak pojave greške, one se većinom popravljaju pomoću sistema reparacije DNK. Zatim, vernost originalu ogleda se u tačnosti prepisivanja sastava DNK u sastav RNK pri transkripciji, kao i u prevođenju na sastav proteina pri translaciji. Mnogi od molekula RNK i proteina imaju i regulatorne funkcije, koje doprinose stabilnosti razvića i obezbeđuju adekvatan plastični odgovor organizama u varijabilnim uslovima životne sredine.

Ceo opisani sistem makromolekula je dovoljno fleksibilan da se može menjati. Osnovne promene, apsolutno svojstvene svim živim bićima, ogledaju se u rekombinaciji gena u sastavu DNK, što je inače opšta pojava u mejotičkoj deobi prilikom gametogeneze. No i drugi činioci mogu dovesti do rekombinacije DNK, što povećava genetičku i fenotipsku varijabilnost koja je osnova za delovanje evolucionih mehanizama i pravce adaptivne evolucije u konkretnim uslovima životne sredine. Sve direktne promene u sastavu DNK (mutacije i rekombinacije) dešavaju se spontano kroz funkcionisanje prirodnih molekulskih sistema svake ćelije i čitavih organizama. Namerne genetičke modifikacije, koje istraživači žele da izvedu, koriste iste molekulske sisteme. Dakle, u praksi, genetičkim modifikacijama „imitiraju“ se prirodni procesi. U tu svrhu su organizovani postupci za upoznavanje genoma, kao što su sekvenciranje, identifikacija gena i utvrđivanje njihove funkcije, što je već pružilo mnoga korisna znanja i rezultate.

Literatura 3

1. Savić-Pavićević D, Matic G (2011) Molekularna biologija 1. NNK Internacional, Beograd.
2. Sugiura M, Takeda Y (2000) Nucleic acids. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. B Buchanan, W Gruissen & R Jones (Eds), American Society of Plant Physiology, pp. 260-310.
3. Ferl R, Paul AL (2000) Genome organization and expression. Ibid. pp. 312-357.
4. The Arabidopsis genome initiative: sequence and analysis of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* (2000) Nature 408: 796-815.
5. Pruitt RE, Meyerowitz EM (1986) Characterisation of the genome of *Arabidopsis thaliana*. Journal of Molecular Biology 187: 169-183.
6. Bevan M, Mayer K, White O, Eisen JA, Preuss D, Bureau T, Salyberg S, Mewes HW (2001) Sequence and analysis of the *Arabidopsis* genome. Current Opinion in Plant Biology 4: 105-110.
7. Johanssen W (1909) Elemente der exacten Ererblichkeitslehre. Biology and Philosophy 4: 303-329.
8. Watson JD, Crick FHC (1953) A structure of deoxyribonucleic acid. Nature 171: 964-967.
9. Pesole G (2008) What is a gene? An updated operational definition. Gene 417: 1-4.
10. The ENCODE Project Consortium: An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome (2012) Nature 489: 57-74.
11. Gerstein MB, Bruce C, Rozowsky JS, Zheng ZD, Weissman S, Snyder M (2007) What is a gene, post-ENCODE? History and updated definition. Genome Research 17: 669-681.

12. Gingeras TR (2007) Origin of phenotypes: Genes and transcripts. *Genome Research* 17: 682-690.
13. Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57: 19-53.
14. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279-289.
15. Galun E (2005) RNA silencing in plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 11: 113-123.
16. Hutvagner G, Simard MJ (2008) Argonaut proteins: key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 22-32.
17. Mallory AC, Vaucheret H (2004) MicroRNAs: something important between the genes. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 120-125.
18. Glišić Lj (1998) Opšta citologija. Unija bioloških naučnih društava Jugoslavije.
19. Dawe RK (1998) Meiotic chromosome organisation and segregation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 371-395.
20. Hanin M, Paszkowski J (2003) Plant genome modification by homologous recombination. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 157-162.
21. McClintock B (1948) Mutable loci in maize. *Carnegie Institution of Washington Year Book* 47: 155-169.
22. May BP, Martienssen RA (2003) Transposon mutagenesis in the study of plant development. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22: 1-35.
23. Wendel JF (2000) Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* 42: 225-249.
24. Bouché N, Bouchez D (2001) *Arabidopsis* gene knockout: phenotypes wanted. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 111-117.

Poglavlje 4

Promenljivost genoma tokom evolucije, domestikacije i savremene selekcije

Mirjana Nešković

U toku skoro četiri milijarde godina, koliko se pretpostavlja da traje život na Zemlji, živa bića su prošla kroz ogroman broj geografskih, klimatskih i drugih promena u sredini u kojoj žive, dok su evoluirala do oblika koje poznajemo danas. Za to vreme mnogo vrsta je iščezlo, a nastajale su druge, koje su bile sposobnije da prežive pod novim uslovima. Za nastajanje novih vrsta neophodno je postojanje genetičke varijabilnosti, koja se može ispoljavati kada se promene spoljašnji uslovi i koja predstavlja proksimalni osnov za evolucione promene. Potencijal promenljivosti živog sveta vidljiv je svakom posmatraču koji lako može zapaziti individualne razlike u okviru jedne populacije, ili razlike između populacija na različitim staništima. Pojam **biološki diverzitet (biodiverzitet)** predstavlja varijabilnost među živim organizmima unutar vrsta, između vrsta i u ekosistemima. Očuvanje diverziteta vrsta ili ekoloških zajednica danas je jedan od prvenstvenih zadataka ekologije i biologije uopšte. Živimo u vremenu kada se nepredvidivim procesima prirode koji ugrožavaju životnu sredinu pridružio i čovek. Sa razvojem modernog industrijskog društva ubrzano se uništavaju prirodni resursi na kojima društvo počiva. Srećom, biolozi i naučnici drugih oblasti svesni su te opasnosti, pa nastojanja da se ona umanj i spreči jedan su od glavnih ciljeva savremene naučne zajednice [1].

Izvestan broj angažovanih pobornika zaštite prirode ubraja, među faktore koji je ugrožavaju, i pojedina genetička istraživanja, a naročito ona usmerena na modifikaciju genoma. Mnogi od njih smatraju da modifikacije genoma upravo skreću prirodne tokove evolucije u pravcu degradacije biodiverziteta i uništenja prirodnih resursa njegovog obnavljanja. Kada se u javnosti govori o biodiverzitetu, obično se polazi od nivoa vrsta; međutim previđa se činjenica da se biodiverzitet vrsta zasniva na **genetičkom diverzitetu**. Čovek je na genetički diverzitet nesvesno ili svesno uticao od samog početka civilizacija, prvo kroz proces **domestikacije** biljaka i životinja, a zatim kroz moderne metode **oplemenjivanja i selekcije** tokom XX veka. Na nivou gena, posledice ovih ljudskih praksi nisu bitno različite od procesa genetičkih promena tokom evolucije. Evolucija, domestikacija i veštačka selekcija imaju isti zajednički imenitelj – održavanje tokom generacija konkretnih genetičkih varijanti koje su nastajale mutacijama, tj. **modifikacijama gena**. Tome se danas pridružuje i genetičko inženjerstvo, koje u tom pogledu ne donosi ništa suštinski novo [2]. Prva i ogromna razlika između ovih procesa je različita vremenska skala na kojoj se oni odvijaju. Sličnost se ogleda u tome što se u osnovi svih navedenih fenomena nalazi genetički diverzitet i selekcija u potomstvu onih jedinki koje imaju najveću adaptivnu vrednost u određenim uslovima životne sredine. Nasuprot evolucionim promenama, koje podrazumevaju duge vremenske skale i zasnivaju se na delovanju evolucionih mehanizama koji su nezavisni od čoveka (tj. prirodni su), kroz domestikaciju su ljudi – svakako nenamerno u prvo vreme – učestvovali u selekciji onih biljaka i životinja koje su imale osobine najkorisnije za ljudska društva. Selektioneri današnjice sami kreiraju i raznovrsnost biološkog materijala i odabiraju organizme sa poželjnim karakteristikama. Najzad, u genetičkom inženjerstvu rukovodi se izborom **gena čije su funkcije poznate**. U svojoj suštini, unošenje stranog gena u genom neke biljke jeste povećanje genetičkog diverziteta na kome se zasniva efekat selekcije novih osobina. Osnovna ideja ovog poglavlja je

da na izabranim primerima pokaže šta je zajedničko opisanim procesima, kao i da se suprotstavi uverenju da genetičko inženjerstvo predstavlja neprirodan, čak i protivprirodan postupak. A u daljem tekstu će biti pokazano da genetičko inženjerstvo zahteva opreznost, proveru i kontrolu, bar onakvu kakvu zahtevaju i drugi proizvodni postupci u savremenom industrijskom društvu.

Morfološke i fiziološke osobine jedne individue (**fenotip**) određene su njenim **genotipom**, a razvojni programi po kojima se vrste razlikuju među sobom određeni su genotipovima koji postavljaju granice u okviru kojih osobine unutar vrste mogu varirati. Proces postanka novih vrsta, označen kao **specijacija**, vrlo je dobro objašnjen poslednjih godina na molekularnom nivou. Među činiocima koji povećavaju genetički diverzitet kod biljaka i mogu uticati na proces specijacije, nalaze se **unakrsno oplođenje, mutacije i poliploidija**.

Unakrsno oplođenje među varijetetima ili ekotipovima iste vrste ima veliki značaj za kombinovanje fenotipskih osobina budući da se varijeteti i ekotipovi odlikuju različitom zastupljenošću različitih alela na brojnim genima. U konkretnim uslovima životne sredine u jednoj populaciji, prirodnom selekcijom biće favorizovane one kombinacije alela koje učestvuju u razviću osobina sa najvećim pozitivnim efektom na adaptivnu vrednost organizama. Biljke sa povoljnim alelskim kombinacijama obezbeđuju brojnije potomstvo, a transgeneracijska posledica ovog selekcionog procesa jeste povećanje učestalosti ovih genskih varijanti i genetičke homogenosti populacije. Nezavisne evolucione (genetičke) promene u dve ili više populacija iste vrste dovode do njihove divergencije i postepenog nastanka podvrsta i, konačno, novih vrsta.

Ulogu **mutacija** ne treba mnogo objašnjavati. Tokom brojnih metaboličkih ćelijskih procesa i genetičkih mehanizama ćelijske deobe

dešavaju se spontane mutacije, a delovanje različitih faktora spoljašnje sredine, npr. mutagena, može indukovati promene u strukturi DNK. U svakom slučaju, mutacije dovode do gubitka funkcije nekog gena i posledičnih promena u fenotipu, ili mogu usloviti promene funkcionalnosti gena i sticanje nekih novih fenotipskih svojstava. Mnoge mutacije su letalne, dok nesporno postoje i korisne mutacije koje uslovljavaju bolju prilagođenost uslovima sredine zbog čega će takve genske varijante biti selektivno favorizovane. Iako su mutacije relativno retki događaji u prirodi, njihov značaj na vremenskoj skali evolucije ne treba potcenjivati. U oplemenjivanju biljaka veliki značaj imaju **indukovane mutacije**, koje se mogu proizvesti zračenjem ili mutagenim hemijskim sredstvima. Na listi Međunarodne agencije za atomsku energiju, nalazi se oko 2250 novih varijeteta, koji su dobijeni indukovanim mutacijama. Oni se odlikuju novim agronomskim osobinama, hemijskim sastavom, ili drugačijim razvojnim putevima.

Jedno novijeshvatanjeuzrokagenetičkogdiverziteta pojavilo seposle uvođenja molekularnih metoda u izučavanju strukture biljnog genoma [3]. Naime, zapaženo je da je većina (70%) biljnih vrsta tokom miliona godina svoje evolucije prošla kroz višestruke periode udvostručavanja genoma, to jest doživljavale su višestruke runde **poliploidizacije genoma**. Starosti poliploidija u evolucionim linijama različitih grupa biljaka su različite – od veoma drevnih poliploidija na počecima divergencije evolucionih linija, do skorijih poliploidija. Genom tih vrsta je u početku udvostručen, ali tokom vremena se neki delovi dupliranog genoma gube, hromozomski parovi se postepeno diferenciraju i postaju novi hromozomi, a vrsta s vremenom postaje diploidna sa povećanim brojem hromozoma u odnosu na početni. Ono što ostaje od poliploidije su ponovljene **familije gena** prisutne na dva hromozoma (nakon jedne duplikacije), ili četiri (nakon dve duplikacije), itd. Duplikacijama pojedinačnih gena (usled nejednakog

krosing-overa) nastaju kopije gena na istom hromozomu (familije gena), a poliploidijom se dupliraju čitave familije. Većina unikatnih sekvenci DNK u današnjim genomima su umnožene u više kopija, koje grade familije srodnih gena; njihovi produkti su slični, ali se kao izoenzimi mogu na elektroforezi razlikovati. Multigenske familije su „sirovi materijal“ na koji deluje prirodna selekcija. Svi ponovljeni geni, čiji se proizvodi ne razlikuju, označeni su kao **redundantni**, a selektivna prednost organizama koji ih sadrže jeste povećavanje doze proteina za koje ovi geni kodiraju. U takve gene spadaju geni za ribozomalne RNK, za rezervne materije, npr. proteine semena, zatim za neke pigmente, sekundarne proizvode i brojni drugi. Tokom evolucije duplirane kopije gena mogu divergirati, odnosno funkcija gena može biti promenjena posle udvostručavanja. Svi geni koji potiču od zajedničkog pretka su **homologni**. Homologni geni koji se nalaze u različitim evolucionim linijama (vrstama) označavaju se kao **ortologni** geni, dok se duplirane kopije gena u istom genomu specifičnije nazivaju **paralogni** geni. Nastanku novih funkcija gena u različitim diferenciranim ćelijama, ili kod različitih vrsta, doprinose novi konteksti regulacije njihove aktivnosti u kojima učestvuju drugačiji *cis*-elementi, pa ih aktiviraju različiti regulatorni faktori. Promene se mogu desiti i u kodirajućem regionu gena, zbog čega će se dobiti različiti krajnji produkti, odnosno proteini. Udvostručeni geni, nastali bilo duplikacijom pojedinačnih gena bilo poliploidijom, mogu imati različite sudbine. Oni mogu biti utišani ili sa novim biohemijskim i fiziološkim funkcijama zbog kojih će organizmi potencijalno biti otporniji prema nepovoljnim sredinskim uslovima. Najzad, oni mogu na razne načine učestvovati u rekombinacijama i mnogim genskim interakcijama. Za ilustraciju ovih pojava postoje dobro proučeni primeri; svi oni svedoče o evoluciji gena i genetičkog diverziteta.

4.1. Evolucija C4 biljaka

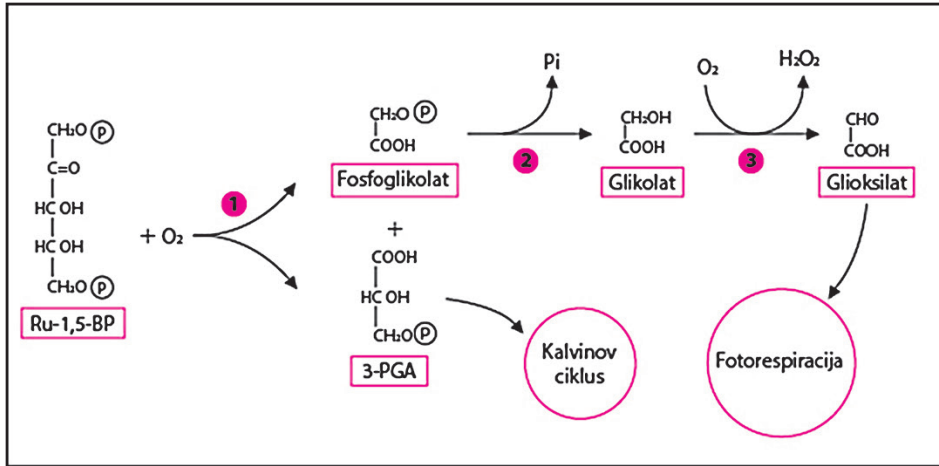
Evolucija biljnih vrsta dobro je dokumentovana na osnovu fosilnih nalaza, na osnovu morfoloških osobina izumrlih i recentnih biljaka, na osnovu embrioloških podataka, geografskog rasprostranjenja i mnogih otkrića u svim granama biologije. Evidencija o evoluciji fizioloških funkcija kasnila je za dokazima evolucije u drugim disciplinama, jer nije lako utvrditi kako su se obavljali fiziološki procesi izumrlih biljaka. Jedan od interesantnih uvida u evoluciju fizioloških funkcija pružaju recentne biljke, koje se razlikuju od većine biljaka po načinu fotosintetičkog usvajanja CO_2 iz atmosfere (fiksacija CO_2) i njegovog ulaska u organske supstance (karboksilacija). Osobine tih biljaka su obuhvaćene terminom **C4 sindrom**.

- CO_2 se kod većine biljaka vezuje za **ribulozu-1,5-bisfosfat (RuBP)**, šećer sa pet ugljenikovih atoma, a od nestabilnog produkta postaju odmah dva molekula **3-fosfoglicerinske kiseline (3-PGA)**, sa po tri ugljenika. Takve biljke, čiji je prvi stabilan produkt fotosinteze jedinjenje sa tri atoma ugljenika zovu se **C3 biljke**.
- CO_2 se kod izvesnih biljaka vezuje za **fosfoenolpiruvat (PEP)**, koji već ima tri ugljenika, tako da se dobija oksal-sirćetna kiselina; ona brzo prelazi u **malat** (jabučna kiselina) ili u **asparaginsku** kiselinu. Sve ove tri kiseline imaju po četiri atoma ugljenika, pa se biljke koje ovaj proces obavljaju zovu **C4 biljke**.
- Prema tome, primarna razlika između C3 i C4 biljaka je u tome što funkciju vezivanja CO_2 obavljaju različiti enzimi – karboksilaze. Kod C3 biljaka to je **karboksilaza ribuloza-1,5-bisfosfata (Rubisco)**, a kod C4 biljaka **fosfoenolpiruvatna karboksilaza (PEPC)**. Istovremeno, Rubisco vrši i proces oksigenacije, usled nedovoljne specifičnosti prema CO_2 kao supstratu, gde razlaže RuBP na jedinjenje sa tri

ugljenika 3-PGA i na molekul fosfoglikolne kiseline sa dva ugljenika (**Slika 4.1**). Samo 3-PGA nastavlja put u Kalvinovom ciklusu, dok fosfoglikolna kiselina ulazi u proces **fotorespiracije**. Iz tog procesa se delimično, ali najviše do 25% ugljenika može vratiti u Kalvinov ciklus, dok je ostatak izgubljen i vraća se u atmosferu kao CO₂. Karboksilacija putem Rubisco neminovno je povezana sa nepotpunim korišćenjem raspoloživog CO₂. Za razliku od toga, PEP-karboksilaza vezuje sav raspoloživi CO₂ u C4 kiseline i takvih gubitaka nema. Da li će Rubisco obavljati pretežno karboksilaciju ili oksigenaciju RuBP, zavisi od odnosa CO₂ : O₂ u okolnom vazduhu. Pri današnjem sastavu atmosfere, u kojoj preovlađuje kiseonik, kod C3 biljaka se fotorespiracija ne može izbeći i skoro četvrtina CO₂ je izgubljena, što znači i četvrtina potencijalnih proizvoda fotosinteze.

- Bitna odlika C4 biljaka u tome je što se u listu nalaze **dva tipa različito diferenciranih ćelija**, među kojima je proces fotosinteze striktno razdvojen:
- U mezofilnim ćelijama nalaze se hloroplasti u kojima se usvaja CO₂ iz intercelulara i obavlja karboksilacija PEP. Ove ćelije ne sadrže Rubisco, zbog čega se ni jedan dalji fotosintetički proces u njima ne događa. C4 kiseline, jabučna, odnosno asparaginska, transportuju se u posebne ćelije, koje leže oko provodnih snopića i grade njihov jednoslojni omotač, ili **saru**.
- U ćelijama sare C4 kiseline se dekarboksilišu pri čemu se oslobađa CO₂, a trikarbonski ostatak se vraća u mezofilne ćelije. Ćelije sare su jedine u listu koje sadrže Rubisco enzim i kompletne enzime Kalvinovog ciklusa. U njima se koristi CO₂ za karboksilaciju RuBP, koji ulazi u Kalvinov ciklus i u dalje fotosintetičke produkte. Hloroplasti ovih ćelija nemaju fotosistem II i ne proizvode kiseonik. Tako se u tim ćeli-

jama koncentriše CO₂, a koncentracija O₂ je vrlo niska. Pod tim uslovi-
ma je aktivnost Rubisco enzima u karboksilaciji maksimalna. Pomoću
aktivnosti dva enzima, C₄ biljke efikasno koriste CO₂, pa je njihova
produktivnost vrlo visoka.



Slika 4.1. Oksigenacija ribuloze-1,5-bisfosfata (RuBP). (1) Rubisco (ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza), (2) fosfoglikolatna fosfataza, (3) glikolatna oksidaza

4.1.1. Poreklo C₄ biljaka

Do sada je poznato preko 150 biljnih vrsta koje imaju C₄ put fiksacije CO₂. Ove vrste ne potiču od zajedničkog pretka, nego su svrstane u najmanje 18 različitih, čak filogenetski vrlo udaljenih familija monokotila i dikotila. S druge strane nalaze se slučajevi kada su dve bliske vrste istog roda različite po tipu fiksacije CO₂. Smatra se da je poreklo C₄ vrsta polifiletsko, što znači da su tokom evolucije nastale više puta nezavisno, a da je njihova pojava rezultat konvergentne evolucije. Šta je do nje dovelo, može se zaključiti iz činjenice da su sve C₄ vrste poreklom iz tropskih i subtropskih krajeva, dok C₃ vrste pripadaju zonama sa umerenom klimom. U krajevima odakle po-

tiču C4 vrste, temperature su znatno više, snabdevanje vodom je oskudnije i stome su češće zatvorene, čime se smanjuje transpiracija. PEP karboksilaza svojom aktivnošću naknađuje nedostatak CO₂, koji se pri zatvorenim stomama pojavljuje u listu. Otuda smanjenje transpiracije za C4 biljke nema isti poguban efekat na fotosintezu, kao kod C3 biljaka. Iz tog razloga su C4 biljke znatno produktivnije od C3 biljaka. Među C4 biljkama su šećerna trska, kukuruz i sirak, koje imaju najveću poznatu proizvodnju biomase, po čemu nadmašuju ostale gajene biljke, kao što su pšenica i pirinač.

4.1.2. Evolucija fosfoenolpiruvatne karboksilaze (PEPC)

Iz svih dosadašnjih podataka zaključeno je da su se C4 biljke pojavile onda kada je u fotosintetički proces uključen enzim sa novom funkcijom – PEPC. Međutim, treba naglasiti da nije do sada nađen ni jedan enzim koji bi bio jedinstven i specifičan samo za C4 put fiksacije CO₂, pa ni PEPC. I ovaj enzim je univerzalno rasprostranjen kod svih C3 i C4 biljaka i nalazi se u ćelijama svih biljnih organa. On svuda obavlja istu funkciju, tj. karboksilaciju PEP, ali ta reakcija je sastavni segment mnogih metaboličkih procesa. Samo je kod C4 biljaka ovaj enzim, osim osnovne, stekao posebnu funkciju u fotosintezi, koja se obavlja u ćelijama lista. Smatra se da je tip C4-PEPC evoluirao od C3 tipa PEPC, koji se nalazio kod nekog zajedničkog pretka. Molekularni aspekti ove promene rasvetljeni su za poslednje dve decenije, kada su i metode za takve analize postale dostupne. Više vrsta C3 i C4 biljaka bilo je ispitivano, a pokazalo se da su naročito pogodne vrste roda *Flaveria*, iz familije Asteraceae. Ovaj rod sadrži tri tipa biljaka koji su različiti po načinu fiksacije ugljenika: tipične C3 vrste, tipične C4 vrste i C3-C4 vrste, koje su po svojim karakteristikama intermedijerne. Kriterijumi za ovu podelu su bile osobine ključnih enzima koji su izolovani iz njihovih listova, a posebno PEPC. Intermedijerne vrste *Flaveria* su takođe među sobom različite. Kod njih postoji gradacija C4 osobina: kod nekih

su C4 karakteri više izraženi, a druge su bliže C3 biljkama. Ove vrste su omogućile da se prati postepena evolucija enzima iz C3 u C4 tip, što je prikazano u više objavljenih članaka [4, 5].

Prema analizama proteina i iRNK za *PEPC* gen može se zaključiti da je enzim karakterističan za C4 biljke nastao mutacijom C3 gena, kako u okviru regulatornih nizova tako i u okviru kodirajućih sekvenci. Slična istraživanja drugih C4 enzima pokazuju da su i oni evoluirali na način koji je izmenio kinetiku i regulaciju proteina kodiranih predačkim genima. To je u skladu sa shvatanjima da se pojedinačni enzimi, koji katalizuju istu biohemijsku reakciju kod različitih vrsta i drugih taksona, ne moraju razlikovati bitno po redosledu aminokiselina. Ono što enzime razlikuje je njihova vremenska i prostorna regulacija u različitim tipovima ćelija [6].

Prilog 4.1. Gen za fosfoenolpiruvatnu karboksilazu (PEPC)

Gen za PEPC pripada maloj familiji gena od tri klase, označene kao *ppcA*, *ppcB* i *ppcC*. Smatra se da je, tokom evolucije, kod poslednjeg zajedničkog pretka za sve vrste *Flaveria*, gen *ppcB* dupliran i da je od njega nastao gen *ppcA*. U klasi *ppcA* nalaze se dva člana, od kojih je jedan evoluirao u C4-tip enzima u mezofilnim ćelijama lista. Svi ostali geni *ppc* nisu povezani sa fotosintezom i deluju kao C3-tip geni u drugim ćelijama. Prema tome, izoforma *ppcA* kod C4 biljaka je ortologna sa *ppcA* C3 biljaka. Poređenja ova dva oblika odnosila su se na kinetiku enzima, kao i na aktivnost i regulaciju ovih gena. C4-tip PEPC pokazuje oko 10 puta veći afinitet prema fosfoenolpiruvatu nego C3-tip PEPC. S druge strane, zasićenost bikarbonatom (od koga potiče CO₂) postiže se na nižim koncentracijama kod C4, nego kod C3-tipa enzima. Drugim rečima, C4-tip može da karboksiliše 10 puta veću količinu fosfoenolpiruvata nego C3-tip, i to pri znatno nižim koncentracijama CO₂. Malat (jabučna kiselina),

koji je krajnji produkt karboksilacije, inhibira ovu reakciju, ali je C4-tip znatno tolerantniji prema malatu, nego C3-tip. Stoga je od interesa bila uporedna analiza proteina ppcA kod jedne C4 (*F. trinervia*) i jedne C3 biljke (*F. pringlei*). Prema toj analizi, ove dve izoforme su identične u 96% aminokiselina. Ipak dva regiona u proteinu su različiti i javljaju se samo kod C4-tipa proteina. Smatra se da su oni determinante za kinetiku enzima. U jednom od njih, koji leži između aminokiselina 645 do 966, dominantnu funkciju ima serin 774. Svi C4-ppcA enzimi imaju na tom mestu serin, a enzimi C3-tipa umesto njega alanin. Drugi region nalazi se od 296 do 473 aminokiseline i u njemu kod C4-tipa dominira lizin na poziciji 347, a kod C3-tipa nalazi se arginin. Prema tome, dve aminokiseline su kod C4-tipa različite od C3-tipa. Ove promene verovatno utiču na kinetiku enzima i osetljivost u povratnoj inhibiciji. Regulacija aktivnosti ovih gena je takođe različita. Kod C4 biljaka (*F. trinervia*) gen je mnogo intenzivnije eksprimiran, ali samo u listovima i to u mezofilnim ćelijama. Kod C3 biljaka je on slabije eksprimiran, podjednako u listovima, stablu i korenu. Ti podaci ukazuju da postoje specifični *cis*-regulatorni elementi – pojačivači, a oni su i nađeni između nukleotida –1565 do – 2188 bp. Osim tog regiona sličnu funkciju imaju i početne sekvence promotora sve do 570. baznog para.

Razume se, ova istraživanja PEPC su samo prvi koraci u molekularnoj analizi C4 sindroma. Broj enzima koji su morali evoluirati je znatno veći, a tu spadaju i oni koji određuju anatomske i morfološke promene listova, kao i šire restrukturiranje celog metaboličkog sistema lista. Ipak ovi rezultati ukazuju na način, kako se u prirodi, u vrlo dugom periodu vremena, mogla paralelno odvijati evolucija strukture i funkcije.

4.1.3. Faktori selekcije C4 biljaka

Kako je prirodna selekcija učestvovala u evoluciji C4 biljaka? Biljke koje su stekle promene u strukturi gena bile su izložene nekim globalnim spoljašnjim činiocima, koji su doveli do konvergentne evolucije. Postoje mnogi dokazi da je u Zemljinoj atmosferi u ranijim geološkim periodima postojala znatno viša koncentracija CO₂ nego danas. Verovatno su tada sve biljke imale C3 tip fiksacije CO₂; pri višoj koncentraciji CO₂ aktivnost Rubisco u karboksilaciji bila je visoka i omogućavala relativno visoku produktivnost. Gubici ugljenika usled fotorespiracije su bili zanemarljivi. Međutim, tokom miliona godina se usled fotosinteze akumulirao kiseonik u atmosferi, a smanjivala se koncentracija CO₂. Fotorespiracija je u tim uslovima dostizala znatne vrednosti. Sem toga, u tropskim i subtropskim krajevima, gde su se biljke zatvaranjem stoma štitile od prekomerne transpiracije i koncentracija CO₂ u listu se smanjivala. C4 biljke su stekle prednost, jer su pod tim uslovima bile produktivnije i njihovo rasprostranjenje se širilo. Vidljive promene nastupile su u kasnom miocenu, i trajale su kroz ceo pliocen, kada su sisari i koprnene cvetnice postali dominantni organizmi na Zemlji. Cerling i saradnici [7] su u vrlo opsežnom istraživanju utvrdili da su se sisari kasne miocenske epohe, tačnije pre pet do sedam miliona godina, hranili znatno više C4 biljkama, zato što su one u vegetaciji bile dominantne. Kako se sada može objasniti u čemu je prednost C4 biljaka? Tokom miliona godina, pod opadajućim koncentracijama CO₂ u atmosferi, pojavile su se mutacije kod mnogih biljaka, koje su omogućavale prevladavanje ovih nepovoljnih prilika. One su svakako ostavljale više potomstva i postale dominantne u biljnim zajednicama. Verovatno je da mutacijama nisu nastajali novi enzimi, nego je promenjen način regulacije postojećih enzima. Prema tome, promenjeni klimatski uslovi, kao što je snižena koncentracija CO₂, predstavljali su selekcionni pritisak za prirodnu selekciju onih jedinki (i, konačno, vrsta)

koje pod takvim uslovima uspešnije preživljavaju i ostavljaju brojnije potomstvo. O eventualnom korišćenju gena C4 biljaka za povećanje produktivnosti govori se u kasnijem poglavlju (videti Poglavlje 7).

4.2. Promenljivost genotipa u toku domestikacije

U istoriji ljudskog društva čovek je imao velikog udela u evoluciji brojnih životinja i biljaka. Oko deset hiljada godina pre naše ere, kada su ljudske zajednice postepeno napuštale nomadski način života i prešle na zemljoradnju, čovek je pripitomio mnoge životinje i počeo da gaji biljne vrste koje je koristio za ishranu. Za ove organizme prirodna selekcija je zamenjena čovekovim odabiranjem. Možemo pretpostaviti da počeci ove prakse nisu bili sasvim osmišljeni, niti su se razumeli uzroci postepenih promena u gajenim vrstama. Zemljoradnici su jednostavno odbacivali seme koje im nije odgovaralo, a koristili i sejali seme koje je davalo bolje proizvode. Domestikacija glavnih gajenih vrsta može se pratiti po arheološkim nalazima i istorijskim dokumentima kojima raspoložemo. Danas je poznato da su centri porekla najvažnijih gajenih biljaka u tropskom i subtropskom regionu Srednje i Južne Amerike, Azije i Afrike, koji su, svakako ne slučajno, takođe i centri razvoja civilizacije. Iako se radi o različitim vrstama, domestikacija ima neke opšte pravce, koji su doveli do evolucije osobina biljaka korisnih za čoveka. Pre svega, **žetveni indeks**, tj. odnos suve težine onog dela zbog koga se biljka gaji, prema ukupnoj suvoj masi biljke, znatno je promenjen. Gajene biljke imaju relativno krupnija semena, više plodova, veće krtole, itd., nego njihovi divlji srodnici. Divlje biljke poseduju razne adaptacije za **rasejavanje plodova i semena**, u korist širenja areala vrste. Kod gajenih biljaka plodovi i semena većinom ne opadaju sa biljke, tako da ih je lako prikupiti i ubrati. Mnogi oblici **dormancije** razvijeni su kod divljih biljaka, što obezbeđuje da one klijaju tek kad spoljašnji uslovi postanu povoljni. Semena gajenih biljaka većinom su izgubila tu sposobnost,

jer čovek bira pogodno vreme setve. Sve te promene pri domestikaciji ne obuhvataju veliki deo genoma. Tokom godina gajenja nastajale su pojedine mutacije, a čovek je, zatim, birao za gajenje one jedinke koje su imale povoljnije osobine. Tako se frekvencija mutiranih biljaka postepeno povećavala, dok cela populacija, tj. 100% biljaka, nije postala homogena u mnogim osobinama. Verovatno je za taj proces bilo potrebno više vekova, ali ljudi su u novu eru ušli kao zemljoradnici čija se ishrana zasnivala na više kultivisanih biljnih vrsta.

4.2.1. Domestikacija kukuruza

Jedna od vrsta čija je domestikacija dobro proučena i na molekularnom nivou jeste **kukuruz** (*Zea mays* ssp. *mays*); posle više godina kontroverznih debata danas je široko prihvaćeno mišljenje da je kukuruz nastao na teritoriji današnjeg Meksika, domestikacijom divlje vrste **teozinte** (*Z. mays* ssp. *parviglumis*). Obe vrste i danas rastu na istim terenima, pa ih je lako porediti. Na prvi pogled, među njima je najupadljivija razlika u arhitekturi stabla, tj. u načinu grananja. Kukuruz ima jedno nerazgranato stablo, sa izduženom metlicom (muškom cvašću) na vrhu i sa klipom (ženskom cvašću) u pazuhu dva ili tri lista, na vrhovima bočnih grana sa vrlo kratkim internodijama (**Slika 4.2**).

Za razliku od toga, teozinte raste kao razgranati žbun, sva stabla žbuna imaju metlicu na vrhu. Iz pazuha njihovih listova izrastaju dugačke **primarne aksilarne grane**, koje na vrhu takođe nose metlicu. Tek u pazuhu listova primarnih grana javljaju se **sekundarne aksilarne grane**, sastavljene od vrlo kratkih internodija, sa klipom na vrhu. Prema tome, glavna razlika je u položaju klipa: kod kukuruza on se nalazi na bočnim granama prvog reda, a kod teozinte na bočnim granama drugog reda (**Slika 4.2**).



Slika 4.2. Izgled divlje vrste teozinte (A) i današnjeg kukuruza (B)

Sami klipovi kukuruza i teozinte su takođe različito građeni (**Slika 4.3**). Kod kukuruza oni nose više redova zrna nego kod teozinte. Zrna su kod teozinte odvojena jedno od drugog slojem za odvajanje, koji otvrdne i puca pri sazrevanju, što pomaže rasejavanju. Kod kukuruza ta tkiva ne pucaju i zrna ostaju na klip i posle sazrevanja.

Sve osobine građe metlice i klipa, kao i zrna, pod multigenskom su kontrolom. Pošto se teozinte i kukuruz mogu ukrštati, analizirani su njihovi hibridi F2 generacije, koji imaju niz intermedijernih osobina. Bitna je za analizu bila činjenica da postoji striktna segregacija dveju glavnih osobina – morfologije primarnih aksilarnih grana i pola cvetova u cvastima na njima. Naime, sve **dugačke** primarne aksilarne grane uvek nose **metlicu** kao



Slika 4.3. Klip teozinte (levo) i kukuruza (desno), sa hibridom u sredini

teozinte, a sve **kratke** aksilarne grane uvek imaju na vrhu **klip**, kao kukuruz [8]. Analizom lokusa za kvantitativne osobine (eng.: „Quantitative Trait Loci“, **QTL**) utvrđeno je da je za razviće obe osobine veoma važan jedan gen – gen **tb1** (eng.: „teosinte branched 1“). Prirodni recesivni mutanti kukuruza, kod kojih je ovaj gen mutiran, razgranati su i liče na teozinte po dužini bočnih grana i metlici na njihovom vrhu [9]. Prema tome, smatra se da dominantni alel gena **tb1** deluje u isto vreme kao represor rasteanja grane i razvića muške cvasti. Gen **tb1** kod kukuruza ima znatno višu ekspresiju nego **tb1** teozinte, ali razlika nije samo kvantitativna. Kod teozinte, njegova aktivnost je slaba u glavnom stablu i granama prvog reda, a pojačana tek u granama drugog reda. Kod kukuruza, naprotiv, aktivnost **tb1** je pojačana već u granama prvog reda, koje su u skladu s tim inhibirane u rasteanju i nose klip. U molekulsom smislu, protein kodiran ovim genom predstavlja regulatorni protein koji reguliše ekspresiju drugih gena i, samim tim,

značajno utiče na pravce diferencijacije ćelija u kojima je aktivan, odnosno na pravce razvića čitave biljke. Evolucija teozinte u kukuruz objašnjiva je praksom veštačke selekcije kada su ljudi u prvim naseobinama za gajenje izabrali varijantu koja je imala vrlo aktivan alel *tb1* u granama prvog reda. Tako je nastala vrsta sa većim klipom i sa više zrna, koja se ne rasejavaju. U ovom slučaju evolucija se zasnivala na selekciji promenjene regulacije gena, a ne gubitka postojećeg, ili dobitka nekog novog gena. Danas znamo da je takav tok evolucije vrlo rasprostranjena pojava.

Morfološke promene nastale tokom evolucije mogu biti posledica promene samo jednog nukleotida u genskoj sekvenci (kodirajućoj ili *cis*-regulatornoj) koja dovodi do izmenjene funkcije proteina. Otkriveno je da u slučaju razlike koja postoji između zrna kukuruza koja su gola i zrna teozinte koja su obavijena tvrdom opnom, objašnjenje za gubitak opne leži u promeni jednog nukleotida u genskoj sekvenci gena *tga1* (eng.: „teosinte glume architecture 1“) kod kukuruza, koja je dovela do zamene aminokiseline Lys (alel iz teozinte) u Asn (kukuruz) u proteinu [10]. Protein TGA1 kod kukuruza ima funkciju transkripcionog represora.

Prilog 4.2. Rezultati ispitivanja evolucije kukuruza imaju i šire značenje

Doebly i saradnici [9] su jednu liniju kukuruza podvrgli mutagenezi pomoću transpozona. Među mutantima su izdvojene tri linije koje su ličile na prirodni *tb1* mutant, tj. granale su se kao teozinte. U drugoj generaciji ovih mutanata nađeno je da je transpozon bio ugrađen u gen koji je identifikovan kao *tb1*. Na taj način ovaj gen je bio obeležen i izolovan, a zatim upoređen sa podacima iz banke gena. Utvrđeno je da je on u izvesnim regionima identičan sa jednim genom (*cycloidea*) zevalice i sa tri određene sekvence iz arabidopsisa. Geni *tb1* i *cycloidea*

imaju i izvesne funkcionalne sličnosti. Oni utiču na represiju rasteња aksilarnih organa (stabla odnosno cveta); kod zevalice ometaju rasteње dorzalnih kruničnih listića i prašnika, a u klipu kukuruza zaustavljeno je rasteње prašnika. Regioni ovih gena koji su među sobom identični nose signal za lokalizaciju u jedru. To znači da je jedro mesto njihovog dejstva i da su oni regulatori transkripcije. Pod njihovim uticajem su verovatno mnogi drugi strukturni geni, od kojih zavise pojedinačne osobine razvića stabla i reproduktivnih organa.

4.3. Savremena genetika i „zelena revolucija“

U toku prve polovine 20. veka genetička istraživanja napredovala su toliko da je formirana solidna naučna baza za ukrštanje biljaka i selekciju hibrida, što je postalo uobičajena praksa u poljoprivrednim naukama. Iako struktura gena još nije bila poznata, oplemenjivanje biljaka se zasnivalo na pouzdanom saznanju da su nosioci naslednih osobina geni koji su sastavni delovi hromozoma, kao i da se ukrštanjem biljaka dobija potomstvo koje nasleđuje osobine svojih roditelja. Generalno, oplemenjivanje se zasnivalo na sledećim postupcima:

- Izbor roditeljskih sorti koje su imale osobine od interesa za poboljšanje potomstva;
- Hibridizacija ovih roditeljskih sorti;
- Odabiranje u potomstvu onih hibrida koji su imali najbolju kombinaciju roditeljskih osobina, zatim njihovo razmnožavanje kroz više generacija;
- Registracija novih sorti koje su bolje od roditeljskih i njihovo uvođenje u proizvodnju.

Detalji u ovim postupcima razlikovali su se od vrste do vrste, uglavnom zavisno od načina oprašivanja i drugih osobina. Šezdesetih godina 20. veka dostignut je u razvijenim zemljama verovatno najviši mogući nivo u proizvodnji; taj period je stoga dobio naziv „zelena revolucija“. Pod pritiskom sve većih potreba u ishrani stanovnika mnogih zemalja, naučnici više velikih institucija u svetu postigli su ogroman napredak u povećanju proizvodnje upravo onih vrsta biljaka koje se najviše koriste u ishrani. To su u prvom redu kukuruz, pšenica i pirinač.

Moderna (veštačka) selekcija zasniva se na kreiranju biološke raznovrsnosti i odabiranju onih jedinki koje pokazuju najpovoljniju kombinaciju željenih gena (slično prirodnoj selekciji). Selektioneri povećavaju raznovrsnost putem unakrsnog oprašivanja, oslanjajući se na poznate činjenice o mejotičkoj rekombinaciji osobina (videti Poglavlje 3). Odabiranje se obavlja prema osobinama ostvarenim u potomstvu, radi kojih se obavlja ukrštanje. Za taj postupak je neophodno više godina, dok se nova kombinacija osobina ne stabilizuje. Postoje naučni kriterijumi, a i zakonski propisi, koje treba ispuniti da bi se jedna nova sorta zvanično priznala i bila prihvaćena u proizvodnji. Zelena revolucija, međutim, ne oslanja se samo na genetičko poboljšanje osobina. Smatra se da od tog postupka zavisi do 50% povećanja prinosa, no uporedo sa selekcijom, razvijala se i tehnologija gajenja. Ona obuhvata pravovremeno i adekvatno dodavanje mineralnih soli, navodnjavanje ukoliko je potrebno, zaštitna sredstva protiv patogenih organizama, suzbijanje korova i, naročito, način gajenja koji omogućuje primenu sve bolje razvijene mehanizacije. Potrebe društva, međutim, i dalje rastu i očekivani prirast stanovništva na Zemlji zahteva nove tehnologije.

4.3.1. Produktivnost kukuruza i heterozis

Pre nego što se pristupi hibridizaciji, roditeljske sorte se pripremaju tako što se stvaraju „čiste linije“; one ne treba da budu varijabilne bar u onim osobinama koje treba preneti potomstvu. Kukuruz, koji je stranooplodna biljka, ima visoku heterozigotnost. Stoga se kod izabranih roditeljskih sorti kroz više generacija obavlja stroga kontrola polinacije unutar linije (a često se obavlja i samooplodnja biljaka), sve dok osobine koje su od interesa ne postanu praktično homozigotne. Te **inbridne linije** obično nisu visokoproduktivne, što je pojava poznata kao **inbridna depresija**. Ali ako svaka od njih ima neku grupu osobina koja je poželjna i koja je tokom inbridinga postala skoro homozigotna, nakon ukrštanja dve linije dobijaju se u prvoj – F1 – generaciji hibridi koji obe te osobine nasleđuju. Prva hibridna generacija po svojoj produktivnosti često daleko prevazilazi roditeljske linije. Ta pojava je poznata kao **heterozis**. Danas se u svetu uglavnom seje hibridni kukuruz, koji za nekoliko puta premašuje prinos čistih linija. Povećan prinos kukuruza jedan je od glavnih dostignuća zelene revolucije.

4.3.2. Povećanje prinosa pšenice i pirinča

Prinos pšenice povećan je na osnovu drugačijih postupaka. Pšenica je samooplodna biljka, tako da su genotipovi – prirodno čiste, homozigotne linije. Do povećanja prinosa, koji se procenjuje po većim klasovima i krupnijem semenu, može se doći raznim agrotehničkim merama, koje su i preduzimane sredinom 20. veka. No veća težina klasova doprinosi da su mnoge sorte pšenice koje imaju visoko stablo sklone poleganju usled kiše ili vetra, jer stablo ne može da izdrži teret ploda. Semena na poleglom stablu ne sazrevaju, ili čak i trule, a mehanizovana žetva je otežana. Stoga je odlučujući korak u gajenju pšenice učinjen kada su u proizvodnju unete sorte niskog rasta, kao što je sorta „Norin“ i njeni derivati. „Norin“ sadrži

varijante gena koje uslovljavaju nizak rast, po čemu su ovi geni i dobili naziv *rht* (eng.: „reduced height“); biljke sa ovim varijantama gena imaju znatno kraće, deblje i čvrsto stablo koje je otporno prema poleganju. Smanjenjem rasteća stabla mnoge hranljive supstance usmeravaju se ka semenu, pa je i plod bolje razvijen. Većina modernih visokorodnih sorti pšenice dobijena je ukrštanjem nekog genotipa koji obuhvata *rht* gene, sa genotipom koji se odlikuje drugim dobrim osobinama. Na sličan način odgajene su i sorte pirinča sa niskim rastom, jer su i među njima nađene one koje sadrže genske varijante slične *rht* genima niske pšenice.

Postupak ukrštanja relativno je jednostavan, a selekcioneri biraju shemu po kojoj će ga obaviti [11]. Roditeljska sorta (B) koja ima kratko stablo **donor** je te osobine; ona se gaji kroz nekoliko generacija, a potomstvo se odabira isključivo prema visini stabla. Kada se dođe do generacije u kojoj je varijabilnost osobine minimalna, tj. sve biljke su kratke, onda se po toj osobini one mogu smatrati homozigotnim. Za drugog, **rekurentnog** roditelja (A) izabere se sorta koja može imati varijabilnu visinu stabla, ali se odlikuje bilo kojom poželjnom osobinom, kao što je visok kvalitet ploda, ili otpornost prema patogenima, ili, najzad, tolerancija prema nepovoljnim uslovima sredine. Posle ukrštanja (A x B), u potomstvu se odabiraju biljke sa niskim rastom kao što je donor, ali koje po svim drugim osobinama liče na rekurentnog roditelja. Na taj se način u sortu koja ima visoke kvalitete unose geni koji determinišu nizak rast. Ovaj postupak ponavlja se kroz nekoliko generacija. Da bi se povećao udeo gena rekurentnog roditelja, a udeo drugih gena donora smanjio, odnosno ograničio isključivo na gene za nizak rast, obično se primenjuje **povratno ukrštanje**. Pri tome se hibrid više puta ukršta sa roditeljskim genotipom A, a u svakoj se generaciji odabiraju biljke sa niskim rastom, ali sa svim ostalim osobinama drugog roditelja. Posle određenog broja generacija, kada se utvrdi da su hibridne osobine dovoljno stabilizovane, nova sorta se može registrovati i uvesti u

proizvodnju. U stvari, posao selekcionera se nikada ne završava. Nove sorte se i dalje obogaćuju dodatnim osobinama, tako da se savremene sorte znatno razlikuju od onih sa kojima se počelo.

Pomoću sličnih shema hibridizacije selekcioneri zelene revolucije približili su se izolovanju gena na najbolji mogući način, koji je ostvariv klasičnim metodama. Još dosta vremena posle uvođenja *rht* gena u sorte pšenice, selekcioneri su njima manipulisali, a da nisu znali njihovu strukturu i funkciju. Tek je osamdesetih godina pokazano [12] da ovi geni pripadaju sistemu koji reguliše aktivnost giberelina, hormona od kojih zavisi izduživanje ćelija stabla svih biljaka. Na osnovu izučavanja mehanizma dejstva giberelina kod biljke *Arabidopsis*, pokazano je da normalne biljke sadrže jednu varijantu gena *gai* (eng.: „gibberellic acid insensitive“), koji kodira protein GAI, koji pripada DELLA proteinima, negativnim regulatorima signalnog puta giberelina. Ovaj protein deluje kao negativan regulator vegetativnog rasta indukovanog giberelinima. Kada biljke sintetišu gibereline, ili se oni dodaju spolja, giberelini dovode do degradacije GAI proteina preko 26S proteozoma. Tada se ispoljavaju svi poznati efekti giberelina, pa i efekat na rasteenje stabla. Kod arabidopsisa, međutim, nađeni su mutanti koji ne reaguju ni na dodate gibereline i ostaju vrlo niskog rasta. To su *gai* mutanti, za koje je utvrđeno da im u proteinu GAI nedostaje jedan segment od 17 aminokiselina unutar DELLA domena koji je neophodan za vezivanje receptora giberelina GID1. Mutanti *gai* su vrlo niskog rasta, mada sadrže gibereline, čak i u višoj koncentraciji od kontrolnih biljaka; ti giberelini međutim, ne ostvaruju svoju funkciju, jer ne postoji DELLA mesto na GAI proteinu za vezivanje odgovarajućeg receptora giberelina (GID1). Dalja istraživanja pokazala su da je ovaj mehanizam delovanja giberelina univerzalan; kod svih biljaka detektovan je homolog *gai* genu. To je slučaj i sa genom *rht*, koji kod pšenice ima dva alela. Zatim tu spada gen patuljastog kukuruza *d8* (eng.: „dwarf 8“), odgovarajući gen

pirinča i drugi [13]. Za sva žita (cerealije) utvrđena je kolinearost ovih gena, tj. identična pozicija u genskoj mapi na hromozomima u odnosu na markere, što pokazuje da su to ortologi geni, svakako poreklom od istog gena zajedničkog pretka. S obzirom na njegovo nalaženje kod arabidopsisa i drugih dikotila, sigurno je da poreklo ovih gena treba tražiti kod još znatno starijih predaka, u dalekoj prošlosti biljne evolucije.

4.4. Genetičko inženjerstvo kao oblik genetičke modifikacije

Mnogi savremeni istraživači skloni su da genetičko inženjerstvo smatraju nastavkom dosadašnjih istraživanja o promeni genoma biljaka, samo primenom drugačijih tehnika. Kada se iz konteksta evolucije, domestikacije i veštačke selekcije izdvoje podaci koji se odnose na molekularne mehanizme ovih procesa, onda je njihova sličnost očigledna. Jedna od osnovnih razlika jeste u tome što je genetički diverzitet kreiran na različite načine u ovim procesima, ili se selekcija ostvaruje na različite načine. Domestikacija se može smatrati skraćenom evolucijom, s tim što ljudska vrsta u njoj ima aktivnu ulogu. Moderna veštačka selekcija i genetičko inženjerstvo mogu se egzaktno porediti i korisno je da se među njima podvuku sličnosti i razlike koje postoje. U oplemenjivanju i u genetičkom inženjerstvu istraživači imaju isti cilj, prenošenje gena – odnosno u krajnjoj liniji osobina – iz jednog organizma u drugi. Prednost klasične selekcije očevidna je kada su osobine koje se prenose multigenske, tj. zavisne od većeg broja gena istovremeno. Na primer, mnogi postupci selekcionera usmereni su na prenošenje otpornosti prema patogenim organizmima. Patogeneza je proces koji se sastoji iz više etapa: ona počinje time što nekim svojim hemijskim signalom patogen u biljci pokrene niz sukcesivnih reakcija, a završava se sintezom nekog proteina, ili druge

supstance, koja suzbija dalje razmnožavanje patogena (videti Poglavlje 6). Od prve do završne reakcije aktiviran je veći broj enzima i parcijalnih procesa, koji često nisu ni poznati. Ako selekcioneri na kraju odgaje biljke koje su rezistentne prema datom patogenu, onda su oni svoj posao uspešno obavili, pošto rezultat potvrđuje da je prenesen ceo kompleks enzima koji u patogenezi učestvuje. Pomoću genetičkog inženjerstva za sada se ređe manipuliše većim brojem gena istovremeno. Istraživači se uglavnom orijentišu na neki od ključnih enzima u patogenezi, ali u nekim slučajevima to nije dovoljno da **transgene biljke** dostignu onaj stepen rezistencije koji pokazuju roditeljske biljke, iz kojih je transgen izolovan. Sličan je slučaj i sa mnogim drugim multigenским osobinama u razviću, što predstavlja glavni cilj i san mnogih selekcionera.

Vezano nasleđivanje multigenских osobina, tj. tendencija da se iste kombinacije osobina prenose u naredne generacije, može se objasniti time što se geni koji učestvuju u njihovom razviću nalaze blizu jedan drugom na istom hromozomu, zbog čega se alelske kombinacije ne „rasturaju“ rekombinacijama, ili su povezani u sistemu regulacije. Takvo nasleđivanje može imati uticaj na ishod veštačke selekcije. Na primer, u narednu generaciju se mogu preneti geni koji nisu poželjni, a čija aktivnost nije prethodno uočena. Poznato je nekoliko primera, i to iz nedavnih događaja, kada su se pojavile velike epidemije kod pojedinih gajenih vrsta, jer su one imale isti stepen neotpornosti prema određenim patogenima. Ta neotpornost je uočena tek kada su klimatski i drugi uslovi favorizovali pojavu infektivnog agensa. U regionu „kukuruznog pojasa“ (eng.: „corn belt“) u SAD pojavila se 1970. godine epidemija gljive *Helminthosporium maydis*, koja je uništila sav kukuruz. Razlog širenja epidemije je taj što je u celom regionu posejano seme istog hibrida, koji je dobijen posle više ukrštanja, a u sebi je sadržao Texas-germplazmu (T-germplasm), poznatu po svojoj neotpornosti prema parazitu. Gen za neotpornost ima takav

položaj na hromozomu da je u procesu selekcije skoro potpuno izgubljen polimorfizam, zajedno sa genima koje su selekcioneri odabrali. Sličan slučaj dogodio se u Vojvodini i okolnim regionima sa suncokretom, koji je jedne sezone nastradao od epidemije *Phomopsis/Diaportha* [14].

Osim gena značajnih za rezistenciju prema patogenima, susedni regioni DNK (eng.: „flanking regions“) oko gena od interesa mogu sadržati agronomski štetne genske varijante. Iz ovih razloga postoji praksa ukrštanja domestikovanih vrsta sa njihovim divljim srodnicima, kako bi se povratila varijabilnost i osobine koje su u domestikaciji izgubljene. Naravno, neke od „divljih“ osobina nisu poželjne, npr. sinteza nekog toksičnog jedinjenja, kao što su cijanoglukozidi, ili jedinjenja koje kvari kvalitet i ukus jestivih vrsta. Za razliku od veštačke selekcije u kojoj selektivno favorizovanje pojedinih osobina neminovno obuhvata čitave genome i kombinacije brojnih fenotipskih svojstava, u genetičkom inženjerstvu manipuliše se malim delovima genoma, tj. pojedinačnim genima (videti poglavlja 5, 6 i 7).

Kako je ranije opisano, dobijanje novih sojeva domestikovanih biljaka procedurama klasične veštačke selekcije često se zasnivalo na prethodnoj hibridizaciji između varijeteta koji su seksualno kompatibilni (a ponekad i srodnih vrsta biljaka). Mogućnost međusobnog ukrštanja nužna je za dobijanje novih linija sa kombinovanim svojstvima, jer se geni ne mogu preneti iz jednog organizma u drugi ukoliko nije moguće oprašivanje i oplodjenje među njima. Međutim, pošto je DNK svih živih bića sastavljena od samo četiri vrste nukleotida, oni se mogu kombinovati na razne načine, kao što se od istih cigala mogu sagraditi različite građevine. Tako ne postoje nikakve smetnje da se sekvence DNK drugih biljaka, bakterija, gljiva, ili životinja, ugrade u genom biljke-domaćina. Na taj način se genetički diverzitet biljaka znatno povećava, jer transgene biljke mogu da prime i gene koje biljke obično ne sadrže. Ovakvi primeri će biti opisani

naročito u vezi sa transformacijama biljaka koje donose toleranciju prema herbicidima i prema bolestima koje prenose insekti.

Često se kao značajna odlika genetičkog inženjerstva navodi brzina kojom se transgene biljke dobijaju. Taj argument treba uvažiti sa izvesnom rezervom. Razume se da laboratorijski postupci u vezi sa pripremom transgena, sa njegovim prenosom i gajenjem transformisanih ćelija do regeneracije biljaka, traju znatno kraće od onog što rade selekcioneri. Ipak, i transgene biljke se posle laboratorijskog postupka takođe moraju podvrgnuti testovima i proveriti u prirodnim uslovima, koji se ne razlikuju od onih primenjenih u klasičnoj selekciji. Tek posle ovakvih testova može se odobriti njihovo korišćenje u proizvodnji. A kada se uzme u obzir otpor koji u mnogim zemljama postoji prema genetičkom inženjerstvu, onda je jasno da vreme koje mora da prođe do usvajanja finalnih proizvoda i nije toliko kratko koliko na prvi pogled izgleda.

Kao rezime, može se reći da je jedna od razlika između klasičnog i molekularnog pristupa selekciji u tome što istraživači u genetičkom inženjerstvu pri izboru, izolovanju i prenosu gena manipulišu sa precizno određenim sekvencama DNK. Mnogi biolozi su mišljenja da termin „genetički modifikovane biljke“ treba koristiti i za biljke selektovane na klasičan način, i za one dobijene genetičkim inženjerstvom. Za biljke dobijene prenosom sekvenci DNK, treba, po drugima, koristiti isključivo naziv „transgene“. Ali u jednom se svi istraživači izgleda slažu: genetičko inženjerstvo nikako ne može da ukine potrebu da se koriste i klasične metode oplemenjivanja. U širem kontekstu nauke o oplemenjivanju, genetičko inženjerstvo je alternativan način da se dođe do istog cilja. O sličnostima i razlikama govoriće se u ovoj knjizi i na drugim mestima, a iz toga može da se izvede i zaključak o prednostima i nedostacima oba pristupa.

Sažetak

Genetičke modifikacije biljaka događale su se u prirodi od nastanka biljnog sveta. U osnovi svih modifikacija leži nastajanje genetičkog diverziteta i odabiranje pogodnih osobina. U evoluciji biljaka postanak diverziteta je prirodan, usled mutacija i drugih evolucionih mehanizama, a posebno selekcije u konkretnim uslovima životne sredine. Otkako je čovek prešao sa nomadskog na sedentarni način života, počeo je proces domestikacije biljaka i životinja. Aktivno učešće čoveka ogleda se prvenstveno u odabiranju onih promena kod gajenih biljaka koje su donosile veći prinos. Sa razvojem genetike u toku devetnaestog, a naročito dvadesetog veka, razvijene su procedure veštačke selekcije gajenih biljaka, u kojoj je istraživač obavljao oba zadatka: kreiranje genetičkog diverziteta hibridizacijom i selekcijom hibrida sa poželjnim osobinama. Iz aspekta molekularskih mehanizama koji leže u osnovi prirodne selekcije i praksi veštačke selekcije, može se zaključiti da oba procesa imaju zajednički imenitelj: oni se zasnivaju na modifikaciji gena, odnosno na promeni nukleotidnih baza u sastavu DNK, čija je posledica promena u sastavu proteina koje oni kodiraju, ili u promeni njihove regulacije. U ovom poglavlju izloženi su procesi koji su obeležili evoluciju C4 biljaka, a zasnivaju se na modifikaciji ključnog enzima, fosfoenolpiruvatne karboksilaze (PEPC). Zatim, opisana je genska osnova domestikacije kukuruza iz divlje vrste teozinte, koja se ogleda u modifikaciji gena *tb1*, odgovornog za grananje i morfologiju stabla. Najzad, praksa veštačke selekcije prikazana je na primeru selekcije kukuruza i pšenice, kod kojih je postignut vrlo visok prinos putem heterozisa (kukuruz), odnosno odabiranja varijeteta sa niskim stablom (pšenica). Dve poslednje pojave mogle su biti objašnjene na osnovu poznavanja strukture i funkcije gena (*rht* geni kod pšenice). U tom kontekstu, može se zaključiti da genetičko inženjerstvo ne predstavlja neprirodnu pojavu kojom se krše osnovni zakoni prirode. Genetičko inženjerstvo je nov način za dobijanje

genetičkih modifikacija, koji je omogućen razvojem molekularne biologije i genetike, a koji se odlikuje većom preciznošću i pouzdanošću, što se i očekuje u modernoj nauci.

Literatura 4

1. Anđelković M (ed.) (2005) Biodiverzitet na početku novog milenijuma. Zbornik radova sa naučnog skupa, Srpska akademija nauka i umetnosti, Knjiga CXI, Odeljenje hemijskih i bioloških nauka, Knjiga 2.
2. Gepts P (2002) A comparison between crop domestication, classical plant breeding, and genetic engineering. *Crop Science* 42: 1780-1790.
3. Wendel JF (2000) Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* 42: 225-249.
4. Engelman S, Bläsing OE, Gowik U, Svensson P, Westhoff P (2003) Molecular evolution of C4 phosphoenolpyruvate carboxylase in the genus *Flaveria* – a gradual increase from C3 to C4 characteristics. *Planta* 217: 717-725.
5. Westhoff P, Gowik U (2004) Evolution of C4 phosphoenolpyruvate carboxylase. Genes and proteins: a case study with the genus *Flaveria*. *Annals of Botany* 93: 13-23.
6. Doebley J, Lukens L (1998) Transcriptional regulators and the evolution of plant form. *Plant Cell* 10: 1075-1082.
7. Cerling TE, Harris JM, MacFadden BJ, Leakey MG, Quade J, Eisenmann V, Ehleringer JR (1997) Global vegetation change through the Miocen / Pliocene boundary. *Nature* 389: 153-158.
8. Doebley J, Stec A, Wendel J, Edwards M (1990) Genetic and morphological analysis of a maize-teosinte F₂ population: Implications for the origin of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87: 9888-9892.

9. Doebley J, Stec A, Hubbard L (1997) The evolution of apical dominance in maize. *Nature* 386: 485-488.
10. Wang H, Studer AJ, Zhao Q, Meeley R, Doebley JF (2015) Evidence that the origin of naked kernels during maize domestication was caused by a single amino acid substitution in *tga1*. *Genetics* 200: 965-974.
11. Pfeiffer TW (2003) From classical plant breeding to modern crop improvement. In: „Plants, Genes, and Crop Biotechnology“, 2nd ed., Chrispeels MJ and Sadava DE eds. Jones & Bartlett Publ., Sudbury, MA, SAD.
12. Gale MD, Marshall GA (1976) *Heredity* 37: 283–289.
13. Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, Flintham JE, Beales J, Fish LJ, Worland AJ, Pelica F, Sudhakar D, Christou P, Snape JW, Gale MD, Harberd NP (1999) ‘Green revolution’ genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400: 256-261.
14. Škorić D (1985) Sunflower breeding for resistance to *Diaporthe/Phomopsis helianthi*. *Helia* 8: 21-24.

Metode za dobijanje transgenih biljaka

Mirjana Nešković, Jovanka Miljuš Đukić, Slavica Ninković

Genetičke transformacije biljaka podrazumevaju postupak kojim se segment strane DNK prenosi u genom biljke-domaćina; on se stabilno ugrađuje u taj genom i učestvuje u deobi ćelija i u transkripciji, sinhrono sa DNK hromozoma u kojima se nalazi. Biljke su time **genetički transformisane** ili **genetički modifikovane (GM)**, jer njihov genotip sadrži nove gene, a fenotip pokazuje nove osobine. U poslednjim decenijama 20. veka bilo je mnogo pokušaja da se to raznim putevima ostvari. Od starijih postupaka za promenu genotipa jedini koji se i do danas zadržao jeste somatska hibridizacija. Ostale metode korišćene u to vreme imaju danas samo istorijsku vrednost, iz dva razloga: prvo, njihovi rezultati nisu izdržali rigoroznu proveru kojoj su bili podvrgnuti, a drugo, postupci koji su uključeni zametni su, komplikovani i skupi za široku primenu. Danas su za izvođenje genetičkih transformacija dve metode daleko nadmašile sve ranije:

- Genetičke transformacije pomoću bakterija roda *Agrobacterium*, koji služi kao posrednik za prenos stranih gena; strani geni su inkorporirani u plazmid koji je svojstven ovim bakterijama i čiji se deo prenosi u biljke. Ova metoda se zasniva na prirodnoj pojavi prenosa gena iz bakterije u biljku (videti odeljak 5.1), a koristi se za transformaciju celih biljaka.

- Biolistička transformacija, ili bombardovanje mikroprojektilima; to je fizički proces, i sa još nekim manje korišćenim metodama označava se kao direktan prenos stranih gena. Takođe se koristi za cele biljke, ali i za hloroplaste.

5.1. Prirodni transfer DNK iz jednog organizma u drugi

U Poglavlju 3 opisano je kako se genom biljaka menja u prirodi rekombinacijom gena, u okviru iste ćelije. No, za evoluciju biljaka od najvećeg je značaja kombinovanje gena do kog dolazi oprašivanjem i oplodnjem, posle kojih postaju hibridni organizmi, sa kombinovanim osobinama oba roditelja. Opseg ukrštanja je, međutim, ograničen nemogućnošću hibridizacije nesrodnih vrsta, kao i inkompatibilnošću između biljaka iste vrste (eng.: „self-incompatibility“). Ipak, introgresija (unos) stranih sekvenci DNK u genom biljaka zabeležena je u prirodi bar u dva slučaja: to su integracija sekvenci nekih virusa i integracija jednog segmenta DNK bakterija iz roda *Agrobacterium*.

5.1.1. Virusne sekvence ugrađene u biljni genom

Neke vrste DNK virusa koji napadaju biljke ostavljaju za sobom posle infekcije izvesne sekvence svoje DNK, koje su ugrađene u biljni genom. Ove sekvence se replikuju u narednim generacijama i u poslednje vreme su otkrivene kod vrlo velikog broja biljnih vrsta. Virusi su mogli biti integrisani u biljni genom u izvesnom davnom periodu evolucije, u kome se desila masovna infekcija, a njihovi tragovi ostali su u njemu sve do danas. Smatra se da sve vrste banana (*Musa* spp.) nose ostatke virusa **BSV** (eng.: „Banana Streak Virus“). Ostaci drugih DNK virusa nalaze se u nekim vrstama duvana i petunije [1]. Intergrisanе virusne sekvence su neaktivne, ali se mogu

i ponovo aktivirati usled rekombinacije, ili nove infekcije. Izvesni stresni uslovi znatno povećavaju šansu za reaktivaciju. U tom slučaju dolazi do virusnih oboljenja, koja mogu dostići i nivo epidemije. Ukoliko ne dođe do njihove reaktivacije, izgleda da oni ne utiču na promene biljnih osobina, osim što povećavaju količinu repetitivnih sekvenci DNK.

5.1.2. *Agrobacterium* i neoplastično rastenje

Najpoznatiji način prirodnog prenosa gena iz jednog organizma u drugi dešava se posle infekcije biljaka bakterijama roda *Agrobacterium*. Ove bakterije prenose u biljku mali deo svoje DNK, koji se ugrađuje u hromosome biljke. U okviru hromozoma, taj deo se ponaša kao i drugi segmenti hromozoma: replicira se pri ćelijskoj deobi, transkribuje u odgovarajuće iRNK i time omogućava sintezu specifičnih proteina. Ti proteini indukuju sintezu biljnih hormona, neophodnih za ćelijsku deobu. **Neoplastično rastenje** podrazumeva sposobnost **genetički transformisanih** ćelija da se neograničeno dele, čime se formiraju **tumori**. Tumori su patološka pojava, koja može naneti znatnu štetu biljnim plantažama. U fitopatologiji se pojava tumora tretira kao i druge biljne bolesti, pa se primenjuju različite metode za njeno suzbijanje. Međutim, na prirodnom transferu gena iz agrobakterija u više biljke zasnovane su metode genetičkog inženjerstva, tako da njihovo proučavanje daleko prevazilazi fitopatološke aspekte. Pošto je to i glavna tema ove knjige, ovde će, najpre, najveća pažnja biti posvećena odnosu *Agrobacterium* – biljka u prirodnim uslovima, a zatim će biti izloženi eksperimentalni postupci koji se, na osnovu prirodnih pojava, koriste u genetičkom inženjerstvu.

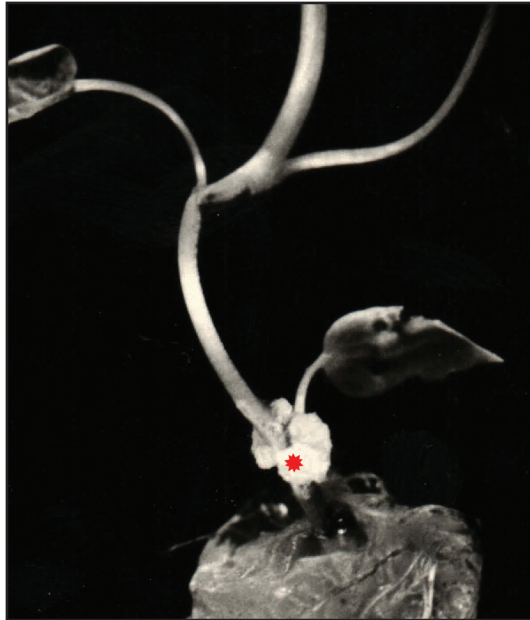
Rod *Agrobacterium*, iz familije Rhizobiaceae, obuhvata gram-negativne bakterije koje žive slobodno u zemljištu, kao pokretni štapići sa bičem. Vrste, a naročito sojevi bakterija, definisane su više prema efek-

tima koje izazivaju na biljkama, nego prema drugim taksonomskim kriterijumima. Tako *Agrobacterium tumefaciens* indukuje u inficiranoj biljci tumore, koji se pretežno razvijaju na nadzemnom delu biljke, stablu i granama, pa su dobili naziv **izraštaji, gale u kruni** (eng.: „crown gall“) (Slika 5.1). Oni mogu da dostignu znatnu veličinu i da ometaju transport vode i asimilata, kao i druge funkcije u biljci.

Agrobacterium rhizogenes izaziva manje ili veće proliferacije, koje su gusto obrasle adventivnim korenovima i izgledaju „dlakavo“ (eng.: „hairy roots“) (Slika 5.2).

Najzad, vrsta *Agrobacterium radiobacter* nije virulentna i na biljci ne izaziva nikakve promene.

Nisu sve biljne vrste podjednako podložne infek-



Slika 5.1. Tumor (izraštaj, gale u kruni, eng.: „crown gall“) nastao nakon infekcije biljke sa *Agrobacterium tumefaciens* (obeležen zvezdicom). Foto. B. Vinterhalter, IBISS

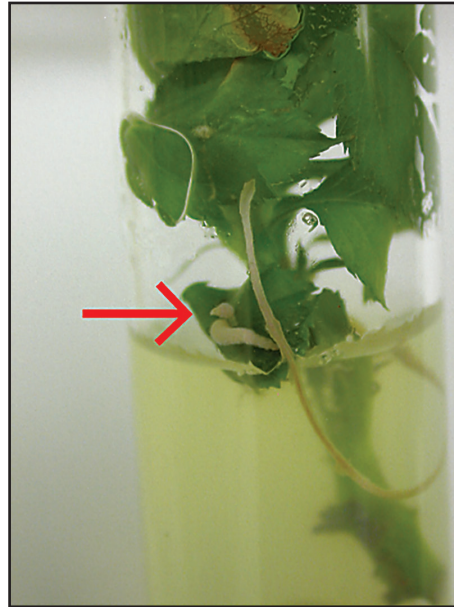


Slika 5.2. „Dlakavi korenovi“ (eng.: „hairy roots“) nastali nakon infekcije biljnog tkiva sa *Agrobacterium rhizogenes*.

Foto: S. Ninković

ciji. U prirodi se tumori razvijaju pretežno na drvenastim biljkama, među koje spadaju i mnoge voćne vrste. Ali u laboratorijskim uslovi- ma se infekcija može lako inicirati, ako se prosto biljka ubode iglom, umočenom u kulturu bakterija (Slika 5.3). Tako je broj potenci- jalnih domaćina znatno proširen. U početku se smatralo da su na- ročito monokotile otporne prema infekciji, ali se danas i one mogu transformisati pojedinim sojevi- ma agrobakterija.

Do infekcije biljaka u priro- di dolazi na korenu, na kome su če- ste mehaničke povrede ili oštećenja od insekata i drugih životinja. Ako je zeljasti deo korena povređen i ako nema infekcije, rane zarastaju tako što se ćelije oko povrede dele i obrazuju **kalusno tkivo**, koje zamenjuje povređene ćelije. Kad rana zara- ste, ćelijske deobe prestaju, a novo tkivo se diferencira u skladu sa svojim položajem prema povredi. Ćelije u deobi su, međutim, meta infekcije za *Agrobacterium*. U procesu zarastanja rana, biljne ćelije sintetišu različita jedinjenja, koja ulaze u sastav ćelijskih zidova novih ćelija. Ta su jedinje- nja fenolne prirode i normalno su prekursori lignina, ali se ona izlučuju i u spoljašnju sredinu. Fenolna jedinjenja, kao što je **acetosiringon** (Slika 5.4), privlače bakterije koje se okupljaju oko mesta povrede. Sa svoje stra- ne, agrobakterije sintetišu supstance kao što je **β -1,2-glukan**, koji pomaže



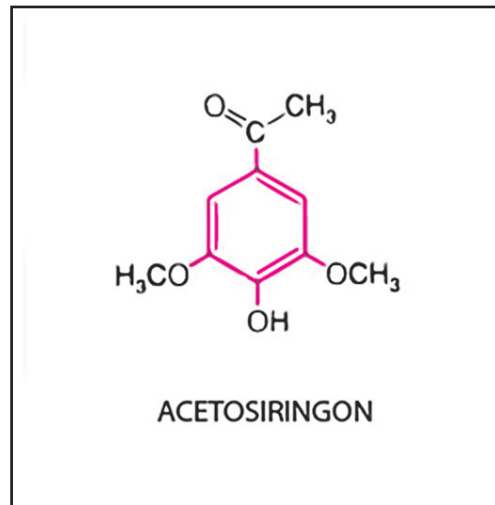
Slika 5.3. Pojava transformisanih korenova („hairy roots“) na mestu uboda lista iglom umočenom u kulturu bakterija *Agrobacterium rhizogenes*.
Foto: M. Stanišić, IBISS

da se one pričvrste za ćelijski zid. One ulaze u povređeno tkivo između ćelija i rasprostiru se najpre u okolini rane. Tada otpočinje specifični proces interakcije bakterija i biljaka, koji dovodi do formiranja tumora.

5.1.3. Ti i Ri plazmidi

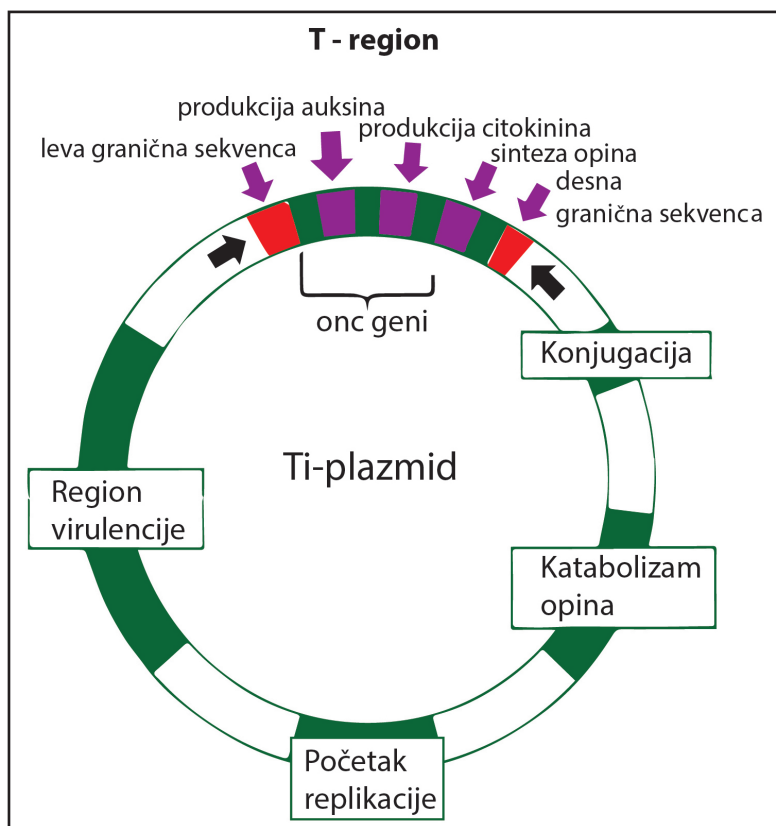
Vrstu *A. tumefaciens* izolovali su Smith i Townsend [2] iz tumora izraslog na biljci *Chrysanthemum frutescens*, pa se od tada zna da je ova bakterija izazivač tumora. Ali trebalo je da prođe više decenija da se način infekcije objasni. Objašnjenje se zasniva na otkriću da se svi virulentni sojevi *Agrobacterium* odlikuju prisustvom jednog velikog plazmida, koji dostiže 180-250 kb. Plazmidi su DNK cirkularnog oblika, koja se nalazi van hromozoma, a može se prenositi među bakterijama prilikom konjugacije. Sojevi *Agrobacterium*, koji nemaju plazmid, nisu virulentni, a ako se plazmid unese u nevirulentne ćelije, one stiču sposobnost da izazovu infekciju. Chilton i saradnici [3] su utvrdili da se deo plazmida (5%) pri infekciji prenosi u biljne ćelije i da se ugrađuje u biljnu DNK. Pošto izaziva tumore, plazmid *A. tumefaciens* nazvan je **Ti-plazmid** (eng.: „Tumor-inducing“). Plazmid *A. rhizogenes*, koji izaziva pojavu korenova, zove se u skladu s tim **Ri-plazmid** (eng.: „Root-inducing“).

Plazmidi su detaljno analizirani i poznaju se njihovi pojedinačni regioni, kao i funkcije koje im pripadaju (Slika 5.5). Za infekciju biljke, od važnosti su dva regiona. Jedan čini segment koji se pri infekciji prenosi u



Slika 5.4. Hemijska struktura acetosiringona, fenolnog jedinjenja koje se izlučuje na mestu povrede biljnih tkiva

biljnu ćeliju i stoga je nazvan **T-DNK** (eng.: „**T**ransferred **D**N A “). Drugi je **vir region** (region virulencije), koji je za taj transport neophodan. T-DNK segment ima 23-25 kb, a u plazmidu je ograničen **levom i desnom graničnom sekvencom**, koje se sastoje od po 25 bp. Aktivni deo T-DNK ima sedam gena, s tim što postoje gen 6a i gen 6b. Jedna vrsta Ti-plazmida, oktopinski plazmid, ima dva odvojena regiona, levi i desni, T_L i T_R . Region *vir* ima oko 40 kb i obuhvata devet operona, *virA* do *virG*, sa ukupno 22 *vir* gena, koji kodiraju isto toliko proteina. Osim *vir* regiona, u prenosu učestvuju i hromozomski geni bakterije, *chvA* i *chvB*, povezani sa sintezom već pomenutog β -1,2-glukana.

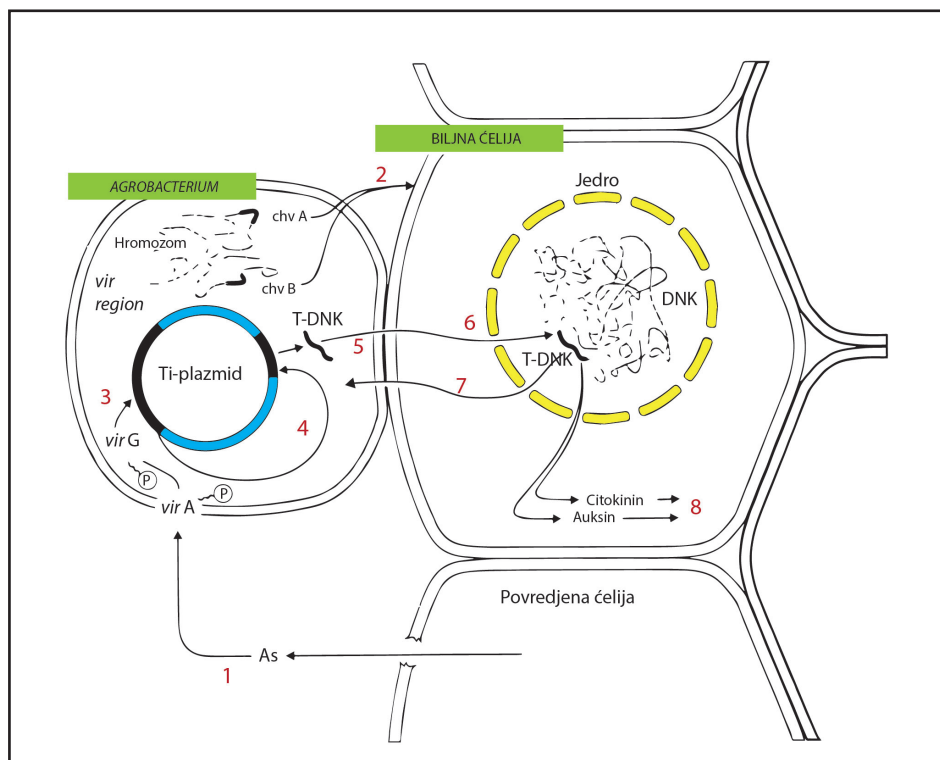


Slika 5.5. Shema Ti plazmida

5.1.4. Prenos T-DNK u biljnu ćeliju

Prenos T-DNK iz bakterijske u biljnu ćeliju kompleksan je proces čiji se početni stupnjevi odvijaju u bakterijskoj, a kasniji u biljnoj ćeliji. T-DNK, koja se u bakteriji priprema za prenos, sama nije aktivna u tom procesu. Prenos je u potpunosti pod kontrolom *vir* gena, ali proteini koje ovaj region kodira uopšte se ne prenose u biljnu ćeliju, osim njih nekoliko. Redosled događaja pri infekciji je sledeći: kada se *Agrobacterium* pričvrsti za ćelijski zid, aktivira se jedan membranski protein, koji je proizvod konstitutivnog *virA* gena (**Slika 5.6. korak 1**). Taj protein je receptor za acetosiringon, a pripada tipu dvokomponentnih histidinskih kinaza, receptora koji u bakterijama detektuju razne hemijske stimulatore iz spoljašnje sredine. U samom procesu pričvršćivanja za biljni ćelijski zid učestvuju proizvodi gena koji se nalaze na hromozomu, *chvA* i *chvB* (**Slika 5.6. korak 2**). Pod dejstvom acetosiringona, ili nekog drugog faktora iz biljne ćelije, dolazi do autofosforilacije receptora, a zatim se fosfat prenosi na drugi protein, koji je proizvod *virG* gena. Fosforilisani VirG protein, koji ima funkciju transkripcionog faktora, sukcesivno aktivira sve *vir* operone (**Slika 5.6. korak 3**). Proteinski produkti ovih gena pripremaju T-DNK za transport. T-DNK je **nukleo-proteinski kompleks**. On obuhvata jednolančani segment DNK koji leži između leve i desne granične sekvence (T_L i T_R). Enzimi VirD1, helikaza, i VirD2, **endonukleaza**, specifično raspoznaju granične sekvence, a VirD2 učestvuje u presecanju donjeg, odnosno spoljašnjeg lanca DNK plazmida (**Slika 5.6. korak 4**). Nakon isecanja molekula VirD2 se vezuje kovalentno za jednolančanu DNK čineći T-DNK/VirD2 kompleks. Na mesto isečene sekvence plazmida sintetiše se, po principu **homologe reparacije**, nov segment, koji nadoknađuje isečeni. Pretpostavlja se da protein VirC1 pomaže u ovom procesu. Produkti operona *virB* su 11 proteina, koji učestvuju u izgradnji **pilusa** (proteinski kanal na membrani). Jednolančana T-DNK, sa proteinom VirD2 izlazi kroz pilus iz bakterije. VirE2 se transportuje u bilj-

nu ćeliju nezavisno od T lanca. Kao što pri konjugaciji segmenti DNK ulaze u drugu bakteriju, u ovom slučaju T-DNK ulazi u biljnu ćeliju (Slika 5.6. korak 5). Prema tome, agrobakterije ne koriste nikakva posebna sredstva za formiranje i transport kompleksa T-DNK, nego ona kojima već raspoložu sve bakterije i koja se koriste pri konjugaciji.



Slika 5.6. Transfer DNK iz *Agrobacterium tumefaciens* u biljnu ćeliju

(1) Supstance oslobođene iz povređene biljne ćelije signaliziraju bakteriji da je u blizini biljna ćelija koju mogu da transformišu; Acetosiringon (As) aktivira bakterijski VirA protein, koji zatim fosforiliše VirG protein. (2) U procesu pričvršćivanja bakterije za biljni ćelijski zid učestvuju proizvodi gena *chvA* i *chvB* koji se nalaze na bakterijskom hromozomu. (3) Fosforilisani VirG protein sukcesivno aktivira ostale gene *vir* regiona čiji produkti učestvuju u (4) isecanju i (5) prenosu T-DNK u biljnu ćeliju. (6) U biljnoj

ćeliji T-DNK, uz pomoć bakterijskih i biljnih proteina, ulazi u jedro i integriše se u DNK domaćina. (7) Integrisana T-DNK omogućava sintezu opina, specifičnih bakterijskih jedinjenja kojima se *Agrobacterium* hrani, kao i (8) sintezu biljnih hormona, auksina i citokinina, čija povećana koncentracija dovodi do lokalne proliferacije biljnog tkiva i do pojave tumora. Cilj proliferacije je povećanje broja ćelija koje će proizvoditi opine.

T-kompleks koji čine T-DNK, VirD2 i veći broj molekula VirE2, nastaje tek u biljnoj ćeliji. Veći broj molekula proteina VirE2 vezuje se za jednolančanu DNK i sa svih strana je obavija, čime je štiti od dejstva nukleaza u biljnoj ćeliji. Kompleks ulazi u jedro biljne ćelije kroz pore u jedrovoj membrani i T-DNK se ugrađuje u hromozomalnu DNK (**Slika 5.6. korak 6**). Proteini VirD2 i VirE2 imaju sekvence koje ih upućuju u jedro. VirD2 se vezuje kovalentno za 5' kraj T-DNK; VirE2 na 3' kraju obmotava celu T-DNK. Smatra se da 5' kraj mora biti netaknut za uspešnu ugradnju T-DNK. Prema onome što se danas zna, mesta na koja će se T-DNK uključiti slučajna su. Ne postoje preference ni za jedan hromozom, niti za posebnu sekvencu nukleotida. Veći broj T-DNK raspoređuje se duž biljne DNK. Ipak, novija ispitivanja pokazuju da je njihova učestanost nešto veća u regionima DNK između gena, u promotorima i na 5' i 3' krajevima koji se ne prevode u proteine. Najmanje se do danas zna o načinu kojim se T-DNK integriše u DNK domaćina. Ako ćelija domaćina počne da se deli, moguće je da se u sintetičkoj fazi (S-fazi deobe), zajedno sa replikacijom DNK domaćina, replicira i jednolančana T-DNK, dok je još van hromozoma. Ona se zatim, u periodu reparacije DNK, integriše na određenim mestima u lanac DNK domaćina. Integracija T-DNK ne zahteva duže homologe sekvence, nego pripada tzv. **ilegitimnom tipu rekombinacije**. **Treba naglasiti da se ni u tom procesu ne koriste nikakvi posebni mehanizmi, nego samo biljni proteini koji takve procese inače obavljaju.**

5.1.5. Ekspresija gena koje obuhvata T-DNK

Ćelija u koju se ugradi T-DNK genetički je transformisana. Pri svakoj daljoj deobi te ćelije i njenih potomaka, T-DNK se zajedno sa celom jedarnom DNK replicira i raspodeljuje u dve nove ćelije. Geni koje je T-DNK donela aktivni su, tj. kao i drugi geni oni se transkribuju i na osnovu sekvence njihove iRNK sintetišu se proteini. Njihovom aktivnošću transformisane ćelije proizvode faktore ćelijske deobe (hormone), intenzivno se dele i obrazuju tumore. Glavne osobine tumora jesu **sinteza opina i proliferativnost (Slika 5.6. korak 7 i 8)**. T-DNK nekih sojeva *A. tumefaciens* obuhvata 7 gena, koji su i označeni rednim brojevima. Od njih su za proliferativnost značajni tzv. **onkogeni**, broj 1, 2 i 4, a za sintezu opina gen broj 3. Geni 1 i 2 učestvuju u sintezi **auksina**, indolil-3-sirćetne kiseline (IAA). Gen 1 (*iaaM*) kodira enzim **triptofan monoooksigenazu**, koja od triptofana proizvodi indol-3-acetamid. Gen 2 (*iaaH*) kodira **hidrolazu**, koja razlaže indol-3-acetamid u indolil-3-sirćetnu kiselinu. Gen 4 (*ipt*) kodira enzim **izopentenil transferazu** (jedan od njenih izoenzima), koji sintetiše **citokinin** izopentenil adenzin (2iP). Put biosinteze IAA i 2iP u tumoru nalazi se i kod mnogih drugih bakterija, ali je po intermedijernim jedinjenjima različit od onoga kojim se ova jedinjenja sintetišu u biljkama. Bez obzira na to, auksin i citokinin koji su krajnji produkti biosinteze u transformisanoj ćeliji, isti su oni faktori koji indukuju deobu biljnih ćelija (**Slika 5.6. korak 8**). Verovatno zbog razlike u enzimima na putu biosinteze, biljka ne može da reguliše taj proces. Transformisane ćelije i tkiva imaju sposobnost neograničene deobe. Čak i kada se tumorske ćelije izoluju i gaje *in vitro*, njima nije potrebno spolja dodavati auksin i citokinin, za razliku od netransformisanih ćelija, kod kojih je biosinteza hormona regulisana.

Opini su spojevi baznih aminokiselina i α -ketokiselina, koji se sintetišu samo u tumorskim ćelijama. Prema vrsti opina, sojevi bakterije *Agrobacterium* svrstani su u nekoliko grupa. Rasprostranjeni su oktopinski sojevi, koji proizvode **oktopin**, derivat piruvata i arginina; nopalinski sojevi sadrže **nopalin**, spoj α -ketoglutarata i arginina. Od ukupno sedam vrsta opina, česti su još **sukcinamopin**, **agropin** i **manopin**. Opini služe za ishranu agrobakterija, kao izvor ugljenika i azota (**Slika 5.6. korak 7**). Biljne ćelije, a takođe ni sve druge bakterije, ne mogu da koriste opine u ishrani, jer nemaju enzime koji ih razlažu. Samo slobodne agrobakterije mogu da se njima koriste, jer njihov plazmid, u delu van T-DNK i *vir* regiona, sadrži region za katabolizam opina. Parazitizam agrobakterija posebne je vrste i označen je kao **bakterijska kolonizacija**. U tom procesu bakterije stimulišu umnožavanje transformisanih ćelija, koje proizvode hranu za čije korišćenje one nemaju konkurenciju.

Ostali geni T-DNK, geni 5, 6a i 6b, kodiraju proizvode značajne za balans auksina i citokina u tumoru. Funkcija gena 7 nije dovoljno objašnjena, a on se i ne nalazi u svim plazmidima.

Svi sojevi *A. rhizogenes* sadrže Ri-plazmid, koji je po svojoj strukturi i načinu prenosa u biljku vrlo sličan Ti-plazmidu. Po vrsti opina Ri-plazmidi se dele na tri grupe. Agropinski Ri-plazmidi imaju T-DNK razdvojenu na dva dela, levi (TL) i desni (TR), koje se nezavisno transportuju u biljnu ćeliju, jer je svaka ograničena specifičnim graničnim sekvencama. Desni deo obuhvata **aux gene** koji su homologni genima 1 i 2 iz Ti-plazmida i takođe **proizvode IAA**. Levi deo sadrži 18 gena od kojih četiri gena učestvuju u indukciji adventivnih korenova i zovu se **rolA**, **rolB**, **rolC** i **rolD** (eng.: „root locus“) geni. Iako je poznato da IAA stimuliše indukciju adventivnih korenova, *aux* gen nije za taj proces neophodan kod biljaka transformisanih Ri-plazmidom. Taj zaključak potiče otuda što neagropinski Ri-plazmidi nemaju TR sekvence, a ipak proizvode korenove. Za pojavu

korenova dovoljni su *rol* geni. Korenovi izrasli na transformisanom tkivu mogu se gajiti u permanentnoj kulturi *in vitro*. Dovoljno je da se njihovi vrhovi u određenim intervalima odsecaju i stavljaju na hranljivu podlogu, gde rastu i granaju se bez ikakvih stimulatora rasteња (Slika 5.7).



Slika 5.7. Transformisani koren zvezdana.

Foto: S. Ninković

Za razliku od toga, korenovi netransformisanih biljaka zahtevaju, pre svega, hormone da bi rasli, a i tada rastu većinom sporo i vremenski ograničeno. Kod mnogih biljnih vrsta na transformisanim korenovima regenerišu se pupoljci, somatski embrioni i cele biljke (Slika 5.8).



Slika 5.8. Biljke zvezdana regenerisane na transformisanim korenovima.

Foto: N. Mitić, IBISS

One imaju karakterističan izgled: internodije su kratke, često zadebljale, listovi su sitni i imaju nabrano parenhimsko tkivo između nerava, vreme cvetanja može biti poremećeno i drugo. Pojedini *rol* geni regulišu ove pojave. Tako, ako nedostaje *rolC*, regeneranti imaju gotovo normalan izgled.

Jedno od pitanja koje i dalje nije u potpunosti objašnjeno odnosi se na regulaciju aktivnosti bakterijskih gena u biljnoj ćeliji. Naime, ekspresija gena u eukariotskim ćelijama zahteva drugačije faktore transkripcije od onih koji postoje u bakterijskim. U ovom slučaju, međutim, bakterijski geni odgovaraju na eukariotske faktore, što znači da njihovi regulatorni nizovi sadrže eukariotske *cis*-aktivne sekvence. Kao moguće objašnjenje može se pretpostaviti da je proces uspostavljanja specijalnog oblika parazitizma, kakav postoji u odnosu *Agrobacterium*-biljka, trajao vrlo dugo tokom evolucije i da su bakterije inkorporirale izvesne eukariotske DNK sekvence, koje im omogućavaju ekspresiju unutar biljnog genoma.

5.2. *Agrobacterium* kao posrednik za prenos stranih gena

Proučavajući prirodni sistem za prenos T-DNK iz agrobakterija u biljnu ćeliju (videti odeljak 5.1), svi su istraživači u jednom bili saglasni: za prenos i integraciju T-DNK potrebni su samo *vir* geni, dok sama T-DNK ne sadrži nijednu sekvencu koja bi učestvovala u njenom sopstvenom prenosu. Segment T-DNK između levog i desnog graničnog regiona – bez obzira na to koji se geni nalaze između njih – **prenosi se kao celina**. To je ukazalo na mogućnost da se iz okvira T-DNK izbace geni koji u njoj postoje, a unesu strani geni zbog kojih je transformacija predviđena. Pre svega treba izbaciti onkogene, koji proizvode auksin i citokinin, da bi se izbeglo formiranje tumora ili adventivnih korenova na transformisanoj biljci. Iz T-DNK se izbacuju, takođe, geni za sintezu opina. Umesto njih unose se **geni od interesa**, kao i **selektabilni** i **reporterski** geni, čiji proizvodi kasnije omogućavaju selekciju i praeenje ćelija u kojima se nalaze geni od interesa. Tako nastaje **rekombinovana DNK**, a njenim unošenjem u biljku konstruišu se **transgene biljke** [4].

5.2.1. *Agrobacterium* i njegovi derivati

Vrste *A. tumefaciens* i *A. rhizogenes* obuhvataju nekoliko opštepoznatih sojeva divljeg tipa, koji se razlikuju pre svega po vrsti opina koje kodira DNK plazmida, a funkcionalno po virulentnosti i po fenotipu tumora koje izazivaju. Najčešće korišćeni sojevi jesu *A. tumefaciens* Ach5 i C58, kao i *A. rhizogenes* 15834 iz kolekcija kao što je ATCC (American Type Culture Collection) i drugih. Ovi sojevi su posle isecanja T-DNK sa njihovih Ti plazmida prestali da budu virulentni i kao takvi služe za unošenje novih plazmida sa rekombinovanom DNK koja će dalje uz njihovu pomoć biti preneti u biljne ćelije. Dobili su i potpuno nove oznake (npr. EHA101 i LBA4404). Najpoznatiji sojevi i njihovi derivati nabrojani su u **Tabeli 5.1**.

Tabela 5.1. Najpoznatiji avirulentni („razoružani“) sojevi *Agrobacterium tumefaciens*.

Originalni virulentni bakterijski soj	Izvedeni avirulentni soj	Opini	Antibiotska rezistencija (Hromozom/Ti plazmid)	Reference
Ach5/pTiAch5	LBA4404/pAL4404	oktopin	Rifampicin/ Spektinomycin, Streptomycin	[5]
A281/pTiBo542	EHA101/pEHA101	nopalini	Rifampicin/Kanamycin	[6]
A281/pTiBo542	EHA105/pEHA105	sukcinamopini	Rifampicin/-	[7]
A281/pTiBo542	AGL-0	sukcinamopini	Rifampicin/-	[8]
A281/pTiBo542	AGL-1	sukcinamopini	Rifampicin, Karbenicilin/-	[8]
C58/pTiC58	GV3101/pMP90	nopalini	Rifampicin/ Gentamicin	[9]
C58/pTiC58	C58/Z707	nopalini	Rifampicin/Kanamycin	[10]

5.2.2. Transport T-DNK i integracija u biljni genom

Nisu sve biljne vrste jednako osetljive prema infekciji agrobakterijama, pa prema tome ni podložne transformaciji. Većina dikotiledonih biljaka reaguje u prirodi na prisustvo agrobakterija formiranjem tumora ili adventivnih korenova [11, 12]. Probama u laboratorijskim uslovima broj potencijalnih domaćina znatno je povećan. Monokotile nisu prirodni domaćini za agrobakterije, ali je i njih moguće transformisati pomoću posebno konstruisanih virulentnih sojeva. Prva faza u transformaciji – formiranje jednolančane T-DNK i njen ulazak u biljnu ćeliju – uglavnom je pod kontrolom bakterijskih gena. Druga faza – ugrađivanje T-DNK u genom biljke – zavisi od proteina biljne ćelije. Relativna neosetljivost biljaka prema infekciji tumači se danas nedostatkom neke funkcije koja je neophodna za potpuni proces. Naročito su varijeteti i genotipovi mnogih gajenih biljaka različiti u pogledu osetljivosti. Uspešna transformacija model-biljaka uopšte ne znači da će i drugi varijeteti iste vrste biti lako transformisani. A upravo je cilj savremene biotehnologije da proširi opseg biljnih vrsta koje će transformacijom steći poboljšane osobine. Stoga se izučavanju prenosa i inkorporacije T-DNK poklanja izuzetna pažnja.

5.2.3. Transformacija *in planta*

Jedna nova metoda za transformaciju pokazala se vrlo pogodnom za izvesne biljne vrste, pre svega za *Arabidopsis thaliana*, ali i rezultati sa drugim vrstama obećavaju. Različiti delovi biljke, kao semena na početku klijanja [13, 14] ili sejanci i apikalni pupoljci u vreme formiranja cvetnih začetaka, infiltriraju se pod vakuumom u suspenziji agrobakterija. Histoemijski je pokazano da agrobakterije u semenima ulaze u ovule, a zatim u plodnike mlade biljke. U apikalnim pupoljcima DNK ulazi u ćelije u subapikalnom meristemu, od kojih će postati ovule i jajne ćelije; seme biljke će u oba slu-

čaja biti transformisano. Prinos transformisanih semena varijabilan je, ali može biti vrlo visok [14], od 90 do 400 transformisanih semena po biljci. Glavna prednost postupka u tome je što se izbegava period kulture *in vitro*, u toku koga može doći do izvesnih genetičkih aberacija, kao što je somaklonalno variranje. Metoda je vrlo pogodna za postizanje insercione mutageneze, radi obeležavanja gena koji kodiraju određene funkcije. Na sličan način uspešno je inokulisana jedna vrsta lucerke, *Medicago truncatula* [15], koja se takođe smatra model-biljkom za leguminozne vrste. Ova metoda može biti vrlo pogodna za biljke koje se u kulturi teško regenerišu, jer bi se transgene biljke mogle razviti zaobilazeći stadijum kulture *in vitro*.

5.3. Biolistička transformacija

Pod ovim nazivom podrazumeva se jedan potpuno mehanički način za unošenje strane DNK u biljne ćelije, koji je razumljiviji ako se upotrebi kolokvijalni naziv „bombardovanje mikroprojektilima“. Iz mnogih razloga ova metoda poslednjih godina sve više ulazi u praksu i sada se koristi bar koliko i agrobakterijum. Mikroprojektili su sterilizovane čestice zlata ili volframa, prečnika do 1,5 μm , na čijoj je površini adsorbovana rekombinovana DNK koju treba uneti u biljne ćelije. Rekombinovana DNK sadrži **gen od interesa**, radi koga se transformacija obavlja, kao i **reporterske i selektabilne gene** (Tabela 5.2 i 5.3).

Tabela 5.2. Reporterski geni koji se koriste u procesu transformacije biljaka.

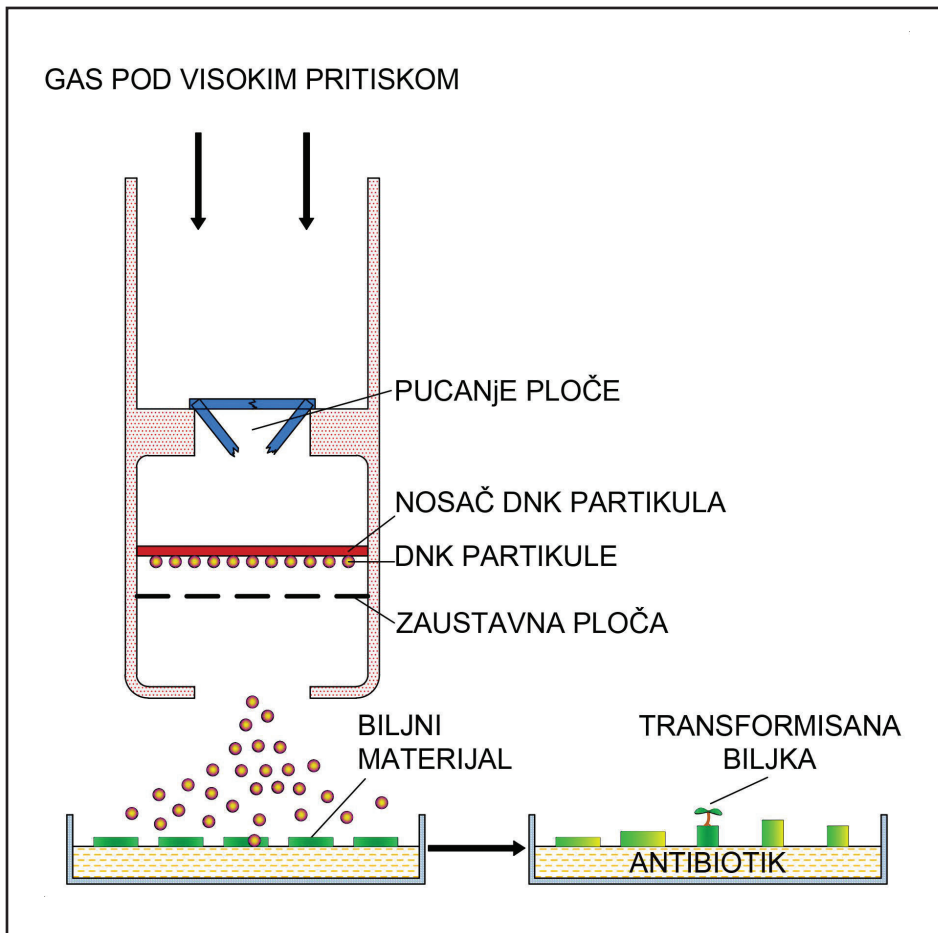
Reporterski gen (enzim/protein)	Skraćenica	Poreklo gena	Esej za detekciju
Oktopin sintetaza	<i>ocs</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Elektroforeza, hromatografija
Nopalin sintetaza	<i>nos</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Elektroforeza, hromatografija
β-glukuronidaza	<i>Gus/uidA</i>	<i>Escherichia coli</i>	Gus-esej histoheмиjski, fluorimetrijski, kolorimetrijski
Zeleni/žuti fluorescentni protein	<i>Gfp/Yfp</i>	<i>Jelly fish (Aequorea victoria)</i>	Fluorescencija
Luciferaza (bakterijski gen)	<i>LuxA/luxB</i>	<i>Vibrio harveyi</i>	Bioluminiscencija
Luciferaza (svitac)	<i>luc</i>	<i>Photonus pyralis</i>	Bioluminiscencija
Hloramfenikol acetiltransferaza	<i>cat</i>	<i>Escherichia coli</i>	Autoradiografija

Tabela 5.3. Selektabilni geni koji se koriste u procesu transformacije biljaka.

Enzim koji kodira selektabilni marker gen	Skraćenica gena	Poreklo gena	Supstrati za selekciju
Rezistencija na antibiotike			
Neomicin fosfotransferaza II	<i>nptII</i>	<i>Escherichia coli</i>	Kanamycin, geneticin (G418)
Neomicin fosfotransferaza III	<i>nptIII</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>	Kanamycin, geneticin (G418)
Higromicin fosfotransferaza	<i>Hpt/hyg</i>	<i>Escherichia coli</i>	Higromicin
Bleomicin aminopeptidaza	<i>ble</i>	<i>Escherichia coli</i>	Bleomicin
Aminoglikozid adeniltransferaza	<i>aadA</i>	<i>Shigella flexneri</i>	Streptomycin, spektinomycin

Enzim koji kodira selektabilni marker gen	Skraćenica gena	Poreklo gena	Supstrati za selekciju
Antimetabolički markeri			
Dihidrifolat reduktaza	<i>dhfr</i>	miš	Metotreksat
Dihidropteroat sintetaza	<i>Dhps/sul</i>	<i>Escherichia coli</i>	Sulfonamidi
Rezistencija na herbicide			
Fosfinotricin acetiltransferaza	<i>Bar/pat</i>	<i>Streptomyces hygroscopicus/S.viridochromogenes</i>	Glufosinat, L-fosfinotricin, Bialafos
Enolpiruvil šikimat fosfosintetaza	<i>Epsps/aroA</i>	<i>Agrobacterium sp/Petunia hybrida</i>	Glifosat
Acetolaktat sintaza	<i>als</i>	arabidopsis/kukuruz/duvan	Sulfonilurea
Glifosat oksidoreduktaza	<i>gox</i>	<i>Achromobacter LBAA</i>	Glifosat
Bromoksinil nitrilaza	<i>bxn</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bromoksinil

DNK je prethodno umnožena u bakteriji *E. coli*, izolovana uobičajenim metodama, a zatim pomešana sa koncentrovanom suspenzijom mikroprojektila, uz faktore koji će pomoći adsorpciju. Tkivo koje treba transformisati stavlja se na platformu posebnog uređaja tzv. „genskog pištolja“ i izlaže „bombardovanju“. Uređaj obuhvata akcelerator, koji pod pritiskom gasa, helijuma ili CO₂, kao i pod vakuumom, daje snažno ubrzanje mlazu mikroprojektila, koji su upravljani na uzorak tkiva (**Slika 5.9**). Mikročestice prodiru u tkivo, a mnoge od njih pogađaju jedro u kome se zadržavaju. Tu se rekombinovana DNK oslobađa i inkorporira u DNK jedra. Time je obavljena transformacija ćelije. Tkivo se zatim gaji u kulturi *in vitro*, pod uslovima koji indukuju njegovo rasteње, deobu ćelija i regeneraciju organa (videti Poglavlje 2). Uspех eksperimenta dalje zavisi od sposobnosti tkiva da regeneriše biljke.



Slika 5.9. Mikrobombardovanje biljnog tkiva

Mnogi istraživači smatraju da biolistička metoda ima veliku prednost u poređenju sa metodom u kojoj se koristi *Agrobacterium* [16]. Ovde se ne postavlja pitanje pogodnosti domaćina i njegove osetljivosti prema agrobakterijama pa je moguće transformisati i one vrste koje su iz nekog razloga bile rezistentne prema bakterijskoj infekciji. DNK se unosi direktno u jedro, pa nije potrebno konstruisati posebne vektore za prenos. Svako tkivo može da bude transformisano, samo ako se iz njega mogu regenerisati biljke. Segment DNK koji se priprema za transformaciju preciznije je isečen;

nema graničnih sekvenci, kao kod T-DNK, koji mogu povući sa sobom neke segmente vektora [17]. Pomoću biolističke metode mogu se u biljnu ćeliju uneti veći segmenti DNK, sa više različitih gena. Najzad, DNK ćelijskih organela dostupna je za transformaciju samo biolističkom metodom. Izvestan nedostatak metode u tome je što se dešava da se u genom jedne ćelije ugradi veći broj kopija DNK koje se verovatno vezuju jedna za drugu pre inkorporacije u genom. To može da ima negativne posledice za ishod transformacije, jer se usled kosupresije i utišavanja gena smanjuje broj transformanata. A zatim, mikrobombardovanje zahteva i relativno skupu opremu, pa se transformacija pomoću agrobakterija još uvek široko koristi.

5.4. Transformacija hloroplasta

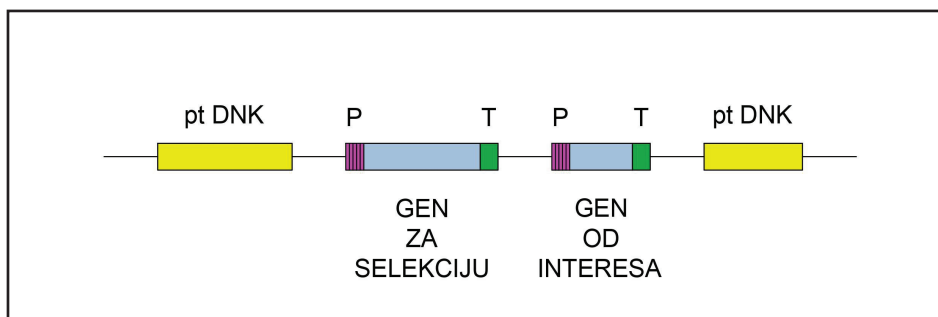
Najbolji primer za uspešnu primenu biolističke metode jeste transformacija hloroplasta. Prisustvo DNK u hloroplastima i mitohondrijama, u koju su uključeni izvesni geni od značaja za biljku, predstavlja izazov za istraživače da i ove DNK genetički modifikuju. Transformacija organela ne može se obaviti posredstvom agrobakterija, iz najmanje dva razloga. Prvo, proteini koji učestvuju u prenosu rekombinovane T-DNK nose signale koji ovaj kompleks upućuju u jedro, pa on ne može ući u organele. Drugo, geni koji su pripremljeni za transformaciju ne ugrađuju se na isti način u DNK jedra i u DNK hloroplasta. Segment DNK koji obuhvata te gene mora biti na drugačiji način konstruisan, ako treba da se ugradi u hloroplaste. Pri biolističkoj transformaciji verovatno se uvek dešava da neki broj mikroprojektila pogodi i hloroplaste, ili mitohondrije. Ako je konstrukt na odgovarajući način pripremljen, on se može inkorporirati u DNK hloroplasta. Pokušaji sa mitohondrijama još nisu pružili zadovoljavajuće rezultate. Biolistička metoda za sada je jedini način kojim se strana DNK može efikasno uneti u ćelijske organele.

Prvi rezultati o transformaciji hloroplasta objavljeni su 1988. godine [18]. Autori su koristili mutant alge *Chlamydomonas reinhardtii*; ova alga ima samo jedan krupan hloroplast, a mutant zbog delecije u genu *atpB* nije mogao obavljati fotosintezu. U hloroplast je pomoću mikroprojektila unesen ispravan *atpB* gen iz divljeg tipa, posle čega je mutant stekao sposobnost za autotrofno rastenje. Ubrzo posle toga transformisani su i hloroplasti nekoliko drugih biljaka (paradajza, soje, uljane repice, pamuka, krompira), ali su najbolji rezultati dobijeni sa duvanom [19]. Tehnika transformacije hloroplasta duvana najbolje je razrađena; duvan se može smatrati model-biljkom za taj postupak.

5.4.1. Konstrukcija vektora

Mnogi proteini koji imaju ključne uloge u metaboličkim procesima u hloroplastu kodirani su u jedru i oni se mogu izmeniti transformacijom jedarnih gena, na neki od načina koji su već opisani. Da bi se uneli novi geni u genom hloroplasta, potrebno je da rekombinovana DNK bude konstruisana na sasvim drugačiji način od one koja se upućuje u jedro. Osnovu za drugačiji konstrukt čini neki segment plastidne DNK (ptDNK), veličine 1-2 kb; za sada, to je gotovo u svim slučajevima DNK plastida duvana. U okvir ovog segmenta smeštaju se geni koje treba uneti u genom hloroplasta: jedan ili više poželjnih gena (gena od interesa), radi kojih se transformacija obavlja, zatim neki selektabilni gen, a eventualno i reporterski. Svi ovi geni stavljaju se pod kontrolu promotora, koji su inače u sastavu plastidnih gena. Takav je npr. promotor operona za plastidnu RNK polimerazu (Prn), koji se spaja sa 5' krajem transgena. Na 3' kraju nalazi se terminator, takođe poreklom iz nekog plastidnog gena (**Slika 5.10**). Levo i desno od ovog konstrukta nalaze se ostaci plastidne DNK (ptDNK) u koju je konstrukt ugrađen. ptDNK duvana koristi se zato što je ona potpuno sekvencirana pa se konstrukt može ugraditi na poznato mesto.

Rekombinovana ptDNK klonira se pomoću jednog plazmida komercijalnog soja bakterije *E. coli*, koja se brzo razmnožava, a sa njom i njen plazmid sa ugrađenom ptDNK. Ovim konstruktom oblažu se čestice zlata ili volframa, a zatim se on bombardovanjem unosi u biljne ćelije. Pošto je rekombinovana DNK homologa sa dugačkim DNK segmentom domaćina, njena integracija se obavlja po principu **homologe rekombinacije**. Mesto na kome će se rekombinovana DNK uključiti nije slučajno kao pri transformaciji jedra, nego je određeno položajem homologih sekvenci. Ako se zna genska mapa ptDNK, moguće je usmeriti uključivanje transgena na određeno mesto u plastomu, kako između gena tako i u repetitivnom regionu. Po analogiji sa terminom „transgene biljke“, one biljke čiji su hloroplasti transformisani nazvane su **transplastomne biljke**.



Slika 5.10. Konstrukcija sa segmentima plastidne DNK za transformaciju hloroplasta: pt DNK – regioni plastidne DNK, P – promotor poreklom iz plastidnog gena, T – terminator poreklom iz plastidnog gena

5.4.2. Selekcija transformisanih hloroplasta

Osim selektabilnih *nptII* i *bar* gena, koji služe za selekciju pri transformaciji jedra (Tabela 5.2), za hloroplaste se specifično koristi *aadA* gen, koji kodira enzim aminoglukozid -3'-adenilil transferazu (AAD). Ovaj enzim inaktivira antibiotike **spektinomycin** i **streptomycin**, čije se dejstvo ogleda u inhibiciji sinteze proteina na plastidnim ribozomima. Na biljkama

se to manifestuje sprečavanjem ozelenjavanja, usporavanjem ćelijske deobe i regeneracije pupoljaka na listovima duvana. Čelije čiji plastidi sadrže *aadA* gen rezistentne su prema navedenim antibioticima. Antibiotici se stavljaju u selektivne podloge u koncentraciji koja zavisi od osetljivosti biljke. Ako plastidi sadrže *aadA* gen, antibiotici su inaktivirani, pa listovi duvana ostaju zeleni, ćelije se dele i razvijaju se pupoljci; na osnovu toga se prepoznaju transformisani klonovi. Kao što će biti izloženo u vezi sa selektabilnim genima i negativnom selekcijom (videti odeljak 5.6.4), stalno prisustvo gena koji nose rezistenciju prema antibioticima nije poželjno. U ovom slučaju potencijalni rizik je i veći, s obzirom na veliki broj kopija transformisane ptDNK. Selektabilni geni se i iz genoma hloroplasta mogu izbaciti pomoću rekombinaza kao što je Cre/lox sistem bakteriofaga P1 (videti odeljak 5.6.5). U tom cilju se, pri konstrukciji vektora, *aadA* gen, odnosno neki drugi, stavi između dva rekombinantna *lox* mesta. Gen za enzim Cre unese se u jedro pomoću agrobakterija, ili na drugi način, a proteinu se doda signal koji ga upućuje u hloroplast. Na taj način se genom hloroplasta oslobađa nepoželjnog gena.

Reporterski geni za transformaciju hloroplasta jesu geni za β -glukuronidazu (GUS) ili zeleno-fluorescentni protein (GFP). Pod fluorescentnim mikroskopom na UV ili plavoj svetlosti, jasno se razlikuje zelena fluorescencija transformisanih hloroplasta od crvene fluorescencije hlorofila.

5.4.3. Razviće transplastomnih biljaka

Mnogi koraci u konstrukciji transplastomnih biljaka najbolje su proučeni na duvanu [19], dobrim delom i zbog poznate regenerativne sposobnosti ove biljke u kulturi *in vitro*. Listovi su najčešći objekat koji se koristi za transformaciju. Kao što je već rečeno, u ćelijama lista duvana može se naći i do sto hloroplasta, a svaki od njih može imati blizu sto genomskih kopija.

Tako samo u jednoj ćeliji može biti do 10.000 kopija ptDNK. Razumljivo je da pri biolističkoj transformaciji samo mali broj hloroplasta može biti pogođen mikroprojektilom. Prvi korak u razviću biljaka čini eliminacija netransformisanih hloroplasta. Radi toga se segmenti listova posle bombardovanja stavljaju u kulturu *in vitro*, na selektivnu podlogu, na kojoj se razmnožavaju samo hloroplasti koji su rezistentni prema selektivnom agensu. Homoplastomne biljke razvijaju se relativno brzo, zavisno od toga kada će se pomoću hormona indukovati diferenciranje pupoljaka. Ako se podloga podese tako da se razvijaju nediferencirani kalusi, onda se može sačekati da svi nerezistentni hloroplasti prestanu da se dele, tako da samo transformisani ostanu u ćelijama kalusa. Njihovo potomstvo će ispuniti ćelije regenerisanih pupoljaka. Smatra se da je potrebno dvadesetak deobnih ciklusa da ostanu u životu samo rezistentni hloroplasti. Alternativno, ovaj proces može biti ubrzan ako se regeneracija pupoljaka indukuje ubrzo posle transformacije. Regeneracija podrazumeva dediferencijaciju ćelija lista u meristemsko tkivo. U meristemskim ćelijama hloroplasti se dediferenciraju u znatno manji broj proplastida, ali su oni svi transformisani. Novi pupoljci se razvijaju iz meristemskih ćelija, a proplastidi se razvijaju u hloroplaste. Misli se da su dovoljna dva ciklusa regeneracije pupoljaka da svi genomi u hloroplastima regeneranata postanu transformisani. Ova procena, razume se, važi za duvan, kod koga je regeneracija pupoljaka obilna i brza.

Sa manje ili više teškoća transformisani su osim duvana plastidi još manjeg broja biljaka. Postoje bar dva razloga za ovako mali broj transplastomnih biljaka. Prvo, da bi došlo do homologne rekombinacije između ptDNK i rekombinovane DNK potrebno je da kod obe postoje relativno dugački regioni sa visokom homologijom. To je moguće kada se u rekombinovanoj DNK koriste segmenti onih istih hloroplasta koji se transformišu, ili vrlo srodnih biljaka. Tako su krompir i paradajz transformisani koristeći segmente ptDNK duvana, koji su homologni za oko 98%. Drugo, da bi se

ostvarila homogenost plastida u bombardovanim segmentima, potrebno je da biljka-transformant ima vrlo visok kapacitet za regeneraciju *in vitro*, kao što je duvan. Većina drugih biljaka u tome znatno zaostaje.

5.4.4. Prednosti i ograničenja transplastomnih biljaka

Pitanje o tome da li je za poboljšanje ekonomski značajnih biljaka korisnija metoda transformacije jedra ili hloroplasta može izgledati u ovom trenutku preuranjeno, s obzirom na dosadašnja dostignuća. Naime, broj biljnih vrsta čiji je jedarni genom transformisan neuporedivo je veći; u stvari skoro svaku biljnu vrstu je moguće transformisati, ako se na tome dovoljno radi. I pored toga, naučnici koji insistiraju na transformaciji hloroplasta [20, 21] ističu da velike prednosti te metode opravdavaju sve napore da se prepreke, uglavnom tehničke prirode, savladaju.

5.4.5. Mogući broj transgena i njihovih transkripata u ćeliji

Hloroplasti sadrže na hiljade kopija genoma koji se mogu transformisati, dok se u diploidnoj biljci nalaze u svakoj ćeliji samo dve kopije homologih hromozoma, u koje se može ugraditi izvestan broj transgena. Srazmerno tome, u hloroplastima se akumulira i veliki broj transkripata koji se dobijaju transkripcijom svih ovih gena. Ako se transformacija obavlja radi toga da transformanti sintetišu posebne proteine, onda je prednost transplastomnih biljaka očigledna. Ima primera koji pokazuju da je količina sintetisanog proteina za oko 40% veća, ako je gen koji tu sintezu reguliše unesen u hloroplaste, a ne u jedro. Osim toga, pri transformaciji jedra, povećan broj iRNK u ćeliji može da ima suprotan efekat, tj. može da proizvede smanjenje ekspresije transgena usled kosupresije i utišavanja gena. S druge strane, pojava utišavanja gena u hloroplastima nije do sada zapažena.

5.4.6. Multigenaska transformacija

U većini do sada uspešnih genetičkih transformacija, transgene biljke sadrže jedan novi gen, usled koga je promenjena osobina koja od tog gena zavisi. Jedarne iRNK eukariota tipično su monocistranske, što znači da svaka iRNK kodira jedan polipeptidni lanac. No mnoge osobine biljaka koje su od interesa za transformaciju poligenski su regulisane, što znači da nekoliko gena učestvuje u njihovoj regulaciji i da je nekoliko proteina potrebno za ispoljavanje te osobine. Da bi se u jedro uneo veći broj gena koji treba sinhrono da budu aktivirani, potrebno je obaviti nekoliko uzastopnih transformacija, za svaku izabrati novi promotor i drugačiji selektabilni gen. Da bi se indukovala sinteza provitamina A u semenu, u biljke pirinča su uneta tri gena (videti Poglavlje 7). Postoji još vrlo mali broj sličnih primera. Najveći broj do sada unetih gena je devet, što je takođe postignuto u transformaciji pirinča (svi kodiraju otpornost prema različitim selektivnim agensima); u drugoj generaciji, međutim, došlo je do segregacije i nisu sve biljke nasledile svih devet gena. Za razliku od toga, geni hloroplasta organizovani su kao operoni i iRNK hloroplasta su policistranske. To znači da jedan regulatorni gen može da aktivira transkripciju više iRNK, koje u translaciji omogućavaju sintezu više nezavisnih proteina istovremeno. Istraživači vide prednost transformacije hloroplasta u tome što je moguće više gena organizovati kao operon i preneti ih sve u istom transformacionom događaju.

5.4.7. Uniparentalno nasleđivanje gena hloroplasta

Hromozomi, koji se nalaze u jedru jajne ćelije u ovuli i u jedru generativne ćelije polena, prilikom oplodjenja spajaju se u jednu diploidnu hromozomsku garnituru, a njihovi geni se u potomcima nasleđuju biparentalno, što znači da potomci imaju jednake šanse da ih naslede od majke ili od oca.

Za razliku od toga, jajna ćelija sadrži proplastide i promitohondrije, dok ih generativna ćelija polena po pravilu nema. Pri sazrevanju polena DNK plastida, koji su se mogli u njemu nalaziti, degraduje se i polen je ne može preneti sledećoj generaciji. Prema tome, plastidi i mitohondrije koji se razvijaju u zigotu poreklom su od majke; njihove osobine su nasleđene **uniparentalno**. Ako su biljke sa uniparentalnim (majčinskim) nasleđivanjem bile transformisane preko hloroplasta, njihovi će potomci sadržati transgene (tj. biće transformisani), jer će naslediti plastide od majke. Ali ih polen tih biljaka neće imati, pošto će se oni degradovati, pa prema tome polen ne može preneti transgene na potomstvo. To je od velikog značaja za primenu genetičkog inženjerstva u poljoprivredi, jer postoji realna mogućnost da se transgeni preko polena prenesu na korovske i druge vrste koje se mogu među sobom unakrsno oprašivati. Rasejavanje transgenog polena ne može se izbeći ako su biljke transformisane preko jedra; sprečavanje ove pojave jedan je od najjačih argumenata u prilog transformacije hloroplasta. U svemu tome potrebno je važno upozorenje: istraživači treba da budu potpuno sigurni da biljna vrsta koju žele da transformišu ima uniparentalno nasleđivanje. Iako je među gajenim biljnim vrstama broj sa biparentalnim nasleđivanjem hloroplasta vrlo mali (a one su uglavnom i poznate), to u svakom slučaju treba proveriti.

5.4.8. Kompartimentacija proizvoda

Neki transgeni koji utiču na sintezu izvesnih hemijskih jedinjenja mogu da izazovu oštećenja ćelije, ako se akumuliraju u velikoj količini. Na primer, toksini koji ubijaju insekte mogu biti štetni za neke funkcije ćelija biljaka koje su transformisane da ih proizvode. Ako se toksini proizvode u hloroplastima (videti Poglavlje 6), onda će oni biti ograničeni u dejstvu, a ćelije će biti zaštićene.

Postoje i supstance koje se sintetišu u biljkama, a koje mogu imati efekat ne samo na jedan nego na više različitih metaboličkih procesa u ćeliji. Tako su biljke koje su transformisane za proizvodnju određene supstance ponekad malog rasta, ili su sterilne, ili mogu imati druge nedostatke. Ovaj plejotropni efekat može biti izbegnut ako su transformisani hloroplasti, pa se novi proizvod zadržava u njima i ne utiče na procese u citoplazmi.

5.4.9. Pozicioni efekat

Pošto je mesto insercije stranog gena pri transformaciji pomoću agrobakterija ili bombardovanjem slučajno, ekspresija transgena je varijabilna, zavisno od sekvenci DNK i gena koji se nalaze oko transgena. Nasuprot ovome, u hloroplastima je mesto insercije fiksirano okolnim sekvencama DNK, pa je ekspresija vrlo stabilna.

5.5. Druge direktne metode transformacije

Nekoliko različitih postupaka koji su upotrebljavani tokom godina zasnivaju se uglavnom na kulturi **protoplasta** u koje se unosi strana DNK. Rekombinovana DNK, najčešće izolovana iz plazmida, može biti „gola“, ili obavijena nekom membranom, tako da se dobiju **lipozomi**. Razna hemijska sredstva, kao npr. **polietilenglikol (PEG)** dodaju se u suspenziju protoplasta, da bi se pojačalo njihovo slepljivanje sa lipozomima. Protoplasti unose DNK ili lipozome endocitozom, preko invaginacija ćelijske membrane, koje obuhvataju spoljašnje vezikule. **Elektroporacija** je postupak u kome se električna struja propušta kroz suspenziju protoplasta. Usled električnog udara, na membrani se privremeno formiraju mali otvori kroz koje DNK ulazi u ćeliju. U specijalnim slučajevima korišćene su i **mikroinjekcije**, kojima se pod mikroskopom u protoplaste unosi DNK. Sve ove metode dosta su komplikovane, a

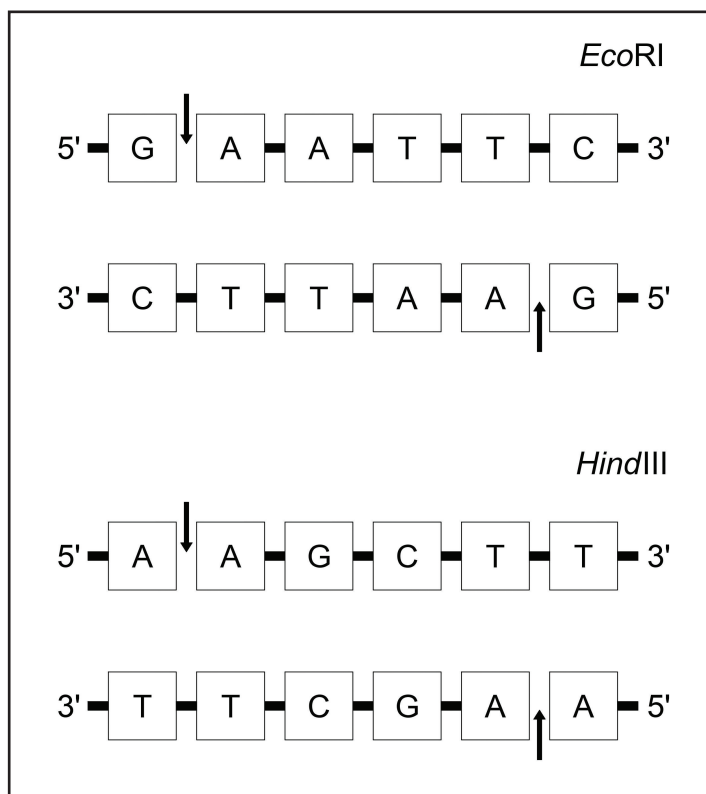
uspeh je neizvestan, zbog male regenerativne sposobnosti protoplasta mnogih vrsta. Za korišćenje protoplasta potrebno je prethodno imati vrlo dobar sistem za njihovu kulturu i regeneraciju. Prednost metoda može biti u tome što se u jednoj suspenziji nalazi do milion protoplasta izloženih infekciji i što se u slučaju uspešne transformacije pouzdano može tvrditi da je transformant poreklom od jedne ćelije.

5.6. Zajednički postupci za više različitih metoda transformacije

5.6.1. Konstrukcija, kloniranje i ekspresija rekombinovane DNK

Ovaj odeljak knjige obuhvata izvesne metode koje su znatnim delom zajedničke za većinu načina transformacije. Bez obzira na način kojim je rekombinovana DNK uneta u biljnu ćeliju, postupci kojima se ona prethodno modifikuje u velikoj su meri slični. Osamdesetih godina 20. veka metode za manipulisanje molekulom DNK bile su već poznate iz rada sa bakterijama i drugim organizmima. Molekul DNK može se iseći na manje fragmente pomoću enzima koji hidrolizuju fosfodiestarske veze između nukleotida. To su **restrikcione endonukleaze**, enzimi koji se nalaze u bakterijama i štite ih od strane DNK. Restrikcioni enzimi imaju sposobnost da prepoznaju kratke segmente DNK, koji imaju specifičan redosled nukleotida (palindromski nizovi). Na primer, enzim *EcoRI*, iz bakterije *Escherichia coli*, prepoznaje segment DNK u kome je redosled nukleotida na jednom lancu 5'-GAATTC-3', a u drugom, komplementarnom lancu je 3'-CTTAAG-5'. Hidroliza se odigrava asimetrično između G i A nukleotida na jednom i A i G nukleotida na komplementarnom lancu (**Slika 5.11**). Na sličan način, endonukleaza *HindIII* hidrolizuje DNK između dva ade-

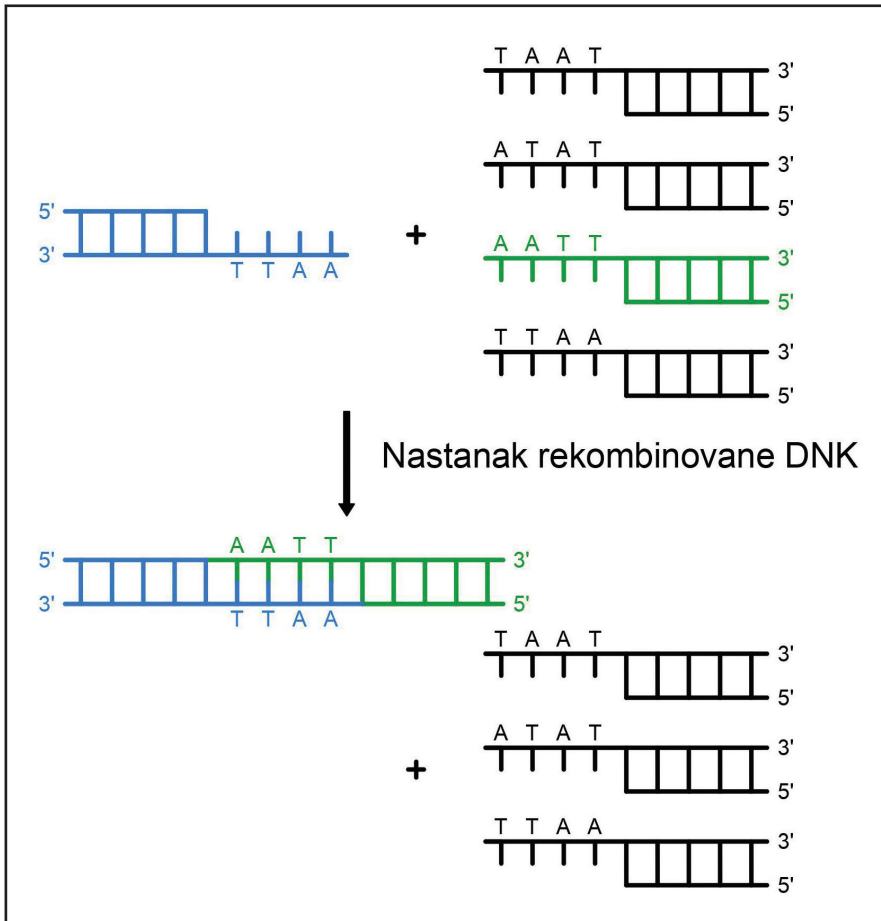
ninska nukleotida. Mesta hidrolize nisu jedno naspram drugog tako da ostaju jednolančani krajevi koji „vise“ (Slika 5.11). Krajevi koji vise označeni su kao „lepljivi“ i pomoću njih se segment DNK može hibridizovati sa drugim, koji ima komplementarne lepljive krajeve, što se događa ako je taj segment hidrolizovan istim restrikcionim enzimom. **Što se tiče svih organizama, restriktione endonukleaze hidrolizuju na isti način bilo koju DNK bez obzira na njeno poreklo.**



Slika 5.11. Nakon dejstva enzima *EcoRI* i *HindIII* dolazi do stvaranja lepljivih (kohezivnih) krajeva (strelice označavaju mesta hidrolize DNK)

Fragmenti različite dužine se pomoću elektroforeze na gelu mogu razdvojiti i nakon toga sa gela skinuti. Ako se potom kombinuju različiti fragmenti, dobijeni iz DNK dva ili više organizama, njihovi komplementarni lepljivi

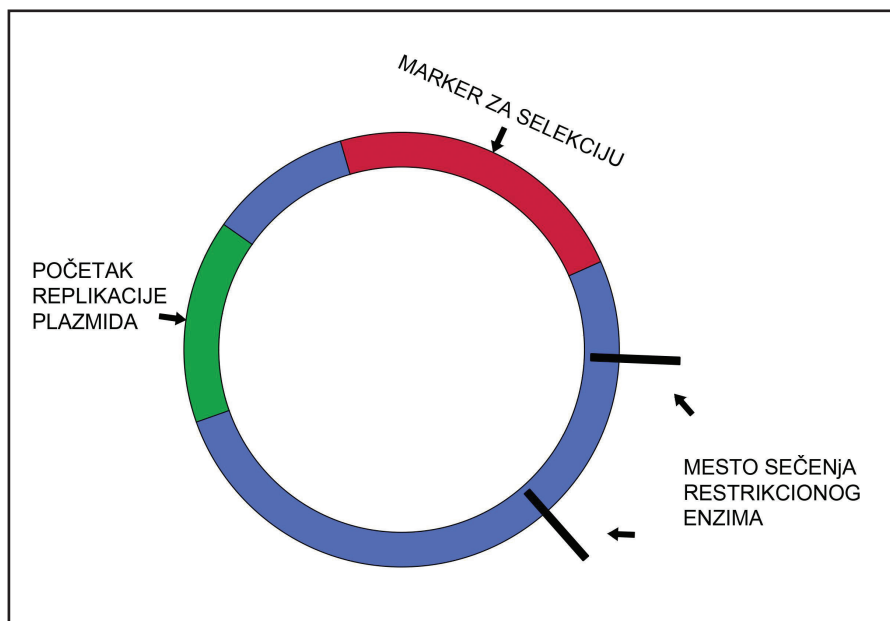
krajevi spojiće se uz pomoć enzima **ligaze**. Na taj način se u DNK koja je presečena određenim enzimom, može uneti strani fragment (npr. promotor, terminator) dobijen iz neke druge DNK, koja je **istim enzimom** isečena. Tako dobijena DNK označena je kao **rekombinovana DNK** (Slika 5.12).



Slika 5.12. Enzim DNK ligaza spaja mesta prekida kovalentnim vezama, čime se dobija rekombinovana DNK

Rekombinovana DNK unosi se u vektore za umnožavanje (kloniranje) koje obično predstavljaju **plazmidi** (Slika 5.13). Pošto se plazmidi umnožavaju u bakterijskim ćelijama koje se dele, rekonstruisani plazmid unosi se u će-

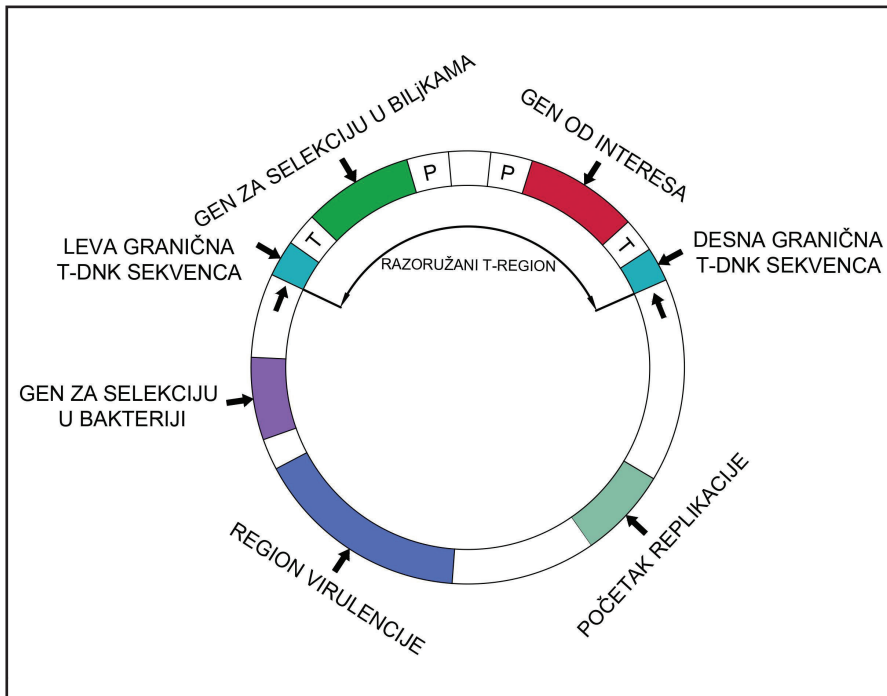
liju bakterije koja se brzo razmnožava; obično se koristi komercijalizovan soj *E. coli*. Da bi se selektovale bakterijske ćelije koje sadrže rekonstruisane plazmide, u plazmid se pri konstrukciji unosi gen koji nosi rezistenciju prema nekom antibiotiku. Zatim se kultura bakterija prenese na podlogu koja sadrži taj antibiotik u dovoljnoj koncentraciji da uništi nerezistentne bakterije. Bakterije koje prežive sadrže u sebi konstruisani plazmid.



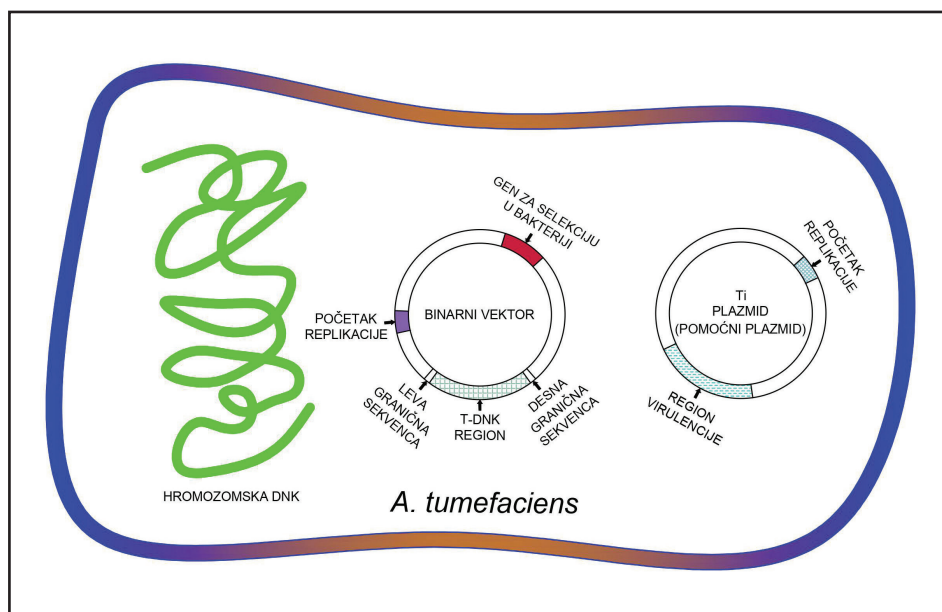
Slika 5.13. Rekombinovani plazmid

Vektori koji se koriste za transformaciju biljaka izgrađeni su na bazi Ti plazmida iz *A. tumefaciens*, ili Ri plazmida iz *A. rhizogenes*. Oni mogu biti (1) **kointegrativni** ili (2) **binarni**. U prvom se svi elementi potrebni za vektorsku funkciju nalaze na istom plazmidu. To je najčešće Ti (Ri) plazmid, kome su odstranjeni onkogeni iz T-DNK, a umesto njih je rekombinacijom sa malog plazmida ubačena željena sekvenca (Slika 5.14). U binarnom sistemu se na pomoćnom plazmidu (derivatu Ti ili Ri plazmida, Tabela 5.1) nalaze *vir* geni, čiji proizvodi ne ulaze u biljku, ali su neophodni za

transfer DNK, a na drugom, binarnom plazmidu nalaze se segmenti DNK sa genima koje treba preneti u biljku (**Slika 5.15**). Da bi vektor bio pogodan za prenos, on treba da bude male molekulske mase i da sadrži jedan ili više selektabilnih gena (npr. gen za rezistenciju prema ampicilinu ili kanamicinu), po kome će se prepoznati bakterije sa pripremljenim vektorom. Takođe se u vektor unosi sekvenca koja obuhvata prepoznatljiva mesta za više restrikcionih enzima (polilinker). Tako pripremljeni vektori prenose se u *Agrobacterium*, sa čijim se ćelijama razmnožavaju istovremeno.



Slika 5.14. Shematski prikaz kointegrativnog vektora



Slika 5.15. Shematski prikaz binarnog vektorskog sistema unutar bakterijske ćelije

5.6.2. Promotori i terminatori

Pošto je veliki broj stranih gena kojima se biljne ćelije transformišu (tj. geni od interesa) poreklom iz bakterija, oni se u biljnoj ćeliji ne eksprimiraju jer ih biljna transkripciona mašinerija ne prepoznaje. Da bi se obezbedila njihova aktivnost, potrebno je da se stave pod kontrolu **promotora**, koji je poreklom iz biljaka, ili iz virusa i bakterija kojima su biljke domaćini. Takođe im se moraju dodati i odgovarajući **terminatori**, kodoni koji označavaju kraj transkripcije pri sintezi iRNK. Promotori koji se koriste mogu biti **konstitutivni** ili **inducibilni** (Tabela 5.4). Prvi obezbeđuju da se geni kontinuirano eksprimiraju u svim transformisanim ćelijama. To su, npr. promotor **nopalinske sintetaze** (NOS promotor) i najčešće upotrebljavani promotor mozaičnog virusa karfiola **CaMV 35S** (eng.: „Cauliflower Mosaic Virus“). Iako je nopalinska sintetaza bakterijski

gen, ona se eksprimira u biljnim ćelijama, pošto pripada regionu T-DNK, čiji svi geni imaju promotore sa takvim svojstvom. CaMV 35S promotor obuhvata najmanje četiri regiona. Onaj najbliži kodirajućem delu gena sadrži TATA blok i esencijalan je za aktivnost. Ostali regioni sadrže sekvence koje pojačavaju dejstvo promotora (**enhenseri**) i koriste se u mnogim konstruktima za dobijanje „supervirulentnih“ vektora. CaMV 35S je efikasan u vezi sa bilo kojim genom, naročito kod dikotila, a vezuje se i za reporterske i selektabilne gene, radi pojačanja njihovog dejstva.

Inducibilni promotori omogućavaju da istraživač reguliše mesto i vreme aktivnosti transgena. U planiranju transgenih biljaka vrlo je važno da strani gen ne bude ekspimiran u svim ćelijama, nego samo u onima u kojima prema zamisli istraživača treba da bude aktivan. Inducibilni promotori su **tkivno specifični**, ili se indukuju određenim **spoljašnjim činiocima**, ili su, najzad, pod **razvojnou kontrolom**, tako da ih indukuju endogeni hormoni i drugi metaboliti (**Tabela 5.4**). Svi inducibilni promotori moraju da ispune sledeće zahteve: oni ne smeju biti aktivni u netransformisanoj biljci, moraju biti vrlo specifični, treba da brzo reaguju na odgovarajuće uslove indukcije, kao i da se brzo isključe kada ti uslovi prestanu. Takvi promotori povezani s poželjnim genima još su malobrojni (**Tabela 5.4**), ali su esencijalni za izvođenje genetičkih modifikacija kod ekonomski značajnih biljnih vrsta.

Tabela 5.4. Lista najčešće korišćenih promotora.

Promotori	Poreklo	Osobine
<i>Konstitutivni</i>		
NOS (nopaline synthase)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	kontrolira sintezu opina
CaMV 35S (cauliflower mosaic virus 35S)	Mozaični virus karfiola	kontrolira sintezu 35S RNK
<i>ZmUbi1</i> (maize ubiquitin I)	kukuruz	kontrolira sintezu ubikvitina
ACT1 (actin 1 rice)	pirinač	kontrolira sintezu aktina-1
<i>Inducibilni</i>		
<i>Ntss23SSU</i> (small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase)	<i>Nicotiana tabacum</i>	indukovan svetlošću
CAB2 (chlorophyll a/b-binding protein)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	indukovan svetlošću
SAG12 (senescence associated gene)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	indukovan senescencijom
PINII (potato inhibitor II)	<i>Solanum tuberosum</i>	indukovan povredom
PR5 (osmotin)	<i>Nicotiana tabacum</i>	indukovan metil-jasmonatom i etilenom
PDF1.2 (plant defensin 1.2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	indukovan metil-jasmonatom
HSP18.2 (heat shock protein18.2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	indukovan visokom temperaturom

Promotor nekog gena koji je aktivan u semenu ili listu, dakle tkivno specifičan, obezbeđuje da se transgen aktivira samo u semenu, odnosno listu transgene biljke. To ima veliku važnost u izvesnim slučajevima, kada je transgen odgovoran za proizvodnju nepoželjne supstance, kao što su proteini za suzbijanje insekata. Ovi proteini treba da se nađu samo u organu biljke koji napadaju insekti (list), ali ne treba da budu u organu koji se koristi u ishrani (seme, plod). Od spoljašnjih faktora koji indukuju aktivaciju gena, najčešća je svetlost, koja preko sistema pigmenata pruža informaciju o intenzitetu i kvalitetu svetlosti i o dužini dana. U prvom slučaju se koriste promotori gena za proteine-nosače hlorofila (*LHCPII*), čiju aktivnost stimuliše fitohrom (svetlo/tamno crvena svetlost). U drugom slučaju se često koristi gen čiju ekspresiju u listovima indukuju kratki dani; to je *SAG12* (eng.: „Senescence Associated Gene“), čiji proizvod učestvuje u senescenciji (starenju) listova. Svaki gen koji je vezan za promotor ovog gena aktiviraće se ako je transgena biljka izložena kratkom danu, bez obzira na to šta je inače funkcija tog gena. Promotori proteina koji imaju zaštitnu funkciju u temperaturnom šoku (videti odeljak 6.5), indukovani su visokom temperaturom. Kratkotrajno izlaganje transgene biljke visokoj temperaturi indukovaće aktivnost gena koji je pod kontrolom takvog promotora.

Često se koriste i promotori koje aktivira neka povreda biljke. Dovoljno je da se transgena biljka povredi, da bi se aktivirao gen pod kontrolom tih promotora. U specifičnim slučajevima koriste se i promotori osetljivi prema nekim hemijskim supstancama.

5.6.3. Selekcija transformisanih ćelija

Kada se u prirodi biljke inficiraju pomoću *A. tumefaciens* ili *A. rhizogenes*, rezultat infekcije se lako može videti po tumoru ili adventivnim korenovima koji se pojavljuju na mestu inokulacije. Ako je, međutim,

T-DNK oslobođena onkogena, onda se neoplastični izraštaji ne javljaju, a transformisane biljke se morfološki ne razlikuju od netransformisanih; za njihovo prepoznavanje koriste se **selektabilni i reporterski markeri** (geni). Ni jedan način prenosa DNK ne dovodi do transformacije svih ćelija eksplantata; čak je obično broj transformisanih ćelija relativno mali. Kada se ne bi primenila selekcija, među regenerantima bi bilo i transformisanih i netransformisanih. Već je ranije pomenuto da se regeneranti razvijaju putem somatske embriogeneze, ili iz adventivnih pupoljaka (videti Poglavlje 2). Ako potiču od somatskih embriona, njihovo je poreklo verovatno jednoćelijsko; tada se iz jedne transformisane ćelije razvija gotovo sigurno embrion čije su sve ćelije, takođe, transformisane. Ako su se, međutim, regenerisali pupoljci poreklom od više susednih ćelija, onda su oni verovatno himerični, tj. sadrže obe vrste ćelija. Kod himeričnih biljaka će se u potomstvu druge, treće i kasnijih generacija pojaviti određena proporcija netransformisanih, što bi u praksi bilo vrlo nepoželjno. Da bi se definitivno odstranile netransformisane ćelije, selekcija je neophodan korak posle unosa rekombinovane DNK. Selekcija transformisanih ćelija može biti **negativna i pozitivna**. Pri negativnoj selekciji u biljke se unose geni čiji produkti pridaju transformisanim ćelijama osobine kao što je rezistencija prema nekom antibiotiku, herbicidu, ili bilo kom drugom letalnom metabolitu (**Tabela 5.2**) koji dovode do smrti netransformisanih ćelija. Pri pozitivnoj selekciji stvaraju se uslovi koji favorizuju transformisane ćelije i koji samo transformisanim ćelijama omogućavaju deobu i razviće; sve netransformisane ćelije tu sposobnost nemaju. U sledećem pasažu izdvajaju se samo formirani embrioni ili pupoljci koji, prema tome, treba da su transformisani. U toku te procedure često se koriste i reporterski geni koji omogućavaju da se vizuelno detektuju transformisane ćelije.

5.6.4. Negativna selekcija

Jedan od agenasa koji se najčešće upotrebljava u negativnoj selekciji jeste antibiotik **kanamicin (Km)**, koji može biti dobar primer za upotrebu selektabilnih markera uopšte. Kanamicin je antibiotik koji u određenoj koncentraciji ubija ćelije. Enzim neomicin-fosfotransferaza II (NPTII), koji kodira *nptIII* gen, fosforiliše kanamicin i time ga inaktivira. Mnoge bakterije sadrže *nptIII* gen, usled čega su rezistentne prema kanamicinu. Izolovan iz bakterija i stavljen pod kontrolu npr. NOS promotora, konstrukt NOS/*nptIII* u transformisanim biljnim ćelijama indukuje, takođe, sintezu NPTII enzima, pa i ove ćelije postaju rezistentne na kanamicin. Slično tome, proizvod selektabilnog *bar* gena jeste enzim koji acetiluje herbicid **fosfotricin**, deo prirodnog antibiotika bialafosa poreklom iz bakterije *Streptomyces sp.*, i time ga inaktivira. Biljke sa *bar* genom stoga su rezistentne prema herbicidu koji sadrži fosfotricin kao aktivnu komponentu (videti Poglavlje 6). Korišćenje kanamicina i drugih antibiotika, iako je efikasno u selekciji, ima i nekih nedostataka. Na primer, dejstvo kanamicina kod raznih biljaka zavisi od primenjene doze. Izvesne biljke, mada vrlo retke, neosetljive su prema kanamicinu i bez transformacije, pa se on ne može koristiti ako se osetljivost prethodno ne proveriti. Kod drugih biljaka se moraju odrediti koncentracije Km koje su efikasne, na kojima umiru sve ćelije koje nisu transformisane. Na subletalnim koncentracijama neke netransformisane ćelije ostaju u životu, jer su zaštićene aktivnošću transformisanih. Mnoge netransformisane ćelije na taj način izbegnu dejstvo Km i nađu se u transgenim biljkama. U tom slučaju potrebno je nastaviti selekciju kroz više pasaža, što zahteva dugo vreme. Drugi nedostaci negativne selekcije pojavljuju se čak i ako je ona bila dovoljno efikasna. Tako, na primer, ćelije koje su transformisane ostaju okružene mrtvim ćelijama. Izumrlo tkivo može da spreči dostup hranljivih supstanci iz medijuma, da omete kontakt među živim ćelijama, a neki put i da izluči štetne supstance. Neka biljna

tkiva ne mogu da podnesu ovakvu izolaciju i slabo se razvijaju. U tom slučaju bolje je upotrebiti neki drugi tip selekcije.

5.6.5. Dobijanje biljaka bez markera

Jedan od razloga zbog kojih je negativna selekcija pomoću antibiotika ozbiljno, ali neosnovano kritikovana jeste taj što geni za rezistenciju prema antibioticima mogu ostati u transgenim biljkama i biti konzumirani u ishrani ljudi ili životinja. Molekularni biolozi su promptno reagovali na kritike negativne selekcije i uveli nove postupke za dobijanje **biljaka bez markera** [22].

Biljke bez markera dobijaju se **uklanjanjem selektabilnog gena** ubrzo posle transformacije, **transformacijom bez upotrebe markera**, ili u kombinaciji oba načina. Za uklanjanje selektabilnog gena za otpornost prema nekom antibiotiku koriste se enzimi **rekombinaze**, koje normalno u ćeliji isecaju fragmente DNK i premeštaju ih na neko drugo mesto, ili ih izlažu degradaciji. Rekombinaze na specifičan način prepoznaju rekombinativna mesta za koja se vezuju. Jedan od takvih enzima je **Cre/lox sistem**, koji pripada bakteriofagu P1. **Cre** je enzim koji na dva **loxP** mesta iseca kratak DNK fragment između njih. Ako se gen za rezistenciju na antibiotik ubaci između tih mesta i on će biti isečen i odbačen. U prvom krugu ćelijskih deoba posle transformacije eksprimira se gen za rezistenciju na antibiotik koji uništava netransformisane ćelije, ali eksprimira se i rekombinaza, koja taj gen zatim iseca. Sličan tome je sistem **R/RS** iz jedne vrste kvasca (*Zygosaccharomyces rouxii*), koji se sastoji od **gena za rekombinazu R** i dva mesta za prepoznavanje, **RS**. Prema tome, ima više mogućnosti da se jednom uneseni gen za rezistenciju na antibiotik izbaciti iz DNK domaćina, pošto je obavio svoju funkciju. Izbor koji se pruža istraživačima umnogome zavisi i od biljne vrste.

Drugi način koji je korišćen za odstranjenje neželjenog gena sastoji se u **dvostrukoj transformaciji**. Potrebno je da se biljke transformišu sa dve T-DNK, od kojih jedna sadrži gen za rezistenciju na antibiotik, a druga gen od interesa za transformaciju [22]. Dve T-DNK mogu biti na istom plazmidu, ili na dva plazmida u istoj ćeliji agrobakterije, ili se unose posebno, istovremeno ili sukcesivno, pomoću dva bakterijska soja. U svakom slučaju, svaka T-DNK ugrađuje se u genom nezavisno od druge, tako da nisu vezane među sobom. Izvestan procenat ćelija imaće samo po jedan T-DNK segment, a manji ili veći procenat oba. T-DNK koja obuhvata gen za rezistenciju prema antibiotiku eliminiše se na dva načina: **isecanjem** ili **segregacijom u potomstvu**. Isecanje se obavlja pomoću neke rekombinaze, ako je gen za rezistenciju postavljen između dva rekombinativna mesta, kao što je opisano. Do segregacije može doći ako se transgene biljke koje imaju obe T-DNK oprašuju sa netransformisanom biljkom, sa očekivanjem da će se, posle mejotičke rekombinacije, u potomstvu pojaviti i pojedinačne biljke, od kojih će svaka imati samo po jednu T-DNK. Na taj način, one biljke u kojima je ostao samo gen od interesa smatraju se uspešno transformisanim. Nedostatak ovog postupka je u tome što iziskuje znatno više rada, dvostruko više transformisanih biljaka u početku, a rezultat se vidi tek u drugoj generaciji. Zatim, ova procedura nije primenljiva kod svih biljaka. Da bi ona bila uspešna, transgene biljke moraju biti fertalne i moraju se razmnožavati polnim, a ne vegetativnim putem. A osim toga, za drvenaste biljne vrste koje imaju dugačak period do cvetanja, ovaj postupak iz tog razloga nije praktičan.

5.6.6. Citokinini kao pozitivni selekcionni agensi

Umesto da se netransformisane ćelije ubijaju, uspostavljaju se uslovi pod kojima **samo** transformisane ćelije mogu da rastu i da se diferenciraju – pozitivna selekcija. Regeneranti dobijeni iz ovih ćelija stavljaju se u uslove u kojima imaju prednost u obavljanju metaboličkih procesa ili razvojnih faza.

Jedan od postupaka koji se koristi u pozitivnoj selekciji jeste zamena antibiotika nekim drugim selektivnim agensom koji nije toksičan [23]; umesto da se radi selekcije ubijaju netransformisane ćelije, tim agensom se podstiče regeneracija transformisanih. Poznato je da su citokinini hormoni koji stimulišu regeneraciju pupoljaka (videti Poglavlje 2). Citokinini se dodaju u hranljivu podlogu na kojoj transformisane biljke rastu, ali ako se oni izostave, regeneracija će se dogoditi samo u ćelijama koje mogu citokinine same da sintetišu. Ključni gen u sintezi citokinina jeste *ipt* gen poreklom sa Ti plazmida, koji se pri transformaciji može uneti u biljne ćelije i indukovati njihovu regeneraciju. Suviše velika doza citokinina, međutim, izaziva preterano grananje pupoljaka i izvesne deformacije, kao što je inhibicija rastenja korena, što svakako nije poželjno kod transgenih biljaka. Stoga se mora primeniti kontrolisana manipulacija *ipt* genom za pozitivnu selekciju regeneranata. Tako su transformisani iseći listova duvana, unoseći *ipt* gen postavljen između dva RS mesta, koja pripadaju R/RS sistemu za eliminaciju [24]. Osim toga, istim konstruktom uneseni su i geni od interesa, u ovom slučaju – da bi se lako detektovali – to su bili geni za neomicin fosfotransferazu II (*nptII*) i za β -glukuronidazu (*uidA*). U segmentima listova regeneracija je stimulisana samo u transformisanim ćelijama koje su dobile *ipt* gen, po čemu su bile prepoznatljive. Prvi regeneranti su imali izgled biljaka tretiranih visokom dozom citokinina, tj. pupoljci su bili kratki, gusti i bez apikalne dominacije. Pojavili su se, međutim, i regeneranti koji su imali normalan izgled i koji su se mogli ožiliti; tokom gajenja je takvih regeneranata bilo sve više. Pokazalo se da je u njima nedostajao *ipt* gen, jer je bio uklonjen pod dejstvom rekombinaze, ali su regeneranti zadržali pozitivnu reakciju na *nptII* i *uidA* gene. Takve transgene biljke mogle su odmah da budu izdvojene iz kulture *in vitro* i da budu prenete u uslove za normalno rastenje i propagaciju. Pozitivna strana ovog postupka u tome je što se uvođenjem *ipt* gena stimuliše regeneracija i kod biljaka koje tu sposobnost imaju u manjoj meri.

Pri upotrebi *ipt* gena uvek postoji mogućnost da se izvesna doza citokinina prenese u okolne netransformisane ćelije i indukuje i njihovu regeneraciju. Stoga mnogi istraživači ne eksperimentišu sa *ipt* genom, nego sa genima za proteine koji učestvuju u prijemu i prenosu citokininskog signala. Među njima se nalaze i oni koji iniciraju regeneraciju, bilo pupoljaka bilo somatskih embriona. Već je izolovano nekoliko gena i proteina koji se nalaze na putu transdukcije. Potvrđeno je za neke od njih da mogu da izazovu citokininsku reakciju bez prisustva citokinina. Ako se takav gen unese u genom ćelije, onda će ta transformisana ćelija, odnosno strukture koje se iz nje razvijaju, biti sposobne za regeneraciju, kao da je dodat citokinin. To ne može uticati na netransformisane ćelije koje taj gen i te proteine nemaju, jer nema načina da se oni prenese iz ćelije u ćeliju. Ovi pokušaji su još u fazi ispitivanja, ali se verovatno za kratko vreme mogu očekivati pozitivni rezultati.

5.6.7. Manozna i drugi šećeri kao selekcionni agensi pri pozitivnoj selekciji

Biljke gajene *in vitro* ne mogu da koriste sve šećere kao izvor metaboličke energije, iako ih lako usvajaju iz podloge na kojoj se gaje. Ukoliko se apsorbovani šećeri ne mogu koristiti u metabolizmu, ćelije se ne dele, organi se ne regenerišu i eksplantati na kraju izumiru. Takvi nemetabolički šećeri su **D-ksiloza** i **D-manoza**, koji se koriste za pozitivnu selekciju transformisanih eksplantata.

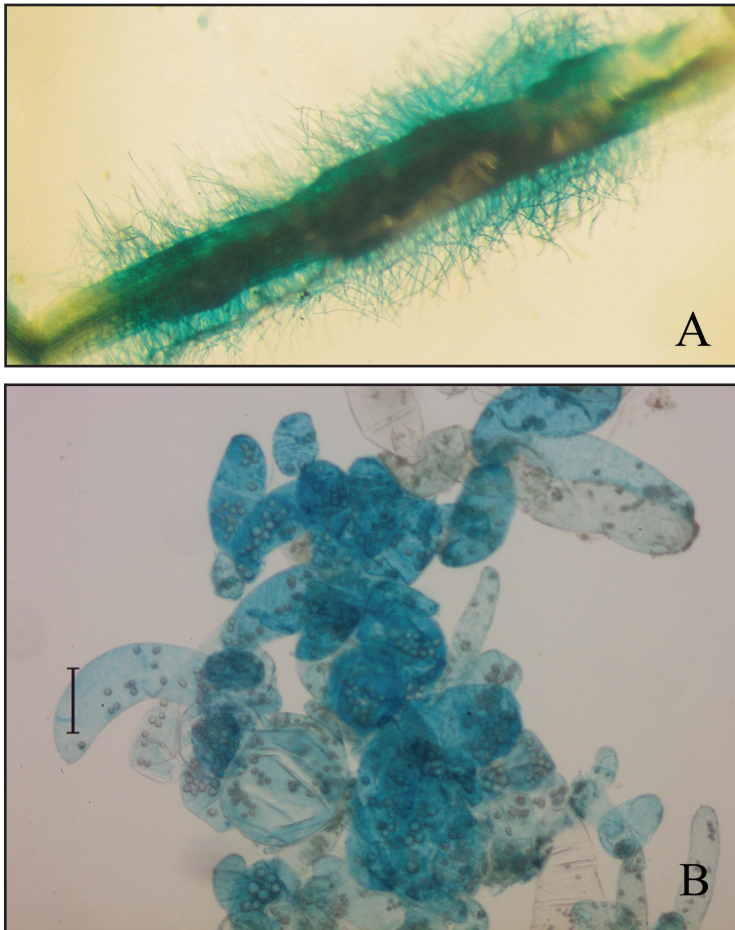
Izvesne bakterije (kao *Thermoanaerobacterium thermosulphurogenes*) nosioci su *xylA* gena, koji kodira enzim **ksilozoizomerazu**. Ovaj enzim katalizira konverziju D-ksiloze u njen izomer, **D-ksilulozu**, na kojoj biljne ćelije mogu da rastu i da se razvijaju. Pomoću *A. tumefaciens* u ćelije krompira, duvana i paradajza unet je *xylA* gen, koji je svu primljenu

ksilozu konvertovao u ksilulozu [25]. Rastenje i razviće transformisanih ćelija tako je bilo favorizovano, dok su netransformisane ćelije postepeno izumrle. Efikasnost transformacije je u ovom slučaju iznosila 18-32%, dok u paralelnom ogledu sa kanamicinom nije prelazila 4-6%.

Manoza je, takođe, šećer koji ne podržava rastenje biljnih ćelija. U ćelijama postoje endogeni enzimi koji manozu fosforilišu u **manozo-6-fosfat**, čime se troše ćelijske zalihe fosfata i ATP. Ovaj proces je toliko intenzivan da netransformisane ćelije izumiru usled nedostatka ATP. Bakterija *Escherichia coli* sadrži *pmi* gen, koji kodira enzim **fosfomanoznu izomerazu (PMI)**. Ovaj enzim u transformisanim ćelijama konvertuje manozo-6-fosfat u **fruktozo-6-fosfat**, koji lako ulazi u sve metaboličke procese. U transformisanim ćelijama time se smanjuje akumulacija derivata manoze, a one dobijaju izvor energije koji im omogućava dalje razviće. Na taj način su uspešno transformisani šećerna repa, kukuruz, pšenica, pirinač [26], sa efikasnošću transformacije od 45%, odnosno 20% za pšenicu i kukuruz, što je znatno više nego pri selekciji sa fosfinitricinom.

5.6.8. Provera genetičke transformacije

Transformacija se smatra uspešnom samo ako se rekombinovana DNK ugradi u genom ćelije-domaćina. Postoje vrlo rigorozni kriterijumi kojima se to ocenjuje i koji omogućavaju da se razlikuje **prolazna** od **stabilne transformacije**. U tom cilju se koriste **reporterski geni**, najčešće *uidA* gen koji kodira enzim **β -glukuronidazu (GUS)**. Enzim GUS katalizuje hidrolizu nekih glukuronida, koji se dodaju analiziranom tkivu [27]. Za histo-hemijske analize koristi se reagens **X-gluk** (5-bromo-4-hloro-3-indolil β -D-glukuronid), koji na mestu hidrolize ostavlja tamnoplavi precipitat. Na primer, meristemi mladih korena, pupoljaka i listova se celi boje tamnoplavo (**Slika 5.16A i B**).

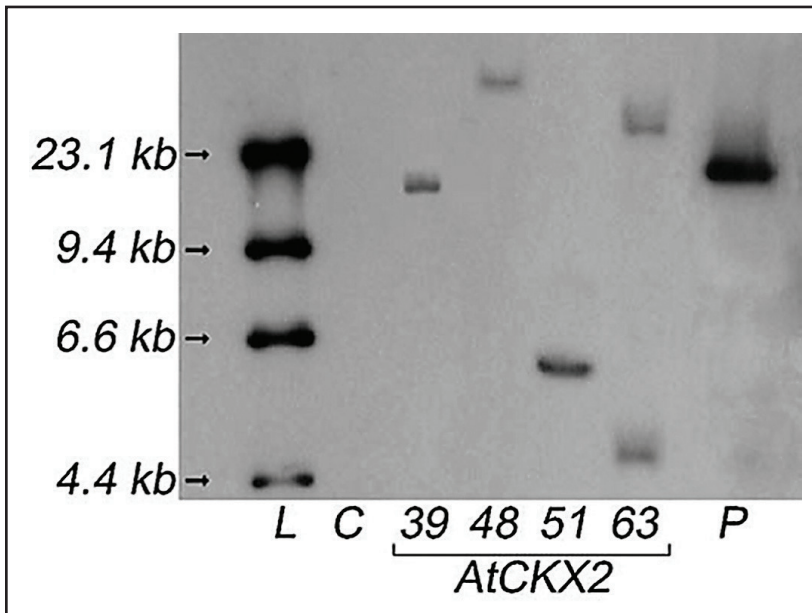


Slika 5.16. Tamnoplavi precipitat ukazuje na aktivnost *uidA* gena u analiziranom tkivu. **A** – Aktivnost *uidA* gena u korenu, **B** – Aktivnost *uidA* gena u suspenziji ćelija. Foto: S. Ninković

Precipitat se može videti i pod mikroskopom i time odrediti u kojoj je ćeliji GUS aktivan. Sličan glukuronid, **4-MUG** (4 – metilumbeliferil β -D-glukuronid), ostavlja posle hidrolize fluorogeni proizvod; po intenzitetu fluorescencije može se kvantitativno odrediti GUS aktivnost.

Prolazna (tranzijentna) transformacija javlja se kada unesena DNK posle bakterijske infekcije ili biolističke transformacije (još) nije inkorporirana u genomsku DNK. Ako je ćelija u deobi, ta DNK može postati dvolančana i van hromozoma, koristeći biljne faktore za duplikaciju. Tada tkivo pokazuje pozitivnu GUS reakciju sa X-glukom. Ako se, međutim, ne ugradi u hromozome, ta DNK se brzo degraduje i ćelije ostaju netransformisane. Ako se transformacija obavlja pomoću agrobakterija, mora se obezbediti da slobodne, još žive bakterije oko eksplantata ne reaguju sa X-glukom i time navedu na lažan zaključak. Svi noviji konstrukti stoga koriste *gus* gen koji sadrži intron. Bakterijske ćelije ne mogu da odstrane intron, pa je pozitivna reakcija siguran dokaz transkripcije samo u biljnoj ćeliji. Broj eksplantata koji pokazuje pozitivnu reakciju 3-4 dana posle transformacije može biti i vrlo visok, do 80% u nekim slučajevima, ali krajnji broj transformisanih regeneranata je obično znatno manji, što i jeste dokaz da znatan deo DNK nije ugrađen u genom.

Stabilna transformacija pretpostavlja inkorporaciju rekombinovane DNK u genom biljke. Tada se rekombinovana DNK prenosi u sve druge ćelije koje nastaju deobom transformisane, a – što je najvažnije – prolazi kroz mejozu i prenosi se na potomstvo. Tek se u tom slučaju može reći da su dobijene transgene biljke. Stabilna transformacija se proverava **Southern-probom**, u kojoj se DNK potencijalno transformisane biljke hibridizuje sa segmentom gena koji je korišćen za transformaciju. Procedura za izvođenje probe detaljno je opisana u mnogim priručnicima [28]. Tek ako se u tom testu dobije pozitivan signal, može se zaključiti da je transformacija uspela (**Slika 5.17**).



Slika 5.17. Southern blot analiza transformisanih biljaka krompira. L – DNK standard; C – netransformisani krompir; 39, 48, 51, 63 – linije krompira transformisane genom za citokinin oksidazu 2 poreklom iz *Arabidopsis thaliana* (*AtCKX2*) uz pomoć *Agrobacterium tumefaciens*. Pojava pozitivnih signala na različitim visinama kod različitih linija krompira ukazuje na različita mesta insercije gena nakon infekcije sa *A. tumefaciens*. P – plazmid koji nosi *AtCKX2* gen. Foto: S. Zdravković-Korać, IBISS

Southern blot analiza skoro se u potpunosti može zameniti metodomama koje se baziraju na amplifikaciji specifičnog DNK fragmenta (DNK sekvence) uz pomoć enzima DNK polimeraze, kao što su PCR, RT-PCR i qPCR metoda, koje su takođe opisane u brojnim priručnicima.

5.6.9. Provera prisustva „backbone“ vektora

Od oponentata genetičkog inženjerstva čuju se zamerke da se ne zna tačno koje se sve sekvence mogu uneti u genom biljke, zajedno sa rekombinovanom DNK. Pošto se to bez provere ne može potpuno isključiti, sekvence plazmida (eng.: „backbone“) za koje se sumnja da mogu biti unete koriste se kao proba za obavljanje hibridizacije (Southern blot) ili kao matrica za amplifikaciju (PCR). U slučaju da su i neželjene sekvence prisutne, takvi konstrukti se dalje ne koriste za transformaciju, i traži se drugi način za njihovo isključenje.

5.7. Nove metode transformacije biljaka

Pored već opisanih metoda za transformaciju biljaka, u svetu se razvijaju i mnoge nove metode, osmišljene tako da omogućavaju primenu ne samo u transformaciji biljaka nego i u lečenju bolesti kod ljudi koje nastaju zbog nasleđenih ili *de novo* mutacija na DNK. Kada je o biljkama reč, nove metode imaju za cilj primenu u budućoj komercijalnoj proizvodnji genetički modifikovanih biljaka. Većinom su izvedene iz onih koje se već koriste, kao što su transformacija uz pomoć *Agrobacterium tumefaciens* ili biolističke metode. Još uvek su u eksperimentalnoj fazi i većina ima za cilj uvođenje mutacija ili unošenje gena na tačno određena mesta u genomu biljaka, kao i indukciju kratkih delecija.

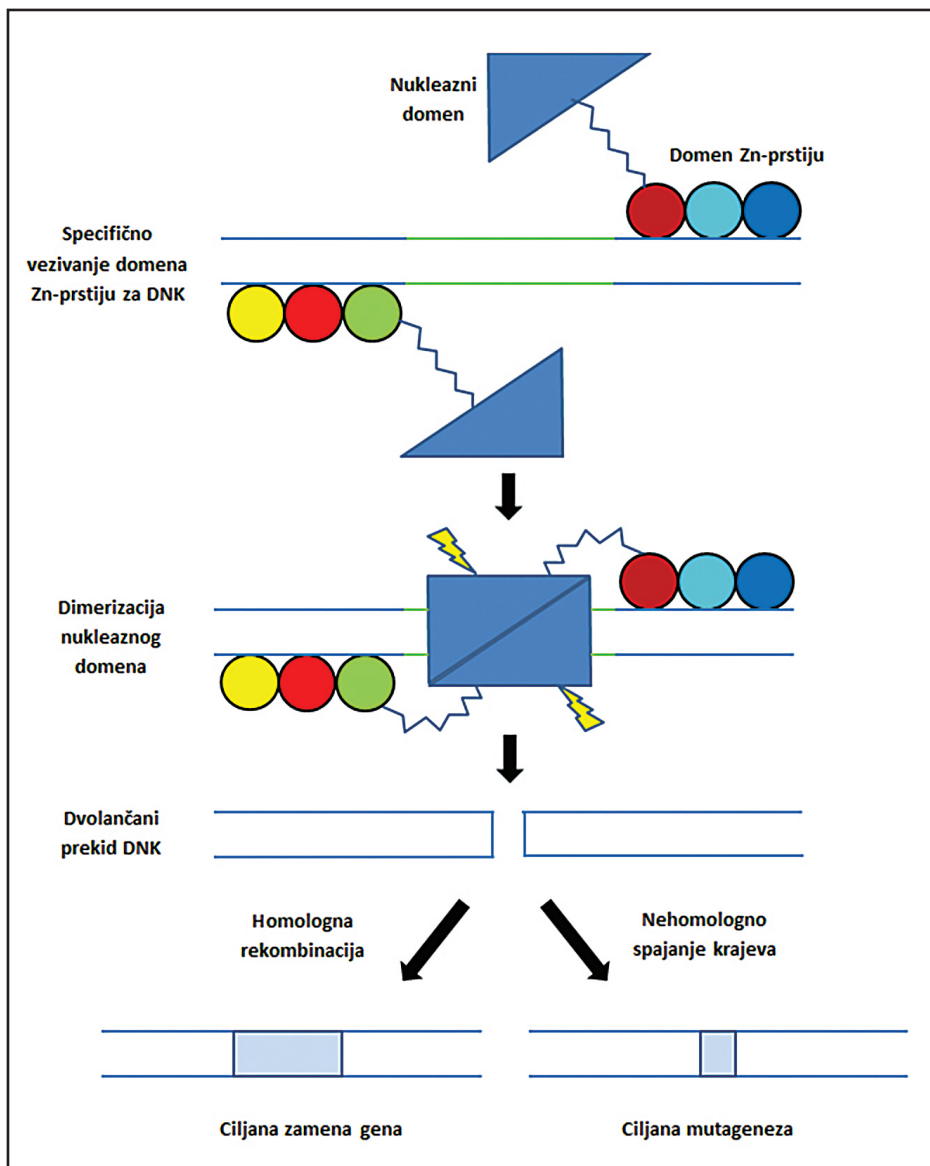
U Evropskoj uniji se vodi rasprava o tome da li ove nove tehnike treba podvesti pod zakone o genetički modifikovanim organizmima, kao i o načinima detekcije i identifikaciji modifikacija [29]. Formirana je grupa stručnjaka iz zemalja EU, koji treba da procene koliko su daleko otišla istraživanja u ovoj oblasti, šta su pogodnosti koje donose, a šta su ograničenja. Tehnike koje se analiziraju, a koje će ovde biti pomenute jesu: tehnologija nukleaza sa cinkanim prstima (ZFN), mutageneza preko oligonukleotida (ODM), cisgeneza i intrageneza, metilacija DNK zavisna od RNK, kalemljenje na GM podloge, reverzno ukrštanje i agroinfiltracija. Nedavno

se pojavila metoda koja prethodi da istisne sve ostale, a to je editovanje genoma CRISPR/Cas9 metodom. Neke od primena na kojima se eksperimentišu jesu tolerancija na herbicide kod uljane repice i kukuruza, otpornost na gljive kod krompira, otpornost na sušu kod kukuruza i drugo. Očekivalo se da će mnogi od ovih eksperimenata u skorije vreme kao rezultat dati komercijalni proizvod, pogotovo ako ove tehnike ne budu definisane kao genetičke modifikacije. Suprotno očekivanjima istraživača, u avgustu 2018. godine Evropski sud pravde doneo je odluku prema kojoj se biljke dobijene korišćenjem CRISPR/Cas9 metode, smatraju za GMO i potpadaju pod istu zakonsku regulativu kao i „klasične“ GM biljke (više detalja se može pronaći u Poglavlju 8). Interesantno je da se sa razvojem metoda odmah prijavljuju i patenti kao novi varijeteti biljaka koji su dobijeni novim metodama transformacije. Većinom se razvijaju u institutima i privatnim kompanijama, a u EU se najviše radi na primeni mutageneze preko oligonukleotida, cisgenezi i intragenezi, reverznom ukrštanju i kalemljenju, dok su u Severnoj Americi najzastupljenije tehnologija nukleaza sa Zn-prstima, mutageneza preko oligonukleotida i agroinfiltracija, dok se ostale tehnike za sada ređe koriste. Najveći broj patenata prijavljen je u Severnoj Americi, gde i privatne kompanije i instituti imaju dužu tradiciju prijave patenata [30].

Prednosti ovih metoda nad klasičnim u tome su što, pored toga što omogućavaju transformaciju na specifičnim mestima u genomu, kod mnogih je princip da se transgeni ne zadržavaju trajno u dobijenim biljkama, što znači da ih biljke za tržište neće sadržati. Ovo je u stvari i razlog što se može očekivati donošenje odluke da neke od ovih novih metoda ne budu podvedene pod zakone o GMO, pogotovo što detekcija neće biti moguća bez pratećih informacija. Ograničavajući efekti za primenu, kao i kod drugih metoda, jesu mala efikasnost transformacije (ZFN, ODM, cisgeneza) usled nedostatka efikasnog metoda za uvođenje u ćeliju, kao i efikasnog sistema za regeneraciju transformanata.

5.7.1. Tehnologija nukleaza sa Zn-prstima ZFN-1, ZFN-2 i ZFN-3

Tehnologija nukleaza sa cinkanim prstima (eng.: „Zinc-Finger Nuclease technology – ZFN“) koristi ZFN nukleaze, sintetičke proteine dizajnirane tako da hidrolizuju dvolančanu DNK na specifičnim mestima, što omogućava efikasnu i preciznu genetičku modifikaciju (mutacije, insercije, delecije) na određenim mestima na DNK molekulu [31]. ZFN nukleaze su veštački restrikcioni enzimi koji u svojoj strukturi poseduju dva domena: domen koji se specifično vezuje za određene sekvence na biljnoj DNK (domeni Zn-prsti u biljnoj DNK) i nukleazni domen, koji hidrolizuje DNK na tom mestu (**Slika 5.18**). Zahvaljujući tehnikama molekularne biologije, domeni koji se vezuju za DNK mogu se sintetisati tako da prepoznaju bilo koju poznatu sekvencu i na tom mestu izvršiti promene. Takođe, kotransformacijom sa plazmidom koji nosi željenu sekvencu, ona se može ubaciti na željeno mesto. Varijanta ZFN-1 odnosi se na izazivanje mesto-specifičnih mutacija, koje će prirodni mehanizam DNK replikacije prepisati u sledeću generaciju, a ZFN-2 na tačkaste mutacije ili promene nekoliko baza u željenom regionu ili genu, pri čemu se izmenjeni gen/sekvenca ubacuje samo da bi navela mehanizme reparacije da na određeni način povežu isečene krajeve DNK, ali ta sekvenca se ne ugrađuje u genom i ne nasleđuje u slučaju ZFN-2. Varijanta ZFN-3 odnosi se na unošenje sekvenci od nekoliko kilo-baza. Tehnikom ZFN-1 dobijen je duvan tolerantan na herbicid preko gena za acetolaktat sintazu, kao i duvan koji nosi reporter *gus* gen ili GFP protein [32, 33, 34]. ZFN-3 metoda je korišćena za dobijanje davana i kukuruza tolerantnih na herbicid preko gena za fosfinotricin acetiltransferazu. Kukuruz je za sada jedina žitarica transformisana na ovaj način.



Slika 5.18. Mehanizam delovanja nukleaza sa Zn-prstima

5.7.2. Mutageneza putem oligonukleotida

Mutageneza putem oligonukleotida (eng.: „Oligonucleotide Directed Mutagenesis – ODM“) još je jedna tehnika koja omogućava uvođenje mutacija na specifičnim mestima, i to mutacija kao što su bazne zamene ili indukcija kratkih delecija. Oligonukleotidi koji se koriste u ovoj metodi dugački su od 20 do 100 nukleotida i homologni su sa target (ciljnom) sekvencom, osim sa onim delom sekvence koji želimo da promenimo. Mogu se uneti u ćeliju pomoću PEG metode ili elektroporacije, ali za biljke su najpogodnije biolističke metode ili elektroporacija protoplasta. Oligonukleotidi generišu ugradnju pogrešnih nukleotida na ciljnom mestu što se zatim nasleđuje, dok se sami oligonukleotidi degraduju. Navode se primeri korišćenja ove metode kod različitih useva (npr. pirinač, uljana repica) za dobijanje biljaka tolerantnih na herbicide. Interesantan je primer pirinča, gde je ova metoda korišćena za dobijanje biljaka tolerantnih na herbicid hlorsulfurin [35]. Gen za enzim acetolaktat sintazu kod prirodno otpornih biljaka razlikuje se od uobičajene verzije samo u jednom nukleotidu. Himerni RNK/DNK oligonukleotidi dizajnirani da „ciljaju“ željeni kodon, koji kodira tu sekvencu u enzimu, ubačeni su biolističkom transformacijom, a sekvenciranje dobijenih tolerantnih biljaka pokazalo je da se sekvenca razlikuje na željenom mestu. Radi se i na dobijanju rezistencije na antibiotike kod kukuruza, banane, pšenice [36]. Mala efikasnost ove metode dovela je do razvoja kompjuterskog programa preko koga se testiraju potencijalni oligonukleotidi [37] za uvođenje mutacija.

5.7.3. Cisgeneza i intrageneza

Cisgeneza i intrageneza (eng.: „cisgenesis, intragenesis“) jesu načini za transformaciju biljaka genima koji potiču iz taksonomski bliskih vrsta. Ovde se radi o transformaciji željene biljne vrste preko DNK sekvenci koje

potiču iz organizma iste ili bliske vrste (vrste koje se međusobno ukrštaju), a kao rezultat se dobija novi kvalitet za određenu osobinu. U procesu cisgeneze, sekvenca koja se uvodi u željenu biljku (zajedno sa regulatornim delovima gena) neizmenjena je i praktično bi se to moglo postići i klasičnim ukrštanjem jedinki, ali za mnogo duže vreme. Kod intrageneze, sekvence mogu biti izmenjene, što ima za cilj dobijanje novog kvaliteta. Najviše se koriste za transformacije voća (jabuke, jagode, grožđe), za postizanje otpornosti na gljive i neke bolesti. Prvi varijetet jabuke otporne na gljivu *Venturia inaequalis* koja je odgovorna za izazivanje krastavosti, najštetnije bolesti na jabukama, dobijen je upravo cisgenezom [38, 39]. Razvijena je linija jabuka „Gala“ koja nosi *Rvi6* gen zaslužan za prirodnu otpornost jabuka na ovu gljivu, a poreklom iz jabuka varijeteta „Florina“. Puno se radi i na krompiru (krompir sa povećanim sadržajem amilopektina dobijen je intragenezom), zatim na lucerki, žitaricama (ječam, pšenica). Kao vektor za transformaciju najčešće se koristi *A. tumefaciens* [40]. Insistira se na tome da cisgene biljke nisu različite od tradicionalno dobijenih biljaka i da ih ne treba smatrati transgenim, pa da se prema tome regulativa koja se odnosi na transgene biljke ne može odnositi na cisgene [41]. Ukoliko se zaista cisgene biljke ne budu smatrale transgenim, to će omogućiti njihovu široku primenu u dobijanju novih varijeteta, naročito poljoprivrednih biljaka.

5.7.4. Metilacija DNK zavisna od RNK

Metilacija DNK sekvenci preko RNK molekula (eng.: „RNA-dependent DNA Methylation – RdDM“) omogućava selekcionarima da proizvode biljke koje nemaju izmena u nukleotidnim sekvencama, ali dolazi do izmena u ekspresiji gena. Princip je da se indukuje utišavanje gena i to preko metilacije promotorske sekvence ciljanog gena. Biljka se transformiše sekvencom DNK koja kodira za RNK regulatorne sekvence gena koji treba

da se utišaju. Prilikom transkripcije doći će do pojave dvolančane RNK (dsRNK). Njena pojava će u ćeliji indukovati enzimski proces (proteinski kompleks „dicer“) čija je uloga utišavanje gena preko RISC kompleksa (videti Poglavlje 3), a posledica toga je metilacija promotorske sekvence ciljnog gena i inhibicija transkripcije. Metilacija promotorske sekvence trajna je i nasleđuje se u sledećim generacijama, mada se može očekivati da se kroz generacije postepeno izgubi. Mehanizam metilacije sekvenci DNK zavisao od RNK u poslednje vreme intenzivno se proučava, jer ima važnu ulogu u mnogim procesima u razviću biljaka, kao i u odgovoru na stres [42, 43, 44]. Tehnika je korišćena kod nekoliko vrsta useva (kukuruz, krompir, šargarepa) za utišavanje pojedinih gena.

5.7.5. Kalemljenje na GM podloge

Kalemljenje na GM podloge (eng.: „grafting on GM rootstock“) klasična je metoda u voćarstvu kojom se postiže bolji kvalitet plodova voćnih vrsta koje se kaleme na podlogu. Razlika u odnosu na klasičnu metodu jeste korišćenje kalema ili plemke koji su GM. Ukoliko se radi o kalemljenju transgene plemke na podlogu koja nije modifikovana, dobijaju se GM biljke i plodovi. Ako se kalemi ne-GM plemka na GM podlogu, nadzemni delovi neće nositi genetičku modifikaciju. Pri tome se GM podloge za kalemljenje dobijaju uobičajenim metodama transformacije, pomoću bakterije *Agrobacterium* ili biolističnim metodama. Cilj je kalemljenje na podloge koje daju dobar korenov sistem, otporan na bolesti koje se mogu pojaviti ili na uslove zemljišta. Postoje podaci o eksperimentima na vinovoj lozi, kruškama, šljivama, narandžama, jabukama [45]. U Japanu je kalemljenje popularna metoda koja se često koristi za lubenice i dinje, pošto su njihovi kultivari neotporni prema bolestima [46]. Da bi se dobile podloge koje nose rezistenciju prema mozaičnom virusu bundeve (eng.: „Cucumber Green Mottle Mosaic Virus – CGMMV“), korišćena je

genetička transformacija preko *A. tumefaciens* unošenjem gena za protein omotača virusa u divlju vrstu lubenice (koja je popularna kao podloga za kaleme). Efikasnost transformacije je mala, ali dovoljna da se dobiju podloge za kalemljenje. Patent za kalemljenje lubenica po ovoj metodi još nije prijavljen, ali je verovatno da se to u dogledno vreme može očekivati.

5.7.6. Reverzno ukrštanje

Selekcionerima i odgajivačima je poznat fenomen heterozisa (videti Poglavlje 4) koji se ispoljava u tome što potomci dobijeni ukrštanjem homozigotnih roditeljskih linija imaju poboljšane osobine. Potomci su obično veći i daju bolji prinos, što je naročito izraženo kod kukuruza. Sam fenomen heterozisa je verovatno multifaktorijalan i nedovoljno istražen [47]. Da bi došlo do heterozisa, pažljivo se odabiraju linije koje se ukrštaju, ali rezultat nije uvek izvestan. Proces reverznog ukrštanja (eng.: „reverse breeding“) nudi obrnutu strategiju, tj. proizvodnju homozigotnih roditeljskih linija koje ukrštanjem daju elitni heterozigotni fenotip, od kojeg se i krenulo. Ova metoda uključuje sledeće korake: (a) selekcija elitnih heterozigotnih linija koje će se reprodukovati, (b) supresija rekombinacija u mejozi koja ide preko utišavanja gena (*dmcl* i *spo11*) transformacijom sa RNKi (interferirajuća RNK) sekvencama (to se radi da bi individualni hromozomi zadržali originalnu roditeljsku strukturu), (c) proizvodnja haploidnih mikrospora iz cvetova transgenih heterozigotnih linija, (d) korišćenjem tehnologije udvajanja hromozoma dobijaju se homozigotne linije iz kojih se zatim preko kultura mikrospora *in vitro* dobijaju homozigotne biljke, (e) selekcija linija koje ne sadrže transgene, a ukrštanjem daju početnu elitnu heterozigotnu biljku. Može se zaključiti da ova metoda omogućava očuvanje elitnih genotipova, koji se lako mogu rekonstruisati ukrštanjem homozigotnih linija, a što će doneti značajan pomak u proizvodnji novih varijeteta voćaka i žitarica. Primena ove metode ograničena je na biljke

sa malim diploidnim genomom (kukuruz, pirinač, grašak, šećerna repa, krastavac, luk, brokoli, lubenica, paradajz), a teško se sprovodi na biljkama sa velikim ili poliploidnim genomom kao što su pšenica i ovas.

5.7.7. Agroinfiltracija

Kod agroinfiltracije (eng.: „agro-infiltration, floral dip“) listovi ili cela biljka potapaju se u suspenziju *A. tumefaciens*, pri čemu se primenom vakuuma bakterije infiltriraju u tkivo (videti odeljak 5.2.3). Pri tome dolazi do visokog nivoa ekspresije gena na lokalnom nivou – tranzijentna, prolazna transformacija. Ako se biljka ostavi da donese seme, mali broj je transformisan. Ova tehnika se najviše koristi za analizu interakcija biljka-patogen. „Floral dip“ metoda transformacije korišćena je za uvođenje delecija preko ZFN proteina u neki od gena arabidopsisa [48]. Mnoge biotehnoške kompanije pokušavaju da ovu metodu koriste za proizvodnju rekombinantnih proteina u paradajzu, salati ili detelini i duvanu. Radi se o proteinima za terapijske svrhe kao što su vakcine, antitela, proteini krvi, ali još uvek nema proizvoda koji su spremni za tržište.

5.7.8. Editovanje genoma CRISPR/Cas9 sistemom

Poslednjih nekoliko godina naglo se povećao broj radova koji opisuju transformaciju ćelijskih linija, riba zebrića i miševa novom metodom koja omogućava transformaciju genoma na precizno odabranom mestu, a tehnički je lako izvodljiva. Radi se o „editovanju genoma“ preko **CRISPR/Cas9** sistema (eng.: „Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9“), za koji se smatra da će imati veliki značaj ne samo u fundamentalnim istraživanjima funkcije ljudskih gena uključenih u mnoge bolesti već i u lečenju tih bolesti.

Vrlo brzo je počela primena ove metode u transformaciji biljaka, tako da je 2013. godine prijavljena prva aplikacija na biljkama duvana i arabidopsisa [49, 50, 51]. Do danas je lista biljaka transformisanih ovom metodom proširena, pa se mogu naći podaci o primeni na pirinču, sorgumu, krompiru, topoli, soji, narandži.

Šta je CRISPR/Cas9 sistem? CRISPR/Cas 9 sistem postoji kod bakterija i arhea [52], a sam CRISPR DNK lokus prvi put je otkriven u genomu *Escherichia coli* [53] kao lokus sa neuobičajenim ponovcima. On predstavlja jedini do sada pronađen imunski sistem bakterija baziran na RNK. Zasniva se na principu prepoznavanja sopstvenih i diskriminaciji egzogenih (stranih) nukleotidnih sekvenci, tako što bakterija u svom genomu čuva male sekvence gena iz drugih bakterija ili faga sa kojima je dolazila u susret [54] kako bi ih mogla prepoznati u sledećem susretu. Pored CRISPR lokusa važna komponenta sistema je endonukleaza čija aktivnost stvara mutacije na ciljanoj, tj. stranoj DNK. Postoje tri tipa sistema u zavisnosti od toga koja je nukleaza vezana uz CRISPR lokus: *cas3*, *cas9* (*csn1*) ili *cas10* kao tip I, II i III. Tip II je najređi i ne postoji kod arhea, ali je najjednostavniji i ima veliki potencijal kao metod za ciljane izmene genoma, a poreklom je iz bakterije *Streptococcus pyogenes*. Karakteristika tipa II jeste da endonukleaza zahteva prisustvo kratkog, definisanog graničnog motiva **PAM** (eng.: „Protospacer Adjacent Motif“) koji se nalazi nizvodno na jednom od lanaca ciljane DNK, neposredno uz ciljanu sekvencu. Ovaj motiv je važan za pozicioniranje endonukleaze i sečenje lanaca.

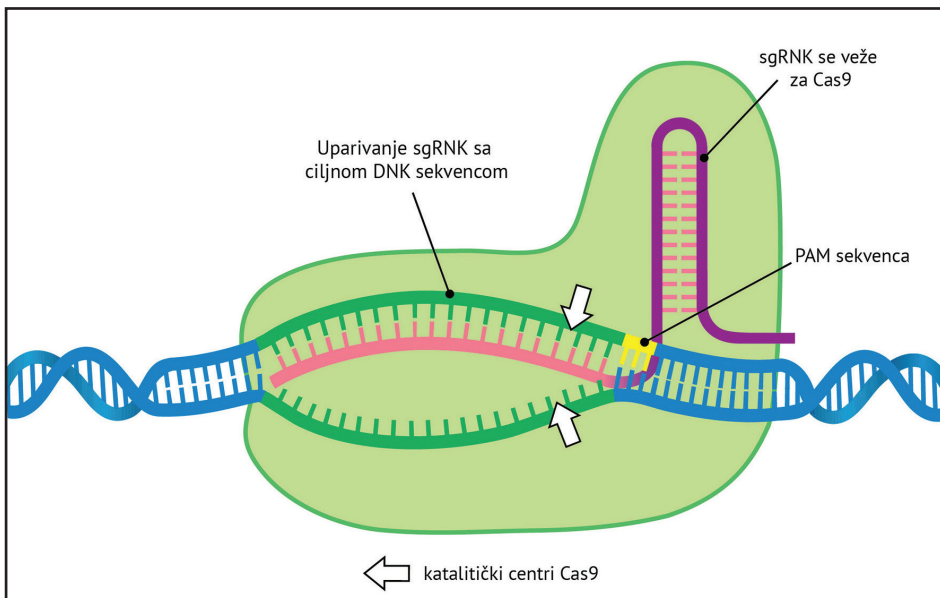
Fragmenti DNK (20 bp do 27 bp kratke granične sekvence) sa CRISPR lokusa, kao i PAM motiv prepisuju se u malu RNK (**crRNK**) koja služi kao „vodič“ prema meti (virusna ili bakterijska sekvencu) pri novim infekcijama, uz pomoć transaktivirajuće RNK (**tracrRNK**). Kompleks crRNK sa tracrRNK kruži po ćeliji u „potrazi“ za „uljezima“. CRISPR DNK bakterijski region može se nazvati i crRNK region, pošto ove male sekvence kodiraju za crRNK, a međusobno su razdvojene repetitivnim ili

palindromskim sekvencama. Kompleks se vezuje za Cas endonukleazu koja ima dva domena, tako da može da hidrolizuje oba lanca DNK kada dođe do hibridizacije crRNK sa DNK lancem neposredno uz PAM motiv. Na ciljnoj DNK se stvaraju dvolančani prekidi koji indukuju ćelijski mehanizam reparacije, nehomolognu reparaciju, **NHEJ** (videti Poglavlje 3). Za ovaj sistem poznato je da „greši“ u procesu ponovnog spajanja lanaca i to dovodi do indukcije mutacija (delecija ili kratkih insercija). Ako se uvede mutacija u aktivni centar Cas endonukleaze dobija se enzim koji može da hidrolizuje samo jednu stranu DNK, a ukoliko se pri transformaciji na unesenom konstrukt u obezbedi željena sekvenca kao zamena, aktivira se homologna reparacija koja pri ponovnom spajanju lanaca ne proizvodi greške (eng.: „**H**omologous End Joining - **HEJ**“) [55]. Pored toga, Cas endonukleaza može se mutirati i tako da se dobije potpuno neaktivan enzim koji se vezuje za DNK (funkcija prepoznavanja i vezivanja nezavisna je od enzimske funkcije Cas endonukleaze), ali svojim vezivanjem za DNK onemogućava pristup RNK polimerazi, pa mu je uloga promenjena u „transkripcioni represor“ [56]. Ovo je samo jedna od mogućnosti za „proširenu primenu“ metode u fundamentalnim i primenjenim istraživanjima i na sisarskim i biljnim ćelijama.

Kako se ova metoda koristi za transformaciju biljaka? Eksperimenti na arabidopsisu, pirinču i duvanu pokazali su da je za aktivnost Cas 9 endonukleaze dovoljno prisustvo samo sintetičke RNK (eng.: „single guide **RNA** – **sgRNK**“) koja je konstruisana tako da bude kombinacija crRNK i tracrRNK [57]. Pri tome je važno da sgRNK zadrži dve osnovne karakteristike u odnosu na crRNK i tracrRNK – na 5' kraju PAM sekvencu odgovornu za prepoznavanje ciljne sekvence, a na 3' kraju dvolančanu strukturu za koju se veže Cas9 (**Slika 5.19**). Željene sekvence se ubacuju u binarni vektorski sistem, kako je to i pri transformaciji pomoću bakterije *Agrobacterium*, koji je i ovde metoda izbora. Za transformaciju arabidopsisa koristi se uglavnom agroinfiltracija. Pojedini autori kao problem pri primeni ovog sistema na

biljkama navode nisku efikasnost transformacije, kao i različite nuspojave usled nespecifičnog vezivanja za ciljnu sekvencu. Problemi se mogu prevazići preciznim konstruisanjem sgRNK, kao i korišćenjem dužih specifičnijih PAM motiva. Postoji veliki broj kompjuterskih programa za analizu sekvenci koji mogu pomoći u prevazilaženju problema nespecifičnog vezivanja za ciljne sekvence.

Septembra 2016. godine, pojavio se rad u kome autori [58] opisuju istovremenu mutaciju čak 14 različitih gena korišćenjem tehnike CRISPR/Cas 9! Kao model biljka korišćen je arabidopsis, a autori tvrde da su promene visokospecifične i da nema nespecifičnih mutacija. Svoju tvrdnju dokazuju metodom sekvenciranja druge generacije, a to je metoda koja omogućava brzo i precizno generisanje velikog broja podataka sa višestruko pročitanih sekvenci. Sekvenciranjem je potvrđeno da nema hromozomskih translokacija i neželjenih promena. Ovi rezultati ukazuju na veliki potencijal ove metode, ne samo na polju biljne biotehnologije, već i u mnogim drugim granama nauke.



Slika 5.19. CRISPR/Cas9 sistem

5.8. Kultura *in vitro* i genetičke transformacije

Transformacija biljnog genoma pomoću bilo koje metode dešava se samo na nivou pojedinačnih ćelija. Te ćelije moraju imati dvojaka svojstva: one treba da budu prijemčive za stranu DNK, a zatim sposobne za replikaciju i regeneraciju organa. Ne može se očekivati da sve ćelije imaju oba svojstva. Prijemčivost je niska kod visokodiferenciranih ćelija, a relativno visoka kod meristemskih i parenhimskih ćelija koje se lako dediferenciraju pod uticajem biljnih hormona. Ćelije koje su još u toku deobe ili one kod kojih je deoba naknadno indukovana, sposobne su za proliferaciju i za regeneraciju različitih organa, pupoljaka, korena, embriona i najzad celih biljaka, kao što je ranije izloženo (videti Poglavlje 2). Na osnovu toga razvijene su tehnike kulture ćelija, tkiva i organa *in vitro*, na kojima se temelji savremena biotehnologija. Ove tehnike su primenjivane više od 40 godina pre nego što se pojavilo genetičko inženjerstvo, koje sigurno ne bi bilo uspešno bez njih. Biljke iz sterilne kulture najčešće se koriste za transformaciju, da ne bi došlo do drugih, neželjenih infekcija. Od bitnog je značaja činjenica da transformisane ćelije reaguju na uslove u kulturi i na stimuluse kojima se izlažu uglavnom na isti način kao i netransformisane. Iz tog razloga za svaku vrstu koja se želi transformisati, treba prethodno utvrditi optimalan protokol za gajenje i regeneraciju, pa tek onda pristupiti unošenju stranih gena. Kad se uzmu u obzir različite biljke, može se reći da se svaki deo biljke može transformisati. U protokolu po kome se ovi eksplantati gaje *in vitro*, menja se samo to što se eksplantati izlažu postupku za transformaciju. Ukoliko ima izgleda da je ona uspela, u svemu se dalje postupa kao i sa netransformisanim biljkama. Transformacija se smatra uspešnom, ako se prisustvo transgena koje je potvrđeno molekularnim analizama i dodatno potvrdi, oprašivanjem transformanata, u prvoj ili prve dve generacije (F_1 i F_2) i time pokaže da biljke stabilno nasleđuju strane gene u svom genomu po Mendelovim zakonima. Biljke koje prođu kroz ovu proceduru mogu se nazvati **transgenim biljkama**.

Sažetak

Metode koje se godinama koriste za dobijanje transgenih biljaka neprekidno se usavršavaju, sa raznim ciljevima: da postanu preciznije i osjetljivije, da budu jednostavnije i kraće, da budu jeftinije i da ne daju razloge za sumnju u njihovu bezbednost po zdravlje ljudi i zaštitu okoline. Treba još jednom podsetiti da enzimski kompleksi, koji normalno u biljnim ćelijama obavljaju reparaciju DNK i rekombinaciju gena, kao i sve druge genomske procese, učestvuju i u inkorporaciji strane DNK u genom ćelije-domaćina. Istraživači se služe prirodnim sredstvima, samo raspolažu tehnikama koje prirodne procese ubrzavaju, usmeravaju i regulišu na načine koji su za željene svrhe korisni. U to će se uveriti čitaoci u narednim poglavljima u kojima su izložena dosadašnja dostignuća genetičkog inženjerstva.

Literatura 5

1. Harper G, Hull R, Lockhart B, Olszewski N (2002) Viral sequences integrated into plant genome. *Annual Review of Phytopathology* 40: 119-136.
2. Smith EF, Townsend CO (1907) A plant-tumor of bacterial origin. *Science* 25: 671-673.
3. Chilton MD, Drummond MH, Merlo DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cell: molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11: 263-271.
4. Gelvin SB (2000) *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 223-256.
5. Ooms G, Bakker A, Molendijk L, Wullems GJ, Gordon MP, Nester EW, Schilperoort RA (1982) T-DNA organization in homogeneous and heterogeneous octopine-type crown gall tissues of *Nicotiana tabacum*. *Cell* 30: 589-597.

6. Hood EE, Helmer GL, Fraley RT, Chilton M-D (1986) The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTi-Bo542 outside of T-DNA. *Journal of Bacteriology* 168: 1291-1301.
7. Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research* 2: 208-218.
8. Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA (1991) A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology (NY)* 9: 963-967.
9. Koncz C, Schell J (1986) The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics* 204: 383-396.
10. Hepburn AG, White J (1985) The effect of right terminal repeat deletion on the oncogenicity of the T-region of pTiT37. *Plant Molecular Biology* 5: 3-11.
11. De Cleeney M, DeLay J (1976) The host range of crown gall. *Botanical Review* 42: 389-689.
12. De Cleeney M, DeLay J (1981) The host range of infectious hairy roots. *Botanical Review* 47: 174-194.
13. Bechtold N, Ellis J, Pelletier G (1993) *In planta Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris, Life Sciences* 316: 1194-1199.
14. Ye GN, Stone D, Pang SY, Creely W, Gonyales K, Hinchea M (1999) *Arabidopsis* ovule is the target for *Agrobacterium in planta* vacuum infiltration transformation. *Plant Journal* 19: 249-257.
15. Trieu AT, Burleigh SH, Kardailsky IV, Maldonado-Mendoza E, Versaw VK, Blaylock LA, Shin H, Chion T-J, Katagi H, Dewbre GR, Weigel D, Harrison MJ (2000) Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings of flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant Journal* 22: 531-541.

16. Altpeter F, Baisakh N, Beachy R, Bock R, Capell T et al. (2005) Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: Myths and Realities. *Molecular Breeding* 15: 305-327.
17. Kononov ME, Bassuner B, Gelvin SB (1997) Integration of T-DNA binary vector 'backbone' sequences of tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *The Plant Journal* 11: 945-957.
18. Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB, Sanford JC (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240: 1534-1538.
19. Maliga P (2004) Plastid transformation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 55: 289-313.
20. Daniell H, Khan MS, Allison L (2002) Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends in Plant Science* 7: 84-91.
21. Maliga P (2003) Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends in Biotechnology* 21: 20-28.
22. Puchta H (2003) Marker-free transgenic plants. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 74: 123-134.
23. Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Endo S, Zamada K, Komamine A (2001) Systems for the removal of a selection marker and their combination with a positive marker. *Plant Cell Reports* 20: 383-392.
24. Zuo J, Niu QW, Ikeda Y, Chua NH (2002) Marker-free transformation: Increasing transformation frequency by the use of regeneration-promoting genes. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 173-180.
25. Sugita K, Matsunaga E, Ebinuma H (1999) Effective selection system for generating marker-free transgenic plants independent of sexual crossing. *Plant Cell Reports* 18: 941-947.

26. He Z, Fu Y, Si H, Zhang S, Yu Y, Sun Z (2004) Phosphomannose-isomerase (*pmi*) gene as a selectable marker for rice transformation via *Agrobacterium*. *Plant Science* 166: 17-22.
27. Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
28. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Vols. 1, 2 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1626 pp.
29. Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodriguez-Cerezo E (2011) New plant breeding techniques. State-of-the-art and prospects for commercial development. JRC Scientific and Technical Reports.
30. Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodriguez-Cerero E (2012) Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nature Biotechnology* 30: 231-239.
31. Petolino JF (2015) Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 51: 1-8.
32. Tovkach A, Zeevi V, Tzfira T (2009) A toolbox and procedural notes for characterizing novel zinc finger nucleases for genome editing in plant cells. *The Plant Journal* 57: 747-757.
33. Maeder ML, Thibodeau-Beganny S, Osiak A, Wright DA, Anthony RA, Eichinger M, Jiang T, Foley JE, Winfrey RJ, Townsend JA, Unger-Wallace E, Sander JD, Muller-Lerch F, Fu F, Pearlberg J, Gobel C, Dassie JP, Pruett-Miller SM, Porteus MH, Sgroi D, Iafrate AJ, Dobbs D, McCray PB, Cathomen T, Voytas DF, Joung JK (2008) Rapid „Open-Source“ engineering of customised zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Molecular Cell* 31: 294-301.
34. Weinthal D, Tovkach A, Zeevi V, Tzfira T (2010) Genome editing in plant cells by zinc finger nucleases. *Trends in Plant Sciences* 15: 308-321.

35. Okuzaki A, Toriyama K (2004) Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. *Plant Cell Reports* 22: 509-512.
36. Dong C, Beetham P, Vincent K (2006) Oligonucleotide-directed gene repair in wheat using a transient plasmid gene repair assay system. *Plant Cell Reports* 25: 457-465.
37. Wassman CD, Tam PY, Lathrop RH, Weiss GA (2004) Predicting oligonucleotide-directed mutagenesis failures in protein engineering. *Nucleic Acids Research* 32: 6407-6413.
38. Vanblaere T, Szankowski I, Schaart J, Schouten H, Flachowsky H, Brogini GAL, Gessler C (2011) The development of a cisgenic apple plant. *Journal of Biotechnology* 154: 304-311.
39. Jansch M, Paris R, Amoako-Andoh F, Keulemans W, Davey MW, Pagliarani G, Tartarini, Patocchi A (2014) A phenotypic, molecular and biochemical characterization of the first cisgenic scab-resistant apple variety „Gala“. *Plant Molecular Biology Reporter* 32: 679-690.
40. Holme BI, Wendt T, Holm PB (2013) Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnology Journal* 11: 395-407.
41. Schouten HJ, Krens FA, Jacobsen E (2006) Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO Reports* 7: 750-753.
42. Chinnusamy V, Zhu J-K (2009) RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants. *Science in China Series C: Life Sciences* 52: 331-343.
43. Okano Y, Miki D, Shimamoto K (2008) Small interfering RNA (siRNA) targeting of endogenous promoters induced DNA methylation, but not necessarily gene silencing, in rice. *The Plant Journal* 53: 65-77.
44. Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJM (2000) Transcriptional silencing and promotor methylation triggered by double-stranded RNA. *The EMBO Journal* 19: 5194-5201.

45. Xu J, Wang ZY, Yin HZ, Liu XY (2009) Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Malus zumi* (Matsumura) Rehd using leaf explant regeneration system. *Electronic Journal of Biotechnology* 12.
46. Park SM, Lee JS, Jegal S, Jeon BY, Jung M, Park YS, Han SL, Shin MY, Ryu KH, Yang SG, Harn CH (2005) Transgenic watermelon rootstock resistant to CGMMV (cucumber green mottle mosaic virus) infection. *Plant Cell Reports* 24: 350-356.
47. Dirks R, van Dun K, de Snoo B, van den Berg M, Lelivelt CL, Voermans W, Woudenberg L, de Wit JPC, Reinink K, Schut JW, van der Zeeuw E, Vogelaar A, Freymark G, Gutteling EW, Keppel MN, van Drongelen P, Kieny M, Ellul P, Touraev A, Ma H, de Jong H, Wijnker E (2009) Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis. *Plant Biotechnology Journal* 7: 837-845.
48. Pater S, Pinas EJ, Hooykaas PJJ, van der Zaal BJ (2013) ZFN-mediated gene targeting of the *Arabidopsis* protoporphyrinogen oxidase gene through *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation. *Plant Biotechnology* 11: 510-515.
49. Xing H-L, Dong L, Wang H-Y, Han C-Y, Liu B, Wang X-C, Chen Q-J (2014) A CRISPR/Cas9 tool kit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology* 14: 327-339.
50. Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Nekrasov V (2013) Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods* 9: 39-48.
51. Feng Z, Mao Y, Xu N, Zhang B, Wei P, Yang D-L, Wang, Zhang Z, Zheng R, Yang L, Zeng L, Liu X, Zhu J-K (2014) Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *PNAS* 111: 4632-4637.
52. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA (2012) RNA-guided silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482: 331-338.

53. Harrison MM, Jenkins BV, O'Connor-Giles KM, Wildonger J (2014) A CRISPR view of development. *Genes & Development* 28: 1859-1872.
54. Chylinski K, Makarova KS, Emmanuelle C, Koonin EV (2014) Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research* 42: 6091–6105.
55. Simington LS, Gautier J (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual Review of Genetics* 45: 247-271.
56. Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, Lim WA (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 152: 1173-1183.
57. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF III (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology* 31: 397-405.
58. Peterson BA, Haak DC, Nishimura MT, Teixeira PJPL, James SR, Dangl JL, Nimchuk ZL (2016) Genome-Wide Assesment of Efficiency and Specificity in CRISPR/cas9 Mediated Multiple Site Targeting in Arabidopsis. *PLoS ONE* 11: e0162169.

Poglavlje 6

Genetički modificovane biljke na tržištu

Slavica Ninković

Nova era u biotehnologiji biljaka, označena kao era genetičkih transformacija biljaka započela je pre više od 30 godina. Tada je u biljke duvana po prvi put unesen strani gen tj. gen poreklom iz drugog organizma. Ovo revolucionarno dostignuće bilo je zasnovano na pionirskim radovima biljnog patologa Armina Brauna iz 1947. godine, koji je sugerisao da DNK poreklom iz *Agrobacterium tumefaciens*, bakterije koja inficira biljke, može da izazove biljne tumore. Paralelni rad tri grupe naučnika, Marca van Montagua i Jeffa Schella u Belgiji, Mary-Dell Chilton u SAD i Roba Schilperoorta u Holandiji u periodu od 1974. do 1980. godine potvrdio je postojanje prirodnog transfera DNK: *A. tumefaciens* deo svoje sopstvene DNK unosi u jedarnu DNK biljke uz pomoć plazmidnog sistema. Grupa Montagu-Schell iskoristila je ovaj sistem za konstrukciju genskih vektora i uradila prvu transformaciju biljaka duvana. Od tada su urađene transformacije ogromnog broja različitih biljnih vrsta, od kojih su mnoge doživele komercijalizaciju, a mnoge još uvek nisu. Od 1996. godine, kada je prvi transgeni usev izašao na polje, do danas, površina na kojoj se gaje transgene biljke povećana je sto puta. Prema podacima iz 2019. godine [1] GM biljke se gaje u ukupno 29 zemalja na površini od sto devedeset miliona hektara. O kolikoj je površini reč govori i podatak da je ova površina 50% veća od celokupne obradive površine SAD ili Kine. Upravo su Sjedinjene Američke Države zajedno

sa Brazilom, Argentinom, Kanadom i Indijom zemlje koje prednjače u uzgoju GM biljaka. Najzastupljenije GM biljne vrste koje se gaje jesu soja, kukuruz, pamuk, kanola, šećerna repa, papaja, tikvice, krompir, jabuke i plavi patlidžan. Kod komercijalnih GM biljaka trenutno su najzastupljenija tri svojstva, a to su otpornost prema herbicidima, insektima ili virusima. O tome šta leži u osnovi ovih svojstava, o prednostima, kao i eventualnim rizicima gajenja biljaka koje ih poseduju govori se u ovom poglavlju.

6.1. Otpornost prema herbicidima

Genetički modifikovane biljke najčešće se poistovećuju s transgenom sojom otpornom prema herbicidima. Razlog verovatno leži u tome što je otpornost prema herbicidima genetička modifikacija koja je danas najzastupljenija na površinama sa GM usevima. U pitanju je modifikacija koja biljkama omogućava preživljavanje u uslovima primene odgovarajućih herbicida, što im daje veliku prednost u odnosu na korove u njihovom neposrednom okruženju.

6.1.1. Istorija borbe sa korovima

Dobro je poznato da su korovi biljke koje kompetiraju sa kultivisanim biljkama za hranu, vodu i svetlost, a da istovremeno nemaju nikakvu upotrebnu vrednost za čoveka. Poznato je i da korovi mogu da izazovu velike gubitke u prinosu gajenih biljaka ukoliko se njihov rast efikasno ne kontroliše. Od davnina korišćen, a danas još uvek zastupljen u mnogim nerazvijenim zemljama gde ga uglavnom obavljaju žene, najprimitivniji vid kontrole jeste mehanički vid, odnosno čupanje ili iskopavanje korova [2]. Sa razvojem mehanizacije, ručno okopavanje, koje je iziskivalo mnogo snage i truda, bilo je zamenjeno mašinskim okopavanjem. S vremenom se pokazalo da dugotrajna primena ove metode vodi eroziji zemljišta i gubitku plodnog

tla, što je pokrenulo potragu za novim rešenjima. Kako se krajem 19. i početkom 20. veka intenzivno razvijala hemijska industrija, tako je i borba s korovima dobijala novo ubojito oružje poznato pod imenom herbicidi i postajala znatno efikasnija. Herbicidi, naročito savremeni, uspešno su zamenili ulogu čoveka i mašina u kontroli korova. U današnjoj praksi vrlo često se upotreba herbicida kombinuje sa mehaničkom kontrolom.

6.1.2. Šta su herbicidi?

Herbicidi su hemijska jedinjenja koja narušavaju vitalne procese biljaka. Najznačajniji procesi za koje su dizajnirani herbicidi jesu fotosinteza, biosinteza aminokiselina, kao i asimilacija azota. Postoje brojni herbicidi koji inhibiraju ove procese. Tako herbicidi triazin, urea i uracil, kao i bromksinil, inhibiraju elektronski transport kod fotosistema II, dok bipiridil herbicidi, parakvat i dikvat, deluju na fotosistem I. Biosintezu računvastih aminokiselina inhibiraju herbicidi iz klase sulfoniluree, imidazolinonini i triazolopirimidini, odnosno inhibitori acetolaktat sintaze (ALS inhibitori), dok je herbicid glifosat najpoznatiji inhibitor sinteze aromatičnih aminokiselina. Asimilaciju amonijum jona inhibira herbicid fosfotricin, potentni inhibitor glutamin sintetaze, enzima uključenog u regulaciju metabolizma azota.

Pored gore navedenih postoje i druge grupe herbicida koje deluju kao inhibitori sinteze lipida, inhibitori mitotičkih deoba, herbicidi auksinskog tipa i mnogi drugi. Sva ova jedinjenja dizajnirana su tako da inhibiraju enzime koji se sreću kod biljaka, ali ne i kod sisara. Prednosti herbicida ogledaju se u tome što se u kratkom vremenskom periodu mogu primeniti na velikoj površini i što veoma efikasno uništavaju višegodišnje korove. Po širini dejstva razlikujemo totalne i selektivne herbicide. Totalni herbicidi, ili herbicidi širokog spektra dejstva uništavaju sve vrste biljaka, dok su se-

lektivni herbicidi dizajnirani tako da ne oštećuju useve, delujući na primer na širokolisne biljke, ali ne i na trave, u koje spadaju i žitarice.

Kako to izgleda u praksi? Generalno, nakon mehaničke obrade zemljišta, čime se kompletno uklanjaju prisutni korovi, primenjuju se herbicidi širokog spektra dejstva koji sprečavaju rast novih korova pre setve useva. Korov koji se pojavljuje tokom sezone rasta useva suzbija se primenom selektivnih herbicida. Kako se tokom jedne sezone pojavljuju različiti tipovi korova, onda se i brojni selektivni herbicidi primenjuju za njihovu kontrolu. To dovodi do nagomilavanja herbicida u zemljištu, a ujedno i do velikih troškova, kako za proizvodnju tako i za primenu herbicida. Godišnje se primeni oko 100.000 t herbicida samo u SAD, dok se na svetskom nivou potroši oko petnaest milijardi američkih dolara na upotrebu herbicida. Nagomilavanje herbicida u zemljištu dovodi do kontaminacije izvora vode koja postaje toksična za ljude i životinje, i sve zajedno negativno utiče na prirodne ekosisteme.

Dugotrajna upotreba herbicida dovodi, takođe, do pojave rezistencije kod samih korova. Rezistencija se kod korova prvi put javila 70-tih godina 20. veka, da bi u narednih 20 godina dostigla dramatične razmere. Prema podacima iz 1993. godine samo prema herbicidu triazinu došlo je do razvoja rezistencije kod 57 korovskih vrsta [3]. Do pojave rezistencije dolazilo je kako prema herbicidima koji su primenjivani na datu populaciju korova tako i prema herbicidima koji uopšte nisu primenjivani na datoj površini, ali su imali sličan mehanizam dejstva (tzv. unakrsna rezistencija). Pokušaj upotrebe alternativnih herbicida dovodio je do pojave multiple rezistencije. Problem koji se javio sa razvojem rezistencije zahtevao je drugačiji pristup u kontroli korova. Pre svega bilo je neophodno smanjiti selektivni pritisak koji je dovodio do pojave rezistencije, a to je značilo smanjenje frekvence i količine primenjenih herbicida. Uvođenje useva rezistentnih prema herbicidima bilo je jedno od potencijalnih rešenja.

Osim kod korova i među gajenim vrstama dolazilo je do spontane pojave rezistencije na pojedine herbicide. To su bili retki događaji ali su oni u stvari bili preteča ideja o dobijanju gajenih biljaka otpornih prema herbicidima. Prvo se u laboratorijskim uslovima krenulo sa dobijanjem mutanata otpornih prema određenim herbicidima. Tako su pomoću hemijske mutageneze dobijene ćelijske linije *Arabidopsis thaliana* i *Datura innoxia*, otporne prema ALS inhibitorima. Pokazalo se da je rezistencija prema herbicidima kod laboratorijskih mutanata bila posledica promena upravo u genima koji kodiraju enzime koji su meta herbicida. Kako je primećeno da je mesto delovanja herbicida pod kontrolom uglavnom jednog ili malog broja gena, onda se, uz pomoć metoda genetičkog inženjerstva, krenulo ka preciznom unošenju određenih gena u biljke domačine, koji su tim biljkama omogućili otpornost na odgovarajuće herbicide.

6.1.3. GM biljke otporne na totalne herbicide

6.1.3.1. Vrste HT biljaka

Transgene biljke otporne prema herbicidima (eng.: „herbicide tolerant plant – HT“) razvijene su i komercijalizovane upravo od agrohemijskih kompanija koje su proizvodile herbicide, kao što su Monsanto (SAD), AgrEvo (Nemačka), DuPont (Kanada) i druge. Glavne strategije za konstruisanje GM biljaka otpornih na herbicide uključivale su sledeće pristupe:

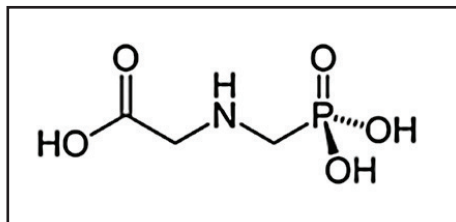
- a) upotreba mutiranih bakterijskih ili biljnih gena, tj. gena koji kao neizmenjeni kodiraju proteine koji su prirodna meta herbicida, ali u ovom izmenjenom obliku nose mutaciju koja ne utiče na funkciju proteina ali značajno smanjuje mogućnost vezivanja herbicida za njih
- b) povećanje ekspresije biljnih gena koji kodiraju normalni ciljni protein, i

c) upotreba gena koji kodiraju enzime za degradaciju i detoksifikaciju herbicida

Najpoznatije transgene linije otporne prema herbicidima koje se danas nalaze na tržištu jesu „Roundup Ready“ i „LibertyLink“ linije.

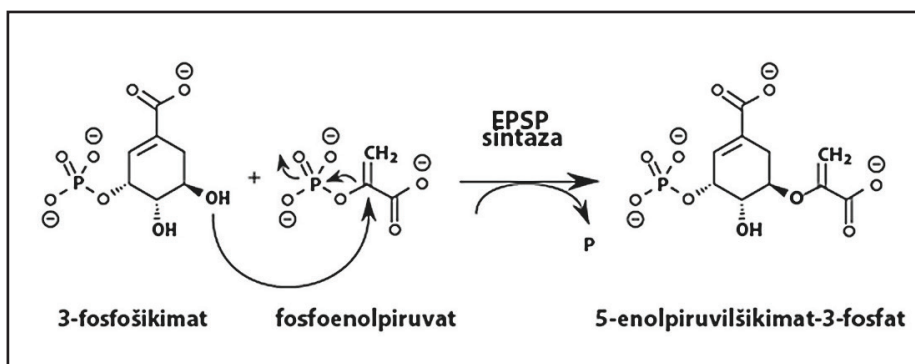
6.1.3.2. „Roundup Ready“ transgena linija – Otpornost prema glifosatu

Herbicid glifosat ili N-fosfonometil-glicin (**Slika 6.1**) predstavlja aktivnu komponentu komercijalnog proizvoda američke kompanije Monsanto poznatog pod imenom „Roundup“. Otuda potiče i naziv čitave linije transgenih biljaka otpornih prema glifosatu.



Slika 6.1. Strukturna formula glifosata

Glifosat je herbicid širokog spektra dejstva koji se pokazao efikasnim kod 76 od 78 najpoznatijih korova. On deluje kao kompetitivni inhibitor **5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat sintaze** (eng.: „5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase - **EPSPS**“), enzima koji učestvuje u sintezi esencijalnih aromatičnih aminokiselina fenilalanina, tirozina i triptofana, kao i drugih proizvoda šikimatskog puta (lignina, alkaloida, flavonoida, indola) kod biljaka, nekih gljiva i bakterija (**Slika 6.2**). Inhibicija ovog enzima ima letalne posledice po ove organizme, pre svega zbog inhibicije sinteze proteina [4].



Slika 6.2. EPSP sintaza katalizuje reakciju vezivanja fosfoenolpiruvata za 3-fosfošikimat

Otpornost transgenih biljaka prema glifosatu postignuta je različitim pristupima. Istorijski gledano, u biljke duvana je metodama genetičkog inženjerstva najpre unet mutirani *aroA* gen poreklom iz bakterija *Salmonella tyfimurium*, koje su bile prirodno otporne prema glifosatu zahvaljujući upravo ovom genu (**strategija a**). Protein koji je kodirao mutirani gen razlikovao se samo u jednoj aminokiselini od normalnog EPSPS enzima bakterija, ali je to bilo dovoljno da inhibira dejstvo glifosata i bakterijama obezbedi otpornost. Transgene biljke duvana kod kojih je primenjena uobičajena doza glifosata pokazale su umerenu toleranciju, dovoljnu da firma Calgene, Inc. iz Kalifornije patentira ovaj gen i da ga dalje unese u neke druge biljke. S obzirom na to da se radilo o genu poreklom iz bakterija prilagođenom prokariotskoj genskoj mašineriji, ekspresija ovog gena u biljnom tkivu povećana je dodavanjem promotorskih i terminatorских sekvenci poreklom iz biljaka, a dodavanje tranzitnih sekvenci za prolaz u hloroplaste, gde se vrši sinteza aromatičnih aminokiselina, omogućilo je normalnu obradu sintetisanog proteina u biljnim ćelijama.

Za razliku od prvih transgenih biljaka, današnje glavne Monsanto-ve „Roundup Ready“ biljke (soja, uljana repica i pamuk) imaju mutirani EPSPS gen poreklom iz *A. tumefaciens* CP4, a tranzitne peptidne sekvence

za prolaz u hloroplaste poreklom su iz arabidopsisa i petunije. Ove biljke se prodaju pod imenom „Roundup Ready 2 Yield“. Kod „Roundup Ready“ kukuruza ugrađen je *EPSPS* gen poreklom iz kukuruza. Ovaj gen je najpre mutiran i selekcionisan u kulturi tkiva, a zatim mu je dodat promotor poreklom iz pirinča, kao i tranzitne sekvence iz kukuruza.

Pored ovih biljaka, Monsanto kompanija je proizvela transgene biljke petunije koje produkuju 20 do 40 puta veću količinu svog normalnog EPSPS enzima i tako obezbeđuju otpornost prema glifosatu (**strategija b**). Velika produkcija enzima je bila posledica postojanja velikog broja kopija *EPSPS* gena. Ove biljke su bile gajene *in vitro* na sve većim i većim koncentracijama glifosata što je, usled velikog selektivnog pritiska, dovelo do multiplikacije *EPSPS* gena u njima.

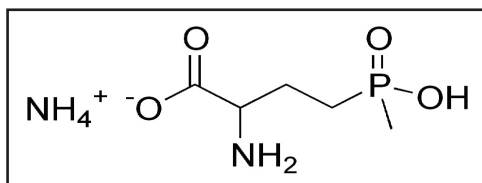


Još jedan vid rezistencije na glifosat sreće se kod transgene kanole. Ovaj varijetet uljane repice koji se gaji u SAD, pored *EPSPS* gena poreklom iz *A. tumefaciens* CP4, sadrži i gen poreklom iz zemljišnog mikroorganizma *Ochrobactrum anthropi* LBAA, koji kodira enzim glifosat oksidoreduktazu (**GOX**), koja detoksifikuje glifosat prevodeći ga u manje štetne produkte glioksilat i glicin (**strategija c**).

6.1.3.3. „LibertyLink“ transgena linija – Otpornost prema glufosinatu ili fosfinotricinu (PPT)

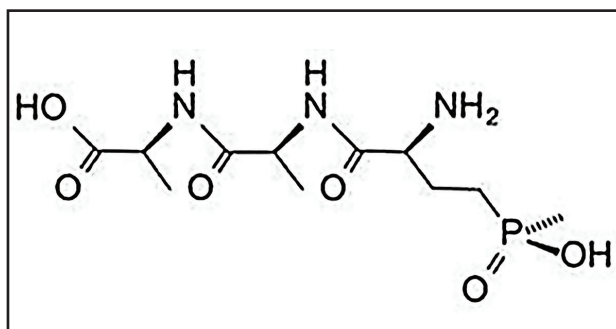
Glufosinat, tačnije glufosinat amonijum (**Slika 6.3**) aktivna je komponenta mnogih neselektivnih herbicida, komercijalizovanih pod različitim prodajnim imenima kao što su BASTA®, BUSTER®, RELY®, FINALE®, CHALLENGE®, IGNITE® i LIBERTY®. Po jednom od tih prodajnih imena dobila je ime „LibertyLink“ i linija transgenih biljaka otpornih na glufosinat, vlasništvo Bayer CropScience kompanije. Najzastupljenije „LibertyLink“ biljke jesu

kukuruz i uljana repica, a postoje i „LibertyLink“ pirinač, pšenica, šećerna repa, krompir, pamuk. Osim ovih biljaka koje su već uveliko na tržištu, dobijen je i veliki broj vrsta otpornih na glufosinat, koje se još uvek testiraju kao što su gladiola, topola, dinja, ječam, sorgum i druge.



Slika 6.3. Glufosinat amonium (DL-fosfinitricin)

Glufosinat je sintetički oblik fosfinitricina (eng.: „phosphinothricin“ - PPT), herbicida prirodnog porekla, proizvedenog od strane bakterije *Streptomyces hygroscopicus* kao jednog dela tripeptidnog antibiotika bialafosa (L-fosfinitricil-L-alanil-L-alanin, **Slika 6.4**).



Slika 6.4. Strukturna formula tripeptidnog antibiotika bialafosa poreklom iz bakterije *Streptomyces hygroscopicus* koji u sebi sadrži prirodni herbicid fosfinitricin

U početku je sam *S. hygroscopicus* korišćen za komercijalnu proizvodnju bialafosa, a kasnije su racemske mešavine aktivne L-PPT i neaktivne D-PPT forme korišćene kao aktivna komponenta kod mnogih komercijalnih herbicida [5]. Bialafos kao intaktni tripeptid ima veoma malo ili nikakvo inhibitorno dejstvo *in vitro*. No nakon ulaska bialafosa u ciljne

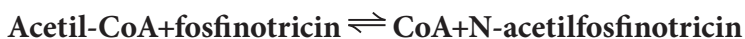
ćelije bakterije ili biljke, hidrolizuje se veza između PPT i dva L-alanina uz pomoć intraćelijskih peptidaza. Oslobođeni L-PPT, kao prirodni analog glutamata, inhibira glutamin sintetazu uzrokujući akumulaciju amonijum jona i trovanje ćelija.

Simptomi žućenja i venjenja kod biljaka pojavljuju se već nakon 3-7 dana od aplikacije herbicida. Prirodna rezistencija biljaka prema PPT za sada nije poznata, mada su uočeni različiti stepeni osetljivosti koji se pripisuju različitim faktorima.

Prilog 6.1. Glutamin sintetaza (GS)

Glutamin sintetaza ključni je enzim u metabolizmu azota koji katalizuje formiranje **glutamina** iz **glutamata** i **amonijaka**, omogućavajući tako ulazak azota u aminokiseline. Njena glavna funkcija jeste asimilacija amonijaka nastalog prilikom fiksacije neorganskog azota ili tokom redukcije nitrata. GS takođe vrši reasimilaciju amonijum jona oslobođenih tokom fotorespiracije, razlaganja proteina i drugih metaboličkih procesa. Enzim je produkt većeg broja gena, čija je ekspresija specifična kako na nivou tkiva i organa tako i na nivou ćelije (citoplazma i hloroplast). Ekspresija gena zavisi i od spoljašnjih faktora koji utiču na nutritivni status ćelije. Zajedno sa GS, enzim **glutamat dehidrogenaza (GDH)** učestvuje u održavanju balansa između azota i ugljenika.

Za razliku od biljaka, bakterija *Streptomyces hygroscopicus* poseduje prirodni odbrambeni mehanizam prema bialafosu, koji joj omogućuje da acetiluje PPT u netoksični metabolit N-acetilfosfotricin uz pomoć enzima **fosfotricin-N-acetil transferaze** (eng.: „phosphinothricin acetyltransferase“ – PAT).



Enzim je produkt **bar** (eng.: „**bialaphos resistance**“) gena. Ovaj gen pod kontrolom 35S promotora, zajedno sa srodnim **pat** genom poreklom iz *Streptomyces viridochromogenes*, iskorišćen je za dobijanje transgenih linija biljaka otpornih na PPT [6, 7]. Kod ovih biljaka primenjena je takozvana strategija detoksifikacije (**strategija c**).

6.1.3.4. Nova generacija HT biljaka

Bez obzira na početne uspehe u suzbijanju većine korova, i smanjenju količine upotrebljenih herbicida, zbog selektivnog pritiska u formi dugotrajne upotrebe jedne vrste herbicida na poljima transgenih useva, s vremenom dolazi do pojave rezistentnih korova. Ovi korovi su od protivnika GM useva i njihove primene nazvani „superkorovi“. Nisu bili u pitanju nikakvi superkorovi, već jednostavno korovi koji su mogli da se unište primenom nekih drugih herbicida na koje još nisu razvili rezistenciju. Da bi se eliminisali rezistentni korovi, započinje se sa primenom herbicida koji imaju drugačiji mehanizam delovanja. Paralelno sa tim javlja se i potreba za transgenim biljkama koje su otporne i prema ovim novoprime-njenim herbicidima.

Tako, nakon pojave korova rezistentnih na glifosat na poljima „Roundup Ready“ soje, kompanija Monsanto stvara novu generacija transgenih biljaka soje (Event 35604), koja pored otpornosti na **glifosat** poseduje i rezistenciju na herbicide koji deluju kao **inhibitori acetolaktat sintaze**. Za razliku od prethodnih generacija transgenih biljaka, otpornost prema glifosatu kod ovih biljaka omogućena je ekspresijom derivata *gat* gena iz zemljišne bakterije *Bacillus licheniformis*, gena koji kodira enzim **glifosat acetiltransferazu (GAT)**. Ovaj gen je pod kontrolom sintetičkog konstitutivnog promotora (SCP1).

Što se tiče **acetolaktat sintaze (ALS)**, u pitanju je enzim koji katalizuje prvi korak u sintezi račvastih aminokiselina (valina, leucina i izoleucina) kod biljaka i mikroorganizama. Inhibicija ovog enzima vodi laganom izgladnjivanju biljaka i inhibiciji sinteze DNK. Acetolaktat sintaza je najčešći cilj brojnih herbicida: od ukupno 270 poznatih herbicida, 135 inhibira acetolaktat sintazu. U transgenim biljkama soje Event 35604 otpornost prema inhibitorima acetolaktat sintaze obezbeđuje gen *gm-hra*, modifikovani ALS gen poreklom iz soje. Ovaj gen je pod kontrolom konstitutivnog sojinog S-adenozil-L-methionine sintaza (SAMS) promotora i kodira ALS protein koji detoksifikuje sulfonilureu i njoj slične herbicide. Oba gena (*gat4601* i *gm-hra*) ubačena su u genom soje mikrobombardovanjem.

Osim Monsanto, i druge hemijske kuće prave nove dvostruko rezistentne transgene biljke (Tabela 6.1). Tako transgene biljke soje Event FG72 pored otpornosti na glifosat, nose i **gen za 4-hidroksifenilpiruvat dioksidenu**, enzim koji obezbeđuje rezistenciju na izoksafutol. Takođe, danas postoje i biljke sa trostrukom rezistencijom na herbicide: na 2,4-D, glifosat i glufosinat (DAS 44406-6, Tabela 6.1).

Tabela 6.1. Transgene biljke otporne prema odgovarajućim herbicidima.

Komercijalni naziv transgene biljke	Vrsta herbicida	Kompanija
MON „Roundup Ready“ usevi soja, uljana repica, pamuk	Glifosat <i>inhibitor EPSPS</i>	Monsanto
LL „Liberty Link“ usevi kukuruz, uljana repica, pamuk	Glufosinat (Fosfotricin) <i>inhibitor glutamin sintetaze</i>	Bayer CropScience
DAS-44406-6 Soja otporna prema 2,4-D, glifosatu i glufosinatu	2,4-D <i>sintetički auksin</i>	Dow AgroSciences

Komercijalni naziv transgene biljke	Vrsta herbicida	Kompanija
DAS-68416-4 Soja otporna prema 2,4-D i glufosinatu	2,4-D <i> sintetički auksin</i>	Dow AgroSciences
DAS-40278-9 Kukuruz otporan prema 2,4-D i inhibitorima ACCaze	2,4-D <i> sintetički auksin</i>	Dow AgroSciences
DAS-40278-9 Kukuruz otporan prema 2,4-D i inhibitorima ACCaze	Inhibitori ACCaze <i> inhibitori acetyl-CoA karboksilaze</i>	Dow AgroSciences
DP-356043-5 Soja otporna prema glifosatu i ALS inhibitorima odobrena 2008.	ALS inhibitori <i> inhibitori acetolaktat sintaze</i>	Pioneer Hi-Bred
DP-098140-6 Kukuruz otporan prema glifosatu i ALS inhibitorima odobren 2009.	ALS inhibitori <i> inhibitori acetolaktat sintaze</i>	Pioneer Hi-Bred
BXN Pamuk otporan prema bromoksilinu odobren 1994.	Bromoksinil <i> inhibitor fotosistema II</i>	Calgene
Events 31807 & 31808 Pamuk otporan prema bromoksilinu i Lepidopterama odobren 1997.	Bromoksinil <i> inhibitor fotosistema II</i>	Calgene
MON-87708-9 Soja	Dikamba <i> sintetički auksin</i>	Monsanto
BPS-CV127-9 Soja	Imidazolinoni <i> inhibitori acetolaktat sintaze</i>	BASF

Komercijalni naziv transgene biljke	Vrsta herbicida	Kompanija
Event FG72 Soja otporna prema izoksafutolu i glifosatu	Izoksafutol <i>inhibitor sinteze karotenoida</i>	Bayer
Event 19-51a Pamuk otporan prema sulfonilurei odobren 1996. u SAD	Sulfonilurea <i>inhibitor acetolaktat sintaze</i>	DuPont
CDC Triffid Pamuk otporan prema ostacima sulfoniluree u zemlji odobren 1999. u SAD	Sulfonilurea <i>inhibitor acetolaktat sintaze</i>	Univerzitet Saskačevan u Saskatunu, Kanada

6.1.3.5. Komercijalizacija i rasprostranjenje HT biljaka

Biljke otporne prema herbicidima, uglavnom glifosatu i glufosinatu, zajedno sa biljkama otpornim prema insektima bile su među prvim generacijama komercijalizovanih transgenih biljaka. Mnoge HT vrste odobrene su za komercijalnu upotrebu, ali mnoge još nisu (Tabela 6.2). Neke od njih još uvek se testiraju na eksperimentalnim poljima.

Tabela 6.2. HT biljke.

Odobrene za komercijalnu upotrebu	Čekaju odobrenje
Soja (<i>Glycine max</i>)	Paradajz (<i>Lycopersicon esculentum</i>)
Argentinska kanola (<i>Brassica napus</i>)	Paprika (<i>Capsicum annuum</i>)
Kukuruz (<i>Zea mays</i>)	Pirevina (<i>Agrostis stolonifera</i>)
Pamuk (<i>Gossypium hirsutum</i>)	Papaja (<i>Carica papaya</i>)
Lucerka (<i>Medicago sativa</i>)	Duvan (<i>Nicotiana tabacum</i>)
Šećerna repa (<i>Beta vulgaris</i>)	Melon dinja (<i>Cucumis melo</i>)
Karanfil (<i>Dianthus caryophyllus</i>)	Bundeva (<i>Cucurbita pepo</i>)
Poljska kanola (<i>Brassica rapa</i>)	Petunija (<i>Petunia sp.</i>)

Odobrene za komercijalnu upotrebu		Čekaju odobrenje
Pšenica (<i>Triticum aestivum</i>)		Ruža (<i>Rosa hybrida</i>)
Lan (<i>Linum usitatissimum</i>)		Šljiva (<i>Prunus domestica</i>)
Cikorija (<i>Cichorium intybus</i>)		Topola (<i>Populus nigra</i>)
Pirinač (<i>Oryza sativa</i>)		
Krompir (<i>Solanum tuberosum</i>)		

Pojedine biljne vrste otporne na herbicide odobrene za komercijalnu upotrebu vrlo brzo su bile prihvaćene od uzgajivača najpre u SAD, zatim i u Argentini (soja), Kanadi (kanola), a danas i u Brazilu, Paragvaju, Urugvaju, Meksiku, Boliviji, Južnoj Africi, Kini, Japanu, Koreji. Tokom 2000. godine soja otporna prema herbicidima gajila se na 59% svih površina pod GM biljkama, što je predstavljalo 36% ukupne proizvodnje soje, kanola na 6%, pamuk i kukuruz na 5%. Podaci iz 2009. ukazuju da je udeo HT soje porastao na 77%, a da je HT šećerna repa za samo tri godine dostigla 95% zastupljenosti ukupne proizvodnje šećerne repe u celoj Severnoj Americi. Što se tiče drugih regiona, prihvatanje je išlo nešto sporije. U Evropi se od 2000. godine soja gajila samo u Rumuniji, a kukuruz u Bugarskoj. Nakon njihovog ulaska u EU 2007. godine, gajenje transgenih biljaka potpuno je zabranjeno. U većini zemalja Evropske unije, kao i u našoj zemlji, trenutno je dozvoljeno samo eksperimentalno gajenje transgenih HT biljaka. Evropska unija, međutim, godišnje uveze 35 do 40 miliona tona transgenog sojinog semena i sirovina poreklom iz Amerike, Argentine i Brazila.

Prihod ostvaren na HT usevima tokom prve 23 godine od njihove komercijalizacije, odnosno od 1996. do 2018. godine, iznosio je 91,3 milijarde američkih dolara, što predstavlja 41% ukupnog svetskog prihoda ostvarenog na GM usevima i što ukazuje na izuzetan značaj ovih modifikacija [8].

6.1.4. Prednosti i nedostaci transgenih biljaka otpornih prema herbicidima

6.1.4.1. Prednosti

Zašto su HT biljke tako brzo prihvaćene od uzgajivača uprkos činjenici da je prinos GM soje nešto niži od prinosa obične soje, dok je GM seme skuplje? Odgovor leži u tome da su ukupni troškovi proizvodnje GM soje manji, bez obzira na skuplje seme i niži prinos. Važno je naglasiti i to da niži prinos HT biljaka nije posledica procesa genetičkih modifikacija, već odlika samih varijeteta koji su korišćeni za dobijanje GM biljaka u poređenju sa varijetetima koji se inače gaje i imaju dobar prinos ali ih je teško transformisati.

Niža cena proizvodnje useva posledica je odsustva potrebe za mehaničkim uklanjanjem korova (nema plevljenja i okopavanja). Takođe su smanjeni i troškovi za upotrebu herbicida (1994-95. farmeri u SAD trošili su 78 dolara po hektaru, a danas samo 37 dolara).

Pored smanjenja ukupnih troškova proizvodnje, prednost gajenja HT biljaka ogleda se i u zaštiti životne sredine. Koriste se bolji herbicidi, kao što je glifosat, koji kontroliše većinu glavnih korova. Ovaj herbicid, vezujući se čvrsto za čestice tla, ostaje u površinskim slojevima zemlje ne prodirući duboko u zemlju, ni u podzemne vodene tokove, brzo se razlaže uz pomoć zemljišnih mikroorganizama preko aminometilfosfonične kiseline do ugljen-dioksida, kratko se zadržava u zemlji (poluživot ovog herbicida kreće se od dva do 190 dana u zavisnosti od vrste zemlje i klimatskih uslova), i primenjuje se samo po potrebi za razliku od višekratne primene selektivnih herbicida na poljima sa netransformisanim usevima.

Smanjena potreba za okopavanjem useva vodi smanjenju erozije zemljišta i gubitka plodnog tla, a s druge strane većoj dostupnosti vode i

organskih materija. Takođe je smanjen gubitak ugljenika iz zemlje i emisija CO₂ u atmosferu, što značajno utiče na smanjenje klimatskih promena. Ova poslednja činjenica dovela je do toga da pokret zelenih, koji je bio glavni pobornik anti-GM kampanje, promeni svoje mišljenje i podrži gajenje GM biljaka u Americi, dok se u Evropi još uvek dešava da eksperimentalna polja pod GM usevima bukvalno izgaze aktivisti pokreta.

6.1.4.2. Nedostaci?

Koji su nedostaci HT biljaka i da li su to zaista nedostaci?

Preterana upotreba herbicida

Postoji mišljenje da bi upotreba transgenih biljaka otpornih prema herbicidima mogla da dovede do nekontrolisane upotrebe herbicida, jer se sada herbicidi mogu primenjivati bez opasnosti da će naškoditi gajenim biljkama. Opasnost od nekontrolisane upotrebe herbicida neosnovana je, jer se željeni efekat u suzbijanju korova na poljima transgenih biljaka postiže primenom znatno manje količine herbicida nego u tradicionalnoj proizvodnji. No protivnici upotrebe genetički modificovanih biljaka tvrde da su podaci o primeni znatno manje količine herbicida važili za prvih nekoliko godina upotrebe HT biljaka, a da se sa pojavom rezistentnih korova ova situacija promenila, jer se preporučuje upotreba i dodatnih herbicida. Jasno je da se promena u količini upotrebljenog herbicida automatski odražava na ukupnu cenu proizvodnje. Ekonomski analitičari, međutim, ukazuju na činjenicu da se površina na kojoj se gaje HT biljke na globalnom nivou ne smanjuje poslednjih nekoliko godina [8] što ukazuje da proizvođači i dalje ostvaruju značajnu ekonomsku korist od ove tehnologije, inače bi je zamenili isplativijom, isto kao što su devedesetih godina 20. veka prešli sa skuplje klasične na jeftiniju GM tehnologiju.

Pojava rezistentnih korova (superkorovi)

Pojava korova rezistentnih na herbicide nije nova pojava. I pre upotrebe transgenih biljaka zabeleženo je postojanje velikog broja rezistentnih korova (80 je registrovano u SAD i Kanadi, 32 u Australiji). Od 1996. godine do danas, na poljima „Roundup Ready“ soje širom sveta razvilo se čak deset rezistentnih korova na glifosat, koji naročito predstavljaju značajan problem u pojedinim delovima SAD. Najpoznatiji od njih su *Conyza canadensis*, *Ambrosia trifida* i *Ambrosia artemisiifolia*. Nedavno je pokazano da korov *Amaranthus palmeri* poseduje sto puta jaču ekspresiju *EPSPS* gena od uobičajene, ekspresiju koja mu omogućava rezistenciju na glifosat, a koja se prenosi i na F2 generaciju [9]. Prisustvo dvostruke rezistencije na herbicide kod GM biljaka može da reši dati problem. Ilustracije radi, Monsanto je 2010. godine proizveo liniju transgenog kukuruza poznatog pod nazivom „SmartStax“ koja nosi osam različitih transgena, dva za otpornost prema herbicidima glifosatu i glufosinatu i šest *Bt* gena za otpornost prema različitim insektima. Smatra se da upotreba herbicida različitog modaliteta dejstva (npr. 2,4-D) može takođe da doprinese rešavanju ovog problema.

Prenos transgena

Prenos gena za rezistenciju na herbicide s transgenih biljaka na divlje srodnike ne bi trebalo smatrati posebno važnim problemom. Ovi geni ne predstavljaju neku prednost za divlje srodnike, jer se herbicidi retko koriste van polja ili farme, pa će oni vrlo brzo biti izgubljeni, jer ne postoji odgovarajući selektivni pritisak. U stvari, korov otporan na herbicide bio je uobičajena pojava na svim, pa i na evropskim farmama i pre pojave GM biljaka. Poznato je da prilikom reprodukcije korova dolazi do rasprostiranja njihovih gena bez ikakvih posledica po okolinu. Ipak, najnoviji laboratorijski podaci iz 2014. godine pokazuju da hibridi koji su nastali klasičnim ukrštanjem divljeg srodnika pirinča sa transgenim

pirinčom, i tom prilikom primili transgen za otpornost na herbicide, proizvode daleko veći broj semena, čak i u odsustvu herbicida, u odnosu na one hibride koji su nastali na isti način ali nisu primili transgen [10]. Naravno u pitanju su ciljani eksperimenti, a šta će se stvarno dešavati u prirodi ostaje da se vidi u narednim decenijama.

HT biljke mogu da postanu korovi

Poznat je slučaj 3 GM varijeteta uljane repice u Kanadi koji su bili rezistentni prema različitim herbicidima: glifosatu, glufosinatu i imidazolinonu. Nakon nekoliko sezona sva tri varijeteta uljane repice koji su gajeni na tom polju postali su rezistentni prema svim herbicidima i ponašali su se kao korov prilikom gajenja drugih kultura na istim površinama [11]. Rešenje ovog problema jeste odvojeno gajenje useva, rotacija useva, kao i primena herbicida kao što je 2,4-D, koji se inače primenjuje u tretmanu prirodno rezistentnih korova čije smo postojanje već spomenuli. Takođe, rešenje problema mogu da budu i inženjerisane biljke koje same proizvode herbicide imitirajući prirodne alelopatske efekte kod biljaka, što je zadatak nekih budućih istraživanja [12, 13].

Negativan uticaj GM useva na biodiverzitet

Potencijalni negativan uticaj GM biljaka na biodiverzitet mogao bi da se ostvari na više načina. Jedan od načina jeste prenos gena sa GM biljaka na divlje srodnike, što bi dovelo do promene njihovih osobina i do promene njihove dosadašnje uloge u životnoj sredini. No, kao što je već rečeno, zbog nedostatka selektivnog pritiska, divlji srodnici bi najverovatnije izgubili dobijeni transgen, pa bi tako nestala i potencijalna opasnost od promena. U poslednje vreme pitanje vezano za ovaj problem menja se u pitanje da li prenos gena sa GM biljaka na divlje srodnike uopšte predstavlja opasnost.

Drugi način jeste uticaj ove nove strategije za kontrolu korova na broj nekultivisanih biljaka u poljima. Prisustvo korova, odnosno njegovog semena bitno je za očuvanje populacije insekata i ptica na poljima, naročito u proleće i jesen. Projekti koji se bave ovim problemom rađeni su u nekoliko evropskih zemalja, između ostalih i u Velikoj Britaniji i njihovi rezultati ukazali su na raznovrsnost promena uzrokovanih gajenjem HT useva [2]. Neki od projekata našli su smanjenje broja korova u usevima i oko njih, pa samim tim i smanjenje broja insekata, neki nisu detektovali nikakve promene, a negde su promene bile pozitivne. Promene su uglavnom bile posledica vrste i načina primene novih herbicida, ali ne i prisustva samih GM biljaka. Najnoviji nalazi ukazuju da, uz pravilnu upotrebu herbicida, GM biljke povećavaju raznovrsnost prirodnih populacija (korova) na poljima useva.

Kao treći problem navodi se gubitak raznovrsnosti kultivara koji nastaje zbog upotrebe samo nekoliko GM kultivara u praksi. No kompanije koje proizvode GM seme najčešće klasičnim metodama ukrštanja dobijaju veći broj kultivara sa istom osobinom, povećavajući na taj način raznovrsnost.

Nasuprot optužbama da su genetički modifikovane biljke potencijalna opasnost za biodiverzitet, treba istaći da daleko veću opasnost po biodiverzitet predstavlja konverzija prirodnih ekosistema u poljoprivredne. Povećana produktivnost ostvarena na površinama na kojima se gaje transgene biljke sprečava dalja iskrčavanja pošumljenih površina, naročito tropskih šuma koje predstavljaju pravo bogatstvo u biodiverzitetu. Poznato je da se trinaest miliona hektara pod ovim šumama izgubi godišnje u zemljama u razvoju zarad dobijanja novih obradivih površina za gajenje većih količina tradicionalnih kultura. Pitanje je da li se želi manja površina sa većom produktivnošću useva i većom površinom na kojoj obitavaju prirodne populacije, ili veća površina sa tradicionalnim kulturama, ali na račun smanjenja biodiverziteta.

U svakom slučaju savršena metoda za kontrolu korova ne postoji i rešenje je u kombinaciji postojećih metoda bez isključivog negativnog stava prema pojedinačnim metodama. Nove generacije transgenih biljaka upravo se dobijaju klasičnom selekcijom, uključujući transgene donore. Razvoj novih metoda koje omogućavaju precizno editovanje genoma i gena, kao što je CRISPR/Cas9 tehnologija, još je jedan pravac u rešavanju problema koji se pripisuju genetički modificovanim HT biljkama.

6.2. Otpornost prema insektima

Živeći u zajednici najmanje sto miliona godina, između biljaka i insekata evoluirali su brojni i različiti tipovi međuodnosa. Neki od njih korisni su za oba partnera – sakupljajući polen, insekti unakrsno oprašuju biljke; neki su korisni samo za biljke – biljke karnivore zarobljavajući insekte u specijalizovanim organima obezbeđuju dodatni azot i fosfor u uslovima smanjene dostupnosti ovih elemenata. No biljke su najčešće napadnute od herbivornih insekata. Mehanizmi odbrane od herbivora evoluirali su milionima godina i zbog toga su zajednički za većinu biljnih familija. Poznavanje prirodnih mehanizama odbrane biljaka neophodno je radi razvijanja efikasnih metoda u borbi protiv štetnih vrsta insekata. Iako se dobro zna da su različiti sekundarni metaboliti koje biljke proizvode toksični za insekte, njihov biosintetski put malo je poznat ili suviše kompleksan da bi se koristio za dobijanje biljaka otpornih prema insektima. Danas su glavno oružje u borbi protiv štetočina sintetički ili prirodni insekticidi, koji deluju na nivou endokrinog, nervnog, skeletnog ili digestivnog sistema insekata. Uprkos velikim količinama primenjenih insekticida, značajni su ekonomski gubici, kao i gubici povezani s narušavanjem životne sredine. Zato se interesovanje naučne javnosti okreće ka genima čiji produkti deluju na nivou digestivnog sistema insekata i koji se unose u biljke u cilju povećanja njihove otpornosti, tzv. eng.: „insect-resistance transgenes“. Prvi akademski članci koji govo-

re o transgenim biljkama otpornim prema insektima publikovani su 1987. godine, a prve transgene biljke otporne prema insektima komercijalizovane su 1995. godine. Bile su to biljke krompira sa *cry3A* genom iz bakterije *Bacillus thuringiensis* koje su komercijalizovane pod imenom „New Leaf“.

Do danas su mnoge biljke transformisane genima za toksine poreklom iz bakterije *Bacillus*, inhibitore proteinaza i amilaza, lektine, hitinaze, peroksidaze itd. Od svih ovih gena kao najefikasniji pokazali su se *cry* geni poreklom iz bakterije *Bacillus thuringiensis*, pa su biljke koje ekspimiraju ove gene za sada i jedine komercijalizovane biljke. Zato će i ovo poglavlje koje se odnosi na transgene biljke otporne prema insektima uglavnom biti posvećeno tzv. **Bt** (*Bacillus thuringiensis*) biljkama.

6.2.1. Kontrola insekata štetočina konvencionalnim metodama

6.2.1.1. Hemijska kontrola

Hemijska kontrola podrazumeva upotrebu agrohemijskih jedinjenja poznatih kao sintetički insekticidi. Upotreba insekticida, naročito Di-Di-Ti-ja, u kontroli insekata imala je veliki uspeh tokom 60-tih godina 20. veka, u periodu poznatom kao „zeleno revolucija“. Vrlo brzo, međutim, pokazali su se i negativni efekti njihovog dejstva, kako na okolinu tako i na ljudsko zdravlje. DDT je povučen iz upotrebe, a njegovo mesto zauzeli su drugi manje štetni insekticidi koji se brže razgrađuju. Danas je upotreba agrohemikalija pod strogom kontrolom i bazirana je na naučnim činjenicama. Problemi povezani s upotrebom insekticida, međutim, i dalje su prisutni. Zadržavanje ostataka insekticida u hrani, pojava rezistencije kod insekata štetočina i negativni efekti insekticida na korisne insekte predstavljaju probleme koje je teško rešiti. Bolje poznavanje fiziologije i ponašanja insekata moglo bi da dovede do stvaranja nove generacije insekticida koji bi delovali na nivou hormona i sprečavali normalan razvojni put insekata.

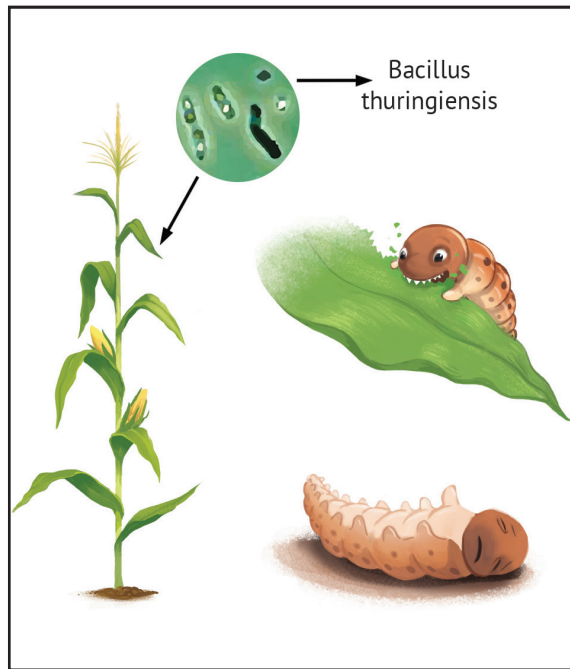
6.2.1.2. Biološka kontrola

Biološkom kontrolom obuhvaćeni su biološki procesi i prirodne supstance koje omogućavaju kontrolu insekata štetočina uz minimalne troškove i s minimalnim uticajem na životnu sredinu. Biološka kontrola podrazumeva, pre svega, upotrebu korisnih insekata, kao što su bubamare koje se hrane insektima štetočinama. Upotreba prirodnih insekticida poreklom iz biljaka (piretrin iz duvana), kao i iz mikroorganizama kao što su bakterije, entomopatogene gljive i nematode, takođe spadaju u domen biološke kontrole. Najpoznatiji biološki insekticid jeste kristalni protein poreklom iz bakterije *Bacillus thuringiensis*.

***Bacillus thuringiensis* i prirodni insekticid**

Bacillus thuringiensis je gram-pozitivna bakterija koja živi na različitim mestima kao što su semenska prašina, zemlja i površina biljaka. Ova bakterija je prvi put otkrivena 1902. godine u Japanu u uzgajalištu svilenih buba. Ponovo je iz populacije brašnenog moljca 1911. godine izolovana i okarakterisana od Ernsta Berlinera u Nemačkoj. *Bacillus thuringiensis* razlikuje se od srodnih *Bacillus* vrsta zbog prisustva parasporalnih kristala koji se formiraju tokom sporulacije i koji imaju insekticidno svojstvo. Parasporalni kristali sastoje se od jednog ili više kristalnih proteina (Cry) odnosno δ -endotoksina, veličine oko 130 kDa. Kada se spore ili kristali nađu u digestivnom traktu insekata, alkalna sredina creva insekata dovodi do rastvaranja kristala, i oslobađanja protoksina. Protoksini se pod dejstvom crevnih proteaza prevode u aktivni toksin-protein veličine 65-70 kDa. Toksin se vezuje za specifične receptore na membrani epitelijalnih crevnih ćelija insekata, inkorporira se u membranu i, stvarajući pore, remeti elektronski, K^+ i pH gradijent što dovodi do smrti ćelija, samim tim i do smrti insekta (**Slika 6.5**).

Mada rastvorljivost kristala, kao i aktivnost proteaza, igraju značajnu ulogu, interakcija između toksina i receptora određuje specifičnost dejstva koje karakteriše Bt tok-sine. Protein je aktivan samo kod jedne ili eventualno nekoliko vrsta insekata. Do danas je otkri-veno oko 130 *cry* gena koji kodiraju δ -endotoksine. Oni su prema struktur-noj homologiji proteina, kao i prema specifičnosti



Slika 6.5. Bt toksini izazivaju smrt insekata

za domaćina, klasifikovani u različite subfamilije. Cry1 toksin aktivan je protiv Lepidoptera (leptiri), Cry2 kod Diptera (dvokrilci), dok je Cry3 aktivan protiv Coleoptera (tvrdokrilci). Postoje *Bt* sojevi koji su aktivni i protiv drugih familija insekata, kao i protiv nematoda, pljosnatih crva i protozoa. Ima, međutim, i nekoliko značajnih insekata štetočina, kao što su vaši i bele mušice, koje su neosetljive na do sada poznate kristalne proteine. Bt toksini nisu štetni za ljude, sisare i druge životinje, jer oni na površini creva nemaju receptore za Bt toksine. To je bila i glavna prednost pri korišćenju Bt spora i kristalne mešavine kao bioinsekticida (tzv. Bt sprej). No zbog velike specifičnosti toksina, njihove nestabilnosti usled dejstva UV zraka, kao i nemogućnosti da toksini prodru u unutrašnjost biljnih tkiva (npr. srž stabla kukuruza) i dođu u dodir sa insektima koji se tu nalaze, primena bioinsekticida bila je ograničena i iznosila je samo dva odsto od ukupne potrošnje insekticida.

6.2.1.3. Kombinovana kontrola

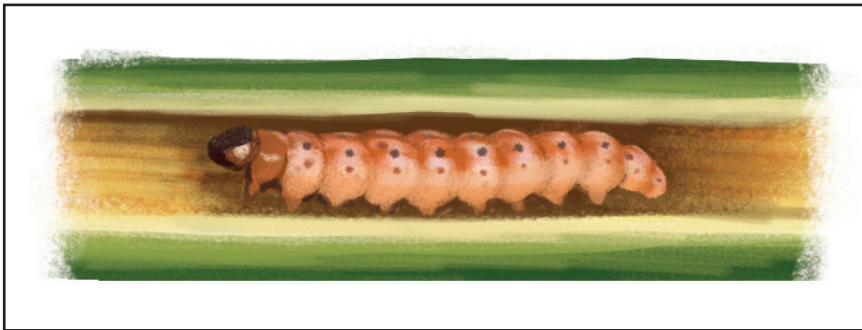
Ovaj vid kontrole insekata u poljoprivredi poznat je kao **IPM** (eng.: „Integrated Pest Management“). U SAD je u upotrebi od 70-tih godina 20. veka. U pitanju je ekološki pristup koji akcenat stavlja na kontrolu broja, a ne na istrebljenje insekata. Ukoliko bi skoro svi insekti bili ubijeni, preostala bi samo populacija insekata rezistentnih na insekticide koja bi činila genetičku osnovu budućih još rezistentnijih populacija. Kombinovani pristup obuhvata nekoliko nivoa. Prvi nivo se odnosi na sprečavanje zaraze selekcijom varijeteta koji su pogodni za lokalne uslove, kao i održavanje zdravih useva uklanjanjem zaraženih biljaka. Drugi nivo se odnosi na otkrivanje i identifikaciju insekata i praćenje nivoa zaraze. Ukoliko nivo zaraze prelazi dozvoljeni nivo, pristupa se prvo mehaničkoj kontroli koja uključuje ručno uklanjanje insekata, postavljanje zamki i mreža, pa i preoravanje. Sledeći nivo je biološka kontrola. Biološka kontrola je takođe ekološki bezbedna. Ona se zasniva na upotrebi predatora (korisni insekti koji se hrane insektima štetočinama) i upotrebi bioinsekticida poreklom iz mikroorganizama (*Bacillus thuringiensis*), entomopatogenih gljiva i nematoda. Hemijski insekticidi, kao poslednji nivo zaštite, koriste se samo ako je to neophodno i njihova upotreba je često ograničena na određeni period životnog ciklusa insekata. Mnogi noviji insekticidi biljnog su porekla (nikotin, piretrum) ili nekog drugog prirodnog porekla (npr. analozi juvenilnog hormona insekata). Prirodni mehanizam odbrane biljaka od insekata takođe se može uključiti u IPM kontrolu.

6.2.2. GM biljke otporne prema insektima – alternativni vid kontrole

Prirodni mehanizmi odbrane biljaka prema insektima poslužili su kao ideja za razvoj *in planta* rezistencije tj. otpornosti same biljke. Jedna od prvih strategija bila je ekspresija *Bt* gena u pojedinim delovima biljke ili celim biljkama, koja se koristi za kontrolu larvi Lepidoptera. Pored ovog postoje i drugi, manje efikasni, ali obećavajući pristupi kao što su inhibitori proteaza [14, 15, 16, 17, 18, 19, 20], lektini [21] i drugi insekticidni geni.

6.2.2.1. Bt transgene biljke

Dobijanje transgenih biljaka u kojima bi se eksprimirali *Bt* geni koji kodiraju toksine, rešavalo je problem nestabilnosti *Bt* bioinsekticida usled dejstva UV zraka, kao i problem nedostupnosti insekata koji se nalaze u unutrašnjosti biljaka (**Slika 6.6**).



Slika 6.6. Kukuruzni plamenac (*Ostrinia nubilalis*) u stabljici kukuruza

Takođe, kod transgenih biljaka toksin je u prilici da deluje na ranim stupnjevima razvicia insekata (npr. na stupnju larve), koji su sami po sebi osetljiviji i ceo sistem je daleko bezbedniji po okolinu pošto se toksični produkt nalazi unutar biljke. Problem uske specifičnosti pojedinačnih toksina mogao bi, takođe, biti rešen unošenjem više različitih gena u *Bt* biljke.

Prve transgene biljke koje nose *Bt* gene bile su duvan i paradajz, dobijene 1987. godine [22, 23, 24]. One su nosile deo gena (eng.: „truncated gene“) iz *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk), koji je specifičan za lepidoptere, i čiji je proizvod bio odmah aktivan. Dobijene transgene biljke na polju su pokazivale izvestan stepen otpornosti prema insektu predatoru (stepen oštećenja ploda paradajza bio je smanjen), za razliku od biljaka sa celim genom koje nisu pokazivale nikakvu otpornost. Ekspresija proteina bila je, međutim, veoma niska (0,001% ili nekoliko ng/mg ukupnih proteina) i nedovoljna za efikasniju zaštitu od insekata na polju. Uzrok niske ekspresije bio je neodgovarajući nukleotidni sastav gena. *Bt* geni kao i drugi bakterijski geni imaju veliku zastupljenost A/T nukleotida (60-70%), za razliku od biljnih gena (40-50%). Regioni bogati A/T nukleotidima mogu da sadrže terminaciona mesta transkripcije (poliadenilatne nizove), skrivena mesta spajanja iRNK i motive koji destabilišu iRNK (ATTTA). Zbog toga je izmenjen nukleotidni sastav gena tako da ne utiče na aminokiselinski sastav i dobijena je povećana ekspresija proteina najpre 10, zatim 100 i na kraju 500 puta u odnosu na neizmenjeni gen (0,2-0,3% ukupno rastvorljivih proteina) [25]. Konstruisano je nekoliko delimično, ili kompletno sintetičkih gena. Većina njih kodira proteine koji su aktivni protiv Lepidoptera [*cry1A(a)*, *cry1A(b)*, *cry1A(c)*, *cry1C*], dok drugi geni, npr. *cry3A*, kodiraju proteine aktivne protiv Coleoptera kao što je krompirova buba zlatica (*Leptinotarsa decemlineata*) [26]. *Cry1A(b)* gen je dodatno izmenjen da bi se omogućila transformacija cerealijskih i dobijanje transgene linije kukuruza otporne prema kukuruznom plamencu (*Ostrinia nubilalis*) [27]. Pored krompira i kukuruza (**Tabela 6.3**) komercijalizovane su i *Bt* biljke pamuka [28, 29] sa agronomski značajnim nivoom rezistencije prema *Helicoverpa armigera* (pamukova sovica). Osim njih još samo *Bt* brokoli, kupus i lucerka imaju ostvareni nivo ekspresije toksina dovoljan da izazove veliku smrtnost insekata u polju.

U većini slučajeva kodirajuće sekvence Bt toksina vezane su uz konstitutivni promotor CaMV 35S i njegove derivate. Osim konstitutivnog promotora korišćeni su i tkivno-specifični promotori, kao što je promotor iz kukuruza koji se eksprimira u tkivu koje vrši fotosintezu, kao i promotor koji je aktivan u polenu kukuruza [27], promotori koji su aktivirani povredom [24], hemijskim signalima [30], kao i neki drugi promotori.

Izuzetno visok nivo ekspresije Bt proteina (3-5% ukupno rastvorljivih proteina u listovima) postignut je kod biljaka duvana u čije je hloroplaste homolognom rekombinacijom ubačen nativni, nemodifikovani gen *cry1Ac* iz *B. thurigiensis* [31]. Pošto je transkripciona i translaciona mašinerija kod plastida slična onoj kod bakterija, onda nije bila neophodna nikakva izmena gena radi dobijanja funkcionalnog produkta. Ovako visok nivo ekspresije toksina omogućio je biljkama duvana otpornost i prema insektima koji su inače pokazivali rezistentnost prema Cry1Ac toksinu.

Tabela 6.3. Komercijalizovane Bt biljke.*

Biljna vrsta	Komercijalni naziv	Gen	Ciljani insekt	Uzgajivači
kukuruz	YieldGard (MON810) Monsanto	<i>cry1Ab</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i> (kukuruzni plamenac)	SAD, Južna Afrika, EU i još 6 zemalja
	YieldGardPlus (MON810xMON863) Monsanto	<i>cry1Ab</i> / <i>cry3Bb1</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i> Diabrotica sp.	Japan
	Star Link (Aventis)	<i>cry9C</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i>	SAD

Biljna vrsta	Komercijalni naziv	Gen	Ciljani insekt	Uzgajivači
pamuk	Bollgard (Monsanto)	<i>cry1Ac</i>	<i>Helicoverpa armigera</i> (pamukova sovica)	Indija
	BollgardII (Monsanto)	<i>cry1Ac / cry2Ab</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>	Indija
	WideStrike (Dow AgroSciences)	<i>cry1Ac / cry1Fa</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>	SAD, Brazil
	WideStrike3 (Dow AgroSciences)	<i>cry1Ac / cry1Fa / Vip3A</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>	SAD

*Kompletan spisak Bt biljaka dostupan je na sajtu: <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/commercialtrait/default.asp?TraitTypeID=2&Trait=Insect%20Resistance>

6.2.2.2. Alternativni insekticidni geni

Prva generacija transgenih Bt biljaka pamuka i kukuruza otpornih prema insektima uveliko se i uspešno gaji na poljima Indije, Kine, Amerike, Australije, i mnogih drugih zemalja (**Tabela 6.3**). Ostaje, međutim, nekoliko značajnih štetočina koje su tolerantne prema dosadašnjim Bt toksinima. Zato se ubrzano traga za novim Bt proteinima, kao i za alternativnim genima čiji produkti imaju insekticidnu aktivnost, kao što su inhibitori proteinaza, inhibitori α -amilaze, inhibitori lipaza, lektini, hitinaze, holesterol oksidaze, TcdA toksin (subjedinica A) bakterije *Photobacterium* i vegetativni insekticidni protein bakterije *Bacillus* (**VIPs**) [32]. U budućnosti ovi proteini mogu da budu komplementarni sa Bt toksinima ili da ih potpuno zamene. Za sada još nisu dostigli efikasnost koje Bt biljke imaju u suzbijanju insekata štetočina.

6.2.3. Dobrobit od upotrebe Bt biljaka

Prednost Bt biljaka ogleda se u velikoj efikasnosti u suzbijanju štetnih insekata koja je približna efikasnosti hemijskih insekticida. Kao ilustracija može da posluži podatak da je na Bt pamuku zabeleženo 90% smrtnosti larvi različitih insekata. S druge strane, Bt biljke su bezopasne za ljude, korisne insekte i druge neciljane organizme, jer su Cry proteini koje ekspimiraju visokospecifični proteini [33].

Zahvaljujući upotrebi Bt kukuruza od 1996. do 2018. godine ostvaren je profit od 59,6 milijardi američkih dolara, dok je još veći profit (63,6 milijardi dolara) ostvaren korišćenjem Bt pamuka [34]. Ovaj profit posledica je povećanog prinosa (44%), kao i smanjenja ukupnih troškova proizvodnje (56%) uključujući smanjenu potrošnju insekticida. Eksperimentalni rezultati gajenja Bt pirinča ukazuju na povećanje prinosa do 8%, smanjenje upotrebe insekticida do 80% (17 kg/ha) i prihod od četiri milijarde dolara godišnje, što za posledicu ima smanjenje smrtnosti u zemljama u kojima je pirinač osnovna namirnica.

Da bi se bolje sagledao doprinos Bt biljaka, neophodno je izneti i podatak da povećanje prinosa od 140 miliona tona kukuruza zahteva dodatna 43 miliona hektara novih obradivih površina, koje bi se dobile na račun krčenja prirodnih zajednica. To znači da upotreba Bt biljaka značajno doprinosi očuvanju biodiverziteta. Pozitivan uticaj na životnu sredinu ogleda se, pre svega, u smanjenju ukupne količine insekticida koja se nalazi u prirodi (za 15,4%), kao i u smanjenju emisije CO₂ u atmosferu [35]. Količina ugljenika koji je ostao u zemljištu u vidu fosilnog goriva na račun gajenja Bt pamuka u periodu od 1996. godine do danas, ekvivalentna je količini od 45 miliona kilograma CO₂ koji bi bio oslobođen u atmosferu. Kako je opšteprihvaćeno da povećano oslobađanje gasova kao što su CO₂, metan i NO u atmosferu predstavlja veliku opasnost za globalno zagre-

vanje, onda je doprinos Bt biljaka u redukciji ovih gasova od izuzetnog značaja. Sve ovo ukazuje na ogromne prednosti gajenja Bt biljaka, što se i ogleda u površini od 28,8 miliona hektara pod biljkama koje nose *Bt* gene. Treba napomenuti da je Bt kukuruz jedini GM usev koji se gaji u zemljama Evropske unije, a koja je inače generalno protivnik upotrebe GM useva. Dve evropske zemlje, Portugalija i Španija gaje Bt kukuruz na površini od 112.000 hektara.

6.2.4. Rizici vezani za upotrebu Bt biljaka

Jedan od glavnih ekoloških rizika upotrebe transgenih Bt biljaka jeste opasnost koja postoji za predatore i parazite štetnih insekata, tj. za njihove prirodne neprijatelje, kao i za korisne insekte. Bt sprej (bakterijske spore i kristalne mešavine), koji se koristi kao bioinsekticid, nema takve efekte zbog njegove visoke specifičnosti i nepostojanosti. To se ne može automatski primeniti i kod transgenih biljaka pošto je toksin kod njih stabilan i vreme izlaganja je dugo, pa se može očekivati i negativan efekat na ne ciljane insekte. Poznat je slučaj gusenica koje su, hraneći se na transgenom Cry1Ab kukuruzu, uzrokovale povećanje smrtnosti kod larvi svojih predatora [36], ali se ne zna da li je to direktna posledica dejstva toksina usled njegove akumulacije u gusenicama, ili je u pitanju nekvalitetna ishrana predatora. U drugoj studiji ovaj protein eksprimiran u polenu kukuruza nije uticao na insekte predatore [37]. Na osnovu relativno malog broja istraživanja vršenih na polju može se zaključiti da Bt biljke nemaju efekta na populaciju korisnih insekata i da čak uzrokuju povećanje broja insekata koji nisu mete u poređenju sa poljem koje je tretirano insekticidima [38].

Drugi problem je vezan za mogućnost evolucije rezistencije kod ciljnih insekata na Bt toksin usled kontinuiranog izlaganja njegovom dejstvu. Poznato je da se insekti lako adaptiraju i da su razvili rezistenciju

na mnoge hemijske insekticide. U laboratorijskim uslovima potvrđena je pojava rezistencije na prečišćen Bt toksin kod nekoliko vrsta insekata i na nekoliko različitih toksina [39]. Pojava rezistencije na Bt sprej u poljskim uslovima je retka, ali je ipak registrovana [40]. Sve je ukazivalo na to da je pojava rezistencije insekata na Bt biljke samo pitanje vremena. Prvi poznati slučaj rezistencije insekata otkriven je 2009. godine na poljima prve generacije Bt pamuka u Indiji [41], a nešto kasnije i u Kini [42]. Takođe su se i u Americi povremeno pojavljivale rezistentne linije *Ostrinia nubilalis* u uslovima neadekvatnog menadžmenta (usled odsustva površina pod ne-transformisanim kukuruzom u neposrednoj blizini Bt kukuruza, videti odeljak 6.2.5). Prva generacija Bt biljaka sa jednim genom za rezistenciju odmah je zamenjena sledećom koja je nosila više *Bt* gena i tako je problem rezistencije privremeno bio rešen [43, 44].

6.2.5. Strategije za sprečavanje pojave rezistencije

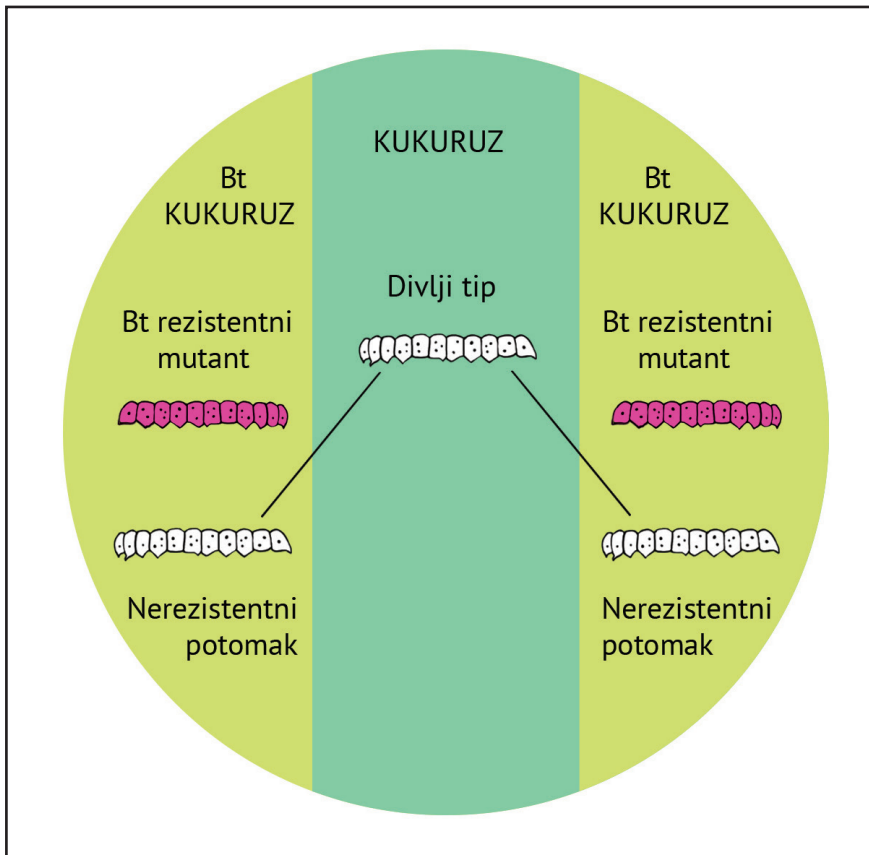
Do pojave rezistencije kod insekata može da dođe iz više razloga: usled modifikacije ili potpunog gubitka receptora u crevu insekata, što vodi ka otpornosti prema toksinima koji se vezuju za isti receptor; usled povećanja proteazne aktivnosti; ili iz nekih drugih razloga. Moguća je pojava i tzv. unakrsne rezistencije (eng.: „cross-resistance“), odnosno rezistencije prema drugim Cry proteinima sa sličnim dejstvom.

Da bi se sprečila ili odložila pojava rezistencije na Bt biljke postulirano je nekoliko strategija koje je za sada teško potvrditi u praksi, ali se zato koriste različiti modeli za simulaciju i predviđanje rezultata [45, 46, 47]. Jedna od strategija jeste upotreba više toksičnih gena sa različitim modulima akcije (dva *cry* gena sa različitim receptorima ili *cry* gen u kombinaciji sa drugim toksičnim genom), tako da je mogućnost unakrsne rezistencije izbegnuta. Ova strategija je poznata kao slaganje gena (eng.: „gene pyramiding“).

Upotreba tkivno-specifičnih ili indukovanih promotora (u ovom slučaju indukovanih povredom prilikom ishrane insektima) omogućava prostorno, odnosno vremensko variranje nivoa toksina. Tako upotreba tkivno-specifičnih promotora smanjuje selektivni pritisak omogućavajući insektima da se nesmetano hrane ekonomski manje značajnim delovima biljke, dok će upotreba inducibilnih promotora omogućiti ekspresiju samo kada je izvestan prag oštećenja pređen i tako smanjiti selektivan pritisak tokom vremena. Odnosno, insekti neće sve vreme biti izloženi negativnom dejstvu toksina, što bi neminovno dovelo do aktiviranja nekog od mehanizama zaštite pa bi jedinke sa tim mehanizmom uskoro postale dominantne u Bt zasadu.

Upotreba vremenskih ili prostornih utočišta smatra se jednom od važnih strategija. Vremensko utočište podrazumeva naizmeničnu rotaciju Bt useva sa netransformisanim biljkama što će usporiti evoluciju rezistencije, posebno ako rezistencija nije stabilna u populaciji insekata. Strategija prostornog utočišta (eng.: „refuge strategy“) podrazumeva da se u polju na kome se gaje Bt biljke, deo toga polja zasadi netransformisanim biljkama. To bi omogućilo Bt-otpornim insektima, koji su preživeli na transgenim biljkama, da se ukrštaju sa još uvek neselektovanim, osetljivim insektima sa netransformisanim biljkama. Na taj način bi se moglo sprečiti povećanje populacije koja je homozigot za recesivni ili semidominantni rezistentni Bt alel (**Slika 6.7**).

Posebno efikasnom entomolozi smatraju upravo strategiju u kojoj su zasadi sa netransformisanim biljkama kombinovani sa transgenim biljkama, kod kojih je nivo ekspresije Bt proteina izuzetno visok – dovoljan da ubije insekte koji su heterozigoti za recesivan ili semidominantan rezistentni alel.



Slika 6.7. Strategija prostornog utočišta

6.2.6. Kontroverze i perspektive

Danas postoji veliki otpor prema GM biljkama, naročito u Evropi. Tome su doprineli brojni razlozi: politički, ekonomski, ali pre svega neznanje i strah. To je dovelo do pojave bezbroj netačnih priča o GM biljkama, koje su označene kao urbani mitovi. Jedan od najpoznatijih je mit o ugroženosti kraljevskog leptira Bt kukuruzom, koji je nastao kao posledica nepravilno postavljenog eksperimenta u laboratorijskim uslovima. Nasuprot tome pokazano je da na poljima sa Bt biljkama čak dolazi do povećanja populacije kraljevskog leptira.

Da bi došlo do komercijalizacije GM biljaka neophodno je sedam do deset godina testiranja. Bt biljke se testiraju daleko više od konvencionalnih varijeteta za koje se pretpostavlja da su sigurni. Jedna Bt soja prolazi kroz 1800 različitih analiza pre komercijalizacije. Dvadeset tri nezavisne analize ishrane stoke pokazale su da su Bt soja i kukuruz ekvivalentni u sastavu, svarljivosti i hranljivoj vrednosti sa svojim netransformisanim parnjacima. Pokazana je, takođe, identičnost GM biljaka sa roditeljskim biljkama preko molekularne karakterizacije (17 analiza), toksikoloških studija (5), marker gena (4), nutritivnog sadržaja (7), alergenskog potencijala, antinutritivnog efekta, proteinske svarljivosti. Uticaj na okolinu kao i ekološki aspekt takođe se testiraju (OECD, CBD, CODEX). Analize transkripata i metabolita kod pšenice i krompira pokazale su veće variranje između konvencionalnih kultivara, čak i među istim kultivarima na različitim lokacijama, nego između GM biljaka i njihovih roditeljskih varijeteta [48].

Perspektive

Poznato je da mirisi predstavljaju glavne atraktante kod insekata. Novija istraživanja identifikovala su delove kontrolne DNK koja učestvuje u uključivanju i isključivanju određenih gena voćne mušice koji joj omogućavaju da razlikuje mirise [49]. Prateći „nos“ voćne mušice, naučnici su na tragu supstance koja bi biljkama i ljudima omogućila da budu „nevidljivi“ za insekte i tako ih zaštitila od njihovog napada.

6.3. Otpornost prema virusima

Pored korova i insekata, virusi predstavljaju još jedan prirodni činilac koji može da izazove velike gubitke u poljoprivredi. Oni izazivaju bolesti kod brojnih ekonomski značajnih biljnih vrsta. Širenje virusa je veoma teško kontrolisati. Kada jednom dođe do infekcije, ne postoji odgovarajući hemijski tretman koji bi sprečio njihovo dalje razmnožavanje. Gubici su ve-

oma veliki i zahtevaju duži period rotiranja useva što dovodi do još većih gubitaka. Virusni se često prenose sa biljke na biljku pomoću insekata. Zato se insekticidi ponekad koriste za kontrolu virusa, ali uspeh je vrlo ograničen. Najefikasniji način kontrole virusa jeste uklanjanje bolesnih biljaka, kao i upotreba rezistentnih varijeteta dobijenih klasičnom selekcijom. Kod mnogih gajenih vrsta, međutim, rezistentni varijeteti ne postoje. Savremena biotehnologija je omogućila dobijanje GM biljaka otpornih na viruse unošenjem najpre viralnih gena u genom biljaka. Prve komercijalizovane genetički modifikovane biljke otporne na viruse, a to su papaja i bundeva, imaju unete gene za proteine omotača virusa. Drugi potencijalni način za odbranu od virusa bio bi prenos gena za prirodnu rezistenciju, nađenog u jednoj biljci, u druge, komercijalno važne biljke, kao i sprečavanje reprodukcije virusa i njegovo širenje unošenjem gena koji kodiraju proteine uključene u replikaciju viralnog genoma.

6.3.1. Građa i replikacija virusa

Virusi su infektivne, submikroskopske strukture koje nemaju ćelijsku građu i kao takve koriste žive ćelije za svoje umnožavanje, izazivajući pri tome vrlo često oštećenja kod ćelije-domaćina. Intaktan ćelijski zid nepremostiva je prepreka za viruse, tako da oni sami ne mogu da prođu kroz neoštećeni ćelijski zid biljne ćelije. Virus, odnosno virusna partikula koju čini nukleinska kiselina umotana u proteinski omotač, prodire u ćeliju na mestu povrede, koja je najčešće izazvana delovanjem insekata, nematoda ili gljiva, glavnih prenosilaca virusa. Nakon ulaska u ćeliju dolazi do oslobađanja genoma iz proteinskog omotača. Najveći broj biljnih virusa poseduje +RNK genom, koji se sastoji od jednolančane RNK pozitivne orijentacije, što znači da može da funkcioniše direktno kao informaciona RNK, tj. kao matrica za sintezu proteina, za razliku od malog broja virusa koji imaju negativno orijentisanu RNK, koja mora prvo da se prevede u iRNK da bi bila funkcio-

nalna. Pored ovih virusa postoje i virusi sa dvolančanom RNK, kao i DNK virusi sa jednolančanom ili dvolančanom DNK. RNK ili DNK molekul poseduje genetičku informaciju za sintezu malog broja proteina, od kojih su najvažniji enzim replikaza, protein za kretanje i protein omotača. Replikaza omogućava umnožavanje molekula nukleinske kiseline. Na primer, kod +RNK virusa se najpre na +RNK lancu sintetiše –RNK lanac koji dalje služi za sintezu mnogih novih +RNK molekula. Ovi molekuli mogu da se šire među ćelijama prolazeći kroz plazmodezme koje su modificovane od proteina za kretanje ili kroz floemske sprovodne snopiće. Ulazeći u novu ćeliju ceo proces umnožavanja kreće iz početka i tako nastaje veliki broj virusnih partikula. Na kraju se virusna RNK ili DNK obavija proteinima omotača, tzv. proces enkapsidacije, formirajući kompletnu virusnu partikulu čime se završava razvojni ciklus (reprodukcija) virusa.

Vrlo često su virusi prisutni u ćelijama biljaka bez vidljivih simptoma, tako da ih ljudi, i ne znajući, unose u svoj organizam preko hrane. Do sada, međutim, nije registrovano nijedno oboljenje čoveka ili domaćih životinja izazvano biljnim virusima [50] što pruža značajnu prednost u prihvatanju transgenih biljaka koje nose gene poreklom iz biljnih virusa u odnosu na druge vrste GM biljaka.

Tipični simptomi virusnih infekcija kod biljaka jesu usporeni rast, žute mrlje ili šare u obliku mozaika na listovima, kovrdžanje listova, venjenje i slično. Ovi su simptomi najčešće lokalizovani. Njihovo dalje širenje moguće je sprečiti uništavanjem zaražene biljke. No kako su glavni prenosioci virusa insekti, kao što su mušice ili skakavci, onda je moguća zaraza epidemioloških razmera koja dovodi do uništavanja kompletnih zasada i do velikih ekonomskih gubitaka. Da bi se predupredili ovako veliki gubici, tokom vremena razvijeni su različiti vidovi borbe protiv virusa.

6.3.2. Konvencionalne metode u borbi protiv virusa

6.3.2.1. Kontrola prenosilaca virusa

Već smo videli da se virusi prenose sa biljke na biljku mehanički ili uz pomoć prenosilaca. Povređujući biljku, prenosioци omogućavaju virusima ulaz u biljnu ćeliju, koji je inače sprečen ćelijskim zidom. Prenosioци virusa najčešće su različiti insekti, ali to mogu biti i gljive i nematode. Jedna od konvencionalnih metoda borbe protiv prenosilaca jeste upotreba insekticida i fungicida. Svi nedostaci koji prate upotrebu pesticida, a to su potencijalni rizici po ljudsko zdravlje i po okolinu, važe i u ovom slučaju. Takođe, ukoliko je virusna infekcija uzela maha (radi se o endogenoj infekciji), nikakva hemijska kontrola nije od pomoći.

6.3.2.2. Kultura meristema

Za razliku od drugih biljnih tkiva koja mogu biti inficirana jednom ili većim brojem vrsta virusa, meristemska tkiva u biljci ostaju najčešće nezaražena. Šta je uzrok ovog fenomena, još uvek se pouzdano ne zna, ali zahvaljujući ovoj pojavi razvijena je *in vitro* tehnika poznata pod nazivom „kultura meristema“ koja omogućava regeneraciju biljaka iz nezaraženog, meristenskog tkiva i dobijanje bezvirusnih biljaka (eng.: „virus-free plants“) [51]. Za dobijanje bezvirusnih biljaka koristi se i termoterapija (produženo izlaganje biljaka visokim temperaturama, i do 90 °C, praćeno kulturom meristema), krioterapija (produženo izlaganje niskim temperaturama, -196 °C), kao i hemoterapija (primena antiviralnih hemikalija kao što je npr. ribavirin). Naravno, u uslovima spoljašnje sredine i ove bezvirusne biljke postaju podložne infekciji.

6.3.2.3. Selekcija otpornih vrsta

Jedan od glavnih načina borbe protiv virusnih infekcija je, pored uklanjanja zaraženih biljaka, selekcija otpornih biljnih vrsta. Rezistencija se kod ovih biljnih vrsta manifestuje odsustvom infekcije ili hipersenzitivnom reakcijom u delovima u kojima je došlo do infekcije, i posledica je prisustva gena koji vodi poreklo najčešće od divljih srodnika. Nedostatak metode klasične selekcije jeste što je ukrštanje sa divljim srodnicima moguće samo kod određenih biljnih vrsta, kao i to što je dobijanje čistih linija bez neželjenih sekvenci, koje se dobijaju zajedno sa željenim genom tokom ukrštanja, dugotrajan (po desetak godina) i zahtevan proces. A povrh svega, selektovane rezistentne linije posle nekog vremena postaju podložne novim virusima.

6.3.2.4. Unakrsna zaštita

Unakrsna zaštita (eng.: „cross-protection“) jeste pojava da biljke nakon infekcije slabim virusima razvijaju značajnu otpornost prema agresivnim virusima, nešto slično kao kod vakcinacije ljudi i životinja. Kako biljke nemaju pravi imunski sistem, ova pojava se objašnjava na više načina. Jedan od mogućih mehanizama jeste da nukleinske kiseline infektivnog virusa budu inkapsulirane proteinskim omotačem prethodnog, slaboinfektivnog virusa i da se tako smanjuje njihova invazivnost. Drugo objašnjenje povezano je sa pojavom poznatom kao utišavanje gena. Radi se o sprečavanju transkripcije gena virusa od strane biljaka. U pitanju je prirodni antivirni mehanizam biljaka, koje uz pomoć jedne vrste malih RNK molekula, **siRNK**, onesposobljavaju virusne RNK (videti Poglavlje 3). Problemi koji prate unakrsnu zaštitu vezani su za mogućnost mutiranja umereno-infektivnih virusa u agresivne viruse. Takođe, virus koji se koristi kao umereni za imunizaciju jedne biljne vrste, može da predstavlja potencijalnu opasnost za neke druge biljne vrste.

6.3.3. GM biljke otporne na viruse

GM biljke otporne na viruse donose rešenje za probleme koji prate unakrsnu zaštitu. Prisustvo samo jednog gena, a ne i celog virusa, bilo je dovoljno da dovede do rezistencije. Prve GM biljke otporne na viruse dobijene su 1986. godine. Američki istraživački tim na čelu sa Rogerom Beachyjem dobio je biljke duvana i paradajza otporne na mozaični virus duvana (virus koji izaziva mozaične šare na listovima ovih biljaka), ugrađujući im gen za protein omotača tog istog virusa [52]. Biljke duvana testirane su u poljskim uslovima i tehnologija koja se zasniva na upotrebi gena za protein omotača virusa ubrzo je komercijalizovana. Osim ove tehnologije razvijene su i neke druge tehnologije. Reč je o upotrebi nekoliko viralnih DNK i RNK sekvenci, kao što je gen za replikazu.

Koncept na kome se zasniva ovaj tip rezistencije kod transgenih biljaka poznat je kao rezistencija izvedena od patogena (eng.: „Pathogen-Derived Resistance-PDR“). Koristi se sekvenca patogena da bi se zaštitio domaćin od efekta samog patogena. U slučaju virusa, geni poreklom iz virusa obezbeđuju otpornost biljaka na dati virus. Tačan mehanizam rezistencije izvedene od patogena u početku nije bio poznat, ali je potvrđeno da je koncept efikasan za mnoge vrste virusa i kod velikog broja različitih biljaka. Rezultati akumulirani u poslednjih 30 godina pokazali su da se rezistencija dobijena prilikom unosa viralnih gena kod transgenih biljaka ostvaruje preko dva mehanizma. Jedan od mehanizama bazira se na delovanju prirodnih ili defektnih viralnih proteina tzv. rezistencija indukovana proteinima, dok se drugi ostvaruje na nivou utišavanja ekspresije gena preko RNK interferencije – rezistencija indukovana pomoću RNK. Prilikom virusne infekcije, viralni gen, komplementaran onom koji se nalazi u transgenoj biljci, biva prepoznat i utišan od malih regulatornih RNK domaćina. Male regulatorne RNK nastaju od dvolančanih RNK

molekula prepisanih sa samog transgena i deo su ćelijskog sistema za detekciju i degradaciju komplementarnih RNK sekvenci. Poznato je da se transgeni vrlo često inkorporiraju u DNK domaćina kao multiple kopije u suprotnoj orijentaciji. Transkripcija ovakvih kompleksa vodi nastanku RNK molekula koji mogu da imaju dvolančanu strukturu. Od njih nastaju male regulatorne RNK, koje usmeravaju RISC kompleks ka komplementarnoj sekvenci u ciljnoj RNK virusa i ciljnu RNK degraduju ili sprečavaju translaciju (videti Poglavlje 3).

Otpornost zasnovana na upotrebi gena za protein omotača virusa u većini slučajeva u osnovi ima mehanizam rezistencije indukovane pomoću RNK i to mehanizam posttranskripcionog utišavanja gena. Retki su slučajevi koji se zasnivaju na delovanju viralnih proteina. Jedan od takvih primera jesu transgene biljke duvana u koje je unet gen za protein omotača mozaičnog virusa duvana. Rezistencija kod transgenog duvana bila je posledica sprečavanja virusa da se u ćeliji-domaćinu oslobodi svog proteinskog omotača i tako započne proces transkripcije i replikacije, odnosno umnožavanja. Unošenje samo nukleinske kiseline virusa dovodilo je do prevazilaženja rezistencije, što je u potpunoj suprotnosti sa onim što se dešava u slučaju kad je rezistencija indukovana pomoću RNK. Što se tiče gena za replikaze, ostvarena rezistencija uglavnom se pripisuje mehanizmu posttranskripcionog utišavanja gena, mada se pretpostavlja da postoje i slučajevi gde je prisustvo viralnih proteina neophodno za ostvarivanje rezistencije.

Osim rezistencije izvedene od patogena, upotreba tzv. *plantibody* tehnologije takođe je obećavajuća za dobijanje GM biljaka otpornih na viruse. Kao što je već rečeno, biljke nemaju imunski sistem, ali se ekspresija gena poreklom iz miša, koji je odgovoran za sintezu antitela na odgovarajuće viruse, pokazala efikasnom u biljnim ćelijama ukazujući na mogućnost pravljenja veštačkog imunskog sistema.

6.3.4. Perspektiva odbrane od virusa

Imajući u vidu izraženu zabrinutost javnog mnjenja zbog prisustva bakterijskih ili viralnih gena u GM biljkama, unos gena biljnog porekla koji omogućavaju rezistenciju na viruse kod otpornih linija bilo bi idealno rešenje u borbi sa virusima. Nedavno su u ćelijama arabidopsisa otkrivena dva gena biljnog porekla uključena u proces replikacije mozaičnog virusa karfiola. Pokazano je da ukoliko se jedan od njih isključi, virusi ne mogu da se replikuju i infekcija izostaje. Ključno je pitanje na koji način blokiranje funkcije jednog biljnog proteina dovodi do inhibicije replikacije i transkripcije virusa. Odgovor na to pitanje mogao bi da doprinese razvoju nove tehnologije u borbi protiv virusa.

Drugi primer jeste otkriće proteina HDA6 od strane japanskih naučnika, koji, vršeći modifikaciju histonskih proteina arabidopsisa zajedno sa MET1 proteinom koji reguliše metilaciju DNK, učestvuje u odbrani DNK molekula od štetnih transpozonskih elemenata [53]. Razjašnjavanje ovih interakcija dalo bi značajan doprinos odbrani od virusa kako kod biljaka tako i kod ljudi [54].

Otkriće piknona, malih gena koji se nalaze u tzv. „junk“ DNK (DNK van kodirajućih regiona) i čije sekvence i veličina odgovaraju malim RNK molekulima koji regulišu ekspresiju preko mehanizma poznatog kao utišavanje gena, takođe bi mogli da posluže u regulaciji invazije virusa [55].

Još jedan gen je potencijalni kandidat za dobijanje transgenih biljaka sa visokim nivoom rezistencije na viruse. Nakon lokalne infekcije patogenima, *NPR1* gen (eng.: „Nonexpressor of Pathogen Related genes“) uz pomoć salicilne kiseline aktivira se, i njegov proizvod iz citoplazme prelazi u jedro gde aktivira odbrambene gene koji omogućavaju odbranu cele biljke u naredna dva dana. Samo visok nivo ekspresije ovog gena izaziva sistemski odgovor biljaka [56].

6.3.5. Komercijalizacija GM biljaka otpornih na viruse

Najstarije komercijalizovane transgene biljne vrste u koje je ugrađen gen za protein omotača poreklom iz manje infektivnih virusnih sojeva jesu transgena papaja (*Carica papaya* L.) i transgena bundeva (*Cucurbita pepo* L.), nastale kao rezultat rada istraživača sa Univerziteta Kornel [57]. Mada precizan mehanizam rezistencije kod transgenih bundeva još uvek nije opisan, smatra se da su i one, kao transgena papaja rezistentne na viruse zahvaljujući mehanizmu posttranskripcionog utišavanja gena.

6.3.5.1. Transgena papaja

Papaja je poznato tropsko voće, mada relativno novo na međunarodnom tržištu. Najpoznatiji uzročnik bolesti papajâ širom sveta jeste virus kružnih mrlja papaje (eng.: „Papaya Ring Spot Virus – PRSV“). Priča o transgenoj papaji i PRSV dešava se na Havajima čija se industrija uglavnom zasniva na proizvodnji ovog tropskog voća. Opasnost od zaraze sa PRSV postaje očigledna 70-tih godina 20. veka. Za postojeće kultivare papaje na Havajima nisu bile poznate ni prirodno rezistentne linije, kao ni divlji srodnici. Napori da se zasadi papaje na Havajima zaštite od infekcije započiju izolacijom i karakterizacijom virusa, razvojem mutanta slabije infektivne moći i primenom unakrsne zaštite. Bez obzira na primenu ovih tehnika, proizvodnja papaje međutim opada do 40% zbog naglog porasta virusne infekcije. Istraživanja na transgenoj papaji započela su 1985. godine i tri godine kasnije rezultirala su komercijalizacijom dve transgene linije papaje, „SunUp“ i „Rainbow“, koje nose gen za protein omotača PRSV i pokazuju visok stepen rezistencije prema ovom virusu.

Interesantno je da transformacija kultivara koji je dominantan na Havajima (žuta papaja, „Kapoho“) nije dala zadovoljavajuće rezultate, tako da je ovaj kultivar ukršten sa transgenom „SunUp“ linijom (homozigot,

crvena papaja) i dobijen je F1 hibrid (hemizigot) koji je nazvan „Rainbow“. „Rainbow“ je osjetljiviji prema izolatima virusa koji nisu sa Havaja, ali je mnogo popularniji među proizvođačima. Uzgoj transgene papaje istovremeno je doprineo povećanju proizvodnje netransgenog „Kapoho“ varijeteta zahvaljujući tome što su zasadi netransformisanih biljaka bili okruženi transgenim biljkama, što je sprečilo dalji prodor virusa. Za sada se transgena papaja gaji u SAD i izvozi u Kanadu. Tehnologija dobijanja transgenih biljaka ustupljena je Brazilu i Jamajci. Severnoazijske zemlje rade na dobijanju varijeteta transgene papaje rezistentnih na lokalne virusne izolate. Japan, kao veliki uvoznik papaje sa Havaja, vrlo se dugo protivio uvozu transgene papaje, ali je od 2012. godine transgena papaja zastupljena i na njihovom tržištu. Uvoz i prodaja transgene papaje za sada nisu dozvoljeni u zemljama Evropske unije.

Što se tiče postojećih rizika u slučaju transgene papaje, eksperimentalnim putem je pokazano da je verovatnoća rekombinacije između transgena i samog virusa mala. Glavni problem predstavlja mogućnost kontakata transgenih biljaka „Rainbow“ sa novopridošlim virusima, na koje su manje otporni. Rešenje je u dobijanju transgenih biljaka „Kapoho“ i ukrštanju sa „SunUp“ varijetetom ili ono što je već urađeno, a to je ponovno ukrštanje F2 „Rainbow“ sa netransformisanim „Kapoho“ biljkama i dobijanje homozigota.

6.3.5.2. Transgene tikve i tikvice (*Cucurbita pepo* L.)

Pored transgene papaje, 1998. godine na tržištu SAD se pojavilo nekoliko Monsantoovih varijeteta transgenih bundeva i tikvica („Independence II“, „Liberator III“, „Freedom III“, „Destiny III“) transformisanih genom za protein omotača poreklom iz mozaičnog virusa tikvica (eng.: „Squash Mosaic Virus“) i mozaičnog virusa lubenice 2 (eng.: „Watermelon Mosaic Virus 2“). Transgeni su pružali značajnu otpornost prema tri od četiri

mozaična virusa koja su napadala ove biljke, a to su: mozaični virus žutih tikvica (eng.: „Zucchini Yellow Mosaic Virus“), mozaični virus lubenice 2 i mozaični virus krastavca (eng.: „Cucumber Mosaic Virus“). Mozaični virusi su umanjivali prinos od 20 do 80% u zavisnosti od faze razvoja inficiranih biljaka. Kako su prenosioci virusa mušice, klasične metode borbe bili su insekticidi i ulja koja su sprečavala pristup insektima. Upotreba transgenih biljaka dovela je do povećanja prinosa na Floridi i u Džordžiji, gde se ove biljke uglavnom i gaje. Transgene tikvice prodaju se isključivo na tržištu SAD. Ono što je dodatno interesantno kod transgenih tikvica jeste da su jednostavnom selekcijom dobijene biljke oslobođene od marker gena korišćenih u njihovoj konstrukciji koji predstavljaju jedan od spornih momenata u prihvatanju transgenih biljaka.

6.3.5.3. „NewLeaf“ krompir

Interesantan je primer transgenog krompira poznatog pod imenom „NewLeaf“, koji istovremeno nosi *Bt* gen i gen za protein omotača iz **PLRV** (eng.: „Potato Leaf Roll Virus“) i **PVY** virusa (eng.: „Potato Virus Y“). Ovaj varijetet krompira pušten je u prodaju, ali je zbog nedovoljnog interesovanja kupaca povučen sa tržišta. Novi varijetet pod imenom „NewLeaf Plus“, pored *Bt* gena nosi virusni gen za replikazu. Iz istog razloga sa tržišta je takođe povučena transgena linija šljive „Honeysweet“, rezistentna na virus šarke šljive, kao i transgeni pasulj rezistentan na zlatni mozaični virus pasulja.

6.3.5.4. Prednosti GM biljaka rezistentnih na viruse

Poznato je da gajenje GM biljaka otpornih prema herbicidima doprinosi smanjenju ukupnih troškova proizvodnje, dok se prednost *Bt* biljaka ogleda u direktnom povećanju prinosa. U poređenju sa ovim transgenim biljkama, linije rezistentne na viruse donose najveći porast profita, pre svega zbog direktnog uticaja na povećanje prinosa s jedne strane, i s druge stra-

ne, zbog isključivanja klasičnih tretmana kao što su primena insekticida ili ulja koja sprečavaju ishranu insekata na biljkama.

6.3.6. Potencijalni rizici gajenja GM biljaka rezistentnih na viruse

Bez obzira na to što je unos gena za protein omotača virusa u GM biljke vrlo efikasan, i kako se do sada pokazalo, bezbedan [58], ipak postoje izvesni rizici na koje ukazuje naučna javnost.

6.3.6.1. Transkapsidacija (Hetero- ili transenkapsidacija)

U prirodi postoje primeri interakcija između biljnih virusa poznatih pod nazivom hetero- ili transenkapsidacija, pri kojima dolazi do međusobne razmene proteina omotača. Nešto slično može da se desi i kod transgenih biljaka. Ovo je vrlo bitno zato što proteini omotača mogu da utiču na osobine virusa kao što su njegova specifičnost, njegovo širenje, na sistemsku invaziju i simptome ekspresije. Rezultati povezani s pojavom transenkapsidacija kod transgenih biljaka dobijeni eksperimentalno i na poljima su kontradiktorni. Rešenje je u upotrebi nefunkcionalnog proteina omotača pri dobijanju transgenih biljaka, što umanjuje mogućnost za razmenu i potencijalnu replikaciju agresivnih virusa. Takođe, upotreba transgena koji ne produkuje protein, već samo RNK koja utišava virusne gene jeste jedno od rešenja, kao i editovanje biljnog genoma CRISPR/Cas9 sistemom.

6.3.6.2. Rekombinacija

Virusi su podložni stalnim genetičkim promenama koje nastaju kao posledica mutacija ili rekombinacija. Mutacije se dešavaju kada se novonastale greške prilikom replikacije ili zračenja spontano zadrže u genomu, dok se rekombinacija dešava kada dva srodna virusa, koji se nalaze u istoj ćeliji domaćina, razmene genetički materijal dajući novi virus. Rekombi-

nacija igra značajnu ulogu u evoluciji virusa [59]. Taj proces je teško pratiti, jer se odvija u znatno širem vremenskom okviru od trajanja naših eksperimenata. Takođe, verovatnoća rekombinacije u prirodnim uslovima bez selektivnog pritiska nije određena. Ono što je izvesno jeste da je genetički materijal virusa (mozaični virus duvana) u kraćem vremenskom periodu (npr. 100 godina) relativno stabilan.

Jedna od glavnih primedaba na upotrebu transgenih biljaka u kojima se eksprimira gen za protein omotača virusa bazira se na postojanju mogućnosti rekombinacije između RNK poreklom od transgena i genoma virusa koji je napao biljku. Ovaj vid rekombinacije primećen je u eksperimentalnim uslovima. U praksi, međutim, kod rezistentnih biljaka nivo replikacije i sinteze odgovarajućih viralnih proteina veoma je nizak, za razliku od osetljivih biljaka gde nivo viralnih proteina može da dostigne i 10% ukupnih biljnih proteina. Na primer, nivo proteina omotača kod „Rainbow“ papaje jeste 87% niži nego nivo istog proteina kod netransformisane papaje zaražene PRSV virusom. Zbog toga je mogućnost rekombinacije znatno veća kod osetljivih biljaka nego kod rezistentnih biljaka. Da bi se eliminisala svaka sumnja, moguće je ugraditi transgen koji obezbeđuje rezistenciju, ali koji ne poseduje sekvence koje se mogu rekombinovati. Mada je rekombinacija deo evolucije virusa, i mada je genetički materijal virusa stabilan u kraćem vremenskom periodu, uticaj GM biljaka na evoluciju virusa teško je predvideti. Ali evoluciju virusa i inače je teško predvideti pa onda to i ne predstavlja neku posebnu novinu.

6.3.6.3. Virusni sinergizam

Poznato je da dvostruka virusna infekcija može da dovede do sinergističkog efekta koji se manifestuje pojačavanjem simptoma kod zaražene biljke. Postoje eksperimentalni podaci za transgene biljke koji pokazuju da u nekim slučajevima gen za proteinski omotač ili sam protein omotača

mogu da učestvuju u sinergističkoj reakciji. Teoretski je moguća pojava i nekih novih oblika interakcija. Transgen koji kodira protein omotača se eksprimira u svim ćelijama, pa je sada izložen kontaktu sa virusima koje normalno ne sreće. To može da vodi novoj vrsti bolesti ili promeni kretanja virusa unutar transgene biljke. Mehanizam sinergizma još uvek nije dovoljno razjašnjen, što trenutno otežava njegovo prevazilaženje.

6.3.6.4. Prenos gena

Transfer gena između gajenih biljaka i njihovih divljih srodnika dešava se od samog početka kultivisanja biljaka. U slučaju transgenih biljaka sa unakrsnim oprašivanjem, transgen virusnog porekla rasejavanjem polena može da pređe na divlje srodnike. Šta će se, međutim, dalje dešavati sa datim genom? Da li će data biljka biti u prednosti? U prisustvu virusnih infekcija – da. U slučaju odsustva selektivnog pritiska, a to je odsustvo specifičnih virusnih infekcija, gen će se vrlo brzo izgubiti kao nepotreban.

Drugo pitanje je i da li će se same transgene biljke, posedujući prednost u odnosu na biljke iste vrste neotporne na viruse, ponašati kao korov? Vreme će pokazati. Takođe se ne zna i teško je predvideti koliko će dugo same te biljke biti rezistentne na viruse, odnosno koliko će dugo trebati virusima da prevladaju rezistenciju kod transgenih biljaka.

Deset godina nakon komercijalizacije bundeve rezistentne na viruse urađena su istraživanja njihovog ekološkog efekta. Analizom više populacija divlje bundeve u periodu od četiri godine utvrđeno je da transgen koji obezbeđuje rezistenciju na viruse nije prisutan ni u jednom od analiziranih uzoraka, što znači da nije došlo do prenosa gena [60]. Ovakva istraživanja neophodna su i sigurno će biti vođena u dužem vremenskom periodu.

6.4. Uloga transgenih biljaka u kontroli patogenih bakterija i gljiva

Mada za sada postoji mali broj komercijalno dostupnih transgenih vrsta sa povećanom otpornošću prema patogenima, ipak će im se u ovom poglavlju posvetiti značajna pažnja, jer su patogene bakterije i gljive, pored virusa, najznačajniji izazivači bolesti kod biljaka. Bolesti izazvane patogenima naročito su uzele maha u savremenoj poljoprivrednoj proizvodnji zbog postojanja tzv. monokultura. Velike površine pod jednim varijetom olakšavaju širenje bolesti, što je u nekim slučajevima imalo i istorijske posledice. Vrlo ilustrativan primer jeste stradanje stotine hiljada siromašnih Iraca u prvoj polovini 19. veka, koji su, usled bolesti krompira izazvane oomicetom *Phytophthora infestans* i nemogućnosti da kupe skupu pšenicu, umirali od gladi. To je izazvalo i prvi veliki iseljenički talas prema Americi i promenilo demografsku strukturu Irske i cele Evrope.

Nedavna primena tehnika molekularne biologije u izučavanju odnosa biljka–patogen rezultirala je identifikacijom i kloniranjem brojnih gena uključenih u odbrambeni odgovor biljaka. To su geni koji kodiraju proteine, peptide ili antimikrobijalne komponente koje direktno ubijaju patogene ili redukuju njihov rast; genetički produkti koji inhibiraju virulentne produkte patogena, koji direktno ili indirektno jačaju opšti odbrambeni odgovor biljaka, geni uključeni u hipersenzitivni odgovor i u reakciju sa avirulentnim faktorima. Unošenje i ekspresija ovih, kao i antimikrobijalnih gena poreklom iz drugih izvora u transgene biljke dovelo je do značajnog smanjenja infekcije. Smanjenje je zavisilo od tipa patogena, kao i od primenjene strategije, ali nikada nije bilo potpuno. Kombinacija gena je dala bolje rezultate u redukciji bolesti od transformacije pojedinačnim genima. Upotreba tkivno-specifičnih ili patogen-inducibilnih promotora vezanih uz odgovarajuće gene rezistencije, sintetičke antimikro-

bijalne proteine ili elicitorne molekule koji stimulišu odbrambeni odgovor biljke, predstavlja budućnost u borbi protiv patogena.

6.4.1. Bakterije

Patogene bakterije predstavljaju mali deo celokupnog bakterijskog domena. Poznato je da su bakterije najstariji i najbrojniji organizmi na našoj planeti. To su jednoćelijski prokariotski organizmi mikroskopske veličine, koji se na osnovu načina na koji dolaze do hrane dele na autotrofne i heterotrofne. Za razliku od autotrofnih, koje same proizvode organske materije, heterotrofne bakterije koriste gotove organske supstance i pritom mogu da budu 1) saprofiti, oni koji koriste uginule organizme i organski otpad kao izvor organskih materija ili 2) paraziti, oni koji koriste žive organizme kao izvor organskih materija. Paraziti su najčešće i patogeni, tj. izazivači bolesti. Najpoznatije patogene bakterije pripadaju rodovima *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Corynebacterium* i *Streptomyces*.

Mehanizmi delovanja patogenih bakterija veoma su raznovrsni. Jedan od najpoznatijih načina delovanja jeste sinteza toksina. Toksini mogu da budu specifični za određenog domaćina ili pak da imaju širok spektar delovanja i da deluju na sve biljke. Tako pripadnici roda *Streptomyces*, koji izazivaju bolest krompira, sintetišu fitotoksin specifičan za krompir poznat pod nazivom takstomin tek nakon kolonizacije tubera [61]. Pretpostavlja se da komponente ćelijskog zida krompira (celobioza i suberin) deluju kao aktivatori sinteze takstomina [62].

Vrlo specifičan mehanizam delovanja patogenih bakterija sreće se kod pripadnika roda *Agrobacterium*. Ovaj prirodni mehanizam iskorišćen je za dobijanje transgenih biljaka (videti Poglavlje 5).

Neke bakterije deluju preko sinteze enzima pektinaza koji razgrađuju ćelijski zid biljaka izazivajući omekšavanje tkiva (eng.: „soft rot“). Ovaj tip delovanja karakterističan je za pripadnike roda *Erwinia* koji dovode do propadanja povrća nakon dužeg stajanja u frižideru ili tokom skladištenja. Još jedan način delovanja patogena jeste sekrecija polisaharida koji se nakupljaju u ksilemskim sprovodnim snopićima biljaka, sprečavajući na taj način transport vode i mineralnih materija od korena do lista, izazivajući najpre venjenje, a zatim i smrt biljke. *Ralstonia solanacearum* najpoznatiji je izazivač venjenja banane, paradajza i krompira u toplijim krajevima, dok venjenje krastavca može biti izazvano i od bakterije *Erwinia tracheiphila*. *Xylella fastidiosa* izaziva začepljenje sprovodnih snopića kod vinove loze i citrusa, a inficira i jabuku, breskvu i badem. Prenose je insekti koji se hrane floemskim sokom (biljne vaši, bele mušice i dr.).

Pripadnici rodova *Xanthomonas* i *Pseudomonas* izazivaju bolesti sekrecijom proteina koji sprečavaju aktivaciju odbrambenog mehanizma domaćina. *Xanthomonas* napada veliki broj biljnih vrsta kao što su paprika, limun, pamuk, paradajz i soja. Neke vrste bakterije *Xanthomonas* uzrokuju pojavu lokalizovanih tačaka ili pruga na listovima, dok se druge šire sistematski i izazivaju pojavu medljike ili crne truleži. Predstavnici ovih bakterija takođe izazivaju lokalizovanu smrt organa (eng.: „canker“). Oni ubacuju proteine efektore, npr. TAL (eng.: „Transcription Activator-Like) efektor, u biljke preko sekrecionog sistema tipa III. TAL protein se vezuje za promotorsku sekvencu biljnog gena aktivirajući sintezu proteina koji pomaže bakterijsku infekciju.

Bakterija *Pseudomonas syringae* (predstavnik roda *Pseudomonas*) takođe zasniva svoju patogenezu na proteinima efektorima. Ova bakterija je postala model sistem za izučavanje molekularnih mehanizama interakcije biljka-patogen zahvaljujući činjenici da tri soja ove bakterije imaju

sekvenciran genom, i da su model biljke *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana*, kao i paradajz (*Solanum lycopersicum*) njeni domaćini. Otkriveno je da nekoliko bakterijskih gena, označenih grupno kao **hrp** geni (eng.: „hypersensitive response and pathogenicity cluster“) igraju ključnu ulogu u bakterijskoj patogenezi. Interesantno je da postoji velika sličnost između *hrp* gena poreklom iz bakterija čiji su domaćini biljke i životinje, što ukazuje na postojanje sličnih mehanizama virulencije kod ovih udaljenih patogena.

S druge strane, nekoliko vrsta roda *Corynebacteria* izazivaju raznovrsne bolesti biljaka, što ukazuje na različite mehanizme delovanja srodnih bakterija. Najpoznatiji predstavnik ovog roda jeste bakterija *Corynebacterium tritici* koja izaziva plamenjaču (medljiku) pšeničnog klsa (eng.: „spike blight“).

Fitoplazme su takođe biljni patogeni, mada su ih ranije svrstavali u mikoplazme, humane patogene. U pitanju su obligatni paraziti floemskog tkiva koje prenose insekti koji se hrane floemskim sokom. Fitoplazme predstavljaju specifičan rod bakterija. Njihova specifičnost ogleda se u odsustvu ćelijskog zida i prisustvu trostruke ćelijske membrane. Simptomi infekcije uzrokovane fitoplazmom jesu pojava struktura sličnih listovima na mestu cveta.

6.4.2. Gljive

Gljive su glavni izazivači bolesti kod biljaka. Odlična ilustracija toga je podatak da od 100.000 poznatih vrsta gljiva (patogenih i nepatogenih) samo njih 100 izaziva bolesti kod ljudi i životinja, a 8000 vrsta su biljni patogeni, od kojih su neki izuzetno štetni. Većinski ostatak čine gljive saprofiti, dopunjene sa simbiontima (čuvane mikorizalne gljive).

Patogene gljive se prema načinu ishrane dele na biotrofne i nekrotrofne [63]. Biotrofi ne usmrćuju domaćina (**Slika 6.8A**), njima je potreban živ organizam kako bi završile svoj životni ciklus [64], dok se nekrotrofi hrane ostacima svog domaćina kod koga su prethodno produkcijom toksina izazvali velika oštećenja koja su dovela do smrti (**Slika 6.8B**).



Slika 6.8. Patogene gljive se prema načinu ishrane dele na biotrofne i nekrotrofne. **A** – *Erysiphe cichoreacearum*, biotrofna gljiva (pepelnica). **B** – *Magnaporthe grisea*, nekrotrofna gljiva (uzročnik krivljenja stabla pirinča)

Postoje i hemibiotrofne gljive koje tokom života iz biotrofa prelaze u nekrotrofe. Prelaz sa jednog načina ishrane na drugi dešava se zbog povećane potrebe za hranom koja prati rast gljive i povećanje njene biomase. Najpoznatija hemibiotrofna gljiva je *Phytophthora infestans*.

Većina patogenih gljiva pripada askomicetama i bazediomicetama. Od askomiceta najpoznatije su: *Fusarium* spp. (uzročnik bolesti venjenja, eng.: „*Fusarium* wilt disease“), *Thielaviopsis* spp. (uzročnik truljenja korena, eng.: „*Thielaviopsis* root rot“), *Verticillium* spp. (uzročnik venjenja), *Magnaporthe grisea* (uzročnik krivljenja stabla pirinča, eng.: „rice blast“). Od bazidiomiceta najpoznatije su: *Rhizoctonia* spp. (izazivač truleži), *Phakospora pachyrhizi* (izazivač rđe kod soje, eng.: „soybean rust disease“) i *Puccinia* spp. (izazivač rđe kod svih cerealija).

Oomicete nisu prave gljive, ali su im veoma slične; imaju slične strategije infekcije i mnogi biljni patolozi ih svrstavaju u gljive. U oomicete spadaju najdestruktivniji biljni patogeni, uključujući rod *Phytophthora* kome pripadaju izazivači poznatih bolesti: *Phytophthora infestans*, uzročnik medljike krompira (plamenjače, eng.: „potato late blight“) i posledično velike gladi u Irskoj (1845–1849) i *Phytophthora ramorum*, koja je izazvala smrt oko milion stabala hrasta, pojavivši se 2000. godine kao potpuno novi uzročnik bolesti (eng.: „sudden oak death“).

Kao i bakterije, i gljive koriste sopstvene enzime za razgradnju ćelijskog zida biljke, omogućavajući na taj način brzo širenje hifa od ćelije do ćelije. Kad se jednom nađu unutar biljke, gljive deluju na više načina: sintetišu toksine koji remete permeabilnost ćelijske membrane, vrše sekreciju polisaharida u sprovodne snopiće ksilema izazivajući venjenje, sintetišu biljne hormone remeteći razvojne procese biljaka.

Neke od gljiva ne samo da dovode do smanjenja prinosa već i proizvode vrlo opasne toksine (aflatoksini, mikotoksini) koji su kancerogeni za ljude ukoliko se hrane delovima biljaka koji su zaraženi ili se ti delovi prerađuju u namirnice.

6.4.3. Klasične metode borbe sa bolestima

6.4.3.1. Agrotehničke metode

Savremena poljoprivredna proizvodnja, naročito u Severnoj Americi i Evropi, zasniva se na upotrebi monokultura, odnosno na upotrebi jednog ili manjeg broja elitnih varijeteta. Na taj način je smanjena genetička varijabilnost, koja je izvor prirodne rezistencije prema patogenima, i omogućena je pojava infekcija epidemioloških razmera. Jedna od agrotehničkih metoda koja bi smanjila nivo infekcije jeste upotreba mešavine različitih

varijeteta sa različitim nivoima rezistencije prema jednoj vrsti patogena. Različiti nivoi rezistencije potiču od prisustva različitih gena za rezistenciju. Nedostatak ove metode jeste nesinhronizovanost sazrevanja ploda kod različitih varijeteta što otežava berbu, pa samim tim smanjuje prinos. Druga opcija koja bi sprečila pojavu epidemije jeste rotiranje kultura. Rotiranje kultura sprečilo bi prenamnožavanje patogena koji napadaju samo jednu vrstu useva.

6.4.3.2. Hemijske metode

Insekticidi

Kao što je ranije rečeno, insekti su vrlo često prenosioci gljiva i bakterija. Primenom insekticida vrši se kontrola prenosilaca patogena, ali ako je biljka već zaražena, onda je primena insekticida beskorisna.

Fungicidi

Fungicidi su hemijska sredstva koja se koriste za suzbijanje gljivičnih patogena. Kao prvi fungicid spominje se bordoska čorba koja se primenjuje još od 1880. godine [65]. U pitanju je mešavina kreča i bakar-sulfata koja je prvobitno primenjivana da odvrati lopove, ali se pokazala efikasnom u sprečavanju bolesti plamenjače vinove loze (eng.: „grape downy mildew disease“). Danas imamo na stotine različitih fungicida. Neki se primenjuju u vidu spreja na polju, neki kao prah kod semena, ali ono što je zajedničko za sve njih jeste da se vrlo često moraju primenjivati više puta, što poskupljuje njihovu upotrebu, tako da se uglavnom primenjuju za zaštitu voća i povrća, ali ne i žitarica. Drugi njihov nedostatak, a i mnogo važniji, jeste njihova toksičnost za ljudski organizam.

Antibakterijske komponente

Antibakterijske komponente, pored dobro poznatih antibiotika kao što su streptomycin ili tetraciklin, uključuju i bakarni ili sulfidni sprej. I oni se zbog visokih cena primenjuju samo kod voća i povrća.

Ono što je zajedničko za dugotrajnu primenu fungicida i antibiotika jeste pojava rezistentnih patogena. Zbog kontinuiranog selektivnog pritiska oni postaju dominantni patogeni na određenom području, a zatim se šire i na druga područja. Pojava rezistentnih patogena zahteva primenu novih hemikalija ili nekih drugih metoda za odbranu, kao što je npr. upotreba rezistentnih varijeteta.

6.4.3.3. Selekcija rezistentnih varijeteta

Klasična selekcija rezistentnih varijeteta nastaje tako što se geni za rezistenciju na patogene koji se mogu naći kod divljih srodnika ili kod starih varijeteta na lokalnim imanjima, ili se čuvaju u genofondu, ukrštanjem prenose u elitni kultivar. Uzgoj rezistentnih varijeteta za sada je jedini način odbrane od patogenih gljiva koje napadaju žitarice. *Puccinia graminis* var. *tritici* poznata je bazidiomiceta koja izaziva bolest rđe kod pšenice. Kod divljih srodnika pšenice otkriven je gen za rezistenciju na *Puccinia graminis* var. *tritici*, pa je klasičnim ukrštanjem i selekcijom dobijen rezistentni varijetet. Bolest povijenih stabljika pirinča takođe se kontroliše upotrebom rezistentnih varijeteta.

I ovaj pristup, međutim, ima svoje nedostatke. Unos rezistentnih gena u elitni kultivar, naročito ako su geni poreklom iz divljih srodnika, zahteva dugotrajno ukrštanje radi eliminacije DNK segmenata poreklom iz divljih srodnika koji nisu poželjni. Pored toga što je ovaj proces dugotrajan, vrlo često nakon kratkog vremena dolazi do prevazilaženja rezistencije od patogena. Primer je opet *Puccinia graminis* var. *tritici*, čiji se genom menja enormnom brzinom, pa je vrlo brzo i rezistentan varijetet pšenice dobio svoj patogen. Dalja borba odvija se u dva pravca: kombinacija više gena za rezistenciju koji obezbeđuju snažniju rezistenciju ili upotreba manje efikasne, ali dugotrajnije rezistencije.

Nedostatke klasične selekcije, kao što je već rečeno, moguće je prevazići metodama genetičkog inženjerstva. Osnovno ograničenje klasične selekcije u tome je da se rezistentni geni ukrštanjem mogu prenositi samo među istim ili vrlo bliskim vrstama. Metodama genetičkog inženjerstva moguće je prevazići te nedostatke i preneti gene i na seksualno nekompatibilne vrste. Takođe, metode genetičkog inženjerstva omogućavaju da direktnim unosom jednog ili više definisanih gena u genom elitnih kultivara ostaju očuvane sve njihove osobine i vrlo brzo se eksprimira i nova osobina. Na taj način se izbegava unos nepoželjnih sekvenci koji se dešava prilikom ukrštanja gajenih kultivara sa divljim srođnicima koji nose gen za rezistenciju.

6.4.4. Interakcija patogena sa biljkama

Svi biljni organizmi, kao i njihovi pojedinačni delovi, nisu u istoj meri podložni infekciji patogena. Kod nekih biljaka patogeni izazivaju bolesti, kod nekih samo blage simptome, a kod nekih uopšte ne dolazi do infekcije. U slučaju odsustva infekcije govori se o rezistenciji ili otpornosti biljaka na patogene. Razlikuju se dva tipa otpornosti: konstitutivna, nedomaćinska otpornost (eng.: „non-host resistance“) i indukovana, domaćinska otpornost (eng.: „host resistance“). Konstitutivna otpornost odnosi se na postojanje rezistencije kod celokupne biljne vrste prema određenom patogenu, odnosno ta vrsta nije domaćin datom patogenu (na primer *Arabidopsis thaliana* poseduje konstitutivnu otpornost prema gljivi *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* koja izaziva plamenjaču kod ječma). Najčešće su u pitanju divlje vrste koje su uglavnom otporne na većinu patogena. Kod gajenih vrsta češća je indukovana ili domaćinska otpornost. U pitanju je otpornost koju pojedinačni kultivar jedne vrste pokazuje prema specifičnom patogenu. Ovaj tip rezistencije posledica

je interakcije poznate kao gen-gen interakcija, gde komplementarno interaguju jedan protein biljke označen kao rezistentni (**R**) protein i jedan protein patogena, označen kao avirulentni (**Avr**) protein, izazivajući dalje kaskadni niz reakcija koji sprečavaju infekciju. U slučaju pojave blagih simptoma infekcije govori se o trećem vidu rezistencije kod biljaka, tzv. nespecifičnoj indukovanoj rezistenciji, koja ublažava simptome bolesti kod biljaka ne sprečavajući pritom patogene da kompletiraju svoj reproduktivni ciklus.

6.4.5. Kako se biljke brane od patogena?

Da bismo razumeli transgene pristupe za odbranu od patogena moramo da se upoznamo sa mehanizmima odbrane samih biljaka. Odbrana biljaka se, kao što je rečeno, može podeliti na konstitutivnu i inducibilnu. Elementi konstitutivne odbrane stalno su prisutni u biljci, dok elementi inducibilne bivaju aktivirani prisustvom patogena. Na taj način biljke štede svoju energiju i raspoložive resurse. I jedan i drugi vid zaštite uključuje više nivoa odbrane od patogena. Prvi nivo odbrane, koji je konstitutivnog tipa, predstavljaju mehaničke (fizičke) barijere koje su nastale kao rezultat anatomske građe biljaka. U pitanju su kutikula, voštane tvorevine, kora i, naravno, ćelijski zid. Za savladavanje ovih mehaničkih barijera patogeni najčešće koriste pomoć insekata, koji prilikom ishrane oštećuju površinu biljaka omogućavajući nesmetani prodor mikroorganizama. S druge strane, i sami patogeni poseduju enzime koji razlažu ove tvorevine. Stome su slabe tačke odbrane biljaka, jer predstavljaju nezaštićene otvore kroz koje bakterije i gljive vrlo lako prodiru u unutrašnjost biljaka. Nedavno je, međutim, pokazano da i stome reaguju na prisustvo patogena zatvarajući svoj otvor.

Drugi nivo odbrane jeste hemijska odbrana konstitutivnog tipa. Hemijska odbrana konstitutivnog tipa uključuje veliki broj malih molekula iz grupe sekundarnih metabolita kao što su fenoli, tanini, alkaloidi, terpeni, glukozidi i druga toksična jedinjenja. Pored ovih jedinjenja konstitutivnu hemijsku odbranu čine i antifungalni proteini (defenzini), antifidanti, kao i enzimi koji izazivaju raspad ćelijskog zida patogena (antimikrobijalni proteini i enzimi).

Treći nivo odbrane čini hemijska odbrana inducibilnog tipa. Inducibilna hemijska odbrana uključuje sintezu fitoaleksina (*de novo* sintetisanih sekundarnih metabolita), proteina povezanih sa patogenezom (eng.: „Pathogenesis-Related Proteins – PR“), aktivaciju burnog oksidativnog odgovora, hipersenzitivnu reakciju i sistemska stečenu reakciju. Za indukciju odgovora neophodno je prisustvo elicitora. Elicitori mogu biti egzogene i endogene prirode. Egzogeni elicitori jesu molekuli koje oslobađaju sami patogeni [npr. beta-glukani, hitin, bakterijski flagelin, avirulentni (Avr) proteini], a endogeni elicitori su poreklom od domaćina, najčešće su u pitanju fragmenti ćelijskog zida (oligogalakturonidi) nastali nakon dejstva enzima bakterija i gljiva.

6.4.5.1. Fitoaleksini

Fitoaleksini su antipatogena jedinjenja male molekulske mase koja se sintetišu vrlo brzo (pola sata) nakon infekcije. Interesantno je da se pojedini fitoaleksini sreću kao deo konstitutivne odbrane nekih biljaka, a kod drugih biljaka se ta ista jedinjenja sintetišu tek nakon invazije patogena. Sinteza većine fitoaleksina zahteva aktivaciju brojnih biosintetičkih enzima. Tako je *de novo* sinteza enzima fenilalanin amonijum liaze (PAL) neophodna za sintezu fitoaleksina iz grupe flavonoida. Mehanizam dejstva fitoaleksina još nije sa sigurnošću utvrđen. Smatra se da imaju citostatičko dejstvo. Postoje tri grupe fitoaleksina: flavonoidi i izoflavonoidi, terpeni

fitoaleksini i poliacetileni. Kamaleksin iz arabidopsisa i rezveratrol iz vinove loze jesu dva najbolje izučena fitoaleksina.

6.4.5.2. Proteini povezani sa patogenezom (PR)

Proteini povezani sa patogenezom doprinose odbrani napadnute biljke u roku od jednog sata nakon infekcije ili dejstva elicitora, i vrlo su brojni. Oni uključuju hitinaze i glukanaze, enzime koji degraduju ćelijski zid gljiva; antimikrobijalne peptide koji nisu enzimi, ali su toksični za patogene (inhibitori proteaza); i enzime koji kontrolišu sintezu antimikrobijalnih komponenti. Tu spadaju i enzimi koji sintetišu druga zaštitna jedinjenja kao što su strukturni proteini ćelijskog zida i peroksidaze koje učestvuju u izgradnji lignina. Za neke od PR proteina još uvek se ne zna njihova tačna uloga. Salicilna kiselina učestvuje u regulaciji aktivnosti mnogih *PR* gena.

6.4.5.3. Interakcija specifična za domaćina i patogena

Osim prisustva nespecifičnih elicitora, indukovani odgovor biljke može biti posledica i gen-gen interakcije, koja je specifična za domaćina i patogena (eng.: „host specific resistance“). U pitanju je interakcija produkata gena za avirulenciju (*Avr* gen) poreklom iz patogena i gena za rezistenciju (*R* gen) poreklom iz biljke. *Avr* geni su identifikovani kod malog broja bakterija i gljiva. Protein virusnog omotača takođe je *Avr* protein. Prisustvo samog *Avr* proteina u biljci može izazvati aktivnost *R* gena. Biljke imaju gene za rezistenciju na viruse, bakterije, gljive, insekte i nematode, ali svi ovi proteini imaju sličnu strukturu, što znači da je mehanizam za prepoznavanje patogena kod različitih biljnih vrsta konzerviran. Promene *Avr* gena i *R* gena vrlo su česte u kratkom vremenskom periodu. U divljoj populaciji uočen je veliki polimorfizam *R* genskog lokusa, za razliku od monokultura koje su zbog toga podložnije infekciji.

6.4.5.4. Hipersenzitivni odgovor

Prisustvo Avr proteina u biljci izaziva pojavu hipersenzitivnog odgovora (eng.: „Hypersensitive Response - **HR**“). Hipersenzitivna reakcija jeste specifičan odgovor biljke na napad patogena. Pokušavajući da izoluje ćelije koje su inficirane patogenima, biljka žrtvuje ćelije koje se nalaze u neposrednom okruženju izazivajući njihovu smrt, tako da nastaju nekrotične površine u obliku mrkih pega oko kojih se dodatno nagomilava kaloza. Smrt je verovatno forma programirane ćelijske smrti uzrokovane produkcijom antimikrobijalnih komponenti (reaktivnih vrsta kiseonika, fenola, NO), kao i signalnih molekula. HR je generalno efikasna kod biotrofa koji zahtevaju prisustvo živih ćelija, ali ni nekrotrofi ne mogu da opstanu u uslovima jakog oksidativnog stresa.

6.4.5.5. Sistemska stečena rezistencija

Sistemska stečena rezistencija (eng.: „Systemic Acquired Resistance – **SAR**“) jeste viši nivo odbrane biljaka od patogenih mikroorganizama, koji nastaje kao posledica indukcije signala pri lokalnom odbrambenom odgovoru i njihovom širenju do ostalih delova biljke, omogućavajući joj znatno veću otpornost prema novoj infekciji u narednih nekoliko nedelja ili meseci, tzv. eng.: „priming“ [66]. Jedan deo biljke može biti jako oštećen zbog infekcije, ali će u sledećem naletu istog patogena postojati znatno jači odbrambeni odgovor.

Za sada se ne zna tačna priroda signala, ali se zna da salicilna kiselina (**SA**) i SAR geni (neki PR proteini) imaju značajnu ulogu u sistemske rezistenciji. Salicilna kiselina preko regulatornog proteina NPR1, poznatog i kao **NIM1** (eng.: „Non-**IM**munity **I**“) dovodi do aktivacije odbrambenih gena. SA stimuliše prelaz NPR1 proteina iz citoplazme u jedro, gde on aktivira transkripcione faktore odbrambenih gena.

Pretpostavlja se da nakon lokalnog prepoznavanja patogena preko **PAMPs** (eng.: „**P**athogen-**A**ssociated **M**olecular **P**atterns“) ili **MAMPs** (eng.: „**M**icrobe-**A**ssociated **M**olecular **P**atterns“) signala od biljke, dolazi do povećane sinteze salicilne kiseline na mestu infekcije [67]. Metil-salicilat, jedinjenje nastalo metilacijom SA, kao i jedinjenja indukovana SA, azelaična kiselina i glicerol-3-fosfat se putem floema transportuju do udaljenih tkiva. Ova jedinjenja imaju ulogu signalnih molekula koja u udaljenim tkivima indukuju povećavanje nivoa SA koja pak indukuje ekspresiju odbrambenih gena (npr. *PR1* gen). U reproduktivnim tkivima ovi signali indukuju epigenetičke promene koje se prenose na potomstvo i omogućavaju sistemsku rezistenciju [68].

Molekularni mehanizam ćelijskog „priming“-a još uvek je nepoznat. Jedna od hipoteza pretpostavlja da „priming“ uključuje akumulaciju neaktivnih ćelijskih proteina koji imaju značajnu ulogu u amplifikaciji ćelijskih signala nakon ponovljenog napada patogena. Ti proteini bi mogli da budu dormantne proteinske kinaze. Nedavno je pokazano da i specifične hromatinske modifikacije na promotorima odbrambenih gena igraju značajnu ulogu u sistemskom odgovoru.

Pored patogenih, i nepatogeni sojevi (sojevi koji koloniziraju koren) izazivaju sistemsku rezistenciju. U pitanju je potpuno drugi odbrambeni put označen kao indukovana sistemka rezistencija (eng.: „**I**nduced **S**ystemic **R**esistance – **ISR**“). Ovaj put uključuje biljne hormone, etilen i jasmonsku kiselinu (**JA**) kao signalne molekule, a ne zahteva prisustvo salicilne kiseline niti akumulaciju PR proteina. NPR1 je i ovde neophodan za aktivaciju gena uključenih u ISR. Indukovana rezistencija se putem isparljive supstance metil-jasmonata prenosi do drugih biljaka.

Treći mehanizam odbrane jeste rezistencija indukovana egzogenom primenom β -amino buterne kiseline (eng.: „ β -**A**mino**B**utiric **A**cid-**I**n-

duced Resistance - **BABA-IR**“), koja aktivira multipli imunski odgovor kod koga proces taloženja kaloze ne zavisi od SA i JA već od abscisinske kiseline (**ABA**). To ukazuje da je SAR najpoznatiji, ali ne i jedini proces uključen u odgovor na napad patogena. Očigledno je da su ovi procesi povezani i da čine mrežu odbrane kontrolisanu od imunskog sistema biljaka.

6.4.6. Genetičke modifikacije

Mada je za sada krompir jedina komercijalno dostupna transgena vrsta sa povećanom otpornošću prema patogenima, postoje brojni uspešni pristupi. Osnovni pristup uključuje proteine povezane sa patogenezom (PR proteini) i antimikrobijalne proteine.

Jedan od najpoznatijih PR proteina jeste hitinaza, sa kojom se prvo i počelo. Ovaj enzim deluje isključivo na ćelijski zid gljiva, što predstavlja veliku prednost prilikom odabira gena za dobijanje genetički modifikovanih biljaka. Pri genetičkim transformacijama korišćeni su biljni, bakterijski, kao i geni iz gljiva koji kodiraju ovaj enzim. Dobijeni su pozitivni rezultati za otpornost transgenih biljaka u staklari, ali su rezultati na polju bili nezadovoljavajući. Očigledno je varijabilnost sredinskih faktora uticala na međusobne interakcije organizama i izazvala nisku efikasnost odbrane. Postoje indikacije da bi istovremena ekspresija više različitih PR gena (npr. β -1,3-glukanaza i ribozomalni inaktivirajući protein, **RIP**) u jednoj biljci mogla da bude rešenje problema koji se javljaju, a to su pre svega ograničena dužina trajanja zaštite i razvoj rezistencije kod patogena. Osim ostalog, nedostatak upotrebe hitinaze jeste i taj što glavni patogeni iz roda oomiceta (*Phytophthora* spp.) nemaju hitin u ćelijskom zidu.

Drugi pristup u dobijanju transgenih biljaka sa povećanom otpornošću prema bakterijama i gljivama odnosio se na upotrebu antimikrobijalnih proteina. Najdalje se otišlo sa defenzinima, malim peptidima koji se

nalaze u svim ćelijama i koji pokazuju litičku aktivnost nakon vezivanja za plazma membranu mikroba. Kako je integritet membrane ključna stvar, mala je verovatnoća da će doći do promene u membrani kao odgovor na prisustvo defenzina. Gen za defenzin iz lucerke ubačen je u krompir i na polju su te biljke krompira pokazivale otpornost prema gljivi *Verticillium dahlia*, ali ne i prema *Alternaria solani*. Nivo rezistencije odgovarao je prirodnoj rezistenciji.

Još jedna grupa antimikrobijalnih proteina pokazala se efikasnom u suzbijanju patogena, a to su temporini poreklom iz sekreta koji luči koža žabe *Rana temporaria*. Ekspresija temporina A u transgenom krompiru obezbedila je otpornost prema bakteriji *Ervinia carotovora* ssp. *carotovora* (trulež krtola krompira) i oomicetama *Phytophthora infestans* (plamenjača krompira) i *Phytophthora erytroseptum* (ružičasta trulež krtola krompira) koje izazivaju tri različite vrste bolesti.

Geni poreklom iz insekata, čiji produkti cecropin i melitin pokazuju antimikrobno dejstvo, takođe su korišćeni u transgenom pristupu. Ekspresija ovih gena u transgenom krompiru obezbedila je otpornost prema bakteriji *Ervinia carotovora* i gljivi *Fusarium solani*.

Problem koji je vezan za zadržavanje mikotoksina, otrovnih i kancerogenih produkata gljiva, u plodovima biljaka koji se kasnije koriste u ishrani stoke i ljudi, takođe je moguće sprečiti transgenim pristupom. Poznato je da nekoliko patogenih gljiva može da inficira klip kukuruza i da dovede do propadanja zrna. Najpoznatije su *Gibberella zeae* i *Fusarium moniliforme*. Obe gljive sintetišu mikotoksine koji su štetni za ljude i životinje koje se hrane kukuruzom. Ugradnja gena za esterazu ili amino-oksidazu poreklom iz gljiva u kukuruz omogućila je detoksifikaciju mikotoksina poreklom iz *Fusarium moniliforme*. Drugi primer je sintetički peptid D4E1 koji se sastoji od 17 aminokiselina i koji poseduje široko an-

timikrobno dejstvo. Ovaj peptid je ubačen u biljke pamuka sa ciljem da inhibira rast *Aspergillus flavus* i tako spreči sintezu aflatoksina. S druge strane, upotreba *Bt* gena kod kukuruza smanjuje mesta povrede izazvane insektima i na taj način smanjuje mogućnost penetracije patogena.

Ovo su sve primeri upotrebe pojedinačnih gena koji obezbeđuju rezistenciju prema jednom ili manjem broju patogena. Ovakav pristup je pogodan jedino u slučaju kada je patogen izrazito agresivan i izaziva velike gubitke, kao što je, na primer, bakteriorna plamenjača (eng. „fireblight“), bolest koju kod jabuka i bresaka izaziva *Erwinia amylovora*, bakterija koja u toku jedne sezone može da uništi ceo voćnjak.

6.4.7. Problemi i rešenja

Kako upotreba *PR* i antimikrobnih gena za sada nije dala rešenje problema rezistencije biljaka na patogene, ideja je bila da se akcenat stavi na gene koji su uključeni u odbrambeni sistem biljaka kao što su *Avr* i *R* geni, geni uključeni u hipersenzitivni odgovor ili u sistemsku stečenu rezistenciju (*NPR1* gen iz arabidopsisa).

Pristup u kome su korišćeni receptorni (*R*) geni pokazao se kao prilično efikasan. Transgene biljke u kojima je eksprimiran *pto* gen, jedan od *R* gena, bile su rezistentne prema većem broju patogena, što ukazuje na to da ekspresija odbrambenog sistema kod biljaka nije specifična za patogen. Interesantno je da je kod ovih transformanata došlo do HR odgovora, do akumulacije salicilne kiseline u listovima i povećane ekspresije *PR* gena. Kod biljaka sa *R* transgenom eksprimirano je ukupno oko 600 gena, od čega se 40% poklapa sa genima eksprimiranim kod čoveka ili kod drozofile pri odgovoru na patogene, što ukazuje na postojanje imunskog odgovora i kod biljaka.

Problemi koji prate ekspresiju jednog ili više *R* gena vezani su za opasnost od pojave rezistencije kod patogena, naročito kod bakterija, slično problemu koji je vezan za upotrebu antibiotika. Drugi problem vezan je za metaboličko opterećenje koje transgene biljke trpe zbog stalno aktiviranog sistema odbrane i koje uglavnom vodi smanjenju prinosa. Dobar primer za to jesu transgene biljke pirinča kod kojih dolazi do značajnih gubitaka u prinosu usled ekspresija *NPR1* gena, za razliku od transgenih biljaka paradajza u kojima povećana ekspresija istog gena obezbeđuje povećanu otpornost prema patogenima, ali ne utiče na prinos.

Rešenje ovog problema jesu transgene biljke sa indukujućim sistemom odbrane koji bi se aktivirao u prisustvu patogena. U slučaju ekspresije transgena poreklom iz oomicete *Phytophthora cryptogena* pod imenom kriptogein, koji je pod kontrolom patogen-inducibilnog promotora, u prisustvu patogena dolazi do pojave istih simptoma kao i u slučaju prisustva avirulentnog organizma (HR). Ovako transformisana biljka pokazuje rezistenciju i prema gljivama iz drugih rodova.

Prenos R gena iz divljih populacija u elitne kultivare

Novi transgeni pristup ogleda se u prenosu rezistentnih gena iz divljih srodnika u elitne varijetete. Primer je transgeni krompir kompanije BASF u koji su uneta dva *R* gena iz *Solanum bulbocastanum*, divlje meksičke vrste otporne na gljivu *Phytophthora infestans*. Do sada se *S. tuberosum* ukrštao sa *Solanum demissum*, a ovo je sad novi izvor rezistentnih gena. Proizvođaču, međutim, nije dozvoljeno gajenje ovih transgenih biljaka na polju zbog toga što nije testirano alergensko svojstvo novih proteina.

Drugi divlji srodnik krompira poreklom iz Argentine, *Solanum venturii* poslužio je kao izvor gena za rezistenciju *rpi-vnt1* koji je omogu-

ćio dobijanje dve transgene linije krompira *Solanum tuberosum* otpornih prema *Ph. infestans*. Ove transgene linije gaje se na poljima SAD i Kanade od 2016. godine, a nalaze se i na tržištu Australije i Novog Zelanda.

6.4.8. Perspektive kontrole patogena

Šta su perspektive?

1. Novi koncept hemijske kontrole

Prskanje biljaka salicilnom kiselinom dovodi do povećanja otpornosti biljaka prema patogenima posredstvom tzv. sistemske rezistencije. Prevelika doza salicilne kiseline, međutim, toksična je za biljke pa se pribeglo upotrebi jedinjenja koje je po strukturi slično salicilnoj kiselini, ali manje štetno za biljke. Ovo jedinjenje ne bi uništavalo direktno patogene, nego bi stimulisalo biljku da aktivira sopstveni odbrambeni mehanizam u borbi protiv patogena.

2. Identifikacija SAR signala

Molekularni mehanizam sistemske stečene rezistencije tzv. ćelijskog „priming“-a još uvek je nepoznat. Identifikacija SAR signala omogućila bi njihovu primenu u biljnoj biotehnologiji i tako verovatno rešila problem otpornosti biljaka na patogene.

3. Pravljenje odgovarajućih receptora

Nedavno otkriće biljnog receptora koji nosi ugrađeni mamac za patogene i na taj način omogućava detekciju patogena i aktivira ćelijsku odbranu sprečavajući dalju infekciju [69] pruža mogućnost za konstrukciju novih receptora sa zamkama koji bi aktivirali odbranu prema bilo kom patogenu.

4. Drugi pristupi

Postoje i neki drugi pristupi nevezani za odbrambeni odgovor biljke. To je primena interferentne RNK tehnologije (RNKi) kojom su utišani auk-sinski i citokininski geni iz *A. tumefaciens* i sprečena infekcija ovom bakterijom. Interesantan je i pokušaj pravljenja antitela na proteine patogena odgovorne za virulenciju. Na poboljšanju ovog pristupa i dalje se radi.

Realnost

Metode molekularne biologije omogućile su mapiranje velikog broja gena za rezistenciju pomoću odgovarajućih markera. Prisustvo genetičkih markera, a ne samo fenotip kao što je to bio slučaj do sada, omogućava praćenje recesivnih gena tokom selekcije. Budućnost transgenog pristupa u borbi protiv bolesti je u prenosu upravo ovih gena za rezistenciju među nekompatibilnim vrstama, što je klasičnim ukrštanjem do sada bilo nemoguće. Unos većeg broja gena doveo bi do ponovnog uspostavljanja polimorfizma među gajenim biljkama, što je inače ključni momenat u odbrani divlje (samonikle) populacije od patogena.

6.5. Transgene biljke i abiotički stresovi

Osim biotičkih faktora veliki problem u uzgoju kultura za ljudsku upotrebu predstavljaju i brojni abiotički faktori. Abiotički faktori se mogu podeliti u faktore primarnog i sekundarnog stresa (**Slika 6.9**). Faktori primarnog stresa su: temperatura (visoka i niska), svetlost, voda (suša i poplava), salinitet, teški metali, dok se pod sekundarnim stresom podrazumevaju osmotski i oksidativni stres. Ovi fizičko-hemijski faktori zajedno sa patogenima i štetocinima značajno doprinose smanjenju kvaliteta i prinosa hrane. Smanjenje prinosa usled dejstva abiotičkih faktora kreće se i do 50% i smatra se da će biti još veće sa klimatskim promenama koje se očekuju u budućnosti [70].

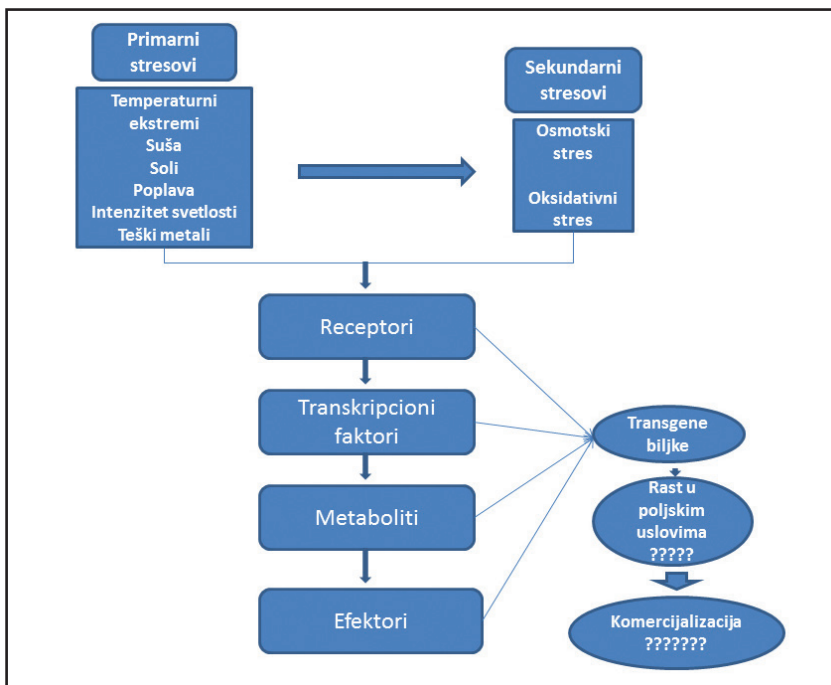
Jedan od glavnih pristupa u rešavanju problema negativnog delovanja abiotičkih stresova jeste dobijanje otpornih genotipova preko metoda klasične veštačke selekcije. Kako je otpornost biljaka na nepovoljne uslove sredine kompleksan fenomen, do sada je vrlo malo učinjeno u tom pogledu. Od sredine 80-tih godina 20. veka, paralelno sa tradicionalnim metodama koje se koriste za dobijanje useva sa povećanom otpornošću prema abiotičkim stresovima, radi se i na primeni metoda genetičkog inženjerstva. Međutim, nedostatak znanja o molekularnim mehanizmima koji leže u osnovi odbrane od abiotičkih faktora otežava njihovu primenu. Otpornost prema biotičkim faktorima uglavnom su monogenske osobine, dok je otpornost prema abiotičkim faktorima poligeniska osobina. Problem još više otežava činjenica da su biljke istovremeno izložene multiplim faktorima stresa. Tako da je napredak u dobijanju transgenih biljaka otpornih prema abiotičkim faktorima vrlo spor. Geni koji su korišćeni za dobijanje transgenih biljaka obezbeđivali su povećanu otpornost prema sredinskim stresovima uglavnom u laboratorijskim uslovima ili uslovima staklare. **Za sada postoji mali broj transgenih biljaka otpornih na abiotičke stresove koje se komercijalno gaje:** kukuruz otporan na sušu „Genuity® DroughtGard™“ (nosi *cspB* gen iz bakterije *Bacillus subtilis*), gaji se u SAD na većim površinama tek od 2018. godine, dok se soja „Verdeca HB4 Soybean“, takođe otporna na sušu (nosi transkripcioni faktor Hahb-4 poreklom iz *Helianthus annuus*), sporadično gaji u Argentini od 2015. godine, a u Brazilu i SAD od 2019. godine.

Zbog toga će se u ovom poglavlju govoriti više o nivoima na kojima se može delovati i genima koji predstavljaju potencijalne kandidate za dobijanje uspešnih transgenih biljaka. Postoji veliki broj gena kandidata za povećanje otpornosti prema abiotičkim stresovima. Oni se mogu podeliti u četiri grupe u zavisnosti od mesta delovanja. Tako razlikujemo gene čiji su produkti uključeni u percepciju signala samog stresora, gene koji ko-

diraju transkripcijske faktore, gene uključene u metaboličke puteve, kao i gene koji kodiraju proteinske faktore (Slika 6.9).

6.5.1. Receptori

Biljke poseduju sposobnost prilagođavanja abiotičkim stresovima, mada stepen njihovog prilagođavanja varira od vrste do vrste. Prilagođavanje je kontrolisano jednostavnim ili složenim signalnim putevima i započinje prijemom promenljivih spoljašnjih signala. Spoljašnji stimuli aktiviraju receptorne molekule i iniciraju kompleksnu signalnu mrežu koja vodi adekvatnom odgovoru. Endogeni stimuli, kao što su biljni hormoni, koordinišu i regulišu molekularne i biokemijske mehanizme koji obezbeđuje toleranciju prema stresu i usmeravaju celokupni rast i razvoj ka boljem preživljavanju.



Slika 6.9. Geni koji predstavljaju potencijalne kandidate za povećanje otpornosti prema abiotičkim faktorima mogu se naći na različitim nivoima signalnog puta aktiviranog nakon delovanja stresora na biljke

6.5.1.1. RLK receptori

Ključnu ulogu u prijemu i odgovoru na abiotički stres imaju receptori označeni kao **RLK** (eng.: „**R**eceptor-**L**ike **K**inases“). Ovu grupu receptora čine brojni proteini lokalizovani u ćelijskoj membrani sa Ser/Thr kinaznim domenom smeštenim u citosolu, koji pored odgovora na stres imaju ulogu i u procesu rastenja i razvića biljaka. Kod arabidopsisa je otkriveno oko 600 a kod pirinča čak oko 1000 homologih proteina koji se dalje klasifikuju na osnovu vanćelijske strukture [71]. Mnogi od RLK proteina okarakterisani su i određena je njihova uloga. Primeri nekih RLK receptora su dati u **Tabeli 6.4**.

Tabela 6.4. RLK receptori koji se aktiviraju kod arabidopsisa i pirinča u uslovi-
ma suše.

Pun naziv RLK receptora (eng.)	Skraćenica
<i>Arabidopsis thaliana</i>	
Receptor-like ProteinKinase1	RPK1
Proline-rich Extensin-like Receptor Kinase 4	PERK4
Guard Cell Hydrogen Peroxide Resistant 1	GHR1
Cysteine-rich Receptor-like Kinase 36	CRK36
Osmotic-stress-inducible Receptor-like Cytosolic Kinase 1	ARCK1
<i>Oryza sativa</i>	
Oryza sativa Stress-Induced Protein Kinase 1	OsSIK1
Oryza sativa Receptor-Like Cytosolic Kinase 253	OsRLCK253

Geni koji kodiraju ove receptore testirani su u transgenim biljkama. Transgene biljke u kojima je povećana ekspresija *RPK1* gena pokazuju povećanu otpornost na sušu i oksidativni stres [72], dok smanjenje ekspresije *CRK36* gena kod transgenih biljaka vodi ka povećanju osetljivosti na osmotski stres [73] što potvrđuje ulogu ovih receptora u kontroli signalnih puteva koji regulišu odgovor na odsustvo vode.

Overekspresija *OsSIK1* gena u transgenim biljkama pirinča vodi ka povećanoj otpornosti ka suši i stresu solima, dok gubitak funkcije ovog gena rezultira u povećanoj osetljivosti na oba tipa stresa [74]. Overekspresija *OsRLCK253* gena u transgenim biljkama *A. thaliana* ima isti efekat [75].

6.5.1.2. HK receptori

Druga familija receptora koja učestvuje u prijemu signala stresa i lokalizovana je u ćelijskoj membrani jeste familija **histidin-kinaza (HKs)**. Histidin-kinaze deo su dvokomponentnog sistema tzv. His-Asp fosforeleja. His-Asp fosforelej uključen je u odgovor na sušu, hladnoću i salinitet. Histidin-kinaze istovremeno su i receptori za hormone kao što su etilen i citokinini. Kod arabidopsisa ima osam gena koji kodiraju receptore ovog tipa. Ovi receptori omogućavaju komunikaciju između stresa i hormonske signalizacije u kojoj učestvuju etilen i citokinini. Tako CK receptori AHK2, AHK3 i AHK4 deluju kao negativni regulatori odgovora na abiotički stres, dok receptori za koje se ne vezuju CK (ATHK1/AHK1) imaju ulogu pozitivnog regulatora u odgovoru na osmotski stres. To potvrđuje i porast otpornosti prema ovom stresu kod transgenih biljaka *A. thaliana* koje imaju povećanu ekspresiju *AHK1* gena [76].

6.5.1.3. MAPK kinaze

Povećanje aktivnosti membranskih signalnih receptora, RLK i HK, preko genetičkog inženjerstva može imati pozitivan uticaj na toleranciju prema abiotičkom stresu menjajući aktivnost nizvodnih signalnih komponenti. Nizvodno od membranskih kinaza nalazi se kompleks **MAPK** kinaza (**Mitogen-Activated Protein Kinase**), čija je uloga amplifikacija signalnog odgovora [77]. Ove kinaze učestvuju u odgovorima biljaka na brojne stresove. Ekspresija *NPK1* gena (eng.: „**Nicotiana Protein Kinase 1**“) u transgenom kukuruzu obezbeđuje ovim biljkama povećanu otpornost na izmrzava-

nje [78], dok su komponente MAPK kaskade kod arabidopsisa: MEKK1 (MAPK kinase 1), MKK2, i MPK3/6 uključene u prenos signala tokom suše i hladnoće. I druge brojne kinaze uključene su u nizvodne signalne puteve.

Molekularna evolucija i divergencija receptora igra ključnu ulogu u definisanju raznovrsnosti odgovora na spoljašnje uslove. Ligandi koji se vezuju za ove receptore još su neidentifikovani. Potencijalni kandidati su hormoni, mali peptidi, hemijski molekuli i fizički stimuli. Otkriće spoljašnjih signala, kao i signalnih molekula, koji deluju nizvodno od membranskih receptora omogućiće uspostavljanje kompletne slike signalnih puteva i tako pružiti mogućnost za manipulaciju ovim putevima uz pomoć genetičkog inženjerstva, a sve u cilju postizanja povećane otpornosti biljaka prema stresnim faktorima.

6.5.2. Transkripcioni faktori

Odgovor i adaptacija biljaka na stresne uslove sredine rezultat je jednog kompleksnog mehanizma koji pored prenosa signala uključuje i regulaciju genske ekspresije. Transkripcioni faktori vrše regulaciju genske ekspresije i samim tim igraju značajnu ulogu u odgovoru na abiotičke stresove. Ovi proteini reprogramiraju ekspresiju gena osetljivih na abiotičke stresore interagujući sa *cis*-elementima u blizini gena.

6.5.2.1. DREB transkripcioni faktori

Najbolje izučena grupa transkripcionih faktora uključena u odgovor na abiotičke stresove, posebno u otpornost na sušu i hladnoću, jeste familija transkripcionih faktora **DREB** (eng.: „**DRE Binding proteins**“). U pitanju su proteini koji se vezuju za konzervativne elemente promotorskog regiona gena osetljivih na nepovoljne uslove sredine. Ovi elementi su označeni kao elementi osetljivi na sušu (eng.: „**Drought Responsive Element – DRE**“).

Overekspresija DREB1A transkripcionog faktora poreklom iz *Arabidopsis thaliana* dovela je do aktivacije velikog broja gena u uslovima odsustva stresa i omogućila mnogim transgenim usevima (pšenica, ječam, pirinač, itd.) istovremenu toleranciju prema suši, hladnoći i solima. Jedan od načina da se postigne povećana multitolerancija prema abiotičkim stresovima jeste kontrolisana ekspresija upravo DREB transkripcionih faktora, a kontrolisanu ekspresiju moguće je postići upotrebom odgovarajućih promotora.

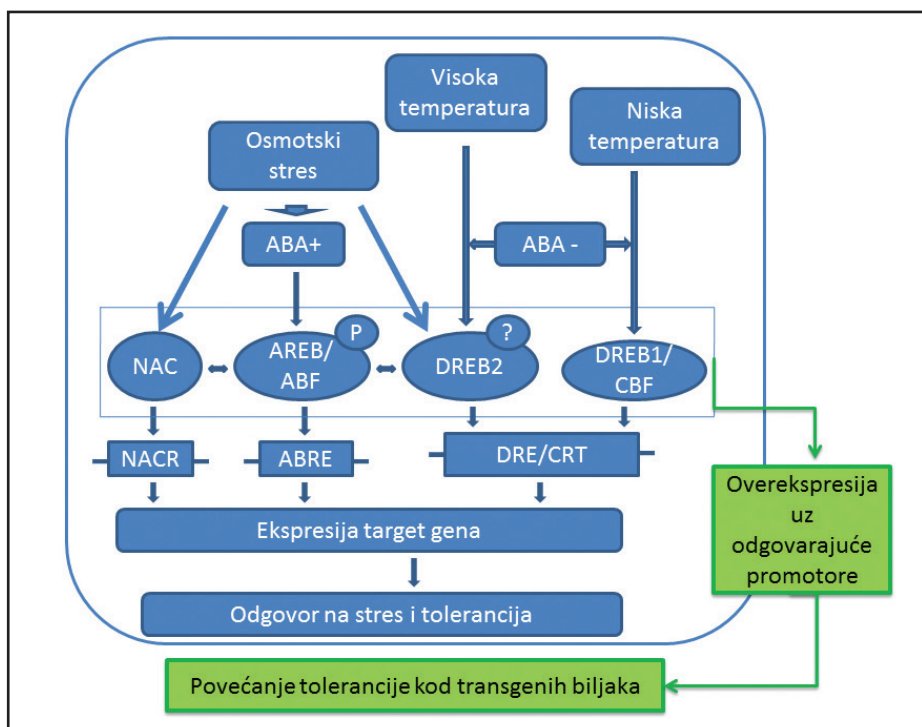
6.5.2.2. bZIP transkripcioni faktori

Dok DREB familija transkripcionih faktora deluje nezavisno od abscisinske kiseline (ABA), hormona čija se koncentracija u ćelijama povećava u uslovima vodnog deficita, transkripcioni faktori zavisni od ABA pripadaju klasi transkripcionih faktora **bZIP** (eng.: „basic leucine-**zip**per“). Ovi proteini vezuju se za gene koji u svom promotorskom regionu imaju motiv označen kao **ABRE** (eng.: „**ABA-Responsive Elements**“). Tri najpoznatija člana ove grupe su **AREB1** i **AREB2** (eng.: „**ABA-Responsive Binding Proteins 1 i 2**“) i **ABF3** (eng.: „**ABRE-Binding Factor 3**“), sva tri poreklom iz *Arabidopsis thaliana* gde deluju kao glavni transkripcioni faktori u uslovima abiotičkog stresa [79]. AREB/ABF proteini fizički interaguju sa DREB/CBF proteinima što ukazuje na postojanje međusobne povezanosti između ABA-zavisnog i ABA-nezavisnog signalnog puta [80].

6.5.2.3. NAC familija transkripcionih faktora

NAC familija transkripcionih faktora dobila je ime po početnim slovima tri proteina: **NAM** (eng.: „**No Apical Meristem**“), **ATAF1/2** i **CUC** (eng.: „**Cup-shaped Cotyledon**“), koji imaju sličan domen vezivanja za DNK. NAC familija je specifična za biljke i predstavlja jednu od najvećih transkripcionih familija kod biljaka. Uključena je u kontrolu brojnih procesa. Geni iz grupe **SNAC** (eng.: „**Stress-responsive NAC**“) imaju važnu ulogu u kontroli otpornosti prema abiotičkim faktorima. *SNAC* geni iz *A. thaliana* i pirinča

svojom aktivnošću povećavaju otpornost prema solima i suši [81]. Upotreba promotorskog regiona gena koji reaguju na stres poreklom iz pirinča uz *SNAC* gene omogućila je toleranciju prema stresu bez inhibitornog efekta na rast biljaka, dok je upotreba promotora sa specifičnom ekspresijom u korenu vezanom uz *SNAC* gene pirinča, omogućila povećanje tolerancije na abiotičke stresove kod transgenog pirinča gajenog u poljskim uslovima [82, 83]. To ukazuje da odgovarajući promotori specifični za koren ili stome vezani uz *SNAC* transkripcione faktore mogu da budu efikasno oružje za odbranu od abiotičkih stresova (**Slika 6.10**).



Slika 6.10. Geni koji kodiraju transkripcione faktore uključene u odgovor na sušu, uz upotrebu odgovarajućih promotora, predstavljaju vrlo značajne kandidate za dobijanje transgenih biljaka sa povećanom otpornošću prema stresu
ABA – abscisinska kiselina; NAC, AREB/ABF, DREB2, DREB1/CBF-transkripci-
oni faktori; NACR, ABRE, DRE/CRT-motivi u promotorskom regionu gena koje
prepoznaju transkripcijski faktori

6.5.2.4. MYB familija transkripcionih faktora

MYB (eng.: „Myeloblastosis“) proteine karakteriše visokokonzervativni region označen kao MYB domen koji se sastoji od četiri ponovka od po 52 aminokiseline, koji nisu potpuno identični i koji služe za vezivanje za DNK molekul. Broj MYB domena varira među proteinima. Većina MYB proteina ima ulogu transkripcionih faktora sa ključnim ulogama u regulaciji razvića, metabolizma, kao i u odbrani od biotičkih i abiotičkih stresova. Najbolje izučeni MYB proteini jesu proteini arabidopsisa koji učestvuju u regulaciji odgovora na sušu i osmotski stres. Međutim, overekspresija jednog od njih u transgenim biljkama *A. thaliana* rezultirala je patuljastim fenotipom transgenih biljaka [84].

Kod pšenice su identifikovana tri MYB proteina od kojih je *TaMYB2A* najreaktivniji i njegova overekspresija kod *A. thaliana* doprinela je povećanju multitolerancije prema abiotičkim stresovima, a nije imala negativan efekat na fenotip [85].

6.5.2.5. ERF transkripcioni faktori

ERF (eng.: „Ethylene Response Factors“) proteini važni su regulatori viška vode u slučaju poplave kod biljaka. Od 5 ERF proteina koji se sreću kod *A. thaliana*, četiri učestvuju u odgovoru na poplavu i hipoksiju. *SUB1A* je transkripcioni faktor iz ove grupe proteina zastupljen kod pirinča. Ovaj transkripcioni faktor takođe učestvuje u otpornosti na poplavu [86].

6.5.2.6. HSF transkripcioni faktori

Još jedna grupa transkripcionih faktora jesu **HSF** proteini (eng.: „Heat-Stress Transcription Factors“) koji se vezuju za palindromski motiv u promotorskom regionu gena osetljivih na visoke temperature (eng.: „Heat Shock Inducible Genes – **HS**“). *HSF1* i *HSF2* imaju ključnu ulogu u regulaciji aktivnosti svih ostalih HSF proteina u uslovima visoke temperature.

Geni koji kodiraju transkripcione faktore mogu biti veoma korisni u poboljšanju tolerancije prema stresu kod transgenih biljaka, iako je mehanizam njihovog delovanja u otpornosti na stres veoma složen.

6.5.3. Metaboliti

U uslovima abiotičkog stresa kod biljaka dolazi do sinteze brojnih metabolita, a sve u cilju zaštite ćelijskih komponenti od potencijalnog oštećenja. Najzastupljeniji metaboliti jesu prolin, manitol, trehaloza i glicin-betaïn. Geni koji kodiraju ključne enzime u biosintezi ovih metabolita među prvima su iskorišćeni za dobijanje transgenih biljaka. No, kao što je već ranije bilo rečeno, ovi geni su obezbeđivali povećanu otpornost prema sredinskim stresovima uglavnom kod transgenih biljaka gajenih u laboratorijskim uslovima ili uslovima staklare.

Akumulacija prolina regulisana je od strane dva gena koji kodiraju ključne enzime u biosintezi prolina: δ^1 -pirolin-5-karboksilat sintetaza i δ^1 -pirolin-5-karboksilat reduktaza. Overekspresija ovih gena u transgenim biljkama povećava njihovu toleranciju na uslove suše, uslove visoke temperature, saliniteta i hladnoće [87].

Manitol ima ulogu u regulaciji osmotskog potencijala ćelija. Nagomilavanje manitola u transgenim biljkama duvana i pšenice usled overekspresije gena koji kodira enzim manitol-1-fosfat dehidrogenazu poreklom iz *E. coli*, povećava toleranciju ovih biljaka na sušu i soli [88]. Akumulacija manitola dešava se i usled povećane ekspresije enzima manozo-6-fosfat reduktaze iz *Apium graveolens* u transgenim biljkama *A. thaliana*, što ovim biljkama obezbeđuje normalno funkcionisanje u uslovima slanog stresa [89].

Još jedan metabolit koji se akumulira u uslovima abiotičkih stresova je trehaloza. Trehaloza je redak saharid, koji se sreće kod bakterija,

gljiva i nekih biljaka otpornih na stresove. Ima ulogu signalnog molekula i istovremeno štiti ćelijske strukture u uslovima stresa. Akumulacija trehaloze u transgenim biljkama uz pomoć enzima trehalozo-6-fosfat sintetaze (TPS) i trehalozo-6-fosfat fosfataze (TPP) poreklom iz *E. coli*, kao i enzima TPS1 i TPS2 poreklom iz *Saccharomyces cerevisiae* obezbeđuje otpornost transgenih biljaka prema solima, suši i hladnoći.

Glicin-betain ima, takođe, značajnu ulogu u odbrani od abiotičkih stresora. Pokazano je da akumulacija glicin-betaina uz pomoć enzima holin dehidrogenaze poreklom iz *E. coli* i holin oksidaze poreklom iz *Arthrobacter globiformis*, koji prevode holin u glicin-betain, obezbeđuje transgenim biljkama povećanje otpornosti prema hladnoći i suši [90]. Šećerna trska sa holin dehidrogenazom poreklom iz *Rhizobium meliloti* je nedavno registrovana u Indoneziji kao transgeni varijetet otporan na sušu.

Biljni hormoni imaju vodeću ulogu u odbrani od abiotičkih stresova. Na prvom mestu je ABA, a zatim citokinini i brasinosteroidi, kao i etilen, jasmonska i salicilna kiselina. Brasinosteroidi su novi biotehnoški target za povećanje otpornosti prema stresu. Očekuje se otkriće uloge i drugih hormona u odbrani od stresa. Tolerancija prema abiotičkim stresovima zavisi od balansa biljnih hormona u samoj biljci koji je pak posledica kompleksne interakcije (pozitivne ili negativne) između različitih hormonskih signalnih puteva. Otkrivanje gena koji su povezani sa sintezom, metabolizmom i signalnom ulogom hormona umnogom će doprineti konstrukciji transgenih biljaka sa povećanom otpornošću prema abiotičkim stresorima. Glavni problem ostaje u kontroli primenjene doze i odgovora, s obzirom na to da je neophodno održavanje ravnoteže između pozitivnog efekta biljnih hormona na toleranciju prema stresu i negativnog efekta na rast i razvoj biljaka. Rešenje je upotreba specifičnih promotora koji bi omogućavali ekspresiju transgena na odgovarajućem razvojnom stupnju, u specifičnom tkivu ili organu i pri specifičnim uslovima sredine

što bi dovelo do stvaranja transgenih useva koji bi uz minimalne gubitke u prinosu rasli u različitim uslovima stresa.

6.5.4. Proteini efektori

Proteini efektori uključuju jonske pumpe i transportere, proteine toplotnog stresa i druge molekularne šaperone, kao i enzime uključene u detoksifikaciju ili popravku funkcija izmenjenih tokom abiotičkog stresa. Geni koji kodiraju za neke od ovih proteina su testirani kao kandidati za dobijanje transgenih biljaka sa povećanom otpornošću prema abiotičkim stresovima.

Najozbiljniji kandidati za dobijanje biljaka otpornih na stress su geni koji kodiraju acil-CoA-vezujuće proteine (eng.: „Acyl-CoA-Binding Proteins – **ACBPs**“) poreklom iz arabidopsisa. Ovi proteini su uključeni u međucelijski transport, zaštitu, i formiranje rezervi acil-CoA estera, koji imaju važnu ulogu kao intermedijeri i regulatori lipidnog metabolizma i ćelijske signalizacije. Overekspresija pojedinačnih gena iz ove familije značajno povećava otpornost prema raznim vrstama abiotičkih stresova, pa čak i prema biotičkim stresorima, što pruža jednu široku lepezu otpornosti transgenim biljkama [91].

6.5.5. Zaključak

Brojne studije koje se bave razvojem otpornosti prema abiotičkom stresu putem genetičkog inženjerstva su u toku. Za razliku od prethodnih koje su se bazirale na jednom transgenu, nove studije se okreću transformaciji sa više gena, bilo da su u pitanju signalni ili transkripcioni molekuli. Detaljnije upoznavanje signalnih puteva i uloge različitih gena tokom odgovora na abiotičke stresove doprineće nastajanju većeg broja uspešnih transgenih biljaka.

Sažetak

Zahvaljujući razvoju metoda rekombinovane DNK i razjašnjenju procesa prirodnog transfera gena iz bakterije *Agrobacterium tumefaciens* u biljke, započela je era genetičkog inženjerstva biljaka, tj. era unošenja gena poreklom iz drugih genoma u genom biljaka i dobijanje genetički modifikovanih (GM) biljaka. U toku proteklih trideset godina ogroman broj biljnih vrsta je transformisan velikim brojem različitih gena. Mnoge od ovih biljaka nisu ni izašle iz laboratorije, mnoge su još uvek na eksperimentalnim poljima. Samo određeni broj biljnih vrsta sa određenim tipom modifikacije je dobio dozvolu za komercijalnu proizvodnju i uspešno se gaji u mnogim zemljama širom sveta. To su pre svega genetički modifikovane biljke sa povećanom tolerancijom prema herbicidima. Najpoznatije i najzastupljenije od svih su transgene linije soje: „Roundup Ready“ transgena linija koja poseduje otpornost prema glifosatu i „LibertyLink“ transgena linija sa otpornošću prema fosfinotricinu.

Drugi tip modifikacija zastupljen na tržištu je otpornost prema insektima. Bt kukuruz i Bt pamuk su biljke koje pokazuju rezistenciju prema svojim najvećim štetočinama zahvaljujući unetim genima poreklom iz bakterije *Bacillus thuringiensis*, koji deluju na digestivni trakt insekata štetočina sa efikasnošću koja je približna efikasnosti hemijskih insekticida.

Treći tip uspešne modifikacije je otpornost prema virusima. Biljke papaje su uspešno transformisane genom za protein omotača virusa i na taj način zaštićene od uzročnika bolesti koji je pretio potpunom uništenju ove vrste. Najpoznatiji uzročnik bolesti papaja širom sveta je virus kružnih mrlja papaje.

Bez obzira na brojne kontroverze koje prate GM biljke, gajenje ovih biljaka, zajedno sa klasičnim kulturama, u uslovima konstantnog porasta

broja stanovnika ima velike prednosti. Gajenje GM biljaka otpornih prema herbicidima doprinosi smanjenju ukupnih troškova proizvodnje, dok se prednost Bt biljaka i virus-rezistentnih linija ogleda u direktnom povećanju prinosa.

Dobijanje transgenih biljaka sa povećanom otpornošću prema patogenima, kao i prema abiotičkim faktorima u novije vreme samo potvrđuje široke mogućnosti koje pruža tehnologija genetičkog inženjerstva biljaka.

Literatura 6

1. ISAAA Brief 2019-55: Global status of commercialized Biotech/GM Crops in 2019: Executive Summary: Biotech crops drive socio-economic development and sustainable environment in the new frontier. <http://www.isaaa.org>
2. Thompson A (2006) GM Crops: the impact and the potential. CSIRO Publishing, Australia.
3. Holt JS, Powles SB, Holtum JAM (1993) Mechanisms and agronomic aspects of herbicide resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 203-229.
4. Funke T, Han H, Healy-Fried ML, Fischer M, Schonbrunn E (2006) Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 13010-13015.
5. Hoerlein G (1994) Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology* 138: 73-145.
6. De Block M, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gossele V, Movva NR, Thompson C, Van Montagu M, Leemans J (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expressing of a detoxifying enzyme. *The EMBO Journal* 6: 2513-2518.

7. Nikolić R, Zdravković-Korać S, Ninković S, Dragičević M, Miljuš-Đukić J, Banović B, Bohanec B, Savić J, Mitić N (2013) Fertile transgenic *Lotus corniculatus* resistant to the non-selective herbicide phosphinothricin. *Annals of Applied Biology* 163: 475-493.
8. Brookes G, Barfoot P (2020) GM crop technology use 1996-2018: farm income and production impacts. *GM Crops & Food* 11: 242-261.
9. Powles SB, Yu Q (2010) Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annual Review of Plant Biology* 61: 317-347.
10. Wang W, Xia H, Yang X, Xu T, Si HJ, Cai XX, Wang F, Su J, Snow AA, Lu BR (2014) A novel 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase transgene for glyphosate resistance stimulates growth and fecundity in weedy rice (*Oryza sativa*) without herbicide. *New Phytologist* 202: 679-688.
11. Chrispeels MJ, Sadava DE (2003) *Plants, Genes and Crop Biotechnology*. Jones and Bartlett Publishers, Inc. USA.
12. Mitić N, Dmitrović S, Đorđević M, Zdravković-Korać S, Nikolić R, Raspor M, Đorđević T, Maksimović V, Živković S, Krstić-Milošević D, Stanišić M, Ninković S (2012) Use of *Chenopodium murale* L. transgenic hairy root *in vitro* culture system as a new tool for allelopathic assays. *Journal of Plant Physiology* 169: 1203-1211.
13. Dmitrović S, Mitić N, Budimir S, Janošević D, Živković S, Skorić M, Ninković S (2015) Morpho-histological and bioherbicidal evaluation of wild-type and transformed hairy roots of goosefoot. *South African Journal of Botany* 96: 53-61.
14. Ninković S, Miljuš-Đukić J, Radović S, Maksimović V, Lazarević J, Vinterhalter B, Nešković M, Smigočki A (2007) *Phytodecta fornicata* Brügge-mann resistance mediated by oryzacystatin II proteinase inhibitor transgene. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 91: 289-294.

15. Cingel A, Savić J, Vinterhalter B, Vinterhalter D, Kostić M, Šešlija Jovanović D, Smigočki A, Ninković S (2015) Growth and development of Colorado potato beetle larvae, *Leptinotarsa decemlineata*, on potato plants expressing the oryzacystatin II proteinase inhibitor. *Transgenic Research* 24: 729-740.
16. Cingel A, Savić J, Čosić T, Zdravković-Korać S, Momčilović I, Smigočki A, Ninković S (2014) Pyramiding rice cystatin *OCI* and *OCII* genes in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) for resistance to Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). *Euphytica* 198: 425-438.
17. Cingel A, Savić J, Lazarević J, Čosić T, Raspor M, Smigočki A, Ninković S (2017) Co-expression of the proteinase inhibitors oryzacystatin I and oryzacystatin II in transgenic potato alters Colorado potato beetle larval development. *Insect Science* 24: 768-780.
18. Cingel A, Savić J, Lazarević J, Čosić T, Raspor M, Smigočki A, Ninković S (2016) Extraordinary adaptive plasticity of Colorado potato beetle: „Ten-striped spearman“ in the era of biotechnological warfare. *International Journal of Molecular Sciences* 17: 1538.
19. Dunse KM, Stevens JA, Lay FT, Gaspar YM, Heath RL, Anderson MA (2010) Coexpression of potato type I and II proteinase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107: 15011-15015.
20. Meyer M, Huttenlocher F, Cedzich A, Procopio S, Stroeder J, Pau-Roblot C, Lequart-Pillion M, Pelloux J, Stintzi A, Schaller A (2016) The subtilisin-like protease SBT3 contributes to insect resistance in tomato. *Journal of Experimental Botany* 67: 4325-4338.
21. Hilder VA, Powell KS, Gatehouse AMR, Gatehouse JA, Gatehouse LN, Shi Y, Hamilton WDO, Meryweather A, Newell CA, Timas JC, Peumans WJ, van Damme E, Boulter D (1995) Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgenic Research* 4: 18-25.

22. Barton K, Whitely H, Yang NS (1987) *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiology* 85: 1103-1109.
23. Fischhoff DA, Bowdish KS, Perlak FJ, Marrone PG, MvCormick SM, Niedermeier JG, Dean DA, Kusano-Kretzmer K, Mayer EJ, Rochester DE, Rogers SG, Fraley RT (1987) Insect tolerant tomato plants. *Bio/Technology* 5: 807-812.
24. Vaeck M, Reynaerts A, Hoftey H, Jansen S, DeBeuckleer M, Dean C, Zabeau M, Van Montagu M, Leemans J (1987) Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 327: 33-37.
25. Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL, Fischhoff DA (1991) Modification of coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 3324-3328.
26. Perlak FJ, Stone TB, Muskopf YN, Petersen LJ, Parker GB, McPherson SA, Wyman J, Love S, Reed G, Biever D, Fischhoff DA (1993) Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Molecular Biology* 22: 313-321.
27. Koziel MG, Beland GL, Bowman C, Carozzi NB, Crenshaw R, Crossland L, Dawson J, Desai N, Hill M, Kadwell S, Launis K, Lewis K, Maddox D, McPherson K, Meghji MR, Merlin E, Rhodes R, Warren GW, Wright M, Evola SV (1993) Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology* 11: 194-200.
28. Perlak FJ, Deaton RW, Armstrong TA, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Fischhoff DA (1990) Insect-resistant cotton plants. *Bio/Technology* 8: 939-943.
29. Perlak FJ, Oppenhuizen M, Gustafson K, Voth R, Sivasupramaniam S, Herring D, Carey B, Ihring RA, Roberts JK (2001) Development and commercial use of Bollgard® cotton in the USA-early promises versus today's reality. *The Plant Journal* 27: 489-501.

30. Williams S, Friedrich L, Dincher S, Carozzi N, Kessmann H, Ward E, Ryals J (1993) Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expression in transgenic plants. *Bio/Technology* 7: 194-200.
31. McBride KE, Svab Z, Schaaf DJ, Hogan PS, Stalker DM, Maliga P (1995) Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplast leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Bio/Technology* 15: 362-365.
32. Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, Nye GJ, Craig JA, Koziel MG (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 5389-5394.
33. Kumar S, Chandra A, Pandey KC (2008) *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy. *Journal of Environmental Biology* 29: 641-653.
34. ISAAA 2018. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2018: Biotech Crops Continue to Help Meet the Challenges of Increased Population and Climate Change. ISAAA Brief No. 54. ISAAA: Ithaca, NY. <https://www.isaaa.org/>
35. Brookes G, Barfoot P (2010) Global impact of biotech crops: Environmental effects, 1996-2008. *AgBioForum* 13: 76-94. <http://www.agbioforum.org>
36. Hilbeck A, Baumgartner M, Fried MP, Bigler F (1998) Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environmental Entomology* 27: 480-487.
37. Pilcher CD, Obrycki JJ, Rice ME, Lewis LC (1997) Preimaginal development, survival, and field abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis* corn. *Environmental Entomology* 26: 446-454.

38. Marvier M, McCreedy C, Regetz J, Kareiva P (2007) A meta-analysis of effects of Bt cotton and maize on non-target invertebrates. *Science* 316: 1475-1477.
39. Tabashnik BE (1994) Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* 39: 47-79.
40. Shelton AM, Robertson JL, Tank JD, Perez C, Eigenbrode SD, Preisler HK, Wilsey WT, Cooley RJ (1993) Resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacilllls thuringiensis* subspecies in the field. *Journal of Economic Entomology* 86: 697-705.
41. Bagla P (2010) India. Hardy cotton-munching pests are latest blow to GM crops. *Science* 327: 1439.
42. Zhang H, Yin W, Zhao J, Jin L, Yang Y, Wu S, Tabashnik BE, Wu Y (2011) Early warning of cotton bollworm resistance associated with intensive planting of Bt cotton in China. *PLoS ONE* 6: e22874.
43. Tabashnik BE, Huang F, Ghimire MN, Leonard BR, Siegfried BD, Rangasamy M, Yang Y, Wu Y, Gahan LJ, Heckel DG, Bravo A, Soberón M (2011) Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. *Nature Biotechnology* 29: 1128-1131.
44. Cariere Y, Crickmore N, Tabashnik BE (2015) Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. *Nature Biotechnology* 33: 161-168.
45. Alstad DN, Andow DA(1995) Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science* 268: 1894-1896.
46. McGaughey WH, Gould F, Gelernter W (1998) Bt resistance management: a plan for reconciling the needs of the many stakeholders in Bt-based products. *Nature Biotechnology* 16: 144-146.
47. Tabashnik BE, Brevault T, Cariere Y (2013) Insect resistance to Bt crops: Lessons from the first bilion acres. *Nature Biotechnology* 31: 510-521.

48. Catchpole GS, Beckmann M, Enot DP, Mondhe M, Zywicki B, Taylor J, Hardy N, Smith A, King RD, KellDB, Fiehn O, Draper J (2005) Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 14458-14462.
49. Miller CJ, Carlson JR (2010) Regulation of odor receptor genes in trichoid sensilla of the *Drosophila* antenna. *Genetics* 186: 79-95.
50. Balique F, Lecoq H, Raoult D, Colson P (2015) Can plant viruses cross the kingdom border and be pathogenic to humans? *Viruses* 7: 2074-2098.
51. ten Houten JG, Quak F, van der Meer FA (1968) Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free plant material. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 74: 17-24.
52. Beachy RN, Loesch-Fries S, Tumer NE (1990) Coat-protein mediated resistance against virus infection. *Annual Review of Phytopathology* 28: 451-74.
53. To TK, Kim JM, Matsui A, Kurihara Y, Morosava T, Ishida J, Tanaka M, Endo T, Kakutani T, Toyoda T, Kimura H, Yokoyama S, Shinozaki K, Seki M (2011) *Arabidopsis* HDA6 regulates locus-directed heterochromatin silencing in cooperation with MET1. *PLoS Genetics* 7: e1002035.
54. Liu X, Yu CW, Duan J, Luo M, Wang K, Tian G, Cui Y, Wu K (2012) HDA6 directly interacts with DNA methyltransferase MET1 and maintains transposable element silencing in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 158: 119-129.
55. Feng J, Naiman DQ, Cooper B (2009) Coding DNA repeated throughout intergenic regions of the *Arabidopsis thaliana* genome: evolutionary footprints of RNA silencing. *Molecular BioSystems* 5: 1679-1687.

56. Kinkema M, Fan W, Dong X (2000) Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *The Plant Cell* 12: 2339-2350.
57. Gonsalves D (1998) Control of Papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Annual Review of Phytopathology* 36: 415-437.
58. Fermin G, Keith RC, Suzuki JY, Ferreira SA, Gaskill DA, Pitz KY, Manshardt RM, Gonsalves D, Tripathi S (2011) Allergenicity assessment of the Papaya ringspot virus coat protein expressed in transgenic Rainbow papaya. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 10006-10012.
59. Sztuba-Solińska J, Urbanowicz A, Figlerowicz M, Bujarski JJ (2011) RNA-RNA recombination in plant virus replication and evolution. *Annual Review of Phytopathology* 49: 415-443.
60. Prendeville HR, Pilson D (2009) Transgenic virus resistance in cultivated squash affects pollinator behavior. *Journal of Applied Ecology* 46: 1088-1096.
61. Kers JA, Cameron KDA, Joshy MV, Bukhalid RA, Morello JE, Wach MJ, Gibson DM, Loria R (2005) A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Molecular Microbiology* 55: 1025-33.
62. Lerat S, Simao-Beaunoir AM, Beaulieu C (2009) Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *Molecular Plant Pathology* 10: 579.
63. Slater A, Scott NW, Fowler MR (2008) *Plant Biotechnology: The Genetic Manipulation of Plants*. 2nd Edition. Oxford University Press, Oxford.
64. Bardin M, Nicot PC, Normand P, Lemaire JM (1997) Virulence variation and DNA polymorphism in *Sphaerotheca fuliginea*, causal agent of powdery mildew of cucurbitis. *European Journal of Plant Pathology* 103: 545-554.

65. Chrispeels MJ, Sadava DE (2003) *Plant, Genes and Crop Biotechnology*. Second Edition. Jones and Bartlett Publishers International, London.
66. Gozzo F, Faoro F (2013) Systemic Acquired Resistance (50 years after discovery): Moving from the lab to the field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 12437-12491.
67. Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
68. Veloso J, Garcia T, Bernal A, Diaz J (2014) New bricks on the wall of induced resistance: salicylic acid receptors and transgenerational priming. *European Journal of Plant Pathology* 138: 685-693.
69. Sarris PF, Duxbury Z, Huh SU, Ma Y, Segonzac C, Sklenar J, Derbyshire P, Cevik V, Rallapali G, Saucet SB, Wirthumeller L, Menke FLH, Sohn KH, Jones JDG (2015) A plant immune receptor detects pathogen effectors that target WRKY transcription factors. *Cell* 161: 1089-1100.
70. Chen MX, Lung S-C, Du Z-Y, Chye M-L (2014) Engineering plants tolerate abiotic stresses. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3: 81-87.
71. Osakabe Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran L-S P (2013) Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 64: 445-458.
72. Osakabe Y, Mizuno S, Tanaka H, Maruyama K, Osakabe K, Todaka D, Fujita Y, Kobayashi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) Overproduction of the membrane-bound receptor-like protein kinase 1, RPK1, enhances abiotic stress tolerance in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 285: 9190-9201.
73. Tanaka H, Osakabe Y, Katsura S, Mizuno S, Maruyama K, Kusakabe K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2012) Abiotic stress-inducible receptor-like kinases negatively control ABA signaling in Arabidopsis. *The Plant Journal* 70: 599-613.

74. Ouyang SQ, Liu YF, Liu P, Lei G, He SJ, Ma B, Zhang WK, Zhang JS, Chen SY (2010) Receptor-like kinase OsSIK1 improves drought and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa*) plants. *The Plant Journal* 62: 316–329.
75. Giri J, Vij S, Dansana PK, Tyagi AK (2011) Rice A20/AN1 zinc-finger containing stress-associated proteins (SAP1/11) and a receptor-like cytoplasmic kinase (OsRLCK253) interact via A20 zinc-finger and confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *New Phytologist* 191: 721–732.
76. Tran LS, Urao T, Qin F, Maruyama K, Kakimoto T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 20623–20628.
77. Rodriguez MC, Petersen M, Mundy J (2010) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 61: 621–649.
78. Shou H, Bordallo P, Fan JB, Yeakley JM, Bibikova M, Sheen J, Wang K (2004) Expression of an active tobacco mitogen-activated protein kinase enhances freezing tolerance in transgenic maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 3298–3303.
79. Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2014) The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold and heat. *Frontiers in Plant Science* 5: 170.
80. Lee SJ, Kang JY, Park HJ, Kim MD, Bae MS, Choi HI, Kim SY (2010) DREB2C interacts with ABF2, a bZIP protein regulating abscisic acid-responsive gene expression, and its overexpression affects abscisic acid sensitivity. *Plant Physiology* 153: 716–727.

81. Gujjar RS, Akhtar M, Singh M (2014) Transcription factors in abiotic stress tolerance. *Indian Journal of Plant Physiology* 19: 306–316.
82. Jeong JS, Kim YS, Baek KH, Jung H, Ha SH, Choi YD, Kim M, Reuzeau C, Kim J-K (2010) Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant Physiology* 153: 185–197.
83. Jeong JS, Kim YS, Redillas MC, Jang G, Jung H, Bang SW, Choi YD, Ha SH, Reuzeau C, Kim J-K (2013) *OsNAC5* overexpression enlarges root diameter in rice plants leading to enhanced drought tolerance and increased grain yield in the field. *Plant Biotechnology Journal* 11: 101–114.
84. Lippold F, Sanchez DH, Musialak M, Schlereth A, Scheible WR, Hinch DK, Udvardi MK (2009) *AtMyb41* regulates transcriptional and metabolic signaling responses to osmotic stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 149: 1761–1772.
85. Mao X, Jia D, Li A, Zhang H, Tian S, Zhang X, Jia J, Jing R (2011) Transgenic expression of *TaMYB2A* confers enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in *Arabidopsis*. *Functional & Integrative Genomics* 11: 445–465.
86. Xu K, Xu X, Fukao T, Canlas P, Maghirang-Rodriguez R, Heuer S, Ismail AM, Bailey-Serres J, Ronald PC, Mackill DJ (2006) *Sub1A* is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* 442: 705–708.
87. Vinocur B, Altman A (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 123–132.
88. Abebe T, Guenzi AC, Martin B, Cushman JC (2003) Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology* 131: 1748–1755.

89. Sickler CM, Edwards GE, Kirats O, Gao Z, Wayne L (2007) Response of mannitol-producing *Arabidopsis thaliana* to abiotic stress. *Functional Plant Biology* 34: 382-391.
90. Kar PK, Shaw BP (2013) Differential expression of choline monoxygenase transcript determines the plant to be glycine betaine accumulator or non-accumulator. *Development* 3: 383–386.
91. He M, He C-Q, Ding N-Z (2018) Abiotic stresses: General defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. *Frontiers in Plant Science* 9: 1771.

Povećanje prinosa gajenih biljaka i poboljšanje kvaliteta biljnih proizvoda

Mirjana Nešković

Biljke žive u različitim delovima sveta u različitim klimatskim uslovima koji su vrlo često nepovoljni i smanjuju njihov prinos. Prinos je u velikoj meri zavisao od genotipa, što podrazumeva postojanje individualne genetičke varijabilnosti unutar populacije i vrste. Na visinu amplituda oko prosečnog prinosa bilo kog genotipa utiču brojni spoljašnji činioci. Traganje za genotipovima koji su sposobni da i pod nepovoljnim uslovima održe relativno visok prinos bilo je donedavno glavni cilj selekcionera u poljoprivredi. Savremene biotehnoške metode, nastavljajući taj trend, razvijaju se sa svrhom da se genotip promeni, putem unošenja gena koji tu sposobnost povećavaju. Modifikacije koje su usmerene na povećanje usvajanja CO₂ i smanjenje utroška vode opisane su u prvom delu ovog poglavlja.

Kvalitet biljnih proizvoda koji se koriste u ishrani čoveka i domaćih životinja takođe zavisi od genotipa. Današnje poljoprivredne biljke proizašle su iz milenijumskog empirijskog odabiranja ili kao rezultat smišljenog ukrštanja i selekcije, koju obavljaju savremeni genetičari. Biotehnologija i genetičko inženjerstvo predstavljaju deo i nastavak tih istraživanja, ostvarujući rezultate do kojih se ne može doći klasičnim metodama. U drugom delu ovog poglavlja govori se o genetičkim

modifikacijama gena za sintezu proteina, ulja, ugljenih hidrata, vitamina i drugih sastojaka hrane, sa ciljem da se oni bolje prilagode potrebama i zdravstvenim problemima današnjeg čoveka.

7.1. Povećanje prinosa: odnos fotosinteze i transpiracije

Produktivnost biljaka se procenjuje na osnovu usvojenog CO_2 koji je ugrađen u organske supstance, a u odnosu na količinu vode koja je u istom periodu isparila iz biljke u transpiraciji. Prema tome, produktivnost odražava odnos između fotosinteze i transpiracije. Ugljen-dioksid ulazi u listove kroz stome – pore na njihovoj površini, a vodena para – takođe kroz stome – izlazi iz listova. Iz toga je jasno da su fotosinteza i transpiracija u antagonističkom odnosu: da bi se smanjio gubitak vode, stome se manje ili više zatvaraju, ali se time smanjuje i fotosinteza. Nedovoljna koncentracija CO_2 u listu jeste prvi uzrok ograničavanja fotosinteze. Biotehnološki pristup rešenju ove kontroverzne situacije razvija se u dva pravca. Prvi čine raznovrsni pokušaji da se održi visok nivo fotosinteze i pod sniženom koncentracijom CO_2 u intercelularima lista, a drugi da se poveća tolerancija ostalih metaboličkih procesa u listu prema gubitku vode. Cilj prvog dela ovog poglavlja jeste da izloži rezultate dosadašnjih eksperimenata, usmerenih na povećanje efikasnosti usvajanja CO_2 , kao i na bolje snabdevanje vodom.

7.1.1. Da li se može povećati efikasnost apsorpcije CO_2 ?

Naslov o ovom problemu sa znakom pitanja znači da je problem uočen i da su mu posvećena odgovarajuća istraživanja, ali da je još neizvesno da li će postignuti pozitivni rezultati biti prihvatljivi za primenu u poljoprivrednoj praksi. Kao što je već ranije izloženo, CO_2 se iz atmosfere, odnosno iz međucelijskih prostora (intercelulara) lista, uključuje u organske supstance

procesom **karboksilacije**. Kod biljaka postoje dva enzima – **karboksilaze**, koji taj proces obavljaju. To su **Rubisco** enzim, ili ribuloza–1,5-bisfosfatna karboksilaza/oksigenaza i **PEPC** ili fosfoenolpiruvatna karboksilaza. Po tome koji enzim obavlja primarnu karboksilaciju, razlikuju se **C3** (Rubisco) i **C4** (PEPC) biljke. Od ove dve karboksilaze, Rubisco ima daleko slabiju efikasnost. Eventualna poboljšanja asimilacije CO₂ usmerena su u dva pravca: ka povećanju aktivnosti Rubisco, ili, alternativno, ka nalaženju načina da se PEPC i drugi efikasni enzimi C4 puta uključe u C3 biljke (videti Poglavlje 4).

7.1.1.1. Za aktivniji Rubisco enzim

Da bi se moglo prići poboljšanju funkcije Rubisco, bilo je potrebno najpre dobro upoznati strukturu i način delovanja ovog enzima, u čemu su u poslednjoj deceniji postignuti značajni rezultati. Rubisco se nalazi u hloroplastima i čini oko 30-50% svih rastvorljivih proteina lista. Njegova molekulska masa iznosi 560 kDa, a enzim se sastoji od osam malih i osam velikih polipeptidnih subjedinica. Informacija za osam malih subjedinica nalazi se u jedarnom genomu (*rbcS* gen); protein se sintetiše u citoplazmi i zatim prenosi u hloroplaste. S druge strane, genetička informacija za osam velikih subjedinica locirana je u genomu hloroplasta (*rbcL* gen). Male i velike subjedinice se, u stromi hloroplasta, uz pomoć posebnih proteina – šaperonina, sjedinjuju u strukturu koja predstavlja S₈L₈ holoenzim. Između dve velike subjedinice nalazi se aktivni centar enzima, na koji deluju različiti aktivatori ili inhibitori. Sam aktivni centar obavlja dve reakcije na istom supstratu, tj. na ribulozi–1,5-bisfosfatu: **karboksilaciju RuBP**, u kojoj se CO₂ vezuje za supstrat, i **oksidaciju RuBP**, u kojoj se supstrat oksiduje pomoću O₂ (videti Poglavlje 4).

Rubisco je jedan od najmanje aktivnih enzima u biljkama. Prvi razlog je njegova nespecifičnost, jer deluje na dva supstrata (CO_2 i O_2). Dejstva na jedan ili drugi supstrat uzajamno su isključiva. Drugo, bez obzira na supstrat, Rubisco je spor enzim; on je podložan regulaciji mnogih drugih činilaca, kao što je **Rubisco aktivaza**. Enzim aktivaza uklanja izvesne inhibitore koji ometaju dejstvo Rubisco. Pošto aktivnost Rubisco enzima određuje količinu fotosintetičkih proizvoda, smanjenje fotorespiracije, tj. smanjenje afiniteta Rubisco prema O_2 u korist CO_2 , predstavlja jedan od značajnih ciljeva koji stoje pred biotehnologijom. Aktivni centar Rubisco je meta za moguće genetičke manipulacije. Još jedna osobina Rubisco ima značaj za biljke. Pošto Rubisco ima nisku aktivnost, biljke su tokom evolucije prilagođene da njegovu masu enormno povećaju. On je tako jedan od najobilnijih proteina generalno, i biljke u njegovu sintezu investiraju znatnu količinu materijala, naročito azota.

Dostignuća u biotehnologiji koja čine osnovu za poboljšanje rada Rubisco jesu sledeća [1, 2, 3]:

- Pomoću X-zraka definitivno je utvrđena trodimenzionalna struktura celog molekula Rubisco. Modeli Rubisco enzima viših biljaka među sobom su skoro identični („ S_8L_8 holoenzim“). Funkcionalne jedinice strukture jesu četiri para velikih subjedinica, koji su na krajevima spojeni malim subjedinicama. Aktivni centar se nalazi između dve velike subjedinice; C-terminalni deo velike subjedinice, koji je označen kao region 6, od vitalnog je značaja za specifičnost vezivanja CO_2 ili O_2 . U njemu je ključna aminokiselina valin 331; kad se on zameni alaninom, faktor specifičnosti opada za oko 40%. Još nekoliko aminokiselina na bližim i daljim mestima je sa različitom efikasnošću uključeno u ovaj proces. Dirigovanim mutacijama ovih aminokiselina faktor specifičnosti se može promeniti. Povećanje ovog faktora je od interesa, jer se time povećava i afinitet prema CO_2 u odnosu na afinitet prema O_2 .

Pretpostavlja se da bi taj postupak smanjio fotorespiraciju i povećao fotosintetički prinos.

- Postoji prirodna varijabilnost među različitim biljkama u katalitičkim svojstvima Rubisco. Pre svega, kod nekih dinoflagelata i fotosintetičkih bakterija, Rubisco nije izgrađen od 16 (8+8) subjedinica; *Rhodospirillum rubrum* npr. ima samo dve velike subjedinice u sastavu Rubisco. Putem genetičkih modifikacija, moguće je na razne načine kombinovati holoenzim Rubisco. Razume se, to je lakše ostvarljivo kod prokariota. No dobijena je hibridna varijanta Rubisco, u kojoj je mala subjedinica graška prenetu u genom arabidopsisa; međutim, hibridni Rubisco nije dostigao aktivnost enzima arabidopsisa [4]. U drugom eksperimentu, ipak, hibridni Rubisco, sastavljen od velikih subjedinica suncokreta i malih subjedinica duvana [5] bio je katalitički aktivan. Zatim, gen za veliku subjedinicu može se preneti u jedro, a gen za malu u hloroplaste, što je postignuto kada je postala moguća transformacija hloroplasta. Ovakvi ogleđi ukazuju na mogućnost da se različitim kombinacijama subjedinica izgradi efikasniji holoenzim.
- Kao što je već rečeno, Rubisco je kod biljaka jedan od najobilnijih proteina i biljke pri njegovoj sintezi troše mnogo materijala, naročito azota. To je svakako jedan od razloga zbog kojih nedostatak azota smanjuje fotosintezu. Koliko je štednja azota za biljke važna, vidi se i po tome što se u toku starenja lišća, pre opadanja, proteini (među kojima Rubisco čini do 50%!) razgrađuju i njihovi sastojci se prenose u delove biljke koji prezimljuju. Međutim, primeri algi pokazuju da Rubisco ne mora biti suviše veliki, da bi bio funkcionalan. Osim toga, kod C₄ biljaka, kod kojih se Rubisco nalazi u ćelijama sare provodnog snopića, okružen višom koncentracijom CO₂ (videti Poglavlje 4), on je za 1/3 do 1/4 manji protein nego kod C₃ biljaka; to ne utiče na fotosintezu, ali smanjuje potrebu za azotom. Stoga postoje pokušaji

da se smanji veličina molekula Rubisco pomoću transformacije gena za veliku subjedinicu, iz kojega bi se pri sintezi izostavili oni delovi polipeptida koji za funkciju nisu esencijalni.

- Pošto je aktivnost Rubisco regulisana aktivazom i nizom drugih enzima koji manje ili više direktno utiču i na aktivazu, u tom pravcu se otvaraju nove mogućnosti za poboljšanje aktivnosti i sintezu „boljeg“ Rubisco enzima.

Nekoliko navedenih pravaca u pokušajima za sintezu boljeg enzima još nisu doveli do njegovog konkretnog poboljšanja. Ipak, oni predstavljaju dobru i realnu osnovu za relativno brzo ostvarenje pozitivnih rezultata. Svi istraživači koji se ovim problemima bave, izražavaju visok optimizam i uverenje da će u bliskoj budućnosti poboljšanje efikasnosti Rubisco biti ostvarljiv zadatak.

7.1.1.2. Uvođenje C4 enzima u C3 biljke

Činjenica da su se tokom evolucije fotosintetičkog procesa pojavile biljne vrste (C4) koje poseduju efikasnije enzime za asimilaciju CO₂ od dotadašnjih (C3) vrsta, navela je mnoge naučnike na ideju da te enzime prenesu u C3 biljke i da ih u njima aktiviraju. Pomoću metoda rekombinovane DNK takve ideje su postale ostvarljive [6]. Olakšavajuća okolnost je u tome što se C3 i C4 biljke među sobom ne razlikuju po genima koje sadrže, nego po njihovoj regulaciji (videti Poglavlje 4). U C4 fotosintezi učestvuje znatan broj enzima koji u C3 procesima nemaju značajnu ulogu, ali postoje; upravo tim enzimima je posvećena najveća pažnja u genetičkom inženjerstvu. Među njima su najinteresantniji sledeći:

- **PEPC, fosfoenolpiruvatna karboksilaza**, koja CO₂, odnosno bikarbonatni jon HCO₃⁻, vezuje za fosfoenolpiruvat. To je **ulazna reakcija** za CO₂, a PEPC je **početni** enzim u C4 ciklusu. Krajnji produkti njegovog

dejstva su malat ili aspartat. Ovaj enzim je lociran u mezofilnim ćelijama, i to u hloroplastima malatnih, a u citoplazmi aspartatnih biljaka.

- **NADP-ME i NAD-ME** su dekarboksilaze, ili jabučni enzimi, vezani za NADP, odnosno NAD. Oni dekarboksilišu C4 kiseline i ponovo oslobađaju CO₂, koji ulazi u C3 Kalvinov ciklus. Glavna funkcija ovih enzima je koncentrisanje CO₂; stoga se oni nalaze u istom odeljku u kome je i Rubisco.
- **PPDK, fosfoenolpiruvatna dikinaza**, enzim koji fosforilacijom piruvata proizvodi fosfoenolpiruvat, koji je inicijalni akceptor za CO₂. To je **završni** enzim u C4 ciklusu; pošto proizvodi supstrat za narednu karboksilaciju, on je neophodan za konstantno održavanje ciklusa. Ovaj enzim je lociran u mezofilnim ćelijama, i to u hloroplastu malatnih, ali u citoplazmi aspartatnih biljaka.

Između početne i krajnje reakcije C4 ciklusa aktivan je znatan broj drugih enzima koji su lokalizovani u mezofilnim, ili u ćelijama omotača provodnog snopića i raspodeljeni su između hloroplasta, mitohondrija i citoplazme ovih ćelija. Ceo kompleks enzima, zajedno sa specifično diferenciranim ćelijama lista, poznat je kao **C4 sindrom** i opisan detaljnije u Poglavlju 4. Neki od tih enzima su sa manje ili više uspeha preneti u C3 biljke. Ovde će biti izloženi rezultati koji se odnose samo na dva od njih, na PEPC i PPDK.

- Geni koji kodiraju PEPC i PPDK izolovani su kao cDNK kopije odgovarajućih gena kukuruza; njima je pridodat neki od promotora gena za proteinske nosače hlorofila a i b, ili za veliku subjedinicu *RbcL* iz biljaka domaćina. Ovi konstrukti su uvedeni pomoću sojeva *Agrobacterium* u duvan ili krompir. Kao rezultat dejstva PEPC, povećana je karboksilacija PEP u listovima duvana i krompira, od dva do pet puta u odnosu na netransformisane biljke. Taj nivo karboksilacije bio je, međutim, daleko

niži nego u kukuruзу, u kome isti enzim efikasno deluje u C4 ciklusu. Slično neznatno povećanje dejstva zapaženo je i u slučaju drugih enzima [6]. Ipak, ovi rezultati potvrdili su dve stvari: prvo, da se geni C4 biljke mogu preneti u genom C3 biljaka gde učestvuju u transkripciji i translaciji, ne ometajući fotosintezu domaćina. Drugo, novi enzimi, koji su pri sintezi dobili tranzitni peptid, upućuju se na pravilan način u ćelijske kompartmente biljke domaćina i tamo se eksprimiraju.

- C3 biljke kod kojih je zapažena povećana karboksilacija PEP posle unošenja gena za PEP karboksilazu, proizvele su i povećanu koncentraciju malata (jabučne kiseline). Ipak, CO₂, koji se preko malata oslobađa u transgenim ćelijama ne uključuje se u Kalvinov ciklus; porast CO₂ nije dovoljno veliki da bi povećao fotosintezu, niti da bi smanjio fotorespiraciju. Umesto toga, malat se koristi za razne druge (anaplerotične) reakcije, koje su uobičajene u C3, kao i u C4 ćelijama. On, pre svega, dopunjuje rezerve malata koji ulazi u ciklus limunske kiseline; stoga je u nekim slučajevima zapaženo čak pojačanje disanja, umesto fotosinteze! Malat ima još nekoliko važnih funkcija u organizmu. On je prateći anjon pri transportu kalijumovih jona kroz ćelijske membrane, npr. u stominim i nekim drugim ćelijama, učestvuje u regulaciji pH citoplazme, u transportu jona, sazrevanju plodova i dr. Transgene biljke ga koriste za sve ove funkcije, ali ne i za povećanje fotosinteze.
- U nešto drugačijim eksperimentima transformisan je pirinač, ali ne sa konstruktom cDNK i stranim promotorima, nego sa intaktnim genima kukuruza za PEPC i PPDK. Intaktni geni su sadržali originalne promotore, kao i sve introne i egzone [7]. Autori su pošli od ideje da su C4 geni evoluirali od svojih C3 prekursora time što su stekli nove *cis*-elemente (videti Poglavlje 3), i to u ćelijama u kojima su potrebni *trans*-faktori već postojali. Prema tome, u C3 ćelije je samo trebalo uvesti te nove *cis*-sekvence, da bi geni funkcionisali kao u C4 ćelijama. Ta je

pretpostavka bila tačna. Većina transgenih biljaka pirinča, koje su dobile intaktni gen kukuruza za PEPC, imala je PEPC aktivnost čak 2-3 puta višu nego kukuruz, a od 30 do 100 puta višu nego netransformisani pirinač. Enzim je po količini dostigao 12% nivoa ukupnih rastvorljivih proteina lista. Za razliku od toga, intaktni gen kukuruza prenet u duvan, nije pokazao takvu povišenu aktivnost, verovatno usled nedostatka odgovarajućih *trans*-faktora. U slučaju gena za PPDK pokazano je da su introni i nekodirajuće sekvence C4 gena neophodni za stabilnost transkripta [8]. Rezultati ovih eksperimenata pokazuju da više činilaca učestvuje u transkripciji C4 gena u C3 ćeliji, koji u C3 biljkama nedostaju. Moguće je da biljke, među kojima je transfer gena uspešan, moraju biti filogenetski srodne, kao pirinač i kukuruz. Možda C4 i C3 gen treba da budu ortologni geni, tj. da potiču od istog zajedničkog pretka, s tim što je jedan od njih (C4) kasnije evoluirao. To znači da bi i za C3 dikotile trebalo koristiti bliskog C4 srodnika za prenos gena, što je pokazano za neke vrste *Flaveria*. Očevidno je to ograničenje za genetičke modifikacije, ali možda i put koji je za sada ostvarljiv [8].

- Znatne teškoće koje su iskrsele pri pokušajima prenosa C4 gena u C3 biljke mogle su se i očekivati. Dimorfizam ćelija u C4 listu i dimorfizam hloroplasta u njima predstavljaju smetnju koju nije lako otkloniti. Za sada se malo zna o tome kako nastaje strukturni dimorfizam i dugo se smatralo da C4 ciklus bez kompartmentacije nije moguć. Za poslednjih desetak godina ova su shvatanja promenjena, pošto je otkriveno više različitih vrsta kod kojih se ceo C4 ciklus dešava u istoj ćeliji [9, 10]. Najbolje su te pojave proučene kod izvesnih vrsta submerznih vodenih biljaka, kao što je *Hydrilla verticillata* i kod kopnenih biljaka kao *Borszczowia aralocaspica*, koje naseljavaju Srednjoazijsku pustinju. Vodene biljke kao *H. verticillata* pripadaju familiji Hydrocharitaceae i označene su kao fakultativne C4 biljke [11]. Pod povoljnim uslovima one žive kao C3

biljke, ali se pri nedostatku CO_2 u prirodi, a takođe i u laboratorijskim uslovima, u njima za oko 12 dana indukuje C4 ciklus. Tada se za oko 10-16 puta stimuliše sinteza C4 enzima, PEPC, PPDK i NADP-ME. PEPC obavlja karboksilaciju u citoplazmi, a zatim se malat prenosi u hloroplast, u kome se oslobađa CO_2 i pomoću Rubisco ulazi u Kalvinov ciklus. Kompartimentacija, prema tome i ovde postoji, ali je ostvarena između citoplazme i hloroplasta iste ćelije. Za razliku od toga, *B. aralocaspica* i druge biljke, koje pripadaju familiji Chenopodiaceae, imaju u istoj ćeliji funkcionalno različite hloroplaste, koji su lokalizovani u različitim delovima ćelije, a povezani su među sobom citoplazmatičnim nitima. U hloroplastima distalnog dela, koji je u kontaktu sa intercelularima, obavlja se karboksilacija i fosforilacija PEP pomoću PPDK; taj kompartment, prema tome, funkcioniše ekvivalentno mezofilnoj ćeliji C4 biljaka. Hloroplasti proksimalnog dela sadrže Rubisco i fiksiraju oslobođeni CO_2 , kao u ćeliji omotača provodnog snopića. Ovi nalazi mogu imati značajne evolucione implikacije. Familija vodenih Hydrocharitaceae evoluciono je vrlo stara; njeni ostaci pronađeni su oko 40.000 miliona godina pre prvih C4 monokotila. Pretpostavlja se da bi ona mogla biti prethodnik savremenih biljaka sa C4 ciklusom, kao i da takvih neotkrivenih biljaka ima znatno više u današnjoj flori. Sama činjenica da je moguć opstanak C4 ciklusa bez ćelijskog dimorfizma možda ukazuje na nove puteve kojima bi se moglo ostvariti povećanje fotosinteze putem prenosa efikasnijih C4 enzima u C3 biljke.

7.1.2. Da li se može poboljšati snabdevanje vodom?

Visok prinos gajenih biljaka je u najvećoj meri ugrožen nedostatkom vode. To se može reći ne samo za predele na Zemlji koji imaju malu godišnju količinu padavina ili izrazito sušna godišnja doba, nego i za predele sa umerenom klimom koji u proseku ne oskudevaju u vodi, ali u kojima su

česti, čak i svakodnevni, sušni uslovi. Biljke su prilagođene da na raznovrsne načine preživljavaju pod takvim uslovima. Mnoge od njih imaju morfološke i anatomske osobine koje smanjuju transpiraciju, druge su razvile fiziološke i biohemijske mehanizme koji povećavaju njihovu toleranciju prema gubitku vode. Morfološke osobine **kserofita** – biljaka otpornih prema suši, karakteristične su za pojedine vrste i samo su delimično zavisne od spoljašnjih činilaca. No pošto su to složene razvojne osobine, odgajivači ne mogu mnogo da utiču na njih. Međutim, pojedine fiziološke osobine, koje zavise od ekspresije specifičnih gena, mogu da budu u znatnoj meri modifikovane, a da se spoljašnja morfologija biljke mnogo ne izmeni. Takve osobine su u fokusu biotehnoških istraživanja. One su ugrađene u mehanizme pomoću kojih biljke savlađuju dnevni nedostatak vode, što im omogućava da i pored vodnog deficita obavljaju normalno sve svoje funkcije, ili se bar relativno brzo oporave od posledica suše. Ti mehanizmi obuhvataju uglavnom povećanje apsorpcije i transporta vode kroz biljku, kao i savladavanje štetnih posledica formiranja reaktivnih vrsta kiseonika, koje se izgrađuju u listovima ubrzo posle zatvaranja stoma.

Dugotrajni efekti suše razlikuju se od kratkotrajnih; dugotrajna suša se razvija postepeno i obično nije izazvana samo nedostatkom vode, nego i dejstvom drugih faktora, kao što su visoka ili niska temperatura i zasoljenost zemljišta. U prirodi biljke reaguju istovremeno prema kompleksu svih faktora, pomoću odbrambenih mehanizama koji su slični ili zajednički za dva ili više faktora (videti Poglavlje 6).

7.1.2.1. Transport vode kroz biljku – akvaporini

Biljke su najveći provodnici vode iz zemljišta u atmosferu. Na putu zemljište–biljka–atmosfera kretanje vode je regulisano razlikama u hidrauličnom pritisku na početku i na kraju puta i gradijentom vodnog potencijala među ćelijama. Voda prolazi kroz dva tipa biljnih tkiva: ona ulazi u jed-

noćelijske dlačice blizu vrha korena, zatim prolazi kroz niz živih ćelija do ksilemskih elemenata u provodnim snopićima. U listovima voda izlazi iz ksilema, prolazi kroz više živih ćelija u listu, dok ne stigne do stoma, kroz koje se kao vodena para otpušta u okolinu. Zbog karaktera tkiva na tom putu, sile koje pokreću vodu uvis nužno su različite. Isparavanje na površini lista povlači vodenu nit naviše, a vrlo jaka kohezija među molekulima vode sprečava da se ta vodena nit prekine, što čini fizičku komponentu transpiracije. Biološku komponentu čini transport vode kroz žive ćelije korena i lista. Transport vode kroz koren regulisan je razlikom u vodnom potencijalu vodenog rastvora u zemljištu, gde je on visok, i ćelija sa niskim vodnim potencijalom, koje okružuju ksilemske elemente. Voda u tom delu korena može proći kroz apoplast, koji čine ćelijski zidovi, ali se zbog nepropustljivosti zidova endoderma mora kretati i kroz simplast. U svakoj ćeliji voda mora da prođe dvaput kroz ćelijsku membranu, na ulazu i na izlazu. Višak prolazne vode se ne akumulira u citoplazmi, nego u vakuoli. To znači da voda dvaput prolazi i kroz tonoplast, membranu oko vakuole. Ćelijske membrane su vrlo propustljive za vodu, iako je lipofilnost membrane (videti Poglavlje 1) inače prepreka za slobodnu difuziju svih hidrofilnih molekula. Izuzetak je voda, jer sve biljne membrane (kao i životinjske) sadrže posebne proteine – **akvaporine** [12] sa hidrofilnim kanalima koji bez smetnji propuštaju vodu.

Akvaporini su proteini od 26-34 kDa, sa šest hidrofobnih transmembranskih alfa-spirala, povezanih hidrofilnim segmentima; unutrašnjost proteina predstavlja hidrofilni kanal. Oni su vrlo brojni sastavni delovi membrana i svi zajedno ulaze u sastav superfamilije sa najmanje četiri srodne grupe (familije gena). Njihova opšta oznaka je **MIP** (eng.: „**M**ajor **I**ntrinsic **P**roteins“). U genomu *Arabidopsis thaliana* nađeno je ukupno 35 gena koji kodiraju MIP proteine, kod kukuruza 31, a kod pirinča 33. Akvaporini ćelijske membrane označeni su kao **PIP** proteini

(eng.: „Plasma membrane Intrinsic Proteins“), a akvaporini tonoplasta kao **TIP** proteini (eng.: „Tonoplast Intrinsic Proteins“), sa rednim brojevima po kojima se razlikuju [13]. Akvaporini propuštaju vodu zahvaljujući tome što imaju mali promer, nešto veći od prečnika molekula vode. Ipak je u poslednje vreme pokazano da izvesne grupe MIP propuštaju gasove CO₂, NH₃ i jon NH₄⁺, kao i neke neelektrolite, što nije adekvatno objašnjeno. U svakom slučaju, transport kroz akvaporine je pasivan, a može se obavljati u oba pravca. To znači da akvaporini ne troše energiju pri transportu, a da je pravac kretanja određen osmotskim silama i zavisi od gradijenta vodnog potencijala susednih ćelija. Aktivnost akvaporina inhibiraju soli i preparati koji sadrže živu. Kada se biljke tretiraju živinim hloridom (HgCl₂), on smanjuje hidrauličnu propustljivost korena i po tom smanjenju se može indirektno proceniti koliki je udeo akvaporina u ukupnom transportu vode. Razume se, on je vrlo različit kod raznih biljaka i zavisao je od spoljašnjih uslova; u normalnim uslovima izmerene vrednosti iznose 21-85% ukupno transportovane vode.

7.1.2.2. Ekspresija gena za akvaporine i snabdevanje vodom

Prema tome, akvaporini imaju vrlo značajnu funkciju u ukupnom vodnom balansu biljaka. Kod mnogih biljaka je utvrđena korelacija između učestalosti akvaporina na membrani i aktivnosti te membrane u provođenju vode. Broj akvaporina se može povećati, ako se u biljkudomaćina (duvan, npr.) prenesu geni iz genoma *A. thaliana*, kao što je gen *AtH2*, koji proizvodi vrlo aktivan **akvaporin PIP1b**. Transgene biljke duvana, u kojima je time pojačana sinteza akvaporina, prenose više vode iz korena, imaju veći broj stoma i jaču transpiraciju; fotosinteza je u njima efikasnija, rast biljke je veći, kao i suva težina po jedinici površine lista [14]. U duvanu, koji je bio obogaćen genom *NtAQP*, fotosinteza je u transgenim biljkama porasla za 36% do 81%, zavisno od koncentracije CO₂ [15]. Prilično su brojni radovi u kojima je pokazano da sušni uslovi aktiviraju gene koji

kodiraju akvaporine, što znači da povećavaju transport vode. Kada se transgenim biljkama uskrati voda tokom četiri dana, one posle zalivanja brže vraćaju turgor i oporavljaju se od uvelosti, nego netransformisane kontrolne biljke. Svi ti rezultati ukazuju da bi genetičkim modifikacijama moglo da se poboljša snabdevanje vodom transgenih biljaka i izbegnu ili smanje štetne posledice nedostatka vode. Postoje, međutim, i drugi, kontradiktorni nalazi. Na primer, već pomenuti autori [14] utvrdili su da povećana ekspresija akvaporina PIP1b ima povoljno dejstvo samo ako je biljka dobro snabdevena vodom. U uslovima suše dominantno je negativno dejstvo na transgene biljke, tako da one čak brže venu od kontrolnih. Sinteza nekih akvaporina je smanjena tokom suše, pa kod izvesnih biljaka povećana ekspresija akvaporina upravo ima negativan efekat na otpornost prema suši. Ove kontroverzne rezultate za sada nije moguće objasniti, ali s obzirom na to da je otkriće akvaporina kod biljaka relativno nov podatak, potrebna su dalja istraživanja. Nesuglasice se možda mogu povezati sa činjenicom da biljke poseduju tako veliki broj akvaporinskih gena, koji svi imaju u osnovi istu funkciju, često u istim ćelijama. Pošto je teško izolovati pojedinačne vrste akvaporina i posebno analizirati njihove funkcije, možda se negativni rezultati mogu objasniti time što su u takvim slučajevima u transgene biljke preneseni pogrešni akvaporini, koji inače deluju u nekom drugom tipu ćelija, ili na drugom stupnju razvića, ili pod drugim spoljašnjim uslovima. Dok se bolje ne upoznaju osobine brojnih akvaporina i njihova fiziološka funkcija, teško će se njihovo korišćenje usmeriti ka poboljšanju otpornosti biljaka. No u svakom slučaju, intenzivna izučavanja akvaporina u svetu će možda uskoro dovesti do željenog rezultata – do biljaka koje se bolje snabdevaju vodom onda kada je to potrebno radi njihovog preživljavanja.

7.2. Poboljšanje hranljive vrednosti biljnih proizvoda

Poznato je da su biljke, tj. autotrofni organizmi, prvi članovi u lancu ishrane živog sveta, a samim tim i čoveka, bilo da ih on koristi neposredno ili preko životinja koje se hrane biljkama. Bez raznovrsne biljne hrane čovek ne bi opstao, jer samo biljke proizvode izvesne organske supstance koje su neophodne za brojne fiziološke funkcije. Organizam čoveka (kao i svih životinja) raspolaže složenim enzimskim sistemima pomoću kojih razgrađuje sintetisane organske supstance iz hrane, a zatim od osnovnih elemenata proizvodi druga jedinjenja, potrebna za rastenje i dobijanje energije. Ipak, jedan izvestan broj jedinjenja čovek ne može da izgradi i mora ih uzimati od biljaka. Samo su biljke potpuno autotrofne. Da biljke zadovoljavaju sve potrebe čoveka dokaz su vegetarijanci, koji ne uzimaju nijedan životinjski proizvod, a nemaju nikakvih simptoma deficijencije. Sasvim je dobro poznato da samo biljke izgrađuju ugljene hidrate, koji nastaju redukcijom ugljenika u fotosintezi. Ali manje je poznato da čovek ne može da redukuje ni azot, ni sumpor, koji u obliku NH_2 ulaze u sastav svih, a SH u sastav dve aminokiseline (metionin i cistein). Zatim, od dvadeset aminokiselina koje su potrebne za sintezu proteina, čovek sintetiše samo deset, a ostale mora da uzima kroz hranu. Čovek ne može da sintetiše ni linolnu kiselinu, ključno lipidno jedinjenje koje se sintetiše samo u hloroplastima i endomembranskom sistemu biljnih ćelija. Najzad, čovek ne sintetiše ni vitamine, koji su neophodni kofaktori u metaboličkim procesima, nego ih dobija gotove iz biljne hrane. Nisu ni sve biljke, međutim, podjednako bogate sastojcima koji su čoveku neophodni. Stoga biljna ishrana mora biti raznovrsna; u razvijenim zemljama se o tome dovoljno zna i uzima se u obzir u svakoj dijeti koja se preporučuje. To, nažalost, nije slučaj u nerazvijenim zemljama Azije i Afrike, gde je ishrana često vrlo jednolična i sastoji

se od jedne biljne vrste (npr. pirinča), čemu je uzrok siromaštvo ili nepovoljna klima. Zadatak biotehnologije, ili njene grane koja se danas naziva **biofortifikacija ishrane**, ogleda se u tome da proizvede biljke obogaćene sastojcima koji im nedostaju.

7.2.1. Modifikacije sastava biljnih proteina

Izlaganje o genetičkim modifikacijama organskih jedinjenja koja se koriste u ishrani čoveka i domaćih životinja počinje u ovom odeljku sa proteinima, iako oni nisu na prvom mestu po vrednosti postignutih rezultata. Razlog za ovaj redosled leži u tome što su, hronološki, geni za rezervne proteine bili prvi ekonomski značajni geni ugrađeni u heterologne sisteme, tj. druge biljke. Tokom devedesetih godina dvadesetog veka vrlo je malo biljnih gena bilo poznato i izolovano. U to vreme, da bi se geni identifikovali, trebalo je znati koje proteine oni kodiraju, a zatim izdvojiti iRNK i pomoću reverzne transkripcije sintetisati cDNK, koja bi bila kopija prirodnog gena. Pošto su rezervni proteini bili lako dostupni u relativno velikim količinama, sinteza odgovarajuće cDNK je bio izvodljiv proces, tako da su te cDNK korišćene za prenos u genom druge biljke. Posle sekvenciranja genoma nekoliko biljnih i životinjskih vrsta, svaki gen je postao dostupan. Geni sa poznatom funkcijom koriste se danas za genetičke manipulacije. To je doprinelo da veliki broj gena bude iskorišćen za dobijanje transgenih biljaka, uključujući i one koji kodiraju razne proteine. Treba napomenuti da tu spadaju i mnogi proteini koji se ne koriste u ishrani, nego u proizvodnji farmaceutskih proizvoda ili u drugim granama industrije.

7.2.1.1. Rezervni biljni proteini

Semena, plodovi, krtole i drugi biljni organi koji se koriste za ishranu često su bogati rezervnim proteinima. U nekim semenima dostižu i 50-60% ukupnih proteina. Oni su akumulirani u endospermu ili kotiledonima, u ćelij-

skim organelama nazvanim **proteinska tela**. Proteinska tela su obavijena membranom koja nastaje od endoplazmatičnog retikuluma ili tonoplasta, a sadrže raznovrsne, na specifičan način naslagane proteine. Ima više sistema klasifikacije proteina. Uobičajeno je da se biljni proteini po rastvorljivosti svrstavaju u četiri grupe: **albumini** su rastvorljivi u vodi, **prolamini** u alkoholu, **globulini** u rastvorima soli i **glutelini** u razblaženim kiselinama i bazama. Pri klijanju semena, još u ranoj fazi imbibicije, u semenu se aktiviraju ili *de novo* sintetišu enzimi koji razgrađuju proteine. Oslobođene amnokiseline najvećim delom ulaze u sastav proteina mlade biljke.

Prema podacima **FAO** (eng.: „Food and Agriculture Organization“) na prvom mestu u ishrani čoveka i domaćih životinja su žita, koja daju više od 2000 miliona tona ploda godišnje, a među njima su najvažniji kukuruz, pšenica i pirinač. Na drugom mestu su leguminoze, od kojih se dobija 250 miliona tona. Iako semena leguminoza imaju u odnosu na suhu težinu približno dva puta više proteina od žita (20-40% prema 10-12%), ipak su proteini žita najobilniji sastojci ishrane. Ni jedna vrsta proteina, međutim, ne sadrži sve esencijalne aminokiseline. Na primer, kukuruz sadrži do 40% zeina (vrste α , β , γ i δ), koji spada u prolamine. Oni su bogati aminokiselinama koje sadrže sumpor (metionin i cistein), ali se u genu za α -zein, koji je daleko najobilniji, ne nalazi nijedan kodon za lizin, a vrlo je malo kodona za triptofan. S druge strane, među rezervnim proteinima dikotila dominantni su globulini, koji su klasifikovani kao vicilini (7-8S) ili legumini (11-14S). Dok globulini u nekim leguminozama čine oko 42% proteina koji su bogati lizinom, triptofanom i drugim aminokiselinama, oni sadrže samo oko 2% aminokiselina sa sumporom. Očigledno je da je sastav proteina žita i leguminoza komplementaran, tako da ishrana, bazirana na jednoj vrsti semena ne zadovoljava potrebe ni čoveka ni domaćih životinja za svim esencijalnim aminokiselinama. Za ljude u razvijenim zemljama, koji inače uzimaju raznovrsniju hranu, možda to i nije suviše

veliki problem. Za ishranu domaćih životinja, međutim, sastav biljne hrane može biti kritičan za dobar rast. Za životinje koje se hrane semenom, primenjuje se često kombinacija kukuruza i sojinog brašna, jer je moguće napraviti dobro izbalansiranu smešu sumpornih i baznih aminokiselina. No životinje koje se hrane na paši uobičajenim krmnim biljkama bolje napreduju ako dobijaju i neke aminokiseline sa sumporom, kojih u listovima leguminoza ima malo. A u oba slučaja kombinovana ishrana zahteva dodatni rad i povećava troškove proizvodnje. Otuda su se pojavile ideje da su mogućnosti za poboljšanje ishrane ostvarljive preko modifikacije sastava rezervnih proteina [16, 17]. Prvi rezultati su bili vrlo ohrabrujući; neki od njih su sumirani u **Tabeli 7.1**.

Tabela 7.1. Primeri modifikacije rezervnih proteina

Modifikacije i transfer gena koji kodiraju proteine	Glavni rezultati kod transgenih biljaka	Ref.
Gen za γ -zein iz kukuruza, bogat metioninom i cisteinom, prenesen je u lucerku (<i>Medicago sativa</i>), žuti zvezdan (<i>Lotus corniculatus</i>) i duvan (<i>Nicotiana tabacum</i>).	Protein γ -zein nađen je samo u duvanu, u kome je količina ukupnih proteina rastvorljivih u alkoholu dostigla 0,05%. Kod lucerke i zvezdana gen za γ -zein je funkcionalan, ali se ne akumulira protein.	[18]
Geni za γ -zein i β -zein iz kukuruza, vezani za signal KDEL, koji ih upućuje u membranske vezikule ER, preneti su u žuti zvezdan (<i>L. corniculatus</i>), lucerku (<i>M. sativa</i>) i duvan (<i>N. tabacum</i>).	Kod žutog zvezdana nađeno je 0,055% γ -zeina i 0,30% β -zeina. Lucerka sadrži samo γ -zein (0,026%), a u F_1 generaciji davana, posle ukrštanja, nađeno je 1,1% ukupno zeina, što je rezultat blizu zadovoljavajućeg. Smatra se da su količine zeina u lucerki i zvezdanu nedovoljne.	[19]
Gen za δ -zein prenesen je iz kukuruza u belu detelinu (<i>Trifolium repens</i>).	Sve transgene biljke sadržale su u listovima protein δ -zein, od 0,3% u najmlađem, do 1,3% u najstarijem, sračunato na ukupne proteine rastvorljive u vodi.	[20]

Modifikacije i transfer gena koji kodiraju proteine	Glavni rezultati kod transgenih biljaka	Ref.
<p>Konstrukt sastavljen od gena za γ-zein kukuruza i promotora konglicinina soje prenesen je u soju (<i>Glycine max</i>).</p>	<p>Dobijene su dve fertile linije transgenih biljaka. U tri prve transgene generacije (F_0, F_1 i F_2) nađena je iRNK za γ-zein, kao i sam protein. Prolamini u kontroli su iznosili 0,35%, u transgenim biljkama 2,54 i 6,49%. Cistein i metionin su porasli za 29%, odnosno za 18%.</p>	<p>[21]</p>
<p>Brazilski orah (<i>Bertholetia excelsa</i>) sadrži 2S albumin sa oko 18% metionina. Gen (cDNK) za 2S albumin prenesen je u (a) duvan (<i>N. tabacum</i>), (b) graoricu (<i>Vicia narbonensis</i>), (c) krompir (<i>Solanum tuberosum</i>).</p>	<p>(a) U semenu duvana količina metionina povećana je za 30%; (b) 2S albumin nađen je u listovima i korenu graorice; (c) Mikrotuberi i listovi krompira sadrže iRNK i pravilno procesuiran 2S albumin, 0,2% od ukupnog proteina.</p>	<p>(a) [22] (b) [23] (c) [24]</p>
<p>Seme suncokreta sadrži albumin 8 sa 23% metionina+cisteina; cDNK kodirajućeg regiona vezana za specifične promotore prenesena je u grašak (<i>Pisum sativum</i>) i lupinu (<i>Lupinus angustifolius</i>), a cDNK vezana za CaMV 35S preneti je u lucerku (<i>M. sativa</i>) i detelinu (<i>Trifolium subterraneum</i>).</p>	<p>cDNK albumina 8, vezana za specifičan promotor semena, eksprimira se u semenu graška i lupine, a u konstrukt sa promotorom CaMV 35S u listovima deteline i lucerke. Proteini u transgenim biljkama povećavaju količinu aminokiselina sa sumporom, a zaštićeni su od degradacije kod preživara.</p>	<p>[25]</p>
<p>Nekoliko cDNK za rezervne proteine leguminoza preneseni su u model biljke. Geni za (a) legumin, (b) legumine <i>LegA1</i> i <i>LegA2</i> i (c) konvicilin iz graška u duvan, (d) α-fazeolin iz pasulja u duvan, (e) α-konglicinin iz soje u petuniju.</p>	<p>Svi kodirajući segmenti cDNK, vezani za specifične promotore semena, eksprimirali su se u semenu graška, odnosno petunije, u embrionu, u vreme kada se obrazuju rezervni proteini ovih semena. Proteini koje ove cDNK kodiraju prisutni su u transgenim semenima.</p>	<p>(a) [26] (b) [27] (c) [28] (d) [29] (e) [30]</p>

Modifikacije i transfer gena koji kodiraju proteine	Glavni rezultati kod transgenih biljaka	Ref.
Konstruisan je sintetički gen od 292 bp za protein čijih 80% čine esencijalne aminokiseline. Gen je pomoću Ri-plazmida unesen u krompir gajen <i>in vitro</i> .	Biljke-regeneranti iz transformisanih korenova krompira sadrže sintetički gen, koji ulazi u transkripciju i translaciju. Sintetički protein je otkriven u mikrotuberima, ali u maloj količini.	[31]
Zamišljen je dizajn za sintetički protein, koji bi sadržao 43% lizina i 20% metionina (mol/mol), u obliku dvojne α -spirale (CP3-5 protein). Konstruisan je gen koji kodira takav protein i kodirajući region je vezan za promotore za fazeolin pasulja i β -konglicinin soje. Gen je prenesen u duvan.	Prisustvo sintetičkog proteina u transgenim biljkama duvana analizirano je kroz tri polne generacije. Biljke transformisane sa β -konglicinin/CP3-5 stalno su davale fenotip sa visokom koncentracijom lizina, dok su one sa fazeolin/CP3-5 bile varijabilne. To je prvi uspješan pokušaj da se poveća lizin u semenu, pomoću ekspresije novih DNK sekvenci.	[32]
Heksaploidna pšenica ima šest kopija gena koji kodiraju gluten visoke molekulske težine, HMW-GS.	Kvalitet hlebnog brašna ceni se po njegovoj elastičnosti i rastegljivosti. Ove osobine zavise od broja i sastava glutenina, koji se nalaze u skrobnom endospermu. Transgene biljke sa kombinovanim subjedinicama glutena bile su normalne, fertile i stabilne do treće generacije (a, b). Povećanje broja HMW-GS četiri puta učinilo je hleb neupotrebljivim (c). Aktivnost gena za pojedine subjedinice HMW-GS može se utišati pomoću RNKi (d), što sve daje mogućnost za kombinaciju najboljih svojstava pšeničnog brašna.	(a) [33] (b) [34] (c) [35] (d) [36]
Gene za gluten, ili njihove subjedinice, moguće je uneti u genotip druge sorte u kome oni nedostaju, ili u kojoj treba povećati njihov broj pomoću biolističke transformacije.		

Podaci navedeni u **Tabeli 7.1** pokazali su da se geni koji kodiraju mnoge rezervne proteine mogu uspešno preneti iz jedne biljne vrste u drugu, i time promeniti sastav semena transgene biljke. Iskrsle su, međutim, neke

nepredvidive teškoće, koje su dalji razvoj u tom pravcu znatno usporile. Do tih eksperimenata malo se znalo o sintezi proteina u semenu koje se razvija. Naime, proteini se posle translacije prenose u vakuole ili membrane endoplazmatičnog retikuluma (ER), u kojima se uključuju u proteinska tela. Pre toga oni se na karakterističan način savijaju i grade disulfidne i druge veze, od kojih zavisi njihova tercijarna struktura. U proteinskim telima oni se „pakuju“ sa ostalim proteinima, a svaka promena u primarnom redosledu aminokiselina utiče na sekundarnu i tercijarnu strukturu. Proteini koji ometaju formiranje proteinskih tela bivaju degradovani, a seme koje ih ima često ne klija, ili se biljka nepravilno razvija. Iz tih razloga su pokušaji da se poboljša sastav rezervnih proteina danas dosta zapostavljeni.

7.2.2. Modifikacije u metabolizmu ugljenih hidrata

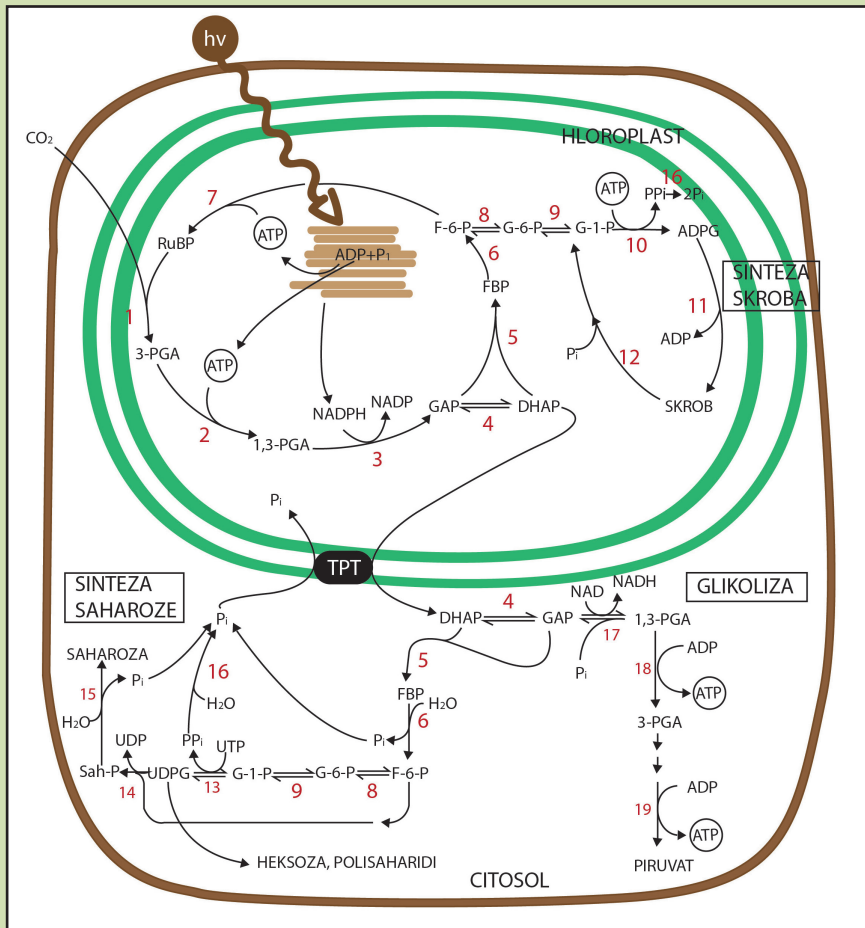
Ugljeni hidrati koji se izgrađuju u fotosintezi ne samo da su osnovni sastojci hrane ljudi i životinja nego su i početna jedinjenja u sintezi aminokiselina, lipida, kao i svih sekundarnih supstanci koje u biljci postoje. Metabolizam ugljenih hidrata u intaktnoj biljci celovit je i kontinuiran proces. List, u kome se obavljaju primarne sinteze **skroba** i **saharoze**, predstavlja njihov **izvor** koji je preko **translokacije saharoze** povezan sa svim drugim organima biljke, koji su njihov primalac, ili **uvir**. Organi biljke koji rastu (izdanak, koren) i organi za akumulaciju rezervnih materija (semena, plodovi, krtole) **privlačni** su **centri za asimilate**, čija snaga zavisi od zapremine i od intenziteta metaboličkih procesa u njima. Potreba za ugljenim hidratima u privlačnom centru povratno utiče na aktiviranje primarnih procesa u listu – i obrnuto. Smatra se da su dosadašnji uspesi u povećanju poljoprivredne proizvodnje postignuti ne samo intenziviranjem primarnih procesa u asimilaciji CO₂, nego i promenjenom **alokacijom**, što znači preraspodelom asimilata u biljci, u korist organa zbog kojih se ona gaji. Metabolizam saharoze u tim organima je često pod kontrolom više re-

gulatornih proteina. Za genetičke modifikacije čiji je cilj poboljšanje proizvoda, biraju se oni geni i enzimi koji imaju ključne funkcije u regulaciji posebnih, divergentnih metaboličkih puteva. Ceo metabolički sistem je fleksibilan; mnogi ključni procesi na koje se može uticati otkriveni su nedavno, ali danas postoji solidna osnova za modifikaciju biljnih proizvoda prema potrebama potrošača.

7.2.2.1. Rezervni polisaharidi

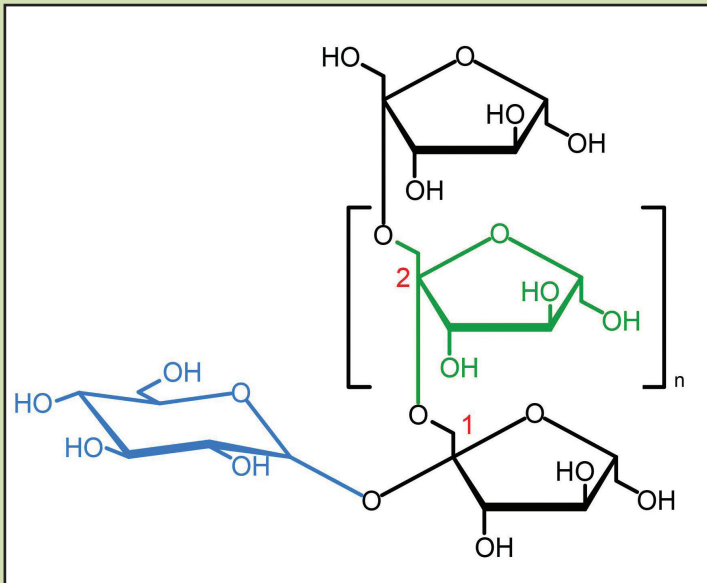
Najobilniji rezervni polisaharid biljaka, zelenih algi i cijanobakterija jeste **skrob**, koji je univerzalno rasprostranjen, a na drugom mestu su **fruktani**, koji se nalaze u organima oko 15% cvetnica, kao i kod nekih gljiva i bakterija. Skrob se u biljkama izgrađuje i odlaže u plastidima, i to u **hloroplastima** fotosintetičkih organa i u **amiloplastima** organa za magacioniranje. Fruktani ispunjavaju vakuole ćelija u kojima se i izgrađuju. S obzirom na to da su vakuole mnogo veće zapremine nego plastidi, značaj fruktana ne treba potcenjivati. Kukuruzni skrob, proizveden najvećim delom u SAD, čini više od 80% ukupnog skroba na tržištu; u Evropi se najviše proizvodi skrob od krompira i pšenice, a u Aziji znatnim delom i od kasave (tapioke). Osim za ishranu, skrob ima znatnu primenu i u raznim industrijskim granama, pa otuda uglavnom dolaze zahtevi za povećanjem proizvodnje i za posebnim strukturnim osobinama koje su u tehnologiji korisne [37]. Shema sinteze skroba i fruktana prikazana je u *Prilogu 7.1*.

Prilog 7.1. Biosinteza skroba i fruktana



Slika 7.1A. Sinteza skroba u hloroplastu i sinteza saharoze u citosolu fotosintetičke ćelije lista. Enzimi: (1) Rubisco, (2) 3-fosfoglicerat kinaza, (3) NADP-GAP dehidrogenaza, (4) trioza-fosfat izomeraza, (5) aldolaza, (6) fruktozo-1,6-bisfosfataza, (7) ribulozo-5-fosfat kinaza, (8) fosfoglukoza-izomeraza, (9) fosfoglukomutaza, (10) ADP-glukozna pirofosforilaza, (11) skrobna sintaza i drugi enzimi koji izgrađuju skrob, (12) skrobna fosforilaza, (13) UDP-glukozna pirofosforilaza, (14) saharozo-fosfatna sintaza, (15) saharozo-fosfatna fosfataza, (16) pirofosfataza, (17) NAD-GAP dehidrogenaza, (18) 3-fosfoglicerat kinaza, (19) piruvat kinaza, (TPT) trioza-fosfat translokator

Prirodni **skrob** ima dve komponente: **amilozu**, koja čini 20-30% i **amilopektin**, koji iznosi 70-80%. Obe komponente su α -D-glukani, pošto se sastoje od monosaharida α -D-glukoze. U amilozi su molekuli α -D-glukoze povezani $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozidnim vezama, pa je amiloza linearan lanac koji može imati od hiljadu do više hiljada glukoznih ostataka. U amilopektinu, osim $\alpha(1\rightarrow4)$ glikozidne veze, postoje na rastojanju od približno 25 molekula glukoze bočni lanci povezani $\alpha(1\rightarrow6)$ glikozidnim vezama, tako da je ovaj molekul razgranat. Početni supstrat za sintezu skroba je **ADP-glukoza (adenozin-difosfo-glukoza)**, koja postaje od **glukoza-1-fosfata** i ATP, pod dejstvom enzima **ADP-glukozne pirofosforilaze (AGPaze)**. Sintezu skroba obavljaju enzimi **skrobne sintaze** i **granajući enzimi** (poznati i kao **Q-enzimi**), od kojih svaki obuhvata više izoenzima sa različitim mestima dejstva. Početni enzim, **vezana skrobna sintaza I**, nalazi se isključivo u plastidu; za njegovo dejstvo potrebno je da postoji jedan kratak glukozni lanac (prajmer), na koji se nadovezuju, jedan po jedan, molekuli glukoze iz ADP-glukoze; oni se vezuju preko ugljenika $1\rightarrow4$ i tako nastaje **amiloza**. **Granajući enzimi** su solubilni i funkcionišu na površini skrobnog zrna. Njihova funkcija se ogleda u hidrolizi jedne veze $1\rightarrow4$ na jednom kraju amiloznog niza, čime se skida segment koji se prenosi na drugo mesto u amilozi, ali se vezuje za atom ugljenika 6, vezom $1\rightarrow6$. Tako se dobija razgranati **amilopektin**, koji sadrži oko 5% bočnih lanaca. **Skrobne sintaze II i III** takođe su solubilne; one produžuju glavni i sve bočne lance amilopektina, dodajući im nove glukozilne ostatke. Raspored bočnih lanaca amilopektina je pravilan i omogućava formiranje dvojnih spirala, usled čega on ima osobine semikristala. Amiloza je amorfna i ispunjava prostore između ovih struktura.



Slika 7.1B. Strukturna formula inulina. Linearni fruktani vezani sa terminalnom α-D-glukozom vezom 2→1

Fruktani su polimeri sastavljeni od fruktoze. U ćelijama lista oni postaju od saharoze izgrađene od primarnih fotosintata, a u organima za magaciniranje od saharoze koja je transportovana putem floema. Dva molekula **saharoze**, koja se sastoji od **glukoze** i **fruktoze (G-F)**, učestvuju u početnoj reakciji. U njoj se prvi molekul saharoze hidrolizuje ($G + F$) i **fruktoza** se prenosi na drugi molekul ($G-F-F$), a glukoza (G), ostaje slobodna. Ovu reakciju katalizira enzim **saharozo : saharozo 1-fruktozil transferaza (1-SST)**, a njegov proizvod je trisaharid **kestoza (G-F-F)**. Dve fruktoze u kestozi vezane su preko ugljenika 1 i 2 β(1→2) vezom. Kestoza je najkraći fruktan, od nje postaju svi drugi fruktani sa većim brojem fruktoznih ostataka. Njihovu sintezu katalizuju **fruktan : fruktan 1-fruktozil transferaze (FFT)**. **Inulin** je linearan molekul, čiji lanac sadrži od tri do nekoliko stotina ostataka fruktoze, koji su svi vezani β(1→2) vezom. **Levani** su takođe linearni, ali su u njihovom lancu ostaci

fruktoze vezani $\beta(2\rightarrow6)$ vezom. **Neoinulini** imaju dva lanca, jedan je vezan vezom $\beta(1\rightarrow2)$ za fruktozu, a drugi vezom $\beta(2\rightarrow6)$, ali za glukozu. Najzad, **graminani** su mešoviti tipovi fruktana, razgranati, jer sadrže lance $\beta(1\rightarrow2)$ i $\beta(2\rightarrow6)$, vezane za fruktozu, a takođe i lanac $\beta(2\rightarrow6)$, vezan za glukozu. Svaki fruktan sadrži po jedan glukozilni ostatak, na početku ili u sredini lanca, ako je deo lanca vezan i za glukozu.

7.2.2.2. Transgene biljke sa povećanom količinom skroba

Enzimi koji učestvuju u sintezi skroba poznati su i dobro proučeni, a geni koji ih kodiraju klonirani su i konstruisane su transgene biljke. Prvi enzim u sintezi skroba, **AGPaza**, sastoji se od dve velike i dve male subjedinice. Ovo je najvažniji, ključni enzim za sintezu skroba (**Slika 7.1A**). On ima limitirajuću, regulatornu funkciju u brzini sinteze, jer se nalazi pod **alosteričnom kontrolom** drugih metabolita. AGPaza je stimulisana u prisustvu 3-fosfoglicerata (3-PGA), a inhibirana inorganskim fosfatom (Pi). Usled izvesnih mutacija postoje, međutim, **deregulisane AGPaze**, koje nisu osetljive prema Pi i dopuštaju znatno veću sintezu skroba. Prva takva mutantna AGPaza otkrivena je kod bakterije *E. coli*, a zatim i kao velika subjedinica AGPaze kukuruza. Kada je AGPaza iz *E. coli* prenetu u krompir, sinteza skroba u krtolama povećana je na oko 150% sinteze u kontrolnim netransformisanim biljkama [38]. U velikim subjedinicama AGPaze kukuruza, za osetljivost prema fosfatu kritičan je region blizu karboksilnog kraja proteina. On se odlikuje prisustvom, na određenom mestu, dve dodatne aminokiseline, tirozina i lizina, koje ometaju alosteričnu inhibiciju fosfatom. Gen koji kodira velike subjedinice, **sh2** (eng.: „shrunken 2“), podložan je mutaciji pomoću transpozona. Zrna kukuruza sa indukovanom mutacijom imaju 11-18% veću težinu od kontrolnih, zbog povećanja sinteze skroba i većeg priliva drugih komponenata preko floema [39].

Modifikovana forma *sh2* gena kukuruza, označena kao *Sh2r6hs*, korišćena je za genetičku modifikaciju drugih biljaka. Pšenica i pirinač su uspešno transformisani kada je ovaj konstrukt unesen u njihov genom biolističkom transformacijom kalusnog tkiva [40, 41]. Biljke regenerisane u kulturi i odgajene u prirodnim uslovima dale su prinos u zrnu povećan za 31% po biljci, a u ukupnoj biomasi za 22% (pšenica), odnosno 38% (pirinač). Povećani prinos bio je moguć zbog promena u nekim osobinama tokom njihovog razvića. Naime, ove biljke, kao i mnoge druge uostalom, formiraju znatno više zametaka plodova nego što će ih sazreti; višak zametaka, koje biljka verovatno ne može da ishrani, sasušuje se i opadne, no oni ilustruju reproduktivni potencijal majke-biljke. Veći broj zametaka semena predstavlja znatno jači privlačni centar za asimilate. U transgenim semenima, sa konstruktom koji obuhvata *sh2* gen, aktivnost AGPaze je 2,7 puta viša od kontrolne, pri inhibitornoj koncentraciji Pi. U takvim okolnostima, kada je ukupna zapremina semena veća, a ključni enzim nije alosterično inhibiran, priliv asimilata prema semenima je znatno povećan, tako da veći broj semena može da dostigne punu zrelost.

Transgena pšenica sa deregulisanom AGPazom ispitivana je u polju tokom četiri naredne godine, na tri lokacije, uz variranje gustine sejanja i navodnjavanja [42]. Povećana aktivnost AGPaze, prinos u semenu i bolji rast biljke održavaju se kroz četiri generacije, ako biljke nisu suviše gusto posejane i ako su navodnjavane. Iz toga je zaključeno da deregulisana AGPaza trajno dovodi do očekivanog poboljšanja, ako spoljašnji uslovi nisu limitirajući. Dosadašnji rezultati u dobijanju povećanog prinosa najvažnijih gajenih biljaka u svetu (kukuruz, pšenica, pirinač i krompir) pomoću modifikacije ključnog enzima u sintezi skroba otvaraju perspektive za značajno povećanje proizvodnje.

7.2.2.3. Odnos amiloze i amilopektina u skrobu

Kao što je navedeno u prethodnom odeljku, običan skrob sadrži znatno manje amiloze nego amilopektina, mada su mnoga odstupanja poznata u prirodi. Izuzeci u ovom pogledu jesu mutanti koji se javljaju kod svih biljnih vrsta sa rezervnim skrobom. Razviće mutantnih biljaka uglavnom nije poremećeno, tako da se mnogi mutanti gaje kao posebne linije, što je moguće jer su mutacije većinom dominantne. Kod mutanata pretežno varira udeo amiloze u skrobu, mada i količina amilopektina može biti varijabilna. Od proporcije amiloze i amilopektina zavise mnoge fizičko-hemijske osobine skroba, koje su manje ili više pogodne za njegovu primenu. Sem što je jedan od značajnih sastojaka hrane, skrob je i veoma važna sirovina za više industrijskih grana. On se koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, u obradi tekstilnih vlakana, u proizvodnji hartije i lepkova; on je glavna sirovina za fermentaciju, u kojoj se dobijaju etil alkohol i mnogi drugi proizvodi. U svim industrijskim postupcima koriste se tokom prerade mnogi fizički i hemijski agensi da bi se dobio proizvod odgovarajućeg kvaliteta. Ovi postupci zahtevaju dodatni rad i sredstva, a takođe i posebne mere za zaštitu potrošača. Stoga su razumljiva nastojanja u biotehnologiji da se do skroba sa specifičnim svojstvima dođe genetičkim modifikacijama, u toku prvih stupnjeva njegove biosinteze [37].

U agronomiji je odavno poznat kukuruz voskovac, za koji je utvrđeno da ne sadrži amilozu. To svojstvo je vezano za genski lokus *waxy*, iz koga je izolovan i kloniran *wx* gen. Slični mutanti se nalaze kod pšenice, ječma, sirka i kod krompira, ali se samo kukuruz voskovac gaji na komercijalnoj osnovi. Skrob bez amiloze pogodan je za pravljenje prozračnih gelova i lepka, čemu doprinosi njegova veća stabilnost prema smrzavanju i topljenju. Kod krompira je poznat jedan mutant bez amiloze (*amf*), ali se on ne gaji komercijalno. Transformacijom ovog mutanta pomoću gena koji kodira **skrobnu sintazu I**, vezanu za amiloplast, mutacija se ispravlja

i mutant počinje da proizvodi amilozu. To se smatra eksperimentalnom potvrdom teze da je za sintezu amiloze potrebna aktivnost *wx* gena. U više laboratorija proizveden je transgeni krompir sa skrobom bez amiloze, time što je transformisan genom za vezanu **skrobnu sintazu I** u komplementarnom, **antisens smeru** [43]. Podsetimo da geni koji se čitaju u antisens smeru mogu smanjiti aktivnost drugog gena. U Evropi je 2010. godine ovakav krompir ušao u komercijalnu proizvodnju a zatim je 2012. povučen sa tržišta usled neprihvatanja GM useva i konačno 2013. godine potpuno je zabranjena njegova proizvodnja. I pirinač bez amiloze proizveden je transformacijom protoplasta, u koje je elektroporacijom unesen *wx* gen kukuruza u antisens smeru, vezan za specifične promotore koji su aktivni u pirinču. Odsustvo amiloze dokazano je u endospermu i u polenovim zrnima. U samooplođenim biljkama druge (F_2) generacije utvrđeno je da je ovo svojstvo stabilno i da se nasleđuje u odnosu 3:1 kao dominantan alel [44]. Izuzetno visoka stabilnost prema zamrzavanju/topljenju postignuta je kod transgene linije krompira, u kojoj je, osim nedostatka amiloze, i amilopektin imao lance skraćene dužine. To je postignuto transformacijom pomoću tri antisens gena istovremeno: gena za vezanu skrobnu sintazu I i gena za solubilne sintaze II i III [45]. Slatki krompir (*Ipomea batatas*), koji je u Aziji i Africi jedan od glavnih useva, nema poznate mutante bez amiloze; transgene biljke bez amiloze dobijene su unošenjem T-DNK *Agrobacterium tumefaciens*, ali sa genom za vezanu skrobnu sintazu I u pravom smeru. U ovom slučaju je kod izvesnih transformanata došlo do utišavanja gena posle transkripcije, usled velikog broja ugrađenih segmenata T-DNK [46].

Skrob sa visokom koncentracijom amiloze takođe je značajan u industriji hrane. On daje vrlo čvrst gel, a u prženoj hrani formira film oko objekata, koji tako upijaju znatno manje masnoće. Ovaj skrob se prerađuje u „rezistentni skrob“, koji je povoljan za mikrobiološke procese u debe-

lom crevu. Amiloza u tim skrobovima može da dostigne 50-90%. Pošto kukuruz sa tim svojstvima ima nisku produktivnost, njegovo gajenje se u SAD stimuliše pod ugovorom na oko 20.000 hektara. Skrob sa visokim procentom amiloze je, u stvari, skrob sa niskim procentom amilopektina. Do njega se dolazi različitim pristupima i ne postoji jedinstven metod oko koga bi se svi istraživači složili. Razlog tome je nedovoljno poznavanje enzima koji katalizuju sintezu amilopektina. Postoje najmanje tri izoforme granajućeg enzima (Q-enzima) i možda više izoformi solubilnih skrobnih sintaza II i III. Transgene biljke kojima su ugrađene antisens cDNK za ove enzime imaju amilopektine različitih struktura. Tako transgeni grašak sa cDNK za *SSII* gen sadrži obilno amilopektin sa nižom molekulskom masom, sa vrlo dugačkim lancima čiji su bočni lanci kratki [47]. Kod kukuruza koji ima nizak nivo amilopektina proučavani su svi enzimi za sintezu skroba u toku razvića zrna. Aktivnost granajućih enzima je uopšte bila vrlo niska, sa potpunim odsustvom izoforme II [48]. Jedna od karakteristika amilopektina u transgenim biljkama bio je visok nivo vezanog fosfata, usled čega oni imaju posebne osobine. Teškoću u ovom istraživanju predstavlja činjenica da u procesu sinteze amilopektina verovatno učestvuje više enzima, s tim što izoenzimi imaju različite parcijalne funkcije, a u dosadašnjim istraživanjima su proučavani samo pojedinačno. Istraživanja u bliskoj budućnosti će verovatno pomoći da se bolje upoznaju različite funkcije enzima u sintezi skroba i da se projektuje sinteza skroba sa specifičnim osobinama.

7.2.2.4. Biosinteza fruktana – proširenje na „skrobne“ biljke

Fruktani su polimeri fruktoze, koji obuhvataju **inulin**, **levane**, **neoinuline** i **graminane** (*Prilog 7.1, Slika 7.1B*). Biljke koje izgrađuju fruktane pripadaju familijama koje nisu bliske među sobom, kao što su Asteraceae, Liliaceae i Poaceae. Smatra se da su se fruktani pojavili posle razdvajanja dikotila i monokotila u evoluciji i da im je poreklo polifiletsko. Ključni

enzim u sintezi fruktana, 1-SST, postao je mutacijom vakuolarne invertaze, u ćelijama koje sadrže saharozu. Smatra se da je invertaza, koja hidrolizuje saharozu, duplirana, a zatim je jedan od enzima izgubio osnovno hidrolitičko dejstvo i evoluirao u transferazu, koja prenosi fruktozu. Takva mogućnost je i eksperimentalno potvrđena. Ako se u vakuolarnoj invertazi jedan segment od 33 aminokiseline na N-terminusu zameni odgovarajućim segmentom G6-fruktozil transferaze luka, onda taj protein stiče svojstva fruktozilne transferaze. Za tu funkcionalnu promenu kritične aminokiseline jesu triptofan 161 i asparagin 166 [49].

Fruktani se hidrolizuju u određenim fazama razvića, a produkti hidrolize se koriste za rastenje, kao, npr. pri klijanju krtola ili obnovi listova posle defolijacije. Fruktanima se pripisuju i druge funkcije u biljci, kao što je zaštita od stresa izazvanog sušom, niskom temperaturom i salinitetom [50]. Fruktani se nalaze u nekim jestivim biljkama i prema medicinskim pokazateljima imaju nekoliko povoljnih efekata u ljudskoj ishrani. Oni se ne metabolišu u organima za varenje i predstavljaju aditive za hranu niske kalorične vrednosti, koji mogu zameniti šećer i masnoće. Dijeta sa fruktanima smanjuje u krvnoj plazmi koncentraciju holesterola, triglicerida i fosfolipida. U želucu stimulišu razmnožavanje korisnih bakterija koje koriste fruktane za svoj rast, kao što su *Lactobacillus* i *Bifidobacteria*, čime se smanjuje broj patogenih vrsta. Oni stimulišu resorpciju kalcijuma i korisni su za prevenciju osteoporoze. Time su fruktani svrstani u sastojke **funkcionalne hrane**, što podrazumeva hranu koja smanjuje rizik od nekih rasprostranjenih bolesti [50, 51].

Zbog razloga koji su navedeni postoji sve veći interes za korišćenje fruktana u prehrambenoj industriji i medicini. Biljke koje ih proizvode u prirodi niske su produktivnosti, a troškovi proizvodnje su visoki. Ono što može smanjiti troškove jeste indukcija sinteze fruktana u biljkama koje ih inače ne proizvode, ali sadrže visoku koncentraciju saharoze, od koje

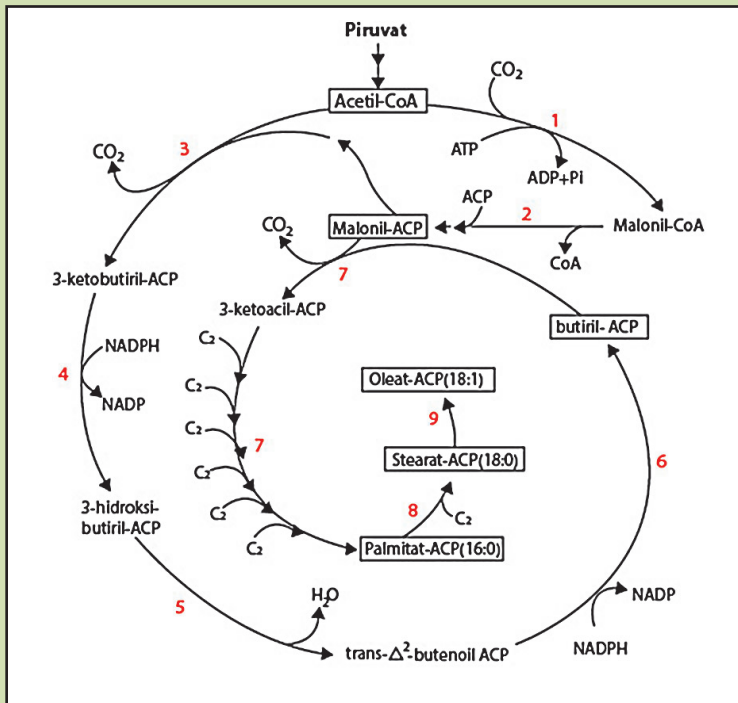
oni postaju. To su u prvom redu krompir i šećerna repa. Enzim koji od saharoze izgrađuje kestožu (1-SST) ne postoji u ovim biljkama, ali se može uspješno preneti. To je ključni enzim (**Prilog 7.1**), koji u krompiru skreće sintetičke procese iz pravca ka skrobu u pravcu fruktana. U šećernoj repi on treba samo da na postojeću saharozu veže molekule fruktoze. A zatim su potrebne i druge fruktan : fruktan 1-fruktozil transferaze, da bi se dobili veći polimeri fruktana. Hellwege i saradnici [52] su prvi put preneli cDNK za enzim 1-SST, iz artičoke (*Cynara scolymus*) u ćelije duvana i krompira i našli u transformisanim biljkama kestožu. Gen za 1-SST, izolovan iz čičoke (*Helianthus tuberosus*) prenesen je u šećernu repu [53], u kojoj je zatim skoro sva rezervna saharoza pretvorena u fruktane niske molekulske mase. Da bi se dobili različiti fruktani u transgenim biljkama [54] klonirani gen za 1-SST crnog luka (*Allium cepa*) prenet je u protoplaste duvana, kojima su zatim dodati ekstrakti biljaka sa fruktozilnim transferazama iz luka i ječma. U protoplastima duvana, koji fruktane uopšte ne proizvodi, otkriveni su fruktani različitog tipa. Šećerna repa je transformisana pomoću 1-SST luka i fruktozilne transferaze 6G-FFT. U listovima transgenih biljaka nađeni su i posle nekoliko meseci fruktani karakteristični za luk, što znači da je saharoza konvertovana u odgovarajuće fruktane, a pritom ukupna količina rezervnih ugljenih hidrata nije smanjena [55]. Ovi rezultati ilustruju početne uspehe u transformaciji saharoze u fruktane, koji su ostvareni za kratko vreme pošto je put sinteze fruktana objašnjen. Može se očekivati da će se uskoro proizvesti krompir ili šećerna repa sa fruktanima, koji će odgovarati potrebama u ljudskoj ishrani i farmaceutskoj industriji.

7.2.3. Biosinteza vrlo dugačkih omega masnih kiselina sa poli-nezasićenim lancem

Mnoga semena sadrže ulja kao rezervne materije. Biljna ulja su ne samo važan sastojak ishrane čoveka i sisara, nego i sirovina koja se koristi u mnogim industrijskim granama. Skoro sva biljna ulja jesu estri alkohola glicerola sa tri masne kiseline (**triacilgliceroli, trigliceridi**). Osobine triglicerida zavise od dužine (broja C atoma) masnih kiselina i od stepena njihove nezasićenosti. Pošto je u biljkama poznato oko 200 masnih kiselina, jasno je da je broj njihovih mogućih kombinacija vrlo veliki. Za čoveka i sisare, biljna ulja su neophodni sastojak ishrane, jer u njihovom organizmu ne postoje enzimi za sintezu esencijalnih masnih kiselina, **linolne** i **α-linolenske**, koje su sastavni delovi ćelijskih membrana; osim toga, one su i prekursori za sintezu neophodnih omega masnih kiselina. U poslednjih nekoliko godina postignuti su vrlo značajni uspesi u genetičkoj modifikaciji biljaka, sa ciljem da se one osposobe za sintezu omega masnih kiselina.

Masne kiseline su ugljovodonični lanci sa jednom karboksilnom grupom. Njihova sinteza počinje u plastidima, a zatim se nastavlja u membranama endoplazmatičnog retikuluma. Osnovni element njihove građe je **acetil-koenzim A (acetil-CoA)**, koji nastaje u glikolizi i još nekim drugim procesima. To je estar acetata (sirćetne kiseline) i koenzima A, sa visokoenergetskom tioestarskom vezom, koja omogućava njegovo učešće u mnogim biosintetičkim procesima. Glavni stupnjevi sinteze masnih kiselina izloženi su u *Prilogu 7.2*.

Prilog 7.2. Biosinteza masnih kiselina



Slika 7.2A. Biosinteza masnih kiselina u hloroplastu. Enzimi: (1) acetil-CoA karboksilaza, (2) malonil-CoA ACP-transacilaza, (3) 3-ketoacil ACP sintaza (KAS III), (4) 3-ketoacil-ACP reduktaza, (5) hidroksiacil-ACP dehidrataza, (6) 3-ketoacil-ACP reduktaza, (7) 3-ketoacil-ACP sintaza (KAS I), (8) 3-ketoacil-ACP sintaza (KAS II), (9) desaturaza

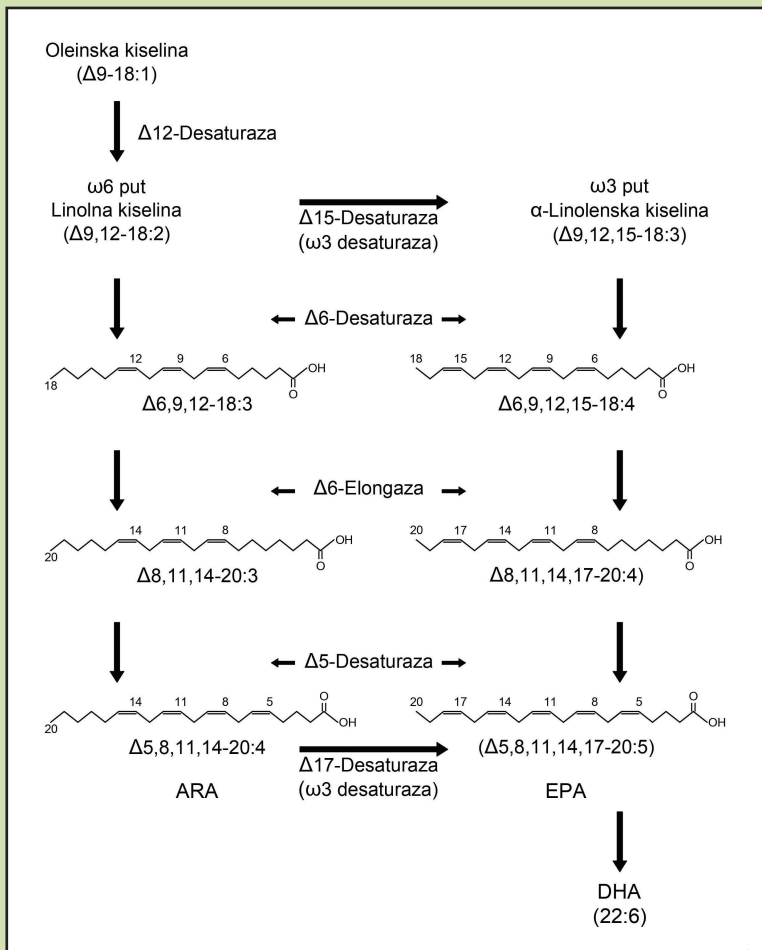
Početni stupnjevi sinteze dešavaju se u stromi svih vrsta plastida; u njima se acetil-CoA prvo karboksiliše i daje **malonil-CoA** koji se vezuje za **protein nosač (ACP)**; sva intermedijerna jedinjenja ostaju vezana za ACP sve do kraja procesa. Na malonil-CoA nadovezuje se još jedan acetil-CoA, pa zatim ceo kompleks gubi CO_2 i od njega postaje jedinjenje sa četiri C atoma, vezano za ACP. Posle niza sukcesivnih reakcija (dve redukcije i jedna dehidratacija), izgrađuje se **butiril-ACP**, koji je osnovni

fragment za sintezu masnih kiselina. ACP je, u stvari, kofaktor enzima **sintaze masnih kiselina**, koji ima sedam povezanih subjedinica. Sintaza masnih kiselina dodaje na butiril-ACP, jedan po jedan, nov molekul acetil-CoA, tako da sa svakim korakom lanac buduće masne kiseline postaje duži za dva C atoma. Prekid rastezanja lanca obavlja **tioesteraza**; u ređim slučajevima prekid se dešava na stupnju C-12 ili C-14, ali kod svih biljaka glavno mesto prekida je na stupnju od 16 ugljenikovih atoma, čime postaje **palmitinska kiselina**. Pošto se ona odvoji od ACP, enzim **elongaza** je može produžiti još jednim acetil-CoA, tako da se dobija **stearinska kiselina** sa 18 ugljenika, a ova pod dejstvom **desaturaze** dobija jednu nezasićenu vezu na C atomu 9 i postaje **oleinska kiselina**. Te tri kiseline, palmitinska (16:0, tj. šesnaest C atoma : 0 nezasićenih veza), stearinska (18:0) i oleinska (Δ^9 -18:1, slovo Δ obeležava prvi od dva ugljenika između kojih je nezasićena veza) jesu prve tri kiseline koje postaju u plastidima. One ili ulaze u sastav plastidnih triglicerida, ili, vezane kao acil-CoA, izlaze iz plastida i ulaze u prostor između dva lipidna sloja membrana glatkog endoplazmatičnog retikuluma. Tu se obavljaju sve dalje promene u njihovoj strukturi; glavni supstrat za promene je oleinska kiselina.

Oleinska kiselina (Δ^9 -18:1) podložna je dejstvu Δ^{12} -desaturaze, koja proizvodi **linolnu kiselinu ($\Delta^9, 12$ -18:2)**, a zatim na nju deluje Δ^{15} -desaturaza, koja proizvodi **α -linolensku kiselinu $\Delta^9, 12, 15$ -18:3** (Slika 7.2B).

Linolna (ω_6) i α -linolenska (ω_3) prekursori su **omega masnih kiselina sa vrlo dugačkim lancem** koje se ne izgrađuju u biljkama, ali mogu da se sintetišu kod sisara iz α -linolenske i linolne kiseline unete hranom (ω_3 ili ω_6 je oznaka za poziciju poslednje nezasićene veze u lancu u odnosu na terminalnu metil grupu). Linolna kiselina pod

dejstvom jedne **elongaze** i **dve desaturaze** prelazi u **arahidonsku kiselinu, ARA (20:4)**, a α -linolenska kiselina, takođe pomoću **elongaze** i **dve desaturaze** daje **eikozapentaenoičnu kiselinu, EPA (20:5)** (Slika 7.2B). Najzad, od EPA putem elongacije i desaturacije postaje **dokozaheksaenoična kiselina, DHA (22:6)**. Masne kiseline se zatim vezuju za glicerol i ulaze u sastav različitih membrana ili rezervnih lipida.



Slika 7.2B. Sinteza omega masnih kiselina sa vrlo dugačkim lancem iz linolne i linolenske kiseline kao prekursora. ARA = Arahidonska kiselina, EPA = Eikozapentaenoična kiselina, DHA = Dokozaheksaenoična kiselina

Biosinteza masnih kiselina koje su u ovom odeljku predstavljene sastoji se od niza kondenzujućih reakcija, u kojima se njihov ugljenični lanac sukcesivno produžuje za dva ugljenikova atoma, a broj nezasićenih veza raste od nula do šest. U tom nizu izdvajaju se tri stupnja: (1) sinteza od butiril-CoA do oleinske kiseline (**Slika 7.2A**), (2) sinteza linolne i α -linolenske kiseline (**Slika 7.2B**) i (3) sinteza omega kiselina sa poli-nezasićenim vrlo dugačkim lancem (**Slika 7.2B**). U metaboličkom sistemu čoveka i sisara nedostaju enzimi potrebni za drugi stupanj, pa se prema tome ni treći ne može obavljati, ako čovek ne dobije linolnu i linolensku kiselinu u biljnoj hrani. S druge strane, biljke ne izgrađuju masne kiseline trećeg stupnja, a čovek ih – smatra se – izgrađuje u nedovoljnoj količini, pa ih takođe mora dobiti sa hranom; najbogatiji izvor ovih supstanci su riblje meso i ulje. U savremenoj medicini postoje nesporni podaci da omega masne kiseline imaju velikog značaja za razviće i zdravlje čoveka. One su od značaja već u prenatalnom razviću, gde utiču na formiranje nervnog sistema fetusa, naročito mozga i oka. Kod odraslih, omega masne kiseline potrebne su za prevenciju kardiovaskularnih bolesti, metaboličkog sindroma i za tretiranje inflamatornih procesa. DHA je posebno značajna kiselina, jer je i prekursor drugih jedinjenja, među kojima su prostaglandini. Na ćelijskom nivou, kao kiselina sa šest nezasićenih veza, ona je vrlo fleksibilan molekul, utiče na fluidnost membrana, na membranske fuzije i na poboljšanje protein-protein interakcija. Kroz istoriju čovek je svoje potrebe za omega kiselinama zadovoljavao hraneći se ribom. U prirodi se, međutim, danas izvori omega kiselina drastično iscrpljuju. To se vidi po smanjenom ribljem fondu u morima i okeanima usled preteranog lova, što predstavlja problem kojim se bave već i agencije UN. U pokušajima da se ribe gaje u akvakulturi, kao što je slučaj sa lososom, troškovi su veći od prinosa, jer se lososi hrane ulovljenom morskom ribom. Morski plankton, tj. jednoćelijske alge i gljive, nisu pogodni izvori masnih kiselina, jer bi troškovi prerađivanja bili vrlo veliki, a javlja se i problem zagađenja ovih mikroorganizama

teškim metalima, dioksinom i drugim zagađivačima [56]. Međunarodne organizacije su se našle pred globalnim problemom da se pronađu novi izvori nezasićenih, omega masnih kiselina i stoga su se pojavili ozbiljni projekti da se za to koriste biljke koje inače sadrže ulje u semenima, s tim da se u njih genetičkim inženjerstvom ugrade enzimi koji katalizuju sintezu omega kiselina [57]. Prva tri uspješna pokušaja u tom pravcu objavljena su 2004. godine, i oni su omogućili dobar uvid u mehanizme sinteze omega kiselina, kao i u teškoće koje još treba savladati.

Ključni enzimi u sintezi omega kiselina jesu specifične **elongaze** i **desaturaze**, koje više biljke nemaju (**Slika 7.2B**). Naučnici su potražili te enzime kod mnogih algi, protozoa, mahovina, nižih gljiva, pa i životinja. Da bi ovi enzimi mogli katalizovati elongaciju ili desaturaciju, masne kiseline moraju biti ili inkorporirane u fosfolipide, ili vezane za CoA. Nije se u početku mnogo znalo o načinu dejstva ovih enzima kod algi i gljiva, pa su zbog toga prinosi u omega kiselinama bili relativno mali. Prve transgene biljke (duvana) dobijene su unosom seta gena za elongazu iz jedne alge (*Isochrysis galbana*), jedne desaturaze iz euglene (*Euglena gracilis*) i druge iz zigomicete (*Mortierella alpina*). Sa konstitutivnim promotorom (CaMV 35S), u listovima duvana dobijeno je, u procentima od ukupnih masnih kiselina, 6.6% ARA i 3% EPA [58]. Iako je to mali prinos, ovaj rad ima poseban značaj, jer je prvi put pokazano da je koncepcija o sintezi omega kiselina u biljkama na solidnoj osnovi. Sa promotorom koji gene za ove enzime aktivira specifično u semenima, sa desaturazom iz alge (*Phaenodactylum tricornutum*) i elongazom iz mahovine (*Physcomitrella patens*), ukupan prinos različitih omega kiselina u semenu lana iznosio je 30-40%; iako ni u ovom eksperimentu prinos ARA i EPA nije bio visok, on je ukazao na neophodnost adekvatnog promotora za semena [59], kao i na potrebu za alternativnom desaturazom zbog nakupljanja neželjenih C18 intermedijera. Treći postupak je 2004. godine patentiran [60], ali se zna da

je korišćen set od šest gena, dve elongaze i četiri desaturaze, iz nekih algi i gljiva, koji su eksprimirani u somatskim embrionima soje (*Glycine max*). U embrionima je akumulirano do 3% DHA, a odrasle biljke su proizvodile EPA [61]. Slično tome je transformisana indijska slačica (*Brassica juncea*) pomoću postupka u kome je u više stupnjeva biolističkim putem ugrađeno u somatske embrione ukupno devet gena, svaki pod nezavisnom kontrolom promotora za seme [62]. U transgenom semenu pomoću prvih šest gena izgrađene su ARA i EPA, koje su bile ugrađene u trigliceride. Transgene biljke su zatim ponovo transformisane vektorom sa još tri gena; dodati su enzimi koji povećavaju količinu EPA, koja je prekursor za DHA. Novi transformanti su sadržali 25% ARA, 15% EPA i male količine DHA (do 1,5%), što je kasnije detaljno opisano [61]. Semena transgenih biljaka su se normalno razvijala i klijala.

Nedavno su opisana [63] dva različita postupka unošenja niza heterologih gena koji efikasno usmeravaju sintezu omega masnih kiselina u ulju semena *Camelina sativa*, dok se istovremeno izbegava nakupljanje neželjenih međuprodukata. Pomoću ovih postupaka je postignut najviši nivo C20+ omega-3 masnih kiselina u standardnoj uljanoj kulturi do sada. U prvom slučaju semenke su sadržale EPA u nivou do 31% (u proseku 24%) a u drugom seme je akumuliralo do 12% EPA i 14% DHA (u proseku 11% EPA i 8% DHA). Ovi nivoi omega-3 masnih kiselina su ekvivalentni onima u ribljem ulju, i predstavljaju prve održive, kopnene izvore. Akumulacija omega-3 masnih kiselina na nivou ribljeg ulja demonstrira efikasnost acil-CoA desaturaze nad prethodno korišćenim lipidnim desaturazama. Sa stalnim napretkom u genetici, proteomici, metabolomici, lipidomici, i genetičkom inženjerstvu, kao i sa povećanjem broja sekvenciranih genoma, modifikacija uljarica postaje veoma izvestan put.

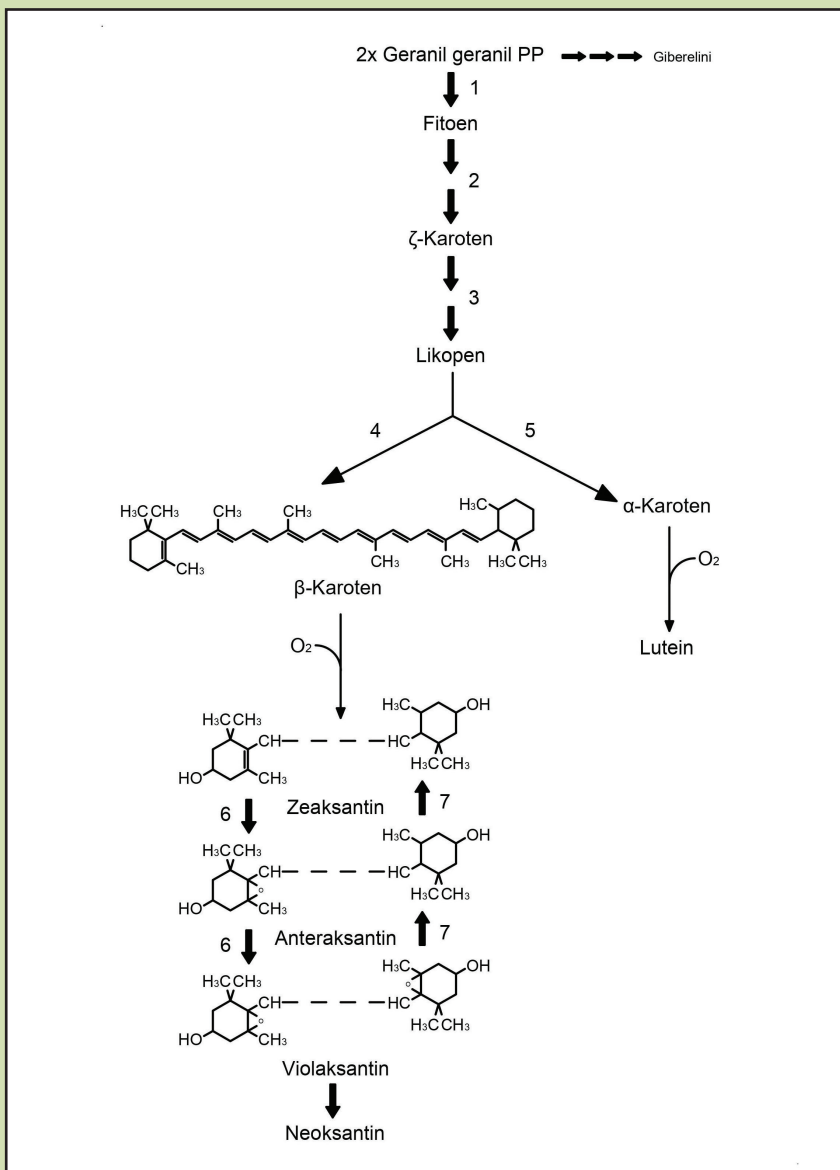
7.2.4. Biosinteza vitamina i akumulacija mikroelemenata

U ishrani čoveka, biljke su najvažniji izvor hranljivih organskih sastojaka i mineralnih elemenata. Čovek iz biljne hrane može dobiti sve vitamine, izuzev vitamina D i B₁₂. Avitaminoze kod ljudi koji se hrane pretežno ili isključivo biljnom hranom ukazuju na nedostatak vitamina u konzumiranim biljkama i na potrebu da se njihova biosinteza pojača. Pošto to iz raznih razloga nije uvek moguće putem konvencionalne selekcije, mnogi istraživači su pribegli metodama genetičkog inženjerstva. Za poslednjih desetak godina postignuti su zaista spektakularni rezultati u povećanju biosinteze **provitamina A (β-karotena)** i **vitamina E (tokoferola)**. Ista populacija ljudi koji pate od avitaminoza često je pogođena anemijom i drugim bolestima do kojih dolazi usled nedostatka mikroelemenata; stoga su nastojanja da se, istovremeno sa poboljšanjem biosinteze vitamina, poveća u biljkama akumulacija gvožđa i cinka.

7.2.4.1. „Zlatni pirinač“

Naziv „**zlatni pirinač**“ (eng.: „Golden Rice“) obuhvata sve genetički transformisane podvrste (*Oryza sativa*, ssp. *japonica* i *indica*) i varijetete pirinča, čiji hranljivi deo semena, endosperm, ima žutu boju, jer sadrži β-karoten. **Karotenoidi** su pigmenti raznih nijansi, od žute i narandžaste do crvene boje, koji učestvuju u fotosintezi, u nekim fotomorfogenetskim procesima, a takođe imaju i ekološki značaj kao dominantni pigmenti mnogih cvetova i plodova. Jedan od karotenoida je β-karoten, koji je u fiziologiji poznat kao provitamin A, jer se u organizmu čoveka razlaže na dva molekula vitamina A. Karotenoidi pripadaju vrlo velikoj i raznovrsnoj porodici izoprenoidnih jedinjenja, čija je biosinteza shematski prikazana u **Prilogu 7.3 (Slika 7.3)**.

Prilog 7.3. Biosinteza karotenoida



Slika 7.3. Biosinteza karotena i ksantofila. Enzimi: (1) fitoen sintaza, (2) fitoen desaturaza, (3) ζ-karoten desaturaza, (4) β-ciklaza, (5) α-ciklaza, (6) epoksidaza, (7) deepoksidaza

Za grupu izoprenoidnih jedinjenja, kojoj pripadaju i karotenoidi, karakteristično je da se sastoje od **izoprena**, ugljovodoničnog fragmenta C_5H_8 . U plastidima, izoprenoidni fragment postaje kao derivat **izopentenil difosfata (pirofosfata) IPP**, koji na jednom kraju („rep“) nosi dve fosfatne grupe. Izopentenil difosfat jednim delom prelazi u svoj izomer, **dimetilalil difosfat, DMAPP**; po jedan molekul IPP i DMAPP se kondenzuju i uz gubitak dve fosfatne grupe proizvode jedinjenje sa 10 ugljenika, monoterpen **geranil-difosfat (GPP)**. Na GPP se postupno nadovezuju fragmenti IPP od po pet ugljenika i izgrađuju najpre jedinjenje od 15 C (seskviterpen **farnezil-difosfat, FPP**), a zatim od 20 C (tetraterpen **geranilgeranil pirofosfat, GGPP**). Vezivanje novih fragmenata je uvek po principu „glava-rep“. Od njih postaju mnogobrojne organske supstance. Mnoge među njima su ciklizovane, ili su dva lanca spojena, tako da se ponekad teško prepoznaje osnovna izoprenoidna struktura. Tako dupliranjem dva segmenta GGPP, koji su ovog puta kondenzovani vezom „rep-rep“, postaje jedinjenje sa 40 ugljenika **fitoen (Slika 7.3)**, koji je prvi stupanj u sintezi karotenoida, iako je bezbojan. Postanak fitoena katalizuje ključni enzim **fitoen sintaza**, koji usmerava dalje sinteze isključivo u pravcu karotenoida. Da bi od fitoena postao prvi obojeni karotenoid **likopen**, a zatim i β -karoten, potrebne su dve **desaturaze**, enzimi koji katalizuju uvođenje dve nezasićene veze, kao i ciklizacija lanca na oba kraja, koju obavlja enzim **ciklaza**. β -Karatoten je provitamin A, jer se u organizmu čoveka, na sredini molekula gde se nalazi „rep-rep“ veza on razlaže na dva molekula vitamina A.

Jestivi deo zrna pirinča ne sadrži uopšte karotenoide, niti enzime koji su uključeni u njihovu sintezu. Međutim, pirinač je glavna hrana u vrlo prostranim delovima sveta, kao što su Indija, Indokina i Indonezija, zatim neki delovi Afrike i Latinske Amerike. Vitamin A je neophodan za sintezu

retinola i njegov nedostatak izaziva poremećaje vida. Prema studijama Svetske zdravstvene organizacije, postoji više od 118 zemalja u svetu u kojima je ukupno 140 do 250 miliona predškolske dece ugroženo slepilom usled nedostatka vitamina A. Simptomi deficijencije vitamina A su noćno slepilo, kseroftalmija i druga oboljenja, koja se često završavaju potpunim slepilom, ili čak i smrću dece. Hipovitaminoza A smanjuje izgled na lečenje bolesti kod dece, kao što su diareja, neka respiratorna oboljenja i male boginje. Samo u jugoistočnoj Aziji oko 250.000 dece oslepi godišnje zbog avitaminoze. Odrasle osobe, kao što su žene tokom trudnoće, imaju teškoća pri porođaju usled hipovitaminoze A. U razvijenim zemljama nedostatak vitamina A ne predstavlja rasprostranjenu opasnost, jer se on nalazi u raznovrsnoj hrani, kao što su riblje meso, jetra, jaja, kao i različite biljke. Dok u Americi ljudi dobijaju samo 26-36% potrebnog vitamina A iz biljne hrane, u ruralnom Bangladešu 80% hrane čini pirinač, u kome provitamina A uopšte nema. Razume se da bi i stanje u ugroženim regionima moglo da bude popravljeno drugačijom ishranom ili uzimanjem lekova sa vitaminom A. Ali zbog opšteg siromaštva i neprosvećenosti, kao i zbog neorganizovane zdravstvene službe, takvo poboljšanje je za sada, a i za blisku budućnost, teško ostvarljiv zadatak. Devedesetih godina prošlog veka razvoj biotehnologije i genetičkog inženjerstva dostigao je stupanj na kome je bilo moguće planirati modifikacije pirinča, sa ciljem da se i u ovu vrstu unese sposobnost da sintetiše vitamin A. Kada bi se sadašnji varijeteti pirinča zamenili transgenim biljkama koje imaju tu sposobnost, bio bi to prirodan i efikasan način da se kvalitet ishrane stanovništva u ugroženim regionima radikalno poboljša.

Ideja da se pirinač genetički modifikuje potiče od istaknutog naučnika Inga Potrikusa iz Švajcarske, koji je vrlo poznat stručnjak za kulturu ćelija i biotehnologiju naročito monokotiledonih biljaka. Prvi eksperimenti na modifikaciji pirinča su ostvareni u saradnji sa Peterom Beyerom iz Nemačke, čija je laboratorija bila poznata po proučavanju biosinteze izopreno-

idnih jedinjenja, posebno pigmenata. U toj laboratoriji su iz cveta narcisa (*Narcissus pseudonarcissus*) izolovani geni koji regulišu biosintezu karotenoida i koji su bili potrebni za modifikaciju pirinča. Projekat Potrikus i Beyer primljen je u početku sa skepsom i od drugih naučnika i od finansijera, jer je ocenjeno da je uspeh malo verovatan, ali da vredi pokušati zbog velike potencijalne koristi – kako je to kasnije opisao jedan od autora [64]. Ipak, trebalo je da prođe osam godina do prvih rezultata [65], koji su konačno potvrdili ispravnost osnovne ideje i dali nov podsticaj daljim istraživanjima.

U prvim radovima na modifikaciji pirinča [65] transformisan je jedan varijetet podvrste *japonica*, čiji su izolovani nezreli embrioni imali zadovoljavajuću sposobnost za regeneraciju *in vitro*. Embrioni su kokultivisani sa suspenzijom dva soja *Agrobacterium tumefaciens*, koji su nosili plazmide sa rekombinovanom DNK i potrebnim genima. Prethodno je utvrđeno da se u endospermu pirinča ne sintetišu karotenoidi, ali da se obavlja prva faza u njihovoj sintezi, koja se završava proizvodnjom geranilgeranil pirofosfata, **GGPP (Prilog 7.3)**. Geranilgeranil pirofosfat je supstrat za sintezu mnogih drugih izoprenoida, pa je trebalo skrenuti metaboličke procese u pravcu sinteze karotenoida; to je bilo uspešno obavljeno, unošenjem u pirinač enzima za sintezu fitoena, što nije izazvalo metaboličke poremećaje u sintezi drugih jedinjenja. Rekombinovana DNK obuhvatala je tri gena koji kodiraju enzim **fitoen sintazu** iz narcisa (*Narcissus pseudonarcissus*), enzim **desaturazu** poreklom iz bakterije *Erwinia uredovora* (koja obavlja obe potrebne desaturacije) i enzim **likopen ciklazu** iz narcisa. Ta tri enzima bila su dovoljna da rekonstruišu ceo put biosinteze β -karotena. T-DNK je nosila još i selektabilni gen koji daje otpornost prema antibiotiku higromicinu. Transformisani embrioni su izrasli u biljke čija su semena imala žut endosperm. U genomu ćelija endosperma dokazano je prisustvo svih stranih gena, a analizama je potvrđeno da endosperm sadrži do 1,6 $\mu\text{g/g}$ karotenoida.

U naučnim krugovima su ovi rezultati pozdravljeni kao još jedan dokaz da je osnovna zamisao o korišćenju genetičkog inženjerstva u praktične svrhe izvodljiva. Oni, međutim, nisu dobro primljeni među protivnicima primene genetičkog inženjerstva, koji su izneli niz razloga protiv prihvatanja „zlatnog pirinča“ u ishrani. Ti razlozi obuhvataju biološke i medicinske aspekte, ali su dominantni etički, sociološki i politički aspekti, koji imaju znatno opštiji karakter i izlaze iz okvira biologije i prirodnih nauka. No za poslednjih nekoliko godina ni istraživači nisu sedeli skrštenih ruku i uložili su ogroman trud da (1) poboljšaju kvalitet transgenog pirinča, (2) stvore osnove za njegovo rasprostranjenje i široko korišćenje u različitim delovima sveta, i (3) izbegnu one postupke u proceduri, koji mogu da izazovu odbojnost potrošača i administrativne zabrane onih vlada koje su pod pritiskom anti-GMO organizacija [66, 67]. U ovom odeljku će pažnja biti posvećena samo razvoju metoda koji poboljšavaju naučne aspekte dobijanja i gajenja „zlatnog pirinča“. O drugim aspektima se govori u kasnijem odeljku (videti Poglavlje 8), u sklopu svih sličnih pitanja sa kojima se primena genetičkog inženjerstva susreće.

- Varijetet podvrste *japonica*, pirinča koji je prvi transformisan, predstavlja pogodan laboratorijski objekat zbog visoke regenerativne sposobnosti, ali to nije pirinač koji se gaji na poljima i koji je glavna hrana stanovništva u jugoistočnoj Aziji. Timovi istraživača su ponovili transformaciju koristeći prvo dva elitna varijeteta podvrste *indica*; jedan od njih se gaji u svim zemljama regiona, a drugi naročito u Vijetnamu. Takođe je transformisan još jedan varijetet *japonica*, čije se osobine lako prenose konvencionalnim ukrštanjem na mnoge druge varijetete pirinča. Na taj način formirane su osnove da se kompleks gena za sintezu β -karotena proširi na mnoge lokalne varijetete i ekotipove, što se može obaviti čak i bez manipulacije genima, u svakoj srednje opremljenoj poljoprivrednoj ustanovi [67].

- Preciznija ispitivanja su pokazala da je radi potpune sinteze β -karotena dovoljno preneti samo dva strana gena, koji kodiraju enzime **fitoen sintazu** i **desaturazu**. Kada se na tom putu izgradi likopen, on povratno indukuje aktivaciju **likopen sintaze**, koja dovršava sintezu β -karotena. To čini konstrukciju vektora znatno jednostavnijom, jer nije potrebno koristiti dva soja *A. tumefaciens*.
- U prvoj generaciji transformisanog pirinča količina β -karotena je bila relativno mala, usled toga što je fitoen sintaza iz narcisa bila nedovoljno aktivna u pirinču. Uporednim ispitivanjem aktivnosti ovog enzima iz raznih biljaka, izabrana je za dalji rad fitoen sintaza iz kukuruza. Prvobitni gen poreklom iz narcisa zamenjen je genom iz kukuruza, i pomoću nove fitoen sintaze proizvedeno je 37 μ g karotenoida na gram endosperma, od čega je 84% činio β -karoten [68].
- Zbog čestih prigovora u javnosti, da je korišćenje antibiotika u selekciji štetno za potrošače, u varijetetima pirinča koji se pripremaju za ishranu antibiotik (higromicin) je zamenjen **manozom**, što znači da je umesto negativne uvedena pozitivna selekcija (videti Poglavlje 5). U drugoj generaciji transformisanog pirinča, u embrione pirinča unesen je gen *pmi* za enzim **fosfomanoznu izomerazu (PMI)** iz *E. coli*; inokulirani embrioni se, posle prve nedelje na saharozi, prenose na podlogu u kojoj se koncentracija saharoze postepeno smanjuje, a povećava se udeo manoze. U tom periodu manozna se u ćelijama intenzivno fosforiliše pod dejstvom endogenih kinaza i prevodi u **manozo-6-fosfat**, koja se ne može koristiti u metabolizmu. Pritom se troše sve ćelijske zalihe ATP i fosfata. Netransformisane ćelije prestaju da se dele, stagniraju u rastanju i na kraju izumiru. Međutim, u transformisanim ćelijama enzim PMI konvertuje manozo-6-fosfat u **fruktozo-6-fosfat**, koji lako ulazi u metaboličke procese i stimuliše deobu ćelija i regeneraciju organa. Fruktozo-6-fosfat naknađuje malu količinu saharoze u podlozi,

ali samo u transformisanim ćelijama. Podešavanjem odnosa saharoze i manoze u selektivnoj podlozi reguliše se odnos transformisanih i netransformisanih biljaka. Nije zapažena pojava biljaka koje konačno uspevaju da izbegnu selekciju. Ćelije koje izumiru ne postaju nekrotične i ne postoji opasnost od izlučivanja materija štetnih za regeneraciju. Na taj način je izbegnuto korišćenje antibiotika, a efikasnost transformacije je porasla na 41%, za razliku od selekcije na higromicinu, koja nije bila veća od 10-20% [69].

- Transgeni pirinač koji se priprema za uvođenje u proizvodnju mora proći kroz znatan broj testova, kojima se podvrgavaju svi biljni proizvodi za koje se traži odobrenje za upotrebu. To su, pre svega, toksikološki i imunološki testovi koji su uobičajeni, ali i specifični testovi kojima se utvrđuje položaj T-DNK u genomu i eventualni uticaj mesta insercije na druge osobine. Kao što se dešava sa svim biljnim vrstama pri transformaciji pomoću *A. tumefaciens*, broj kopija T-DNK u genomu pirinča može da varira, prema jednoj studiji, od jedan do četiri. Zatim, u okviru gena može doći do rearanžmana segmenata, što utiče na njihovu aktivnost. I najzad, zapaženo je i kod pirinča da se izvesne sekvence vektora, koje leže van regiona između leve i desne granice T-DNK, prenose u genom pirinča [70]. To su sve osobine koje se proveravaju pre nego što se odluči koji će transformanti biti korišćeni za razmnožavanje i za proizvodnju transgenog semena.
- Vrlo važna osobina transgenog pirinča, koja se proverava, jeste količina β -karotena i njegova stabilnost u drugoj i trećoj generaciji. Pošto transgene biljke F_0 generacije cvetaju, za samooprašivanje se koriste one koje imaju najveće količine β -karotena. Nasleđivanje ove osobine se dešava u skladu sa Mendelovim pravilima. U generacijama F_1 , F_2 i F_3 količina β -karotena se ne smanjuje, šta više, ona se povećava u odnosu na druge karotenoide. Na taj način, proizvođači koji u jednoj sezo-

ni odgaje seme, ne moraju sledeće godine ponovo kupovati transgeno seme, nego mogu svoje koristiti i u narednoj setvi.

- Posle više od decenije rada na proizvodnji transgenog pirinča obogaćenog provitaminom A, u kojoj su istraživači na briljantan način savladali mnoge naučne prepreke, oni su se susreli sa teškoćama druge vrste, koje su pretežno administrativne prirode, a koje proizlaze iz zakonodavstva pojedinih zemalja, ili su im mnogim brutalnim akcijama nametnute. „Zlatni pirinač“ je bio proizvođen u akademskim ustanovama i potpomognut od strane mnogih humanitarnih organizacija. On nije bio industrijski produkt neke kompanije, koja bi za sebe prigrabila profit. Pronalazači su našli za potrebno da osnuju preduzeće **Syngenta**, čiji je cilj bio da se bavi administrativnim i pravnim poslovima. Preduzeće se i dalje finansira iz humanitarnih fondova, kojima su pristupili mnogi univerziteti i instituti, između ostalog i time što ustupaju besplatno patentna prava i prava na intelektualnu svojinu. Jedan od uslova pod kojima Syngenta radi je čvrsta rešenost da proizvođači koji žele da koriste transgeni pirinač dobiju seme i tehnologiju besplatno, a da se spreči uspostavljanje bilo kakvih patentnih prava, koja bi donela profit krupnoj industriji. Podrška takvim stavovima raste u svetu i treba očekivati da će se uskoro pokazati i prvi rezultati.

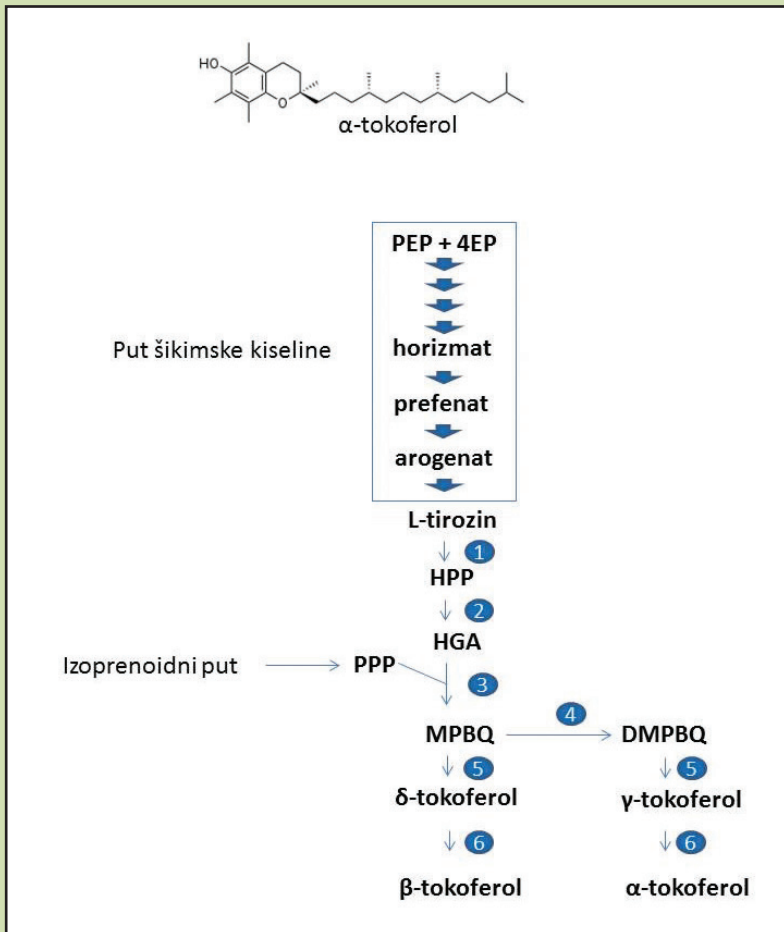
7.2.4.2. Metaboličko inženjerstvo: biosinteza vitamina E

Jedna klasa hemijski bliskih jedinjenja, koja su obuhvaćena nazivom vitamin E, privlači u poslednje vreme znatnu pažnju naučnika koji se bave ishranom ljudi, jer su otkrivena svojstva tih jedinjenja u prevenciji mnogih rasprostranjenih bolesti. Smatra se da zdravi ljudi uglavnom primaju dovoljno vitamina E uobičajenom hranom, ali da postoje stanja u kojima dnevnu dozu vitamina E treba znatno povećati, jer on ima važnu ulogu u smanjenju rizika od kardiovaskularnih i malignih oboljenja i u uspo-

ravanju bolesti vezanih za starenje, kao što su katarakta, artritis i neki poremećaji nervnog sistema. Faktori koji doprinose pogoršanju svih ovih bolesti su slobodni radikali kiseonika, koji deluju kao oksidanti lipidnih jedinjenja, a vitamin E je poznat kao jedno od najjačih antioksidativnih sredstava. Supstance koje kumulativno ulaze u sastav vitamina E sintetišu se isključivo u biljkama, i to u fotosintetičkim organima, mada najveću koncentraciju dostižu u semenima uljarica. Otuda se poslednjih godina znatna pažnja posvećuje povećanju biosinteze vitamina E, u čemu se koriste klasične metode i mutanti, kao i metode genetičkog inženjerstva. Biosinteza vitamina E opisana je detaljno u *Prilogu 7.4*.

Naziv **vitamin E** obuhvata dve klase tokohromanola: **tokoferole** i **tokotrienole**, koji su slični po strukturi, ali različiti po fiziološkoj aktivnosti. Svi tokohromanoli imaju na jednom kraju molekula aromatičnu polarnu grupu („glavu“), za koju je bočno vezan izoprenoidni lanac („rep“); kod tokoferola „rep“ je zasićen, a kod tokotrienola nezasićen lanac. Tokohromanoli su asocirani sa ćelijskim membranama na taj način što bočni „rep“ leži u lipidnom sloju, a polarna „glava“ na površini membrane. Obe klase sadrže po četiri jedinjenja (α , β , γ i δ), koja se razlikuju po broju (1-3) i poziciji metil grupa vezanih za „glavu“. U ćelijama čoveka nalazi se transportni protein čija je specifičnost u tome što preferencijalno vezuje i distribuira α -tokoferol sa tri metil grupe. Iz tog razloga α -tokoferol ima do 30 puta jače dejstvo od ostalih tokoferola i ima najveći udeo u medikamentima koji se koriste. Međutim, u biljnim ćelijama, kao i u uslovima *in vitro*, α -tokoferol nema prednosti nad drugim tokohromanolima u otklanjanju oksidativnog dejstva slobodnih radikala kiseonika. U semenima uljarica nalazi se od 330 do 2000 μg ukupnih tokohromanola na gram ulja, ali je 90% toga γ -tokoferol, koji ima samo oko 1/10 aktivnosti α -tokoferola. Za razliku od toga, zeleni delovi biljaka sadrže između 20 i 50 μg ukupnih tokoferola na gram tkiva, ali se oni sastoje uglavnom od α -tokoferola.

Prilog 7.4. Kompozicija i biosinteza vitamina E



Slika 7.4. Biosinteza tokoferola. Enzimi: (1) TAT, tirozin aminotransferaza, (2) HPPD, 4-hidroksifenilpiruvat dioksigenaza, (3) VTE2, homogentizat fitil transferaza, (4) VTE3, MPBQ metiltransferaza, (5) VTE1, tokoferol ciklaza, (6) VTE4, tokoferol metiltransferaza

Skraćenice: PEP – fosfoenolpiruvat, 4EP – eritrozo4-fosfat, HPP – 4-hidroksifenilpiruvat, HGA – homogentizinska kiselina, PPP – fitil pirofosfat, MPBQ – metilfitil benzokinol, DMPBQ – dimetilfitil benzokinol

Tokohromanoli imaju dva prekursora koji se kondenzuju u jedan (Slika 7.4). „Glava“ tokohromanola postaje od aminokiseline **tirozina**, koji se preko **p-hidroksifenil piruvata (HPP)** konvertuje u **homogentizinsku kiselinu (HGA)**, pomoću enzima **hidroksifenil piruvatne dioksigenaze (HPPD)**. Izoprenoidni „rep“ tokohromanola postaje od **geranilgeranil pirofosfata (GGPP)**, koji pod dejstvom **reduktaze (GGPPR)** prelazi u **fitil pirofosfat (PPP)**. Prvi ireverzibilni stupanj u sintezi tokohromanola obavlja proizvod **VTE2** gena (eng.: „VITAMIN E2“), enzim **homogentizat fitil transferaza (HPT)**, koji kondenzuje homogentizinsku kiselinu sa fitil pirofosfatom, da bi se dobili tokoferoli (Slika 7.4); jedna varijanta ovog enzima, **homogentizat geranilgeranil transferaza (HGGT)**, kondenzuje homogentizinsku kiselinu sa **geranilgeranil pirofosfatom**, čime postaju tokotrienoli. Prvi proizvod kondenzacije pri postanku tokoferola je **metilfitil benzokinol (MPBQ)**. Enzim **ciklaza** (proizvod **VTE1** gena), dovršava ciklizaciju hromanolskog prstena i proizvodi δ -tokoferol (sa jednom metil grupom), koji pod dejstvom **metiltransferaze (VTE4)** prelazi u β -tokoferol (sa dve metil grupe). Alternativno, MPBQ može da bude podvrgnut prvo metilaciji (**VTE3**), kojom postaje **dimetilfitil benzokinol (DMPBQ)**, a zatim ciklizaciji (**VTE1**), čime postaje γ -tokoferol (sa dve metil grupe). Pod dejstvom γ -tokoferolmetiltransferaze (**γ -TMT**, proizvoda **VTE4** gena) postaje α -tokoferol (sa tri metil grupe). Na isti način se dešavaju promene u sintezi α -, β -, γ - i **δ -tokotrienola** [71, 72].

Biosintetički put tokohromanola poznat je već više od trideset godina zahvaljujući korišćenju izotopa i proučavanju enzimskih reakcija. Tek u poslednjoj deceniji 20. veka su identifikovani i geni koji kodiraju ove enzime zahvaljujući sekvenciranju genoma *Arabidopsis thaliana* i cijanobakterije *Synechocystis* PCC6803, kod kojih su putevi biosinteze začuđuju-

će slični. Pokušaji da se u biljkama poveća količina vitamina E razvijaju se u dva pravca, zavisno od cilja transformacije: u pravcu povećanja ukupne količine tokohromanola, ili u pravcu preferencijalne biosinteze α -tokoferola, ako se računa na semena kao na izvor vitamina E i na korišćenje α -tokoferola za medicinske svrhe [71].

Prekursori tokohromanola povezani su sa metaboličkim putevima u ćeliji, kao što su **put šikimske kiseline**, iz koga potiče **homogentizinska kiselina**, i **izoprenoidni put**, u kome je važan član **geranilgeranil pirofosfat**. Nivo neposrednih prekursora tokohromanola zavisi od aktivnosti ovih puteva, od fluksa metabolita koji može biti usmeren u jednom ili u drugom pravcu, što zavisi od afiniteta ključnih enzima prema alternativnim supstratima koji su u kompeticiji. Dobro poznavanje metaboličkih reakcija, enzima koji u njima učestvuju i gena koji kodiraju ove enzime su neophodna baza za **metaboličko inženjerstvo**, čiji je jedan od ciljeva usmeravanje metaboličkih procesa u izabranom pravcu, radi pojačanja biosinteze određenih produkata. U slučaju metaboličkog inženjerstva za dobijanje tokohromanola, u svim korišćenim postupcima su ciljne ćelije transformisane unošenjem jednog ili dva gena (*VTE1-4*). Ekspresija tih gena je time pojačana, pa je povećana i količina metabolita koji je njihov glavni produkt. U tom smislu se biosinteza tokohromanola (vitamina E) može razmatrati kao model-sistem za metaboličko inženjerstvo [73]. Sledeći prikaz glavnih dostignuća, koji se može pratiti prema metaboličkoj mapi u **Prilogu 7.4**, ilustruje postupke koji su primenjeni kada je trebalo napraviti izbor između biosinteze tokoferola ili tokotrienola, kao i u izboru između njihovih α , β , γ i δ derivata.

- Prva potvrda da su homogentizinska kiselina (HGA) i fitil pirofosfat (PPP) prekursori tokoferola došla je iz rada [74] u kome su ćelijske kulture biljke *Carthamus tinctoria* gajene na podlozi sa dodatkom ovih jedinjenja, čime je bila znatno povećana biosin-

teza tokoferola. To je kasnije široko potvrđeno pomoću genskih manipulacija. Trebalo bi očekivati da svako povećanje količine homogentizinske kiseline (HGA) s jedne strane i fitil pirofosfata (PPP), odnosno geranilgeranil pirofosfata (GGPP) s druge, poveća i količinu tokohromanola. Međutim, prenošenje izolovanog gena za **HPPD** iz ječma u arabidopsis i duvan povećalo je *in vitro* aktivnost gena, ali ne i količinu krajnjeg produkata – tokoferola – ni u listu ni u semenu domaćina. Ograničavajući faktor u ovom slučaju bio je nedovoljan fluks metabolita, koji su mnogo više korišćeni za sintezu fenilalanina nego tirozina. Naime, tirozin i fenilalanin imaju zajedničke prekursore, a putevi sinteze se razdvajaju na stupnju posle prefenata. Akumulacija tirozina povratno inhibira njegovu sopstvenu sintezu, tako da je fluks ka fenilalaninu (i mnogobrojnim fenilpropanoidima) obično aktivniji. Da bi se povećao tok metabolita prema homogentizinskoj kiselini, u biljke (koje su već imale pojačanu aktivnost HPPD), uveden je još jedan gen [75], koji prefenat prevodi direktno u **hidroksifenil piruvat**, neposredni prekursor homogentizinske kiseline. To je bio gen koji kodira enzim **prefenatnu dehidrogenazu (PDH)**, poreklom iz kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*). Enzim PDH, katalizujući sintezu hidroksifenil piruvata, zaobilazi mesto razdvajanja puteva ka fenilalaninu ili tirozinu, pa zajedničkim dejstvom PDH i postojećeg enzima HPPD, tok metabolita skreće i „uliva se“ direktno u homogentizinsku kiselinu. Usled toga, proizvedena je znatno veća količina homogentizinske kiseline, a količina tokohromanola porasla je za oko 10 puta u odnosu na onu u kontrolnim biljkama.

- Početni koraci u sintezi izoprenoidnih jedinjenja dešavaju se ili u citoplazmi (počev od mevalonata) ili u plastidima, gde se **gliceraldehid-3-fosfat** i **piruvat** kondenzuju u **1-dezoksi-D-ksilulo-**

zo-5-fosfat (DXP), pod dejstvom **DXP sintaze**. Jedno od ključnih jedinjenja dalje u izoprenoidnom putu je geranilgeranil pirofosfat (GGPP), od koga se granaju putevi za sintezu karotenoida, tokohromanola, hlorofila, plastokinona i mnogih drugih jedinjenja. Estévez i saradnici [76] su transformisali arabidopsis pomoću konstrukta koji je sadržao cDNK za gen koji kodira DXP sintazu, u pravoj ili obrnutoj orijentaciji. U saglasnosti s tim, transgene biljke su ispoljile povećanje, odnosno smanjenje sinteze svih izoprenoidnih plastidnih jedinjenja. U odnosu na netransformisane biljke, količina α -tokoferola porasla je za 154-215% u transgenim biljkama sa pravom orijentacijom transgena, a smanjila se na 43-78% kod biljaka sa obrnutom orijentacijom. Na sličan način menjala se i količina hlorofila, čiji jedan sastavni deo, **fitol**, nastaje od fitil pirofosfata. Fitol je za sintezu tokoferola često deficijentan, ali on postaje u biljci i na drugi način, osim redukcije GGPP. Kada je hlorofil u biljci podvrgnut degradaciji, npr. pri starenju listova, fitol se oslobađa i tokoferol se akumulira u senescentnim listovima.

- Sledeći stupanj u biosintezi tokohromanola, koji je podložan genskoj manipulaciji, jeste izbor između odnosa tokoferola i tokotrienola, koji zavisi od kondenzacije homogentizata sa fitil pirofosfatom (PPP), ili geranilgeranil pirofosfatom (GGPP). U biljkama postoji samo jedan genski lokus za *VTE2* gen, čiji je proizvod enzim koji vrši obe kondenzacije. Njegov afinitet prema GGPP ili PPP zavisi od faktora koji nisu dovoljno poznati. Jedna varijanta enzima ima veći afinitet prema PPP i ona preovlađuje u dikotiledonim biljkama, npr. u arabidopsisu. Više autora je dokazalo da pojačana ekspresija ovog gena u transgenim biljkama arabidopsisa dovodi do vrlo značajnog povećanja ukupne količine tokoferola, kako u listovima tako i u semenu [77]. Druga varijanta enzima, izolovana iz ječma

u pomenutim eksperimentima [75], izazvala je iznenađenje, jer su tom prilikom izgrađeni prvenstveno tokotrienoli, a ne tokoferoli. I to se dogodilo u duvanu, koji tokotrienole inače sadrži u izuzetno malim, jedva merljivim količinama. No u svakom slučaju, taj rezultat otvara mogućnost da se utiče na odnos tokotrienola i tokoferola, čak i kod biljaka koje normalno imaju samo jednu ili drugu grupu ovih jedinjenja.

- Semena mnogih monokotila, kao što su ječam, pšenica i pirinač, bogata su tokotrienolima, a sadrže vrlo malo tokoferola. U njima je otkrivena posebna varijanta enzima **homogentizat geranilgeranil transferaza (HGGT)**, koji za kondenzaciju sa homogentizinskom kiselinom preferencijalno koristi geranilgeranil pirofosfat i time proizvodi tokotrienole. Duvan, kao i većina dikotila, sintetiše samo male količine tokotrienola. Međutim, ćelije kalusa i listovi transgenog duvana sa genom za HGGT sintetišu sve tokotrienole u relativno velikim količinama, dok sinteza tokoferola u njima ostaje na kontrolnom nivou [78]. Slično tome, cDNK ječma, koja sadrži aktivnost HGGT, sintetiše u transgenim biljkama arabidopsisa 700-900 µg ukupnih tokoferola i tokotrienola na gram suve težine, za razliku od kontrolnih biljaka, koje imaju samo 40-65 µg istih supstanci. U listovima transgenih biljaka γ -tokoferol dostiže ~85% ukupnih tokohromanola.
- Osim povećanja ukupne količine tokohromanola, za njihovo korišćenje u medicini, poljoprivredi ili tehnologiji od velike je važnosti njihov sastav, tj. odnos α , β , γ i δ derivata. Ulje semena soje, koje se u svetu koristi od 30% do 70% u ishrani, sadrži samo 10% α -tokoferola, 60-65% γ -tokoferola i 20-26% δ -tokoferola. Semena arabidopsisa i indijske uljane biljke (*Brassica juncea*) takođe sadrže najviše γ -tokoferola. Transgene biljke u koje su preneseni jedan ili

dva gena za enzime koji regulišu sintezu različitih tokoferola imaju znatno drugačiji sastav. Povećana ekspresija *VTE2* gena utiče na povećanje sinteze tokoferola u listovima i semenu transgenog arabidopsisa pet, odnosno dva puta. Ako se istovremeno pojača i ekspresija *VTE4* gena, onda će ta povećana količina biti u obliku α -tokoferola, čime se aktivnost vitamina E povećava oko 12 puta. Sastav sojinog ulja promjenjen je povećanom aktivnošću gena *VTE3*, što je na kraju dovelo do konvertovanja 90% δ -tokoferola u γ -tokoferol. Kada je istovremeno pojačana i ekspresija *VTE4* gena, sav γ -tokoferol je metilovan, i preveden u α -tokoferol [79]. Soja je takođe uspešno transformisana genom za γ -TMT (*VTE4*), izolovanim iz biljke *Perilla frutescens* i stavljenim pod kontrolu promotora za vicilin, jedan protein semena leguminoza [80]. U ulju semena soje procenat α -tokoferola (od ukupnih tokoferola) porastao je od 8,41% u kontroli, na 81,67%. Dalje, gen γ -TMT iz *P. frutescens* katalizovao je i metilaciju preostalog δ -tokoferola; količina β -tokoferola, koji je time nastao, porasla je od 1% do 10,3%. Pošto je β -tokoferol drugi po aktivnosti kao vitamin E, znači da je sav tokoferol preveden u dve najaktivnije forme, čime je biološka aktivnost vitamina E (merena specifičnim testom) porasla u transgenoj soji za oko pet puta. Izraženo na drugi način, to znači da, dok četiri supene kašike sojinog ulja sadrže 13 internacionalnih jedinica (IU) vitamina E, ista količina ulja koje je dobijeno dejstvom γ -TMT sadrži 65 IU vitamina E [71].

Sažetak

Dobijanje biljaka sa povećanim prinosom kao i poboljšanje kvaliteta biljnih proizvoda je oduvek bio cilj uzgajivača, počevši od perioda domestikacije, preko „zelene revolucije“ sve do današnjih dana. Aktivno učešće čoveka tokom domestikacije ogledalo se prvenstveno u odabiranju onih promena kod gajenih biljaka koje su donosile veći prinos. Dok je glavni cilj selekcionera i danas traganje za genotipovima koji su sposobni da i pod nepovoljnim uslovima održe relativno visok prinos, savremene biotehnoške metode razvijaju se sa svrhom da se genotip promeni putem unošenja gena koji tu sposobnost povećavaju.

Pokušaj povećanja prinosa delovanjem na nivou gena koji učestvuju u regulaciji procesa fotosinteze i transpiracije za sada nije bio efikasan, ali dobijeni rezultati čine osnovu za buduće pravce istraživanja na poboljšanje efikasnosti Rubisco enzima, uvođenje C4 enzima u C3 biljke, kao i ekspresiji gena za akvaporine.

Poboljšanje kvaliteta biljnih proizvoda i dobijanje funkcionalne hrane vodi ka kvalitetnijoj ishrani i prevenciji brojnih bolesti. Modifikacije u metabolizmu ugljenih hidrata, biosintezi poli-nezasićenih masnih kiselina, kao i biosintezi vitamina i akumulaciji hranljivih mikroelemenata postaju veoma izvestan put ka tom cilju upravo zahvaljujući stalnom napretku u genetici, proteomici, metabolomici, lipidomici i genetičkom inženjerstvu.

Literatura 7

1. Andrews TJ, Whitney SM (2003) Manipulating ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in the chloroplasts of higher plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414: 159-169.
2. Parry MAJ, Andralojc PJ, Mitchell RAC, Madgwick PJ, Keys AJ (2003) Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation. *Journal of Experimental Botany* 54: 1321-1333.
3. Spreitzer RJ, Salvucci ME (2002) Rubisco: Structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annual Review of Plant Biology* 53: 449-475.
4. Getzoff TP, Zhu G, Bohnert HJ, Jensen RG (2006) Chimeric *Arabidopsis thaliana* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase containing a pea small subunit protein is compromised in carboxylation. *Plant Physiology* 116: 695-702.
5. Kanevski I, Maliga P, Rhoades D, Gutteridge S (2006) Plastome engineering of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in tobacco to form a sunflower large subunit and tobacco small subunit hybrid. *Plant Physiology* 119: 133-141.
6. Matsuoka M, Furbank RT, Fukayama H, Miyao M (2001) Molecular engineering of C4 photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 52: 297-314.
7. Ku MSB, Agarie S, Nomua M, Fukayama H, Tsuchida H, Oni K, Hirose S, Toki S, Miyao M, Matsuoka M (1999) High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. *Nature Biotechnology* 17: 76-80.
8. Miyao M, Fukayama H (2003) Metabolic consequences of overproduction of phosphoenolpyruvate carboxylase in C3 plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 414: 197-203.

9. Minorsky PV (2002) Global warming-effect on plants. *Plant Physiology* 129: 1421-1422.
10. Edwards GE, Franceschi VR, Voznesenskaya EV (2004) Single-cell C4 photosynthesis versus the dual-cell (Kranz) paradigm. *Annual Review of Plant Biology* 55: 173-196.
11. Magnin NC, Cooley BA, Reiskind JB, Boews G (1997) Regulation and localization of key enzymes during the induction of Kranz-Less, C4-type photosynthesis in *Hydrilla verticillata*. *Plant Physiology* 115: 1681-1689.
12. Chrispeels MJ, Maurel C (1994) Aquaporins: The molecular basis of facilitated water movement through living plant cells? *Plant Physiology* 105: 9-13.
13. Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H (2002) Plant aquaporins: multi-functional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell & Environment* 25: 173-194.
14. Aharon R, Shahak Y, Wininger S, Bendov R, Kapulnik Y, Galili G (2003) Overexpression of a plasma membrane aquaporins in transgenic tobacco improves plant vigour under favourable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell* 15: 439-447.
15. Uehlein N, Lovisolo C, Siefritz F, Kadenhoff R (2003) The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature* 425: 734-737.
16. Tabe L, Higgins TJV (1998) Engineering plant protein composition for improved nutrition. *Trends in Plant Science* 3: 282-286.
17. Herbers K, Sonnewald U (1999) Production of new/modified proteins in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 163-168.
18. Bellucci M, Lazzari B, Viotti A, Arcioni S (1997) Differential expression of a γ -zein in *Medicago sativa*, *Lotus corniculatus* and *Nicotiana tabacum*. *Plant Science* 127: 161-169.

19. Bellucci M, Alpini A, Arcioni S (2002) Zein accumulation on forage species (*Lotus corniculatus* and *Medicago sativa*) and co-expression of the γ -zein:KDEL and β -zein:KDEL polypeptides in tobacco leaf. *Plant Cell Reports* 20: 848-856.
20. Sharma SB, Hancock KR, Ealing PM, White DWR (1998) Expression of a sulfur-rich maize storage protein, δ -zein, in white clover (*Trifolium repens*) to improve forage quality. *Molecular Breeding* 4: 435-448.
21. Li Y, Meyer S, Essig JS, Liu Y, Schapaugh MA, Muthukrishnan S, Hainline BE, Trick HN (2005) High-level expression of maize γ -zein protein in transgenic soybean (*Glycine max*). *Molecular Breeding* 16: 11-20.
22. Altenbach SB, Pearson KW, Meeker G, Staraci LC, Sun SSM (1989) Enhancement of methionine content of seed proteins by the expression of a chimeric gene encoding a methionine-rich protein in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 13: 513-522.
23. Saalbach I, Pickardt T, Machemehl F, Saalbach G, Schieder O, Müntz K (1994) A chimeric gene encoding the methionine-rich 2S albumin of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) is stably expressed and inherited in transgenic grain legumes. *Molecular and General Genetics* 242: 226-236.
24. Tu HM, Godfrey LW, Sun SSM (1988) Expression of the Brazil nut methionine-rich protein and mutants with increased methionine in transgenic potato. *Plant Molecular Biology* 37: 829-838.
25. Tabe LM, Higgins CM, McNabb WC, Higgins TJV (1993) Genetic engineering of grain and pasture legumes for improved nutritive value. *Genetica* 90: 181-200.
26. Ellis JR, Shirsat AH, HephherA, Yarwood JN, Gatehouse JA, Croy RRD, Boulter D (1988) Tissue-specific expression of a pea legumin gene in seeds of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Molecular Biology* 10: 203-214.
27. Rerie WG, Whitecross M, Higgins TJV (1991) Developmental and environmental regulation of pea legumin genes in transgenic tobacco. *Molecular and General Genetics* 225: 148-157.

28. Newbiggin EJ, deLumen BO, Chandler PM, Gould A, Blagrove RJ, March JF, Kortt AA, Higgins TJV (1990) Pea convicillin: Structure and primary sequence of the protein and expression of a gene in the seeds of transgenic tobacco. *Planta* 180: 461-470.
29. Sengupta-Gopalan C, Reichert NA, Barker RF, Hall TC, Kemp JD (1985) Developmentally regulated expression of the bean α -phaseolin gene in tobacco seed. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82: 3320-3324.
30. Beachy RN, Chen ZL, Horsch RB, Rogers SG, Hoffmann NJ, Fraley RT (1985) Accumulation and assembly of soybean α -conglycinin in seeds of transformed petunia plants. *EMBO Journal* 4: 3047-3053.
31. Yung MS, Espinoza NO, Nagpala PG, Dodds JH, White FF, Schnorr KL, Jaynes JM (1989) Expression of a synthetic gene for improved protein quality in transformed potato plants. *Plant Science* 64: 99-111.
32. Keeler SJ, Maloney CL, Webber PY, Patterson C, Hirata LT (1997) Expression of *de novo* high-lysine α -helical coiled-coil proteins may significantly increase the accumulated levels of lysine in mature seeds of transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology* 34: 15-29.
33. Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, Vasil IK (1996) Integration and expression of the high-molecular-weight glutenin subunit 1Ax1 gene into wheat. *Nature Biotechnology* 14: 1156-1159.
34. Blechl AE, Andersen OD (1996) Expression of a novel high-molecular-weight glutenin subunit gene in transgenic wheat. *Nature Biotechnology* 14: 875-879.
35. Rooke L, Bekes F, Fidi R, Barro F, Gras P, Tatham AS, Barcelo P, Lazzeri P, Shewry PR (1999) Overexpression of a gluten protein in transgenic wheat results in greatly increase dough strength. *Journal of Cereal Science* 30: 115-120.

36. Yue SJ, Li H, Li UW, Zhu YF, Guo JK, Liu Yj, Chen Y, Jia X (2008) Generation of transgenic wheat lines with altered expression levels of 1Dx5 high-molecular-weight glutenin subunit by RNA interference. *Journal of Cereal Science* 47: 153-161.
37. Jobling S (2004) Improving starch for food and industrial applications. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 210-218.
38. Stark DM, Timmerman KP, Barry GF, Preiss J, Koshore GM (1992) Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP glucose pyrophosphorylase. *Science* 258: 287-292.
39. Giroux MJ, Shaw J, Barry G, Cobb BG, Greene T, Okita T, Hannah LC (1996) A single gene mutation that increases maize seed weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 5824-5829.
40. Smidansky ED, Clancy M, Meyer FD, Lanning SP, Blake NK, Talbert LE, Giroux MJ (2002) Enhanced ADP-glucose pyrophosphorylase activity in wheat endosperm increases seed yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 1724-1729.
41. Smidansky ED, Martin JM, Hannah LC (2003) Seed yield and plant biomass increases in rice are conferred by deregulation of endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta* 216: 656-664.
42. Meyer FD, Talbert LE, Martin JM, Lanning SP, Greene TW, Giroux MJ (2007) Field evaluation of transgenic wheat expressing a modified ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit. *Crop Science* 47: 336-342.
43. Visser RGF, Suurs LCJM, Steeneken PAM, Jacobsen E (2006) Some physicochemical properties of amylose-free potato starch. *Starch – Stärke* 49: 443-448.
44. Terada R, Nakajima M, Issiki M, Okagaki RJ, Wessler SR, Shimamoto K (2000) Antisense *Waxy* genes with highly active promoters effectively suppress *Waxy* gene expression in transgenic rice. *Plant Cell Physiology* 41: 881-888.

45. Jobling SA, Westcott RJ, Tayal A, Jeffcoat R, Schwall GP (2002) Production of a freeze-thaw-stable potato starch by antisense inhibition of three starch synthase genes. *Nature Biotechnology* 20: 295-299.
46. Kimura T, Otani M, Noda T, Ideta O, Shimada T, Saito A (2001) Absence of amylose in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] following the introduction of granule-bound starch synthase I cDNA. *Plant Cell Reports* 20: 663-666.
47. Craig J, Lloyd JR, Tomlinson K, Barber L, Edwards A, Wang TL, Martin C, Hedley CL, Smith AM (1998) Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopectin structure in pea embryos. *Plant Cell* 10: 413-426.
48. Sidebottom C, Kirkland M, Strongitharm B, Jeffcoat R (1998) Characterization of the difference of starch branching enzyme activities in normal and low-amylopectin maize during kernel development. *Journal of Cereal Science* 27: 279-287.
49. Ritsema T, Hernández L, Verhaar A, Altenbach D, Boller T, Wiemken A, Smeekens S (2006) Developing fructan-synthesizing capability in a plant invertase via mutations in the sucrose-bundling box. *Plant Journal* 48: 228-237.
50. Ritsema T, Smeekens S (2003) Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 223-230.
51. Roberfroid MB (1999) What is beneficial for health? The concept of functional food. *Food and Chemical Technology* 37: 1039-1041.
52. Hellwege EM, Gritscher D, Willmitzer L, Heyer AG (1997) Transgenic potato tubers accumulate high levels of 1-kestose and nystose: functional identification of a sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase of artichoke (*Cynara scolymus*) blossom discs. *Plant Journal* 15: 1057-1065.
53. Sevenier R, Hall RD, van der Meer I, Hakkert HJC, van Tunen AJ, Koops AJ (1998) High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet. *Nature Biotechnology* 16: 843-846.

54. Vijn I, van Dijken A, Lüscher M, Bos A, Smeets E, Weisbeek P, Wiemken A, Smeekens S (1998) Cloning of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from onion and synthesis of structurally defined fructan molecules from sucrose. *Plant Physiology* 117: 1507-1513.
55. Weyens G, Ritsema T, van Dun K, Meyer D, Lommel M, Lathouvers J, Rosquin I, Denys P, Tossens A, Nijs M, Turk S, Gerrits N, Bink S, Walraven B, Lefebvre M, Smeekens S (2004) Production of tailor-made fructans in sugar beet by expression of onion fructosyltransferase genes. *Plant Biotechnology Journal* 2: 321-327.
56. Domergue F, Abadi A, Heinz E (2005) Relief for fish stocks: oceanic fatty acids in transgenic oilseeds. *Trends in Plant Biology* 10: 112-116.
57. Graham IA, Larson T, Napier JA (2007) Rational metabolic engineering of transgenic plants for biosynthesis of omega-polyunsaturates. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 142-147.
58. Qi B, Fraser T, Mugford S, Dobson G, Sayanova O, Butler J, Napier JA, Stobart AK, Lazarus CM (2004) Production of very long chain polyunsaturated omega-6 fatty acids in plants. *Nature Biotechnology* 22: 739-745.
59. Abadi A, Domergue F, Bauer J, Napier JA, Welti R, Zähringer U, Cirpus P, Heinz E (2004) Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseeds: Constraints on their accumulation. *Plant Cell* 16: 2734-2748.
60. Kinney AJ, Cahoon EB, Damude HG, Hitz WD, Kolar CW, Liu ZB (2004) Production of very long chain polyunsaturated fatty acids in oilseed plants. Patent WO 2004/071467 A2.
61. Truksa M, Wu G, Vrinten P, Qiu X (2006) Metabolic engineering of plants to produce very long-chain polyunsaturated fatty acids. *Transgenic Research* 15: 131-137.
62. Wu M, Truksa M, Datta N, Vrinten P, Bauer J, Zank T, Cirpus P, Heinz E, Qiu X (2005) Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants. *Nature Biotechnology* 23: 1013-1017.

63. Ruiz-Lopez N, Haslam RP, Napier JA, Sayanova O (2014) Successful high-level accumulation of fish oil omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in a transgenic oilseed crop. *The Plant Journal* 77: 198-208.
64. Potrykus I (2001) Golden rice and beyond. *Plant Physiology* 125: 1157-1161.
65. Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I (2000) Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287: 303-305.
66. Al-Babili S, Beyer P (2005) Golden rice – five years on the road – five years to go? *Trends in Plant Science* 10: 566-573.
67. Hoa TTC, Al-Babili S, Schaub P, Potrykus I, Beyer P (2003) Golden indica and japonica rice lines amenable to deregulation. *Plant Physiology* 133: 161-169.
68. Paine JA, Shipton CA, Chaggar S, Howells RM, Kennedy MJ, Vernon G, Wright SY, Hinchcliffe E, Adams JL, Silverstone AL, Drake R (2005) Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology* 23: 482-487.
69. Lucca P, Ye X, Potrykus I (2001) Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent. *Molecular Breeding* 7: 43-49.
70. Rai M, Datta K, Parkhi V, Tan J, Oliva N, Chawla HS, Datta SK (2007) Variable T-DNA linkage configuration affects inheritance of carotenic transgenes and carotenogenic accumulation in transgenic indica rice. *Plant Cell Reports* 26: 1221-1231.
71. Ajjawi I, Shintani D (2004) Engineered plants with elevated vitamin E: a nutraceutical success story. *Trends in Biotechnology* 22: 104-107.
72. DellaPenna D, Last RL (2006) Progress in the dissection and manipulation of plant vitamin E biosynthesis. *Physiologia Plantarum* 126: 356-368.
73. Chen SC, Li H, Liu G (2006) Progress of vitamin E metabolic engineering in plants. *Transgenic Research* 15: 655-665.

74. Furuya T, Yoshikawa T, Kimura T, Kaneko H (1987) Production of tocopherols by cell cultures of safflower. *Phytochemistry* 26: 2741-2747.
75. Rippert P, Scimemi C, Dubald M, Matringe M (2004) Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. *Plant Physiology* 134: 92-100.
76. Estévez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S, Leon P (2001) 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 22901-22909.
77. Callakova E, DellaPenna D (2003) Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131: 632-642.
78. Cahoon EB, Hall SE, Ripp KG, Ganzke TS, Hitz WD, Coughlan SJ (2003) Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nature Biotechnology* 21: 1082-1087.
79. Van Eenennaam AL, Lincoln K, Durrett TP, Valentin HE, Shewmaker CK, Thorne GM, Jiang J, Baszis SR, Levering CK, Assan ED, Hao M, Stein JC, Norris SR, Last RL (2003) Engineering vitamin E content: From *Arabidopsis* mutant to soy oil. *Plant Cell* 15: 3007-3019.
80. Tavva VS, Kim YH, Kagan IA, Dinkins RD, Kim KH, Collins GB (2007) Increased α -tocopherol content in soybean seed overexpressing the *Perilla frutescens* γ -tocopherol methyltransferase gene. *Plant Cell Reports* 26: 61-70.

Za ili protiv GM biljaka: nada ili strah

Jovanka Miljuš Đukić

Retko se dešava da novo naučno otkriće izazove takvo „burno“ reagovanje javnosti, kao što je izazvala pojava transgenih ili genetički modifikovanih organizama (GMO), naročito biljaka. Istina je da u dugoj istoriji čovečanstva ima puno primera o pronalascima koji su od strane javnosti prihvaćeni sa puno nade i poverenja, a neželjene posledice su nažalost, otkrivene tek kasnije, u toku primene. Znamo za lekove koji su osim osnovne funkcije, da leče, izazivali tragične posledice po zdravlje ljudi jer je njihova primena počela bez detaljnih kliničkih ispitivanja. Ni za štetnost radioaktivnog zračenja se nije znalo u vreme kada su počele nuklearne probe, a kamoli za štetnost pušenja, različitih aditiva u hrani, otrova za štetočine, pa i herbicida i insekticida. Prekomerna upotreba antibiotika danas ima za posledicu pojavu bakterija rezistentnih na većinu antibiotika koji se danas koriste pa ih je teško eliminisati, naročito u bolnicama.

Nije onda čudno da se i na GM biljke i hranu, koja u svom sastavu ima GMO, gleda sa krajnjim podozrenjem i nepoverenjem. Sa druge strane, činjenica je da javnost većinom nema sluha za argumente naučnika i istraživača koji se bave problematikom GMO, a njihovi pokušaji da iznesu argumente u korist GMO tretiraju se kao neuspeli pokušaji individua kupljenih od strane monopolističkih kompanija. U ovom Poglavlju opisaćemo zakone koji se odnose na GM biljke i hranu koja u svom sastavu

ima GMO, kao i pitanja koja javnost postavlja u vezi mogućeg uticaja takve GM hrane na zdravlje ljudi.

Ovo je pokušaj da se iznesu naučne činjenice o GM biljkama, ukoliko postoji bar deo javnosti spreman da ih sasluša.

8.1. Zakonska regulativa o GMO

8.1.1. Zakonska regulativa o GMO u Evropskoj uniji (EU)

U EU postoji prilično glomazna regulativa koja se odnosi na GMO i koja reguliše sve aspekte korišćenja i gajenja. Ova regulativa obuhvata direktive i zakone kojima se uređuje stavljanje u promet i korišćenje GM biljaka (sejanje, gajenje, ogledi), kao i proizvoda koji u svom sastavu imaju GMO. Genetički modifikovani organizmi su u EU zakonima definisani kao „organizmi čiji je genetički materijal (DNK) izmenjen na način koji ne postoji u prirodi i do koga ne može doći prirodnim ukrštanjem“.

Početakom devedesetih godina 20. veka, Komisija Evropske unije donela je zakone koji su stavili promet GMO u legalne okvire. Ovi zakoni poznati kao direktive (*Council Directive 90/220/EEC* i *Council Directive 90/219/EEC*) su doneseni s namerom da se zaštiti zdravlje ljudi, kao i životinja i prirodne sredine od potencijalnih rizika korišćenja GMO. GM proizvodi mogu biti pušteni na tržište tek posle detaljne analize o svim mogućim potencijalnim aspektima delovanja na ljude, životinje i životnu sredinu [1]. Pored zakona, postoje i brojne uredbe ili regulative, koje se bave GMO. Razlika između direktive i regulative je u tome što se direktive moraju ugraditi u nacionalna zakonodavstva, dok se regulative (uredbe) direktno primenjuju. Broj različitih tela koja kontrolišu i odlučuju o GMO je do danas mnogostruko uvećan i to je dovelo do dugog i komplikovanog

procesa odlučivanja o tome da li će neki GMO dobiti dozvolu za korišćenje ili ne. Naravno sve počinje podnošenjem prijave. Na internet stranici Evropske komisije može se naći lista koja daje podatke o statusu odobrenih GM proizvoda, kao i onih za koje su podnesene prijave. Mnogi istraživači smatraju da je duga i komplikovana procedura delom odgovorna za podozrenje javnosti prema GMO.

Trenutno je u Evropskoj uniji na snazi Direktiva 2001/18/EC Evropskog parlamenta, i to od 12. marta 2001. godine, a odnosi se na namerno puštanje u sredinu genetički modifikovanih organizama. Ova direktiva obuhvata staru Direktivu 90/220/EEC i uvodi sledeće principe: analiza rizika po okolinu, ljude i životinje (eng.: „biosafety risk assessment“), obavezno praćenje proizvoda na tržištu, analizu mišljenja javnosti (potrošača), obavezno obeležavanje proizvoda, kao i praćenje porekla modifikacije pri svim fazama iznošenja na tržište i uspostavljanje GMO registra [2]. Dozvole za korišćenje se izdaju na deset godina i mogu se obnoviti. Dozvole izdate prema staroj direktivi moraju se prilagoditi odredbama nove. Direktiva 2001/18/EC se bavi i ogledima u polju na maloj skali. Prema staroj direktivi 18 GM proizvoda je dobilo dozvolu, a danas više od 25 aplikacija za iznošenje na tržište je podneto prema novoj Direktivi [3, 4]. Svaka zemlja članica EU je obavezna da primeni Direktivu. Postoji i Direktiva koja se odnosi na genetički modifikovane mikroorganizme (*Council Directive 98/81/EC*).

Pored pomenutih Direktiva, donesena su i mnoga druga zakonska akta, koja se bliže bave dozvolama za upotrebu GMO u ishrani ljudi. Tako na primer, iznošenje na tržište novih vrsta hrane ili sastojaka u hrani regulisano je Regulativom EC No 258/97 koja se bavi: hranom i sastojcima hrane koji su proizvedeni od GMO, ali ih ne sadrže, a takođe i sastojcima hrane koji su izolovani iz algi, gljiva ili mikroorganizama [1]. Ova Regulativa se bavi i obavezom obeležavanja GM hrane, pošto je jedna

od odredbi zakona zahtev za obeležavanjem svakog proizvoda koji sadrži više od 0,9% DNK poreklom od GMO. Sama granica od 0,9% nije naučno utemeljena, već je potpuno proizvoljno određena kao granica po kojoj se prisustvo DNK iz GMO do 0,9% smatra kao slučajno ili tehnički neizbežno nastala kontaminacija prilikom transporta robe ili u skladištima, pa se takva semena ili hrana biljnog porekla smatraju nemodifikovanim. Regulativa 1139/98 sadrži zahtev da proizvođači podnesu dokaze da su preduzeli mere da ne dođe do mešanja tradicionalne hrane i proizvoda koji sadrže sirovine poreklom od GM biljaka. Regulative 1829/2003 i 1830/2003 se odnose na stavljanje GMO u promet kao hrane i hrane za životinje (1829/2003), a regulativa 1830/2003 pored toga može da posluži i za dobijanje dozvola za oslobađanje GMO u životnu sredinu i njihovo obeležavanje u svrhu informisanja korisnika. Pomenute Regulative takođe obezbeđuju da proces analize potencijalnih rizika i donošenja odluke o dozvoli bude transparentan i ne suviše dug [5].

U nekim zemljama EU postoje magacini, pa i fabrike za preradu stočne hrane koje koriste samo semenski materijal i sirovine poreklom od GM biljaka, da ne bi došlo do mešanja sa nemodifikovanim semenima (Austrija, Belgija, Češka). Pošto se procenat GMO određuje posebno za svaku vrstu biljne DNK koja ulazi u sastav određenog proizvoda, npr. posebno za soju i posebno za kukuruz, može se desiti da finalni proizvod ima u zbiru i više od 0,9% DNK iz GMO od različitih biljaka, a da se smatra nemodifikovanim. Treba napomenuti da ova granica od 0,9% važi samo za odobrene modifikacije, dok je za neodobrene prag niži (0,5%).

Na granicama svake zemlje članice EU razvijena je mreža inspekcija (fitosanitarne i veterinarske inspekcije), a one postoje i u zemljama koje još uvek nisu članice EU. Njihova je uloga da uzimaju uzorke semena i hrane koji se uvoze/izvoze i šalju ih u ovlašćene laboratorije na analizu prisustva GMO. Postoji Centar za istraživanja (eng.: „Joint Research Centar –

JRC“) koji daje naučnu i tehničku podršku donesenim Regulativama EU. Osnovana je i referentna laboratorija pri JRC-u (eng.: „Institute for reference material and measurements – IRMM“) [6], koja razvija nove metode detekcije GMO i prati pojavu novih GMO događaja, a pored toga distribuira standarde, tj. pozitivne GM uzorke koji se koriste u metodama za detekciju GMO. Stručnjaci JRC-a organizuju i obuke zaposlenih u laboratorijama zemalja članica EU koje su uključene u GMO analize, a pored toga bave se i organizacijom međulaboratorijskih poređenja (eng.: „proficiency testing“). Ova testiranja se sprovode među različitim laboratorijama kako bi one proverile svoju sposobnost da precizno identifikuju pojedine GMO. Osnovana je i mreža referentnih laboratorija zemalja članica EU (eng.: „the European Network of GMO Laboratories – ENGL“) koje međusobno sarađuju.

Lista autorizovanih (odobrenih) GM događaja koji su pušteni legalno na tržište odnosi se na sve zemlje EU, tako se ovakvim proizvodima može trgovati po svim zemljama EU. Svaka zemlja članica ima pravo da na svojoj teritoriji zabrani korišćenje proizvoda sa liste [4]. Evropska komisija je 2015. godine objavila Direktivu 2015/412 kao dodatak važećoj Direktivi 2001/18/EC, koja omogućava državama članicama da ograniče ili zabrane kultivaciju GM biljaka na svojoj teritoriji.

Prilog 8.1. Kartagena protokol i PPRI

Kartagena protokol o biosigurnosti je dokument koji su potpisale mnoge zemlje sveta, pa i Srbija, a odnosi se na bezbedno postupanje sa GMO. Pri tome se bezbedno odnosi na to, da iako se ne znaju negativni efekti GMO po zdravlje ljudi i životinja, mora se postupati tako da se takvi eventualni događaji i uticaji preduprede. Ovaj protokol reguliše promet, kao i međugranični prevoz GMO (<http://www.biodiv.org>).

PRRI (eng.: „Public Research and Regulation Initiative“). Širom sveta vlade, naučni instituti i organizacije ulažu velika sredstva u istraživanja da bi se povećala proizvodnja kvalitetne i bezbedne hrane, kao i da bi se omogućilo bolje snabdevanje čovečanstva čistom vodom, poboljšala zdravstvena zaštita i zaštita okoline. Sposobnost moderne biotehnologije da odgovori ovim zahtevima zavisi i od zakona koji se primenjuju. Na zakone država utiču različiti međunarodni sporazumi, između ostalih i Kartagena protokol o biosigurnosti. Dok je pažnja javnosti bila usmerena na usaglašavanje ovih sporazuma, naučnici, kojih može biti desetine hiljada u nekoliko hiljada instituta u razvijenim i zemljama u razvoju, do 2004. godine nisu bili predstavljeni na organizovan način. Godine 2004. organizacija pod nazivom PRRI (Istraživanja i zakoni), osnovana je sa ciljem da omogući istraživačima u javnom sektoru koji se bave modernom biotehnologijom forum preko koga će moći da se informišu i uključe u diskusije. Cilj učestvovanja u ovakvim susretima je da se informišu potencijalni korisnici naučnih rezultata o napretku u biotehnoškim istraživanjima, da se nauka približi javnosti, a pored toga i da se naučnici upoznaju sa bojaznima koja javno mnjenje može imati povodom biotehnoških istraživanja

PRRI je organizacija koju su osnovali naučnici koji se bave biotehnologijom u javnom sektoru (predsednik je Em. Prof. Marc baron van Montagu) a žele da utiču na zakonodavni aparat EU da se smanji komplikovana procedura pri davanju dozvola za nove GMO. Pored toga žele da plasiraju naučne činjenice o GMO u javnost i tako da utiču na prihvatanje GMO od strane javnog mnjenja. Oni održavaju skupove i seminare, sakupljaju primere nenaučne zabrane GMO u zemljama EU i van nje. Postoje i takozvane Crna i Bela knjiga sa primerima zabrane korišćenja GMO proizvoda koji nisu bazirani na naučnim argumentima.

Činjenica je da se u mnogim državama EU izdvajaju velika sredstva za bavljenje biotehnologijom, razvoj novih sorti GM žitarica, a zatim se glomaznom, skupom i dugotrajnom procedurom potpuno onemogućava iznošenje novog GM proizvoda na tržište. Pri tome nema naučnih razloga koji bi to opravdavali nego je u pitanju politički stav, ekonomski interesi, negativna percepcija javnosti, stav medija. Mnoge zemlje ovakav stav pravdaju time da žele da zaštite biodiverzitet svoje teritorije, pa se zalažu za bavljenje organskom poljoprivredom i onom klasičnom, na šta naravno imaju puno pravo. Iako su mnoge zemlje u EU zabranile korišćenje i kultivaciju GM semena, u većini je dozvoljeno korišćenje GMO u stočnoj hrani.

Organizacija i finansiranje. Srce ove organizacije je PRRI Forum, koji povezuje naučnike javnog sektora koji žele da budu informisani o istraživanjima kolega u drugim zemljama, a istovremeno i aktivno uključeni u aktivnosti PRRI. Naučnici koji se bave biotehnoškim istraživanjima mogu se prijaviti da budu članovi Foruma, bez naknade. PRRI je koordinisan od strane Izvršnog komiteta sastavljenog od naučnika iz celog sveta. Aktivnosti i komunikacija se obavlja preko Sekretarijata, a postoje i radne grupe za određene teme. Informacije su dostupne na engleskom, francuskom, ruskom, španskom i arapskom jeziku. Organizacija se finansira preko vlada, međunarodnih organizacija i privatnog sektora. Na primer, Evropska komisija je finansirala projekat koji je trajao tri godine (Science4BioReg), koji je omogućio PRRI da sprovodi osnovne aktivnosti u periodu od 2006. godine do 2009. godine. Informacije o fondovima se mogu naći na sajtu ove organizacije (<http://www.prri.net>).

8.1.2. Zakon o GMO u Srbiji

U Srbiji se zakon o GMO primenjuje od 2001. godine. Za donošenje i primenu zakona je odgovorno Ministarstvo za poljoprivredu (od 2014. Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine, od juna 2017. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede) i trenutno je na snazi verzija zakona iz 2009. godine. U sastavljanju prve verzije zakona su učestvovali renomirani naučnici različitih profila – biolozi i molekularni biolozi, veterinari, doktori medicine, agronomi i drugi. Prema odredbama zakona koji je važio do 2009. godine, bilo je dozvoljeno da se u Srbiju uvozi sojina sačma proizvedena od GM soje, koja je mogla da se koristi kao stočna hrana. U pitanju je „Roundup Ready“ modifikacija soje, koja omogućava biljkama da budu tolerantne na herbicid „Roundup“ (glifosat). Proizvođač je američka kompanija Monsanto. Ova sorta GM soje je najviše gajena u svetu, pomenimo samo Južnu Ameriku gde skoro da više ne postoji soja koja nije GMO. Uvoz GM semena, sejanje i kultivacija GM biljaka u Srbiji je od početka primene zakona bilo zabranjeno, a tako je ostalo i u novoj verziji zakona. U vreme važenja stare verzije zakona o GMO, Srbija je uvozila velike količine GM sojine sačme, uglavnom iz Južne Amerike. Uvedena je obavezna kontrola uvezene semenske robe i hrane, tako što su sanitarna, fitosanitarna i veterinarska inspekcija na granicama Srbije uzorkovale semena, kao i hranu/stočnu hranu, a uzorke slale u laboratorije na analizu. Ministarstvo za poljoprivredu je pratilo uvoz GMO preko izveštaja koje su im laboratorije slale. Obaveza kontrole uvozne robe naravno postoji i danas. Ministarstvo za poljoprivredu imenuje laboratorije koje rade analize GMO i koje moraju ispunjavati uslov da su za poslove ispitivanja akreditovane kod Akreditacionog tela Srbije [7].

Kada je na snagu stupio novi zakon 2009. godine, izazvao je nedoumice, zbog toga što je mnogo restriktivniji od zakona koji važe u

EU. Uvoz modifikovane soje je zabranjen, a ostala je na snazi i zabrana uvoza i kultivacija semena GM biljaka. Zakon je naišao na podeljena mišljenja, pogotovo od strane članova Stručnog saveta za biološku sigurnost, a i od EU. Novina u zakonu je član koji definiše granicu od 0,9% prisustva DNK iz GMO u proizvodima biljnog porekla i prerađenoj hrani. To znači da ukoliko je količina DNK iz GMO u uzorku ispod 0,9%, ta se količina smatra nenamernom kontaminacijom i takav uzorak hrane se smatra nemodifikovanim. Problem sa važećom verzijom zakona je i to što u njemu nema pojašnjenja da granica dozvoljenog prisustva DNK iz GMO od 0,9% važi samo za odobrene modifikacije, kako je u zakonu EU. Kada se radi o semenskom materijalu, granica je niža i iznosi manje od 0,1% DNK iz GMO (zakon o GMO, član 3, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede)

Prilog 8.2. Stručni savet za biološku sigurnost

Stručni savet za biološku sigurnost je stručno telo osnovano pri Ministarstvu za poljoprivredu, a sastavljeno je od stručnjaka različitih profila, kao što su molekularni biolozi, genetičari, entomolozi, ekolozi, evolucionisti, a takođe agronomi, veterinari i lekari. Funkcija ovog tela bila je (i još je) da pažljivo analizira zahteve (aplikacije) pojedinih firmi za primenu, iznošenje na tržište, ograničene poljske oglede i sve druge vidove korišćenja GMO u Srbiji. U nadležnosti ovog stručnog tela je davanje stručnog mišljenja, dok je za donošenje konačne odluke o prihvatanju neke aplikacije odgovoran ministar za poljoprivredu (ministarstvo). Mora se navesti da nijedan zahtev za uvođenje GMO u Srbiju nije dobio pozitivno mišljenje zbog nedostataka u prijavi, osim uvoza Roundup Ready sojine sačme koja je korišćena samo kao stočna hrana. Sa stupanjem novog zakona na snagu, koji je potpuno restriktivan, aplikacije za primenu GMO nisu podnošene.

8.1.3. Zakon o GMO u Ruskoj Federaciji

Prema podacima koji mogu da se nađu na internetu [8] Rusija je rešila da uredi zakone koji bi omogućili napredak na polju biotehnologije i omogućili eventualno korišćenje GM biljaka. Vlada Ruske Federacije je svesna da zemlja zaostaje u razvoju biotehnologije za ostatkom sveta, pa je zato 2012. godine donesen program razvoja biotehnologije i genetičkog inženjerstva do 2020. godine i određene mere koje će omogućiti razvoj biomedicine, industrijske i poljoprivredne biotehnologije. Trenutno, međutim, korišćenje GMO u komercijalne svrhe nije dozvoljeno, kao ni uzgajanje GM poljoprivrednih kultura, ali je nekoliko vrsta GM hrane za ljude i stočne hrane prošlo određene zahteve države pa se mogu uvoziti i koristiti u industriji. U toku 2016. godine došlo je do zaokreta u stavu Ruske federacije u odnosu na GM biljke. Prema pisanju Elene Sharogline [9] predsednik Putin je potpisao dokument o zabrani gajenja i proizvodnje GMO osim u naučne svrhe. Tako je Rusija postala najveća teritorija bez GMO i usmerava se ka organskoj poljoprivredi.

8.1.4. Kakav je zakon o GMO u SAD?

SAD imaju mnogo liberalniji odnos prema GMO u poređenju sa EU kad se radi o gajenju i korišćenju GM biljaka. Osim što su prve uvele GMO u ishranu ljudi, nije potrebno ni obeležavanje takve hrane. U SAD postoje tri agencije odgovorne za regulisanje prometa GMO. To su: Agencija za hranu i lekove (eng.: „The Food and Drug Administration – FDA“), Ministarstvo poljoprivrede (eng.: „The United States Department of Agriculture – USDA“), i agencija za zaštitu životne sredine (eng.: „The Environmental Protection Agency – EPA“). Agencija za hranu i lekove (FDA) pažljivo proučava podnete zahteve za plasiranje novih proizvoda na tržište, i vodi računa o tome da se novi proizvod, koji sadrži sirovine poreklom od GM

biljaka tolerantnih na herbicide ili rezistentnih na štetočine, ne razlikuje od tradicionalnog proizvoda po svom sastavu, a sama činjenica da je u pitanju GMO nije suviše važna. Može se zaključiti da je mnogo lakše dobiti dozvolu za gajenje GMO u Americi nego u EU.

U vesti koja se pojavila u dnevnom listu *Politika* od 5. aprila 2016. godine, navodi se da su kompanije Mars i Kelogs u saveznoj državi Vermont počele da obeležavaju proizvode koji sadrže GMO, a među njima su bombonice M and M i skittles, žvakaća guma vrigli, kao i neke popularne žitarice. Kako se navodi u članku, ovako veliki preokret na tržištu hrane nastao je zato što je u Vermontu 2014. godine stupio na snagu zakon koji propisuje obavezno obeležavanje GM hrane. Realno je bilo očekivati da se ovakva praksa proširi i na druge savezne države, iako su sami proizvođači izjavili da su ubeđeni da je GM hrana bezbedna. Od januara 2022. godine u SAD se očekuje primena standarda koji uvodi obeležavanje GM hrane kao bioinženjerisane hrane.

8.1.5. Južna Amerika i GMO

Brazil i Argentina su drugi i treći najveći proizvođači GM hrane na svetu, odmah iza SAD [10]. Vlada u Argentini je među prvima prihvatila GM hranu, a institucije koje su zadužene za donošenje odluka o GMO i davanje saglasnosti su Nacionalni poljoprivredno-biotehnološki komitet (deo koji se odnosi na životnu sredinu), Nacionalni servis za zdravlje i kvalitet hrane (za ispravnost hrane), Nacionalna direkcija za biznis (trgovina). Konačne odluke donosi Sekretarijat za poljoprivredu i hranu. U Brazilu Nacionalna komisija za biosigurnost je odgovorna za GMO i donosi uputstva vezana za „transport i provoz“, uvoz i eksperimente na polju. Honduras, Kostarika, Kolumbija, Bolivija, Paragvaj, Čile i Urugvaj takođe dozvoljavaju sejanje i gajenje GM biljaka, uglavnom žitarica. U Argentini je poslednjih godina aktuelan problem zagađenja zemljišta zbog prekomernog korišćenja

herbicida. Zbog masovnog sejanja GM soje i drugih poljoprivrednih kultura, a zbog očigledne neinformisanosti ruralnog stanovništva i odsustva kontrole korišćenja hemijskih sredstava, došlo je do zagađenja zemljišta, vode i hrane pesticidima i herbicidima, što ima posledice po zdravlje ljudi. Većina za to optužuje korišćenje GM poljoprivrednih kultura, međutim, krivica je u ljudskom faktoru. Izostalo je prethodno obrazovanje ratara, farmera i poljoprivrednih proizvođača uopšte o načinu i količinama herbicida koje je potrebno koristiti kada se seju GM semena.

8.1.6. Kako se to radi na Istoku u Japanu, Kini i Indiji?

U Japanu je trenutno na snazi verzija zakona o GMO iz 2004. godine [11]. Prema zakonu, postoje određene procedure koje se moraju poštovati kada je u pitanju promet GMO. Sve GMO pošiljke moraju biti obeležene i praćene odgovarajućim dokumentima. Pored toga i Japan je potpisnik Kartagena protokola. Japanska vlada je dozvolila uvoz papaje otporne prema virusima [12] iz Amerike, u kojoj se gaje od 1999. godine. Ovo voće mora biti obeleženo kao GMO. Radi se o rezistentnosti na virus Ringspot (PRSV) koji dovodi do velikog smanjenja prinosa papaje. Ovaj virus je dovodio do redukcije prinosa i do 50% na Havajima, glavnom uzgajivaču papaje u SAD, a uzgajanje transgene papaje je znatno smanjilo gubitke. Pored SAD i Kanada je dozvolila korišćenje ove GM sorte kao hrane. Inače, aplikacija za gajenje GM papaje je podneta i u EU. Japan se susreće sa negativnim stavom javnosti prema GMO kao i mnoge druge zemlje, ali je i pored toga uvoz GMO u Japan ogroman zbog činjenice da Japan ne može da obezbedi dovoljne količine hrane ni za ljude ni za životinje. Postoje inicijative od strane Japanskog društva za biljnu ćeliju i molekularnu biologiju i Japanskog društva oplemenjivača [11] da se organizuju susreti i razgovori sa potrošačima, uvoznicima i vladinim službama kako bi se poboljšao stav o GMO u društvu.

Na internet stranama se mogu pronaći podaci o tome kakav odnos Kina, kao jedna od vodećih svjetskih sila, ima prema GMO. Kina se suočava sa rastućom populacijom ljudi i prema tome neophodno je da se poveća proizvodnja hrane. Zbog rastućih potreba za hranom, kineska vlada je donela odluku da uloži 3,5 milijarde dolara u istraživanja i razvoj GM biljaka. Ova inicijativa se sastoji iz dva dela – komercijalizacije GM varijeteta i edukacije javnosti. Kina je još pre 10 godina dozvolila komercijalno gajenje četiri GM biljne vrste. Pamuk je prva GM biljna vrsta koja je počela da se gaji u Kini 1997. godine, zatim sledi petunija, paradajz i slatki biber 1998. Zatim je sve usporeno, topole su se pojavile tek 2005, a papaja 2006. godine. GM biljke nose gene za rezistentnost prema insektima i tolerantnosti prema herbicidima. Još uvek nema sorti koje su modifikovane tako da imaju povećane prinose. Pamuk koji je rezistentan na insekte, čak 64 varijeteta, u Kini se gaji na 3,7 miliona hektara što čini 70% ukupne proizvodnje pamuka. Kina priprema za tržište najvažniju kulturu, pirinač, sa kojim se poljski ogledi vrše već nekoliko godina. I u EU je poznat kineski GM pirinač tolerantan na herbicide, koji nije odobren u EU.

Kina je obratila veliku pažnju na obrazovanje javnosti. Ni u toj najmnogoljudnijoj zemlji na svetu nije javnost „oberučke“ dočekala GMO, ali se ne može desiti da dođe do uništavanja polja GM biljaka kao što se to dešavalo u Evropi. Naučnici u Kini smatraju da je mogućnost da se nahrani stanovništvo mnogo važnija u odnosu na mogućnost ograničenja korišćenja GMO zbog negodovanja javnosti. Kina je veliki uvoznik GM soje, koja se koristi kao stočna hrana i kao biogorivo. Čak trećinu svetske proizvodnje soje uveze Kina, pa ne čudi izjava ministra za poljoprivredu da će Kina stvoriti povoljnu atmosferu za razvoj GMO biotehnologije (<http://www.scienceamaerican.com/article/china-launches-media-campaign-to-back-genetically-modified-crops>). Huang Dafang, prethodni direktor Instituta za razvoj biotehnologije Kineske akademije poljoprivrednih

nauka rekao je sledeće: „Svaka vrsta nove biotehnologije nosi određeni rizik, ali ta zabrinutost ne bi trebalo da bude izgovor za perfidne metode plašenja javnosti u ime brige za zaštitu okoline“ [13].

Indija se pridružila „GMO klubu“ 2002. godine od kada je u toj zemlji dozvoljen uvoz i sejanje GM pamuka (Bt varijanta kompanije Monsanto) [14]. Pamuk je u Indiji jedna od najvažnijih poljoprivrednih kultura i Bt pamuk je znatno doprineo povećanju prinosa koji se dobija berbom pamuka, imajući u vidu da je biljka pamuka podložna raznim bolestima koje utiču na prinos.

Pre nego što se pomenu mogući uticaji GM hrane na zdravlje ljudi i određeni stavovi javnosti, kao ilustracija navedena je lista odobrenih GM proizvoda po različitim kriterijumima, između ostalog i prema firmi koja je razvila pojedini proizvod (prevod originala <http://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/>), koja omogućava da se dobiju podaci o mnogim GM biljkama i proizvodima.

Tabela 8.1. Spisak GMO prema vrsti modifikacija, kao i firme koje se time bave.

Podela prema komercijalnim osobinama GM biljaka	Tolerancija na abiotički stres Promene u rastu/prinosu Rezistencija na bolesti Tolerancija na herbicide Rezistencija na insekte Izmenjen kvalitet proizvoda Kontrola oprašivanja
---	--

<p>Podela prema GM događaju</p>	<p>Tolerantnost na 2,4D herbicid Izmenjena proizvodnja lignina Antialergeni Rezistencija na antibiotike Rezistencija na insekte Koleoptere Odloženo zrenje/starenje Tolerancija na herbicid Dikambri Tolerancija na sušu Pojačana fotosinteza/prinos Obnavljanje fertilnosti Tolerancija na herbicid glifosinat Tolerancija na herbicid glifosat Tolerancija na herbicid Izoksafutol Rezistencija na insekte Lepidoptere Muška sterilnost Metabolizam manoze Tolerancija na herbicid Mezo-trizon Modifikovana alfa-amilaza Modifikacije aminokiselina Modifikacija boje cveta Modifikovane masne kiseline Modifikovan škrob/ugljeni hidrati Višestruka rezistencija na insekte Smanjenje nikotina Sintaza nopalina Tolerancija na herbicid Oksinil Proizvodnja fitaze Tolerancija na herbicid Sulfonilureu Rezistencija na bolesti izazvane virusima</p>
---------------------------------	--

<p>Kompanije i instituti koji razvijaju GM proizvode</p>	<p>Poljoprivredni biotehnički Institut – Iran Agritop – SAD BASF Bayer i pridružene firme* Syngenta Pekinški univerzitet Bejo Zaden BV Holandija Institut za istraživanja pamuka i poljoprivredni fakultet Darvad, Indija Centar za bioinženjering, Ruska Akademija Nauka Kineska Akademija poljoprivrednih nauka Univerzitet Kornel i Univerzitet Havaji Odeljenje za pamuk, Mjanmar DNK korporacija za biljnu tehnologiju, SAD Dou Agro nauke DuPont (Pioneer Hi-Bred International) EMBRAPA, Brazil Florigene, Australija Monsanto i pridružene firme Nacionalni institut agrobioloških nauka, Japan Novartis i Monsanto Oridin Agritek, Kina, SEITA S.A., Francuska Syngenta Univerzitet Florida Univerzitet Saskačevan, Kanada Vektor Tobako, SAD</p>
--	---

*Napomena: Firma Bayer je 2016. godine kupila američku firmu Monsanto, što je kod evropske javnosti izazvalo bojazan da će GM semena preplaviti Evropu. Bayer je izjavio da se to neće desiti i da neće pokušavati da nametne GM semena Evropi.

8.2. Kako GM hrana utiče na zdravlje ljudi, životinja i životnu sredinu?

Većina gena koji se nalaze u transgenim biljkama poreklom su iz bakterija, neki su iz drugih biljaka ili iz virusa. Uglavnom se radi o prenosu jednog do dva gena, što je metodološki jednostavan postupak, a metode transformacije su detaljno opisane u drugim delovima ove knjige. Prva GM biljka pojavila se u Americi 1994. godine, sa dozvolom američke agencije za lekove da može da se koristi u ishrani ljudi. Bio je to „Flavr savr“ paradajz sa produženim zrenjem koji je postigao veliku popularnost [15, 16]. S vremenom je zaboravljen i povučen sa tržišta, a novi proizvodi nisu više prihvatani sa oduševljenjem, već su se pojavile različite bojazni i strahovi povezani s njihovim korišćenjem. Činjenica je ipak da se hrana koja u svom sastavu ima sirovine poreklom od GM biljaka nalazi na tržištu već trideset godina, da se proizvodi i koristi u mnogim zemljama, počev od Evrope, Amerike, Kine, Australije, Južne Amerike, a da njeno konzumiranje zaista može dovesti do ugrožavanja zdravlja ljudi to bi se teško moglo sakriti. Upravo je to ono za šta javnost optužuje velike kompanije i proizvođače GMO (Slika 8.1).



Slika 8.1. Protesti građana protiv GMO (levo). Kako javnost „zamišlja“ GM kukuruz (desno)

U sledećim pasusima se navode neki od primera naučnih studija o potencijalnim efektima hrane koja u svom sastavu ima GM sirovine na zdravlje ljudi i životinja. Rad koji je uzburkao javnost i dobro uplašio mnoge koji nemaju dovoljno znanja o ovoj temi, jeste rad grupe na čelu sa profesorom Seralinijem [17] sa Univerziteta u Kaenu, Francuska. On i kolege su dve godine pratili efekat transgenog, tj. GM kukuruza na zdravlje pacova. U tekstu se tvrdi da su životinje hranjene GM kukuruzom (11% od ukupne hrane) kraće živele, razvijale ogromne tumore, imale bubrežnu insuficijenciju i hormonski disbalans, te su umirale 2-3 puta češće nego kontrolne. Međutim, stručna javnost je iznela ozbiljne zamerke na postavke eksperimenta, kao i na ove tvrdnje. Korišćen je laboratorijski soj pacova virgin albino Sprague-Dawley [17], razvijen da spontano razvija tumore, pa se i koristi za analizu pojave tumora (ovo znači da će se tumori kod ovih životinja razviti bez obzira na to čime se hrane). Zatim, kontrolna grupa pacova je bila nesrazmerno manja nego eksperimentalna i nije objašnjeno zašto su se kod kontrolnih životinja koje nisu hranjene transgenim kukuruzom razvijali tumori. Pored toga, ako se tvrdi da je pojava tumora direktno izazvana konzumiranjem hrane poreklom od GM biljaka, onda je za očekivati da se kod životinja kojima se daje više takve hrane i tumori češće javljaju, što ovde nije slučaj. Stav je stručne evropske javnosti da se rezultati ove studije ne mogu nikako smatrati dokazima da ovakva hrana izaziva štetne posledice po zdravlje ljudi (The European Food Safety Authority-EFSA, the German Federal Office of Consumer Protection and Food Safety – BVL, Federal Institute for Risk Assessment (BfR)). Redakcija časopisa *Food and Chemical Toxicology* je posle brojnih kritika povukla pomenuti članak iz štampe.

Jedan stariji rad je izneo sasvim suprotne rezultate [18]. U naučnom radu Brake i Evenson-a navode se rezultati analize potencijalnih toksičnih efekata ishrane transgenom sojom na testise miševa. Skotne mišice su

hranjene transgenom sojom tokom perioda gestacije i laktacije. Mladi miševi su hranjeni istom hranom, a posle 8, 16, 26, 32, 63 i 87 dana su žrtvovani, zajedno sa kontrolnim životinjama koje nisu jele hranu koja sadrži u određenoj količini sirovine poreklom od GM biljaka. Rezultati analiza na molekularnom i ćelijskom nivou su pokazali da ovakva hrana nema efekata na sintezu makromolekula, rast ćelija ili njihovu diferencijaciju u analiziranim tkivima testisa. Pored toga, nema razlika u broju okoćenih miševa, kao ni u njihovoj težini po rođenju. Zaključak je da hrana koja sadrži sirovine poreklom od GM biljaka, nema efekata na fetalni razvoj, postnatalni, na pubertet ili razvoj testikularnog tkiva. Mada i ova studija poseduje metodološke nedostatke (neodgovarajući tip statističke analize), činjenica je da radovi koji iznose pozitivnu sliku o korišćenju hrane koja sadrži transgene sirovine, prolaze sasvim nezapaženo od strane javnosti.

Studija koja je trajala četiri godine, a sprovedli su je ekolozi iz Sjedinjenih Američkih Država i Švajcarske, pokazala je da gajenje transgenog Bt kukuruza, koji je rezistentan na više vrsta insekata štetočina, ni na koji način ne ugrožava kišne gliste u zemljištu i to posle više godina sejanja ovog kukuruza. Bt varijeteti sadrže Bt toksin koji je delotvoran protiv crva koji napadaju koren kukuruza i oni obuhvataju 57% kukuruza koji raste u SAD. Kišne gliste su veoma značajne zato što omekšavaju površinu zemljišta, što je važno za plodnost tla. Naučnici iz Minesote (SAD) i Nojšatela (Švajcarska) su proučavali mogućnost da Bt toksin iz kukuruza dospe u zemljište i naškodi kišnim glistama jer one mogu pojesti ostatke kukuruza sa Bt toksinom. Poređen je rast četiri vrste kišnih glista na zemljištu sa Bt kukuruzom i običnim varijetetom kukuruza. Nedvosmisleni je zaključak da na rast i razvoj kišnih glista nema nikakvog značaja da li se na zemljištu gaji transgeni ili običan kukuruz [19].

Slične zaključke donosi još jedan rad [20] na ovu temu. Španski naučnici su zaključili da GM Bt kukuruz nema negativan uticaj na različite

male organizme koji žive u poljima kukuruza. Analizirali su 13 polja i preko 26 različitih rodova artropoda. U Španiji je inače u 2013. godini 30% od ukupne proizvodnje kukuruza obuhvatalo GM kukuruz. Možda je ovaj zaključak doprineo da se ponovo analizira zabrana sejanja Bt kukuruza u Nemačkoj [13]. Naime, posle ponovne i detaljne analize studija na osnovu kojih je zabranjeno gajenje Bt kukuruza, zaključeno je da iznesene naučne činjenice o ekološkim efektima gajenja Bt kukuruza, ni na koji način ne pokazuju bilo kakav negativan efekat Bt kukuruza na okolinu.

Jedno od pitanja koje postavlja javnost je **da li je moguć horizontalni prenos gena sa biljke na bakterije?** Već je opisan prirodan način transformacije koji se obavlja od bakterija prema biljkama, dok proces u obrnutom smeru nije registrovan. Poznato je da su bakterije sposobne da razmenom genetičkog materijala steknu rezistenciju prema različitim antibioticima, što stvara znatne probleme u lečenju ljudi. Zato postoji bojazan da će bakterijski geni iz biljaka biti preneti u bakterije u zemljištu. Međutim u biljkama ne postoji aktivan mehanizam koji bi to omogućio, tako da su rezultati ispitivanja vršenih da bi se to proverilo, bili negativni. Nije nađeno da se geni mogu „vratiti“ iz biljaka u bakterije [21].

Kada se razmatra **moгуćnost rasejavanja gena preko polena**, važno je znati da li je biljka samo ili stranooplodna. Soja je primer za samooplodnu vrstu, što znatno smanjuje opasnost od rasejavanja polena, praktično na minimum. Kukuruz je stranooplodna vrsta, ali činjenica je da u Evropi ne postoje divlji srodnici sa kojima bi se gajeni kukuruz mogao ukrstiti. Obavezna je praksa, propisana zakonom o gajenju GMO u EU, da se oko zasejanog GM kukuruza zaseje par redova nemodifikovanog kukuruza, kako bi se pokupio slučajno zalutali polen. Pored toga, njive moraju biti udaljene jedna od druge makar 200 metara ili više, što je uređeno zakonima svake zemlje u EU.

Proizvode se varijeteti čija su semena sterilna (američka kompanija Monsanto ima u ponudi „Terminator“ varijetete Bt kukuruza i pamuka) što potpuno onemogućava neželjeno rasejavanje transgena. Međutim, tu postoji drugi problem, koji izaziva ogorčenje kod mnogih farmera u svetu. Korišćenjem sterilnog semena nemoguće je ostaviti deo roda za sledeću sezonu kao semenski materijal, a to je nešto što su mnogi poljoprivrednici u svetu navikli da rade, pa i u Srbiji. Siromašnim farmerima u nerazvijenim zemljama je mnogo jeftinije da svake godine ostavljaju deo semena za sledeću sezonu. U stvari, bilo da je reč o semenima „Terminator“ ili bilo kojim drugim GM varijetetima, kompanije koje ih proizvode ne dozvoljavaju da se deo semena ostavlja za sledeću sezonu. Međutim, treba biti pošten pa reći da je takva praksa postoji i u vezi sa hibridnim semenom nemodifikovanog (netransgenog) kukuruza, pa iako je javnost ogorčena na ovakve postupke kompanija, nema protesta kada je u pitanju nemodifikovano seme.

Da li postoji mogućnost da antibiotici koji se koriste kao selektivni markeri u genskim konstruktima dovedu da povećane rezistencije bakterija koje naseljavaju ljudski organizam? Nema dokaza da se ovako nešto dešava, ali se zbog pritiska javnosti proizvode sorte kod kojih se selekcija postiže genima tolerancije na herbicide, a geni za antibiotike se izbacuju. Jasno je međutim da prolaskom kroz digestivni trakt, hrana koja je konzumirana u sirovom stanju, kao i ona termički obrađena prolazi kroz faze razlaganja do osnovnih gradivnih elemenata, pa se tako i proteini razgrađuju i ne zadržavaju svoju primarnu funkciju. Upravo zbog činjenice da veliki deo javnosti ima otpor prema proizvodima koji u svom sastavu nose gene poreklom iz nesrodnih organizama, u institutima EU i Severne Amerike razvijaju se nove metode transformacije, koje omogućavaju novim varijetetima biljaka da ne sadrže transgene, već samo nose nove osobine [22]. Nove metode transformacije

su opisane u Poglavlju 5 ove knjige. Sasvim je moguće da metoda koja se poslednjih godina intenzivno koristi, CRISPR/Cas9, potpuno istisne korišćenje drugih metoda u procesima proizvodnje GM biljaka. Ona zaista, kako je to i pomenuto u Poglavlju 5, pruža velike mogućnosti u „prekranju“ genetičkog materijala, a da pritom ne dolazi do nasleđivanja stranih gena. A kako se ne koristi samo u biljnoj biotehnologiji, već i u farmaciji i medicini, javnost će lakše prihvatiti GM biljke konstruisane na taj način. Nažalost, u avgustu 2018. godine, Evropski sud pravde doneo je presudu kojom su biljke dobijene CRISPR/Cas9 metodom editovanja gena, kao i drugim „novim“ metodama transformacije, proglašene za GMO [23]. Ovo znači da moraju da prođu obaveznu proceduru analize rizika po zdravlje ljudi, životinja, kao i potencijalnog uticaja na sredinu, prema postojećim zakonima o GMO. Prema obrazloženju presude, samo se metode „mutageneze“ kao što je jonizujuće zračenje, koje se koriste dugi niz godina, mogu smatrati bezbednim po zdravlje ljudi i sredine, te prema tome ne potpadaju u postojeće GMO zakone (sorte ječma koje se koriste u proizvodnji piva dobijene su na taj način). Ova odluka je dovela do velikog razočarenja u naučnim krugovima Evrope, jer se s pravom može zaključiti da će ona dovesti do usporavanja razvoja i primene metode editovanja gena i drugih novih metoda, kao i da će se tržište ovakvim proizvodima, a time i profit, prebaciti u liberalnije krajeve.

Da li GM biljke i hrana koja sadrži GMO dovode do povećane pojave alergija na hranu kod ljudi? Hrana koja sadrži GMO može da dovede do pojave alergija kod određenog broja ljudi, ali mora se napomenuti da sam proces nastanka alergija nije do kraja razjašnjen. Do pojave alergija može dovesti svaka vrsta hrane kod određenog broja osetljivih ljudi, tako da podaci govore da postoji veliki broj ljudi koji pokazuje alergiju ili određen stepen netolerancije na pojedine vrste hrane. Ta pojava nije povezana direktno sa procesom transformacije i prisustvom GMO u

hrani, ali jeste za sada jedina negativna pojava koju konzumiranje GM hrane izaziva. Interesantan je primer varijeteta soje „Star link“. Ovaj GM proizvod predstavlja varijetet soje u koji je unesen gen indijskog oraha. Međutim, ispostavilo se da je protein koji je proizvod dotičnog transgena jak alergen, pa je nažalost i „Star link“ soja dovela do češće pojave alergija kod osetljivih potrošača. Proizvođači nisu imali drugo rešenje nego da ovakav GM proizvod povuku sa tržišta.

Upravo rad grupe istraživača o potencijalnoj alergenosti graška kod miševa [24], pokazuje da sama genetička modifikacija nije uzrok pojave alergija. Graškov žižak dovodi do znatnog smanjenja prinosa na poljima graška i njemu srodnih biljaka, dok su transgene biljke, transformisane genom za inhibitor alfa amilaze iz pasulja potpuno zaštićene od ove štetočine. Smatra se da je proizvod ovog gena uzrok alergija kod miševa hranjenih transgenim biljkama, dok se alergija ne pojavljuje kod životinja hranjenih pasuljem. Međutim, autori ovog rada pokazali su da se alergija kod miševa (linija BALB) pojavljuje pri hranjenju transgenim graškom, ali i netransgenim pasuljem, pa i pri hranjenju netransgenim graškom, zbog unakrsne reakcije na lektin iz graška, tako da ovakav rezultat jasno pokazuje da genetička transformacija nije sama po sebi uzrok alergija na hranu. U stručnoj javnosti preovladava, takođe, stav da pojava alergija prema određenoj vrsti hrane ne treba da bude razlog zabrane za pojedine GMO [25].

Da bi se stavila tačka na sve ove kontradiktornosti i nepouzdanе rezultate, Evropska komisija je pokrenula ambiciozan projekat u okviru paketa projekata FP7, nazvan **GRACE** (eng.: „**G**MO **R**isk **A**ssessment and **C**ommunication of **E**vidence“), čiji je cilj da se sprovedu ozbiljne studije potencijalnog uticaja GM biljaka i hrane na zdravlje ljudi, životinja i okoline. Projekat je započeo u julu 2012. godine a trajao je do novembra 2015. godine. Učestvovali su naučnici iz 13 zemalja, i brojni rezultati su dobijeni. Primer je rad objavljen 2014. godine [21] koji pokazuje rezultate

dobijene hranjenjem miševa GM kukuruzom u kome su učestvovali naučnici Slovačke, Nemačke i Španije. Miševi su hranjeni 90 dana i pokazalo se da prisutnost GM kukuruza u količini od 30% u ukupnoj hrani, nema nikakvih efekata na zdravlje miševa. Detaljno su analizirani izgled, ponašanje, rast, a zatim i krvna slika. Rađene su i citološke analize mnogih tkiva, kao bubrega, slezine, jetre, pankreasa, pluća, srca, timusa, materice, testisa, jajnika i mozga. Očekuje se da će dobijeni rezultati staviti tačku na špekulacije i kontroverzne podatke o „štetnosti“ GMO, doprineti objektivnom sagledavanju doprinosa GMO kvalitetnijem životu ljudi, a i da će javnost prihvatiti naučne činjenice o koristi ili eventualnoj štetnosti GMO. Rezultati urađenih studija se mogu pročitati na sajtu „GMO compass“[13].

8.3. Primeri za druge primene genetičkog inženjerstva

Najveći broj genetički modifikovanih biljaka koje se nalaze na tržištima sveta, i to preko 95%, izmenjene su tako da su ili tolerantne prema herbicidima ili rezistentne prema insektima i virusima. Međutim, biljna biotehnologija ima ogroman potencijal u prehrambenoj industriji, farmaciji, medicini i kozmetici. Za ta istraživanja se mnogo manje zna, a to su, na primer, proizvodnja antitela i vakcina u biljkama, raznih enzima, aditiva, aroma, mirisa i ukusa. Lep primer primene GM biljaka, jeste projekat koji je razvijala danska biotehnoška firma **Aresa**. Ideja naučnog tima Arese bila je da se genetički modifikovana korovska biljka arabidopsis (inače biljka koja služi kao glavni eksperimentalni model u biljnoj molekularnoj biologiji) koristi kao detektor nagaznih mina u zemljištu. Ova ideja je razvijana u saradnji sa vojnim stručnjacima. Princip je sledeći: u sastav mina u zemljištu ulazi jedinjenje TNT (trinitrotoluol). Zemljišne bakterije uz pomoć enzima reduktaze „isecaju“ molekule azotdioksida sa TNT molekula, što čini

da je zemljište u kom se nalaze mine puno molekula azotdioksida. Biljke arabidopsisa su genetički modifikovane tako da reaguju na azotdioksid u zemljištu proizvodnjom crvene boje u listovima. To znači da će GM biljke arabidopsisa iznad minskog polja imati crvenu boju, dok će netransformisane biljke i dalje biti zelenih listova. Za biljke je normalno da pored zelenog, proizvode i određenu količinu crvenog pigmenta, ali ne u tolikoj količini da listovi budu potpuno crveni, tako da je transgene biljke arabidopsisa lako razlikovati od biljaka sa normalnim zelenim listovima. Specijalnim vozilima semena biljaka arabidopsisa su izbacivana preko površine zemljišta obogaćenog sa TNT, a zatim je praćen njihov rast. I zaista, za razliku od kontrolnih biljaka i onih koje su rasle na zemljištu bez TNT, u listovima GM biljaka se razvila crvena boja (Slika 8.2). Firma Aresa je imala saradnju sa institutima i ministarstvima u Srbiji, kao i zemljama u regionu, Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini, a pokrenuli su saradnju i sa afričkim i azijskim zemljama.



Slika 8.2. Članak o biotehnološkoj firmi Aresa i pokušaju detektovanja mina pomoću biljaka arabidopsis (prema weforum.org/techpioneers)

Jedan deo eksperimenata izvođen je u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo, u Novom Sadu. Kao eksperimentalni modeli korišćene su biljke duvana, koje imaju velike listove, pa je promena boje listova bolje uočljiva. Neophodne dozvole za izvođenje ograničenog poljskog eksperimenta izdao je Stručni savet za biološku sigurnost Srbije. Nažalost, globalna ekonomska kriza koja je zahvatila mnoge zemlje u svetu, zaustavila je ove eksperimente, a firma se okrenula drugim aktivnostima, kao što je proizvodnja vakcina.

Zdrava hrana?

Evo primera kako GMO može pomoći da se hranimo zdravije. U apotekama postoje mnogi proizvodi koji služe kao dodaci redovnoj ishrani, naročito su popularni „antioksidanti“ za koje se tvrdi da rešavaju sve probleme, a kojih u voću i povrću nema u količinama koje se preporučuju. GM ljubičasti paradajz je pokušaj da se proizvede paradajz sa povećanom količinom antocijanina odgovornih za crvenu i ljubičastu boju u plodovima, a za koje je poznato da štite organizam od štetnih jedinjenja koja nastaju u procesima metabolizma (imaju ulogu antioksidanata). Uobičajene sorte paradajza imaju manju količinu antocijanina nego ljubičasti i treba ga jesti u velikim količinama da bi došlo do pozitivnog efekta na organizam. Eksperimenti sa miševima koji su hranjeni ljubičastim paradajzom pokazali su da oni žive duže i sporije stare [26], pa bi konzumacija ovakvog paradajza bila veoma preporučljiva. Nedavno se pojavio i rad na citrusima modifikovanim po istom principu, a to znači da je povećana produkcija antocijanina u plodu i ljusci. Ljubičasta boja se ne razvija kod citrusa kada se gaje u tropskim predelima, ali pri tretiranju biljaka niskim temperaturama u vreme zrenja plodovi imaju ljubičastu boju [27].

U 2014. godini pojavio se rad koji pokazuje da slatki krompir, vrsta koja se koristi u ishrani stanovništva uglavnom u Južnoj i Severnoj Americi, sadrži gene poreklom iz bakterije *Agrobacterium tumefaciens*.

Naučnici su zaključili da su ove sekvence prisutne u genomu krompira od početka njegove domestikacije dok ih divlje vrste nemaju [28]. To znači da ljudi stotinama godina konzumiraju „prirodno transgeni“ slatki krompir, a da to i ne znaju!

8.4. Nada i/ili strah

8.4.1. „Zlatni pirinač“

Čovečanstvo je suočeno sa činjenicom da broj ljudi na planeti raste. I dok na jednoj strani postoje oni koji fanatično broje svaku kaloriju koju unesu u organizam, boreći se sa prekomernom težinom, na drugoj strani, u zemljama Afrike i Azije ogroman broj ljudi gladuje, a deca od gladi umiru. Moderna biotehnologija može biti način da se poveća proizvodnja hrane koja bi bila jeftina i omogućila da se nahrani rastuća svetska populacija. Mnogi naučnici su ušli u biotehnološke projekte kao entuzijasti, vođeni idejom da se problem gladi u svetu reši. Lep je primer profesora Inga Potrykusa iz Švajcarske, sa Državnog tehnološkog instituta (ETH Institute) u Cirihi, koji je dugi niz godina razvijao projekat „**zlatni pirinač**“. Naime, on i saradnici su razvili sortu pirinča koja nosi gene za sintezu beta karotena, prekursora vitamina A i gene koji pomažu usvajanje gvožđa. Postupak dobijanja „zlatnog pirinča“ je detaljno opisan u Poglavlju 7. Iako je ovaj projekat davno uspešno završen, tek sad su se stekli uslovi da se ova sorta iznese na tržište [29].

Avgusta 2013. godine u prestižnom naučnom časopisu *Science* izašao je članak koji potpisuje dvanaest priznatih naučnika, na čelu sa profesorom Bruceom Albertsom, koji je donedavno bio urednik upravo ovog časopisa [30]. Reagovali su na uništavanje oglednog polja „zlatnog pirinča“ koji se zbio na Filipinima, u organizaciji nevladinih organizacija

kao što su „zeleni“ i neki drugi. Poznato je da je pirinač glavna i često jedina hrana siromašnog stanovništva Azije, koje zato pati zbog nedostatka vitamina A, neophodnog sastojka vidnog pigmenta rodopsina što je uzrok slepila maltene pet stotina hiljada ljudi, a polovina od tog broja umre i to su uglavnom mala deca do pet godina starosti. Projekat „zlatni pirinač“ pokrenuo je već pomenuti profesor Ingo Potrikus sa ETH univerziteta iz Ciriha pre 25 godina, koji se vodio idejom da se siromašnima omogući jeftin i pristupačan izvor vitamina A. Međutim, iako je proizvod dobijen i spreman za korišćenje i pokazalo se da je šaka pirinča dnevno dovoljna da se unese potrebna količina vitamina A, zbog namerno izazvanog negativnog stava javnosti prema GM biljkama i hrani, još uvek je nemoguće da se ovaj pirinač nađe na tržištu. Iako ne postoje naučni dokazi da je GMO hrana štetna za zdravlje, u javnosti se stalno plasiraju podaci o navodnim opasnostima. Zato je ovih dvanaest naučnika diglo svoj glas protiv politike različitih interesnih grupa nadajući se da će autoriteti mnogih država shvatiti da „zlatni pirinač“ može da spasi hiljade života.

Za pokušaje uvođenja „zlatnog pirinča“ u ishranu stanovništva u Aziji vezan je i skandal sa eksperimentom u Kini [31]. Da bi se pokazalo da li GM „zlatni pirinač“ ima pozitivne efekte na zdravlje preko proizvodnje vitamina A, ova studija je morala biti izvedena u delu sveta gde je pirinač uobičajena hrana i na deci koja su najosetljivija na nedostatak vitamina A. Tako je grupa kineske dece četiri godine hranjena GM pirinčem. Jedna grupa dece je hranjena spanaćem, druga „zlatnim pirinčem“, treća kapsulama β -karotena. Rezultati su pokazali da je „zlatni pirinač“ jednako efikasan kao i kapsule vitamina, a bolji od spanaća, što je označeno kao veliki uspeh. Nažalost, mediji su podigli veliku prašinu oko ovog eksperimenta optužujući američke i kineske naučnike da koriste decu kao zamorce, tako da su kineski naučnici imali velikih problema i pokušali da se distanciraju od svega.

Australijski Tehnološki Univerzitet iz Kvinslenda u saradnji sa Nacionalnom poljoprivrednom istraživačkom organizacijom Ugande ima sličan cilj, a radi se o genetičkoj modifikaciji banana koje spadaju u osnovne životne namirnice u Africi. Banane su modifikovane tako da imaju povećanu količinu provitamina A i gvožđa, a sa ciljem da se gaje u Africi. Istraživači iz Ugande se nadaju da će ovakve banane sa povećanom hranljivom vrednošću stići na tržište Afrike za pet godina [13].

Još jedan sasvim novi aspekt proizvodnje GM biljaka jeste primer kako one mogu poboljšati kvalitet života siromašnih slojeva ljudi. Pamuk je biljka karakteristična za Indiju, a od 2002. godine se u Indiji uzgaja i GM pamuk [14]. Pamuk je biljna vrsta ugrožena napadima različitih štetočina, i gajenje GM pamuka znatno povećava prinose. Direktna posledica povećanog prinosa je potreba za većim brojem radnika da bi se on obrao. Gajenje i branje pamuka zavisi od ljudske radne snage i to uglavnom ženske, pa žene predstavljaju grupu koja ima koristi od povećanih prinosa. Površina na kojoj se pamuk gaji je povećana, povećao se i broj zaposlenih žena, a i njihove dnevnice. I druge grane vezane za poljoprivredu, kao što je transport, trgovina i prerada beleže porast u obimu poslova. Značajna je i činjenica da je u isto vreme smanjena upotreba pesticida.

8.4.2. Šta se desi kad poljoprivredni proizvođači spontano prihvate GMO?

Iako je javnost većinom nenaklonjena GMO, ipak je jasno da je takav stav kreiran i od medija i mnogih drugih snaga. U Vojvodini je 2006. godine na nekim mestima sejana već pomenuta GM soja tipa „Roundup Ready“, proizvod američke firme Monsanto, koja proizvodi i istoimeni herbicid na koji je ova soja tolerantna. Pošto su ratari počeli više nego inače da koriste ovaj herbicid, to je postalo sumljivo inspekciji, koja je tako otkrila

GM soju. Seme je verovatno bilo poreklom iz Rumunije, koja je u to vreme proizvodila velike količine GM soje. Kako je tadašnja verzija GMO zakona u Srbiji dozvoljavala uvoz „Roundup Ready“ sojine sačme kao stočne hrane, dok nije bilo dozvoljeno sejanje i gajenje GM soje, takva soja je zaplenjena i prerađena u sojinu sačmu. Od 2009. godine u Srbiji je na snazi novi GMO zakon koji zabranjuje uvoz modifikovane sojine sačme, te se sačma sada uništava. Mnogo je bolje rešenje nađeno u Austriji za slične probleme, a to je izvoz u države koje dopuštaju uvoz GMO stočne hrane.

Postoji članak o edukaciji američkih farmera od strane kompanija koje proizvode GM seme. Zaključak je da su farmeri sada spremni za GM seme, shvativši njegove dobre strane, a to je povećan prinos uz manje korišćenje hemijskih sredstava, a o čemu je bilo dosta reči u prethodnim poglavljima.

Zanimljiv je podatak o presudi suda u Nemačkoj, grad Magdeburg, iz 2009. godine prema kojoj ljudi koji su 2008. godine ušli u polje i uništili biljke GM pšenice, moraju da nadoknade štetu. Radi se o pšenici u koju su preneseni geni iz ječma i pasulja, sa ciljem proizvodnje zrna sa povećanom količinom proteina. Ova pšenica bi se koristila za proizvodnju kvalitetne stočne hrane. Svrha poljskog eksperimenta bila je da se proverí da li pšenica raste normalno u prirodnim uslovima. Protivnici GM biljaka su imali primedbe na blizinu ovih biljaka poljima koje koristi obližnja „banka gena“, u kojoj se čuvaju uzorci semena iz 3000 biljaka, sa argumentom da može doći do mešanja gena. Komisija koja je ispitivala ovaj slučaj je naprotiv, smatrala da nema opasnosti po banku gena, jer je pšenica samooplodna vrsta, a polja banke gena su udaljena 500 metara. I sama banka je na poljima gajila različite sorte pšenice i nije se dešavalo da među njima dođe do neželjenog ukrštanja [13].

8.4.3. Kako reaguje javnost?

Kada se u našoj dnevnoj štampi pojavi članak sa temom o GMO, kao što je mogućnost uvoza GM sojine sačme ili povodom izmene zakona o GMO do koje će najverovatnije doći, ili dešavanja u EU ili okruženju, iznose se netačne i neproverene optužbe. Navode se strašne posledice konzumiranja GM hrane, kao što su smanjenje mozga, dijabetes, sterilnost, propadanje imunskog sistema i još mnogo toga, pozivajući se između ostalog na već pomenuti članak Seralinija i saradnika [17]. Jasno je da svi ne mogu biti do detalja upoznati sa tehnologijom dobijanja GM biljaka, ali zato je odgovornost na novinarima i stručnjacima različitih profila da budu objektivni i iznose samo proverene činjenice u javnost. Srećom, postoje novinari koji potpuno objektivno izveštavaju javnost o činjenicama vezanim za GMO (članci u dnevnim listovima *Politika* i *Danas*). A i ova knjiga je napisana u svrhu iznošenja objektivnih činjenica o GMO tehnologiji.

Dobitnici Nobelovih nagrada podržavaju GMO!

Tridesetog juna 2016. godine *The Washington Post*, američki dnevni list, objavio je pismo koje je potpisalo preko sto naučnika, dobitnika Nobelove nagrade, naslovljeno na lidere organizacije Grinpis (*Greenpeace*), Ujedinjene nacije i vlade zemalja širom sveta [32]. U pismu oni traže od Grinpisa i onih koji ih podržavaju da još jednom razmisle o iskustvu koje farmeri i potrošači u svetu imaju sa hranom dobijenom modernom biotehnologijom, da ponovo pročitaju mišljenja relevantnih naučnih ustanova i agencija i obustave kampanju protiv GMO u globalu a posebno protiv „zlatnog pirinča“. Navode da do sada nema nijednog prijavljenog slučaja negativnog delovanja GM hrane na ljude i životinje. Dalje, da je ta hrana potpuno zdrava i sigurna za korišćenje kao i ona dobijena drugim metodama, kao i da se pokazalo da je učinak na sredinu pozitivan. Navode da je Grinpis predvodio negativnu kampanju protiv „zlatnog pirinča“ koji ima veliki potencijal u sprečavanju bolesti

i smrti izazvanih nedostatkom vitamina A u Africi i Južnoj Aziji. Svetska zdravstvena organizacija procenjuje da 250 miliona ljudi pati od nedostatka vitamina A, uključujući 40 procenata dece ispod pet godina u zemljama u razvoju. Prema Unicefu, godišnje zbog toga umre jedan do dva miliona ljudi, jer nedostatak vitamina A loše utiče na imunski sistem, a 250 do 500 hiljada dece godišnje oslepi. Naučnici pozivaju Grinpis da obustavi kampanju protiv „zlatnog pirinča“, kao i protiv GM hrane generalno. Pozivaju vlade u svetu da ne podržavaju kampanju Grinpisa i da svim farmerima omoguće pristup modernoj biotehnologiji. Negiranje činjenica emocijama i kontradiktornim podacima mora prestati. Na kraju se pitaju: Koliko siromašnih treba da umre pre no što se to okarakterise kao „zločin protiv humanosti“? Naš dnevni list *Politika*, u svom dodatku „Kultura, umetnost, nauka“ od subote 16. jula 2016. godine, preneo je ovaj članak, preveden od strane profesora Univerziteta u Beogradu, dr Vladimira Glišina. U članku se navodi i odgovor Grinpisa gde oni kažu da se nedostatak vitamina A može nadoknaditi različitim dijetama, pravednijom raspodelom hrane i razvojem poljoprivrede. Bez obzira na to, ova grupa najuglednijih naučnika smatra da su razlozi protivljenju GMO neznanje, verske predrasude, ekonomski i politički. Profesor Glišin je završio optimistički – „nadajmo se da će ipak zdrav razum da prevlada“. Spisak dobitnika Nobelove nagrade se može pogledati u celosti na kraju knjige.

Zaključak

Možda se na kraju može zaključiti da je negativan stav javnosti prema GMO na neki način uticao i na pojavu novih metoda transformacije opisanih u Poglavlju 5. Nove metode transformacije, naročito CRIPSR/cas9 metoda, daju mogućnost uvođenja preciznih promena u genom, koje osim novog kvaliteta neće ostavljati i „tuđe“ gene u genomu nosioca. To bi moglo znatno da doprinese pozitivnom odnosu javnosti prema novim generacijama GM proizvoda, ali za sada to nije slučaj, imajući u vidu najnovi-

ju odluku Evropskog suda. Ne treba zaboraviti da i nove metode koriste bakteriju *Agrobacterium* kao vektor za unošenje novog kvaliteta u ćeliju, a koriste se i drugi već opisani načini za transformaciju biljnih ćelija.

Ipak, ideja ove knjige nije samo tehnički opis samih metoda već uvid u evolucione promene koje su dovele do biološke raznovrsnosti života na Zemlji i približavanja javnosti činjenice da zahvaljujući tome što imaju zajedničkog pretka, današnji organizmi u svom genetičkom materijalu nose mnoge predačke sekvence, a pojedine su poreklom od taksonomski potpuno različitih vrsta među kojima danas nema ukrštanja. Svi DNK molekuli, međutim, funkcionišu na zajedničkim principima pa uvođenje gena iz drugog organizma ne remeti normalno razviće domaćina. Samim tim i transformacija biljaka ne predstavlja ništa neprirodno, već slično klasičnoj selekciji, omogućava dobijanje varijeteta koji imaju povećan prinos.

Može se polemisati oko toga da li teorija evolucije ima mane ili ne, ali čitajući ovu knjigu treba da budemo svesni zajedničkog porekla svih živih bića i njihovog ponekad bržeg, ponekad sporijeg razvijanja i prilagođavanja uslovima životne sredine. Zbog toga i naš genomski materijal (DNK) nosi mnoge nizove (sekvence) koji daju podatke o nastanku i migraciji ljudi, a postoje i oni koji su po svojim osobinama očigledno poreklom od bakterija ili virusa. Zato je genetičko inženjerstvo i moguće, jer se DNK svih organizama „prepoznaju“ i mogu da funkcionišu zajedno. Potencijal genetičkog inženjerstva kao specifične metode biotehnologije, da omogući proizvodnju neophodnih količina hrane i različitih drugih proizvoda, lekova, antitela, proizvoda za medicinu, farmaciju, industriju, ogroman je i sigurno je da će čovečanstvo to prepoznati i znati da iskoristi za svoju dobrobit. Dostupni podaci pokazuju da je za protekle 22 godine (1996–2018) GMO znatno povećao produktivnost i zaradu farmera u razvijenim i zemljama u razvoju, tako da je očigledno da su nove biotehnologije nezaobilazno oružje u postizanju efikasne i održive poljoprivrede [33].

Literatura 8

1. https://ec.europa.eu/food/plant/gmo/legislation_en
2. Querci M, Jermini M, Van den Eede G, eds. (2006) The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. Special publication No.1.03.114. European Commission DG-JRC.
3. <http://gmoinfo.jrc.it/>
4. http://europa.eu.int/comm/food/food/biotechnology/authorisation/index_en.htm
5. Tarasjev A, Crnobrnja-Isailović J. „Analiza rizika od GMO – međunarodni standardi i principi“. U: Genetički modifikovani organizmi – činjenice i izazovi: zbornik radova sa naučnog skupa održanog 22-23. oktobra 2013. godine, urednik Marko Anđelković. – Beograd: SANU, 2014, 131-143.
6. <http://gmo-crl.jrc.it/>
7. Miljuš-Đukić J, Banović B, Jovanović Ž, Majić D, Milisavljević M, Samardžić J, Timotijević G (2010) Abundance of soybean Roundup Ready modification in food and feed samples from Serbian retail markets. Romanian Biotechnological Letters 15, Supplement.
8. Restrictions on Genetically Modified organisms: Russian Federation, <http://www.loc.gov/law/help/restrictions-on-gmos/russia.php>
9. Sharolgina E (2016) Moscow Bans GMO: Russia, the World's Largest GMO-free Territory, Platform for the Development of Organic Agriculture. <http://www.globalresearch.ca>
10. https://en.wikipedia.org/wiki/Regulation_of_the_release_of_genetically_modified_organisms#South_America
11. Watanabe KN, Taeb M, Okusu H (2004) Japanese controversies over transgenic crop regulation. Science 305: 1572.
12. Baragona S (2012) Genetically-modified papaya hits shelves in Japan. <http://www.voanews.com/a/genetically-modified-papaya-hits-shelves-in-japan-18/1/2017>

13. <http://www.gmo-compass.org>
14. Nandula R (2002) India joins the GM club. *Trends in Plant Science* 7: 322-323.
15. Dale PJ (1995) R & D regulation and field trialing of transgenic crops. *Trends in Biotechnology* 13: 398-403.
16. FDA Consumer (1994) <http://findarticles.com/p/articles>. Accessed 2012.
17. Seralini G-E, Clair E, Mesnage R, Gress S, Defarge N, Malatesta M, Hennequin D, deVendomois JS (2012) Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Food and Chemical Toxicology* 50: 4221-4231.
18. Brake DG, Evenson DP (2004) A generational study of glyphosate-tolerant soybeans on mouse fetal, postnatal, pubertal and adult testicular development. *Food and Chemical Toxicology* 42: 29-36.
19. Zeilinger AR, Andow DA, Zwahlen C, Stotzky G (2010) Earthworm populations in a northern U.S. Cornbelt soil are not affected by long-term cultivation of Bt maize expressing Cry1Aa and Cry3Bb1 proteins. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 1284-1292.
20. Comas C, Lumbierres B, Pons X, Albajes R (2014) No effects of *Bacillus thuringiensis* maize on nontarget organisms in the field in southern Europe: a meta-analysis of 26 arthropod taxa. *Transgenic Research* 23: 135-143.
21. Zeljenkova D, Ambrušova K, Bartušova M, Kebis A, Kovřížnych J, Krivošíkova Z, Kuricova M, Liškova A, Rollerova E, Spustova V, Szabova E, Tulinska J, Wimmerova S, Levkut M, Revajova V, Ševčíkova Z, Schmidt K, Schmidtke J, La Paz JL, Corujo M, Pla M, Kleter GA, Kok EJ, Sharbati J, Hanisch C, Einspanier R, AdelPatient K, Wal J-M, Spok A, Poting A, Kohl C, Wilhelm R, Schiemann J, Steinberg P (2014) Ninety-day oral toxicity studies on two genetically modified maize MON810 varieties in Wistar Han RCC rats. (EU 7th Framework Programme project GRACE) *Archives of Toxicology* 88: 2289-2314.
22. Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodriguez-Cerero E (2012) Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nature Biotechnology* 30: 231-239.

23. Callaway E (2018) CRISPR plants now subject to tough GM laws in European Union: Top court's ruling threatens research on gene-edited crops in the bloc. *Nature* 25 July 2018.
24. Lee R-Y, Reiner D, Dekan G, Moore A, Higgins TJV, Epstein MM (2013) Genetically modified α -Amylase inhibitor peas are not specifically allergenic in mice. *PLoS ONE* 8: e52972.
25. Bachas-Daunert S, Deo SK (2008) Should genetically modified foods be abandoned on the basis of allergenicity? *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392: 341-346.
26. Butelli E, Titta L, Giorgio M, Mock H-P, Matros A, Peterek S, Schijlen EGWM, Hall RD, Bovy AG, Luo J, Martin C (2008) Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature Biotechnology* 26: 1301-1308.
27. Dutt M, Stanton D, Grosser JW (2016) *Ornaticrus*: Development of genetically modified anthocyanin-expressing citrus with both ornamental and fresh fruit potential. *American Society of Horticultural Science* 141: 54-61.
28. Kyndta T, Quispea D, Zhaic H, Jarret R, Ghislain M, Liuc Q, Gheysena G, Kreuzeb JF (2014) The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 112: 5844-5849.
29. Potrykus I (2013) Unjustified regulation prevents use of GMO technology for public good. *Trends in Biotechnology* 31: 131-133.
30. Editorial: Standing up for GMOs (2013) *Science* 341: 1320.
31. Stendahl MHM, Enserink M (2012) Charges fly, confusion on reigns over Golden Rice study in Chinese children. *Science* 337: 1281.
32. Achenbach J (2016) 107 Nobel laureates sign letter blasting Greenpeace over GMOs. *The Washington Post*, 30/june/2016.
33. Brookes G, Barfoot P (2020) GM crop technology use 1996-2018: farm income and production impacts. *GM Crops & Food* 11: 242-261.

PRILOG 1

GM događaji odobreni za tržište od strane EU*

Biljna vrsta	Varijetet/gen	Svojstvo, otpornost na	Način transformacije	Namena	Proizvođač/ godina odobravanja u EU
Soja	GTS40-3-2 (RoundUp Ready*) <i>cp4 epsps</i>	Herbicid glifosat	Bombardovanje mikročesticama	Ishrana ljudi i životinja	Monsanto Company /2005
	MON89788 (RoundUp Ready*2) <i>cp4 epsps</i>	Glifosat	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Monsanto Company /2008
	A2704-12 <i>pat</i>	Herbicid fosfinotricin (glufosinat amonium)	Bombardovanje mikročesticama	Ishrana ljudi	BASF/2008
	A5547-127 <i>pat</i>	Herbicid fosfinotricin (glufosinat amonium)	Bombardovanje mikročesticama	Ishrana ljudi i životinja	BASF/2012
	CV127 <i>csr1-2</i>	Herbicid sulfonilurea	Bombardovanje mikročesticama	Ishrana ljudi i životinja	BASF/2015
	MON87708 <i>dmo, cp4 epsps</i>	Dikamba herbicid	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Monsanto Company /2015
	MON87708 xMON89788 x A5547-127 <i>dmo, cp4 epsps, pat</i>	Dikamba, Glifosat, Glufosinat	Klasično ukrštanje i selekcija uključujući transgene donore	Ishrana ljudi i životinja	Monsanto Company /2020

Biljna vrsta	Varijetet/gen	Svojstvo, otpornost na	Način transformacije	Namena	Proizvođač/ godina odobranja u EU
Soja	DAS44406-4 <i>aad-12, pat</i>	2,4-D, Glufosinat	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Dow AgroSciences /2017
	DAS44406-6 <i>aad-12, 2mepsps, pat</i>	2,4-D, Glifosat, Glufosinat	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Dow AgroSciences /2017
	MON87705 <i>cp4 epsps, fad2-1A, fatb1-A</i>	Glifosat; Promenjen odnos oleinske/ linolne kiseline u semenu	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Monsanto Company /2015
	FG72 xA5547-127 <i>hppdPf336, 2mepsps, pat</i>	Izoksaf lutol herbicidi, Glifosat, Glufosinat	Klasično ukrštanje i selekcija uključujući transgene donore	Ishrana ljudi i životinja	Bayer/2017
	SYHTOH2 <i>avhppd-03, pat</i>	Herbicidi koji inhibiraju p-hidroksifenilpiruvat dioksigenazu, Glufosinat	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Syngenta /2021
Kukuruz	Bt11 <i>cry1Ab pat</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i> (insekt), Glufosinat	Bombardovanje mikročesticama	Ishrana ljudi i životinja (silaza i seme)	Syngenta Seeds Inc./1998
	DAS59122 <i>cry34Ab1 cry35Ab1 pat</i>	<i>Diabrotica sp.</i> (insekt), Glufosinat	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Dow AgroSciences LLC i Pioneer Hi-Bred International Inc. /2007

Biljna vrsta	Varijetet/gen	Svojstvo, otpornost na	Način transformacije	Namena	Proizvođač/ godina odobranja u EU
Kukuruz	GA21 (RoundUp Ready®) <i>epsps</i>	Glifosat	Bombardovanje mikročesticama	Ishrana ljudi i životinja	Syngenta Seeds Inc./ 2005 (ishrana životinja) 2006 (ishrana ljudi)
	MIR604 <i>mcry3A</i> <i>pmi</i>	<i>Diabrotica</i> sp.(crv kukuruznog korena)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Syngenta Seeds Inc. /2009
	MON810 (Yieldgard®) <i>cry1Ab</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i> (kukuruzni plamenac)	Bombardovanje mikročesticama	Ishrana ljudi i životinja	Monsanto Company /1998 odobren za uzgoj, hranu i trgovinu
	MON88017 <i>cp4 epsps</i> <i>cry3Bb1</i>	Glifosat i <i>Diabrotica</i> sp.	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Monsanto Company /2009
	MON89034 <i>cry1A.105</i> <i>cry2Ab2</i>	Insekti iz roda Lepidoptera	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Monsanto Company /2009
	NK603 <i>cp4 epsps</i>	Glifosat	Bombardovanje mikročesticama	Ishrana ljudi i životinja	Monsanto Company /2004
	T25 (Liberty-Link®) <i>pat</i>	Glufosinat	Hemijski način transformacije protoplasta (PEG)	Ishrana ljudi i životinja	Bayer CropScience (AgrEvo)/ 1998 (gajenje i uvoz hrane)

Biljna vrsta	Varijetet/gen	Svojstvo, otpornost na	Način transformacije	Namena	Proizvođač/godina odobranja u EU
Kukuruz	TC1507 (Herculex®1) <i>cry1Fa2 pat</i>	<i>Ostrinia nubilalis</i> , Glufosinat	Bombardovanje mikročesticama	Ishrana ljudi i životinja	Mycogen (c/o Dow AgroSciences), Pioneer (c/o Dupont) /2005 (ish. životinja) 2006 (ishrana ljudi)
	MIR162 <i>vip3Aa20</i>	Insekti iz roda Lepidoptera	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Syngenta /2012
	MON87460 <i>cspB</i>	Otpornost na sušu	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Monsanto Company i BASF/2015
	MON87427 <i>cp4 epsps</i>	Tkivno selektivna otpornost na glifosat (nema je u polenu)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Monsanto Company /2015
	1507x59122x-MON810x NK603 <i>cry1Ab cry1F cry34Ab1 cry35Ab1 pat cp4 epsps</i>	Insekti iz roda Lepidoptera i Coleoptera, Glufosinat, Glifosat	Klasično ukrštanje i selekcija uključujući transgene donore	Ishrana ljudi i životinja	Pioneer/2018
Šećerna repa	H7-1 <i>cp4 epsps</i>	Glifosat	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Monsanto Company /2007

Biljna vrsta	Varijetet/gen	Svojstvo, otpornost na	Način transformacije	Namena	Proizvođač/godina odobranja u EU
Pamuk	LLCotton25 <i>bar</i>	Glufosinat	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi (ulje) i životinja	Bayer Crop-Science (AgrEvo) /2008
	MON1445 (RoundUp Ready*) <i>cp4 epsps</i>	Glifosat	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi (ulje) i životinja	Monsanto Company /2005
	MON531 (Bollgard*) <i>cry1Ac nptII</i>	Insekti iz roda Lepidoptera	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi (ulje) i životinja	Monsanto Company /2005
	MON15985 <i>cry2Ab2 cry1Ac uidA, nptIII, aadA</i>	Insekti iz roda Lepidoptera	Bombardovanje mikročesticama	Ishrana ljudi (ulje) i životinja	Monsanto Company /2015
	T304-40 <i>pat cry1Ab</i>	Insekti iz roda Lepidoptera, Glufosinat	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi (ulje) i životinja	BASF/2015
	MON88913 <i>cp4 epsps</i>	Glifosat	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi (ulje) i životinja	Monsanto Company /2015
	GHB614x LLcotton25x MON15895 <i>2mepsps pat cry1Ac cry1Ab2</i>	Glifosat, Glufosinat, Insekti iz roda Lepidoptera	Klasično ukrštanje i selekcija uključujući transgene donore	Ishrana ljudi (ulje) i životinja	BASF/2019

Biljna vrsta	Varijetet/gen	Svojstvo, otpornost na	Način transformacije	Namena	Proizvođač/godina odobranja u EU
Uljana repica (Kanola)	GT73 (RoundUp Ready*) CP4 <i>epsps</i> <i>goxv247</i>	Glifosat	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Monsanto Company /1997 (ishrana ljudi) 2005 (ish. životinja)
	MS8 (InVigor) <i>bar</i> <i>barnase</i>	Glufosinat Muška sterilnost	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Bayer Crop-Science (AgrEvo) /2005
	RF3 (InVigor) <i>bar</i> <i>barstar</i>	Glufosinat Obnova fertilnosti	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Bayer Crop-Science (AgrEvo) /2005
	MS8x RF3 (InVigor) <i>bar</i> <i>barnase</i> <i>barstar</i>	Glufosinat Obnovljena fertilnost	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Bayer Crop-Science (AgrEvo) /2005
	T45 <i>pat</i>	Glufosinat	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Bayer Crop-Science (AgrEvo) /2009
	MON88302 <i>cp4 epsps</i>	Glifosat	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Ishrana ljudi i životinja	Monsanto Company /2015
	MON88302x MS8x RF3 <i>cp4 epsps</i> <i>bar</i> <i>barnase</i> <i>barstar</i>	Glifosat Glufosinat Obnovljena fertilnost	Klasično ukrštanje i selekcija uključujući transgene donore	Ishrana ljudi i životinja	Bayer Crop-Science/ Monsanto Europe/2017

*Radi se isključivo o dozvoli za promet proizvoda koji sadrže odgovarajuće GM biljke, sastoje se ili su proizvedeni od njih, a ne o dozvoli za njihovo gajenje (sa izuzetkom kukuruza MON810). Izvor: Genetically Modified Organisms (europa.eu), decembar 2021.

PRILOG 2

Global Area of Biotech Crops in 2019: by Country (Million Hectares)**

Rank	Country	Area (million hectares)	Biotech Crops
1	USA*	71.5	Maize, soybeans, cotton, alfalfa, canola, sugar beets, potatoes, papaya, squash, apples
2	Brazil*	52.8	Soybeans, maize, cotton, sugarcane
3	Argentina*	24.0	Soybean, maize, cotton, alfalfa
4	Canada*	12.5	Canola, soybeans, maize sugar beets, alfalfa, potatoes
5	India*	11.9	Cotton
6	Paraguay*	4.1	Soybeans, maize, cotton
7	China*	3.2	Cotton, papaya
8	South Africa*	2.7	Maize, soybeans, cotton
9	Pakistan*	2.5	Cotton
10	Bolivia*	1.4	Soybeans,
11	Uruguay*	1.2	Soybeans, maize
12	Philippines*	0.9	Maize
13	Australia*	0.6	Cotton, canola, safflower
14	Myanmar*	0.3	Cotton
15	Sudan*	0.2	Cotton
16	Mexico*	0.2	Cotton

Rank	Country	Area (million hectares)	Biotech Crops
17	<i>Spain*</i>	0.1	Maize
18	Colombia*	0.1	Maize, cotton
19	Vietnam*	0.1	Maize
20	Honduras	<0.1	Maize
21	Chile	<0.1	Maize, canola
22	Malawi	<0.1	Cotton
23	<i>Portugal</i>	<0.1	Maize
24	Indonesia	<0.1	Sugarcane
25	Bangladesh	<0.1	Brinjal/Eggplant
26	Nigeria	<0.1	Cotton
27	Eswatini	<0.1	Cotton
28	Ethiopia	<0.1	Cotton
29	Costa Rica	<0.1	Cotton, pineapple
	Total	190.4	

*19 biotech mega-countries growing 50,000 hectares, or more, of biotech crops

**Rounded-off to the nearest hundred thousand.

Source: ISAAA, 2019

PRILOG 3

Laureates Letter Supporting Precision Agriculture (GMOs)

To the Leaders of Greenpeace, the United Nations and Governments around the world

The United Nations Food & Agriculture Program has noted that global production of food, feed and fiber will need approximately to double by 2050 to meet the demands of a growing global population. Organizations opposed to modern plant breeding, with Greenpeace at their lead, have repeatedly denied these facts and opposed biotechnological innovations in agriculture. They have misrepresented their risks, benefits, and impacts, and supported the criminal destruction of approved field trials and research projects.

We urge Greenpeace and its supporters to re-examine the experience of farmers and consumers worldwide with crops and foods improved through biotechnology, recognize the findings of authoritative scientific bodies and regulatory agencies, and abandon their campaign against “GMOs” in general and Golden Rice in particular.

Scientific and regulatory agencies around the world have repeatedly and consistently found crops and foods improved through biotechnology to be as safe as, if not safer than those derived from any other method of production. There has never been a single confirmed case of a negative health outcome for humans or animals from their consumption. Their environmental impacts have been shown repeatedly to be less damaging to the environment, and a boon to global biodiversity.

Greenpeace has spearheaded opposition to Golden Rice, which has the potential to reduce or eliminate much of the death and disease caused by a

vitamin A deficiency (VAD), which has the greatest impact on the poorest people in Africa and Southeast Asia.

The World Health Organization estimates that 250 million people, suffer from VAD, including 40 percent of the children under five in the developing world. Based on UNICEF statistics, a total of one to two million preventable deaths occur annually as a result of VAD, because it compromises the immune system, putting babies and children at great risk. VAD itself is the leading cause of childhood blindness globally affecting 250,000 - 500,000 children each year. Half die within 12 months of losing their eyesight.

WE CALL UPON GREENPEACE to cease and desist in its campaign against Golden Rice specifically, and crops and foods improved through biotechnology in general;

WE CALL UPON GOVERNMENTS OF THE WORLD to reject Greenpeace's campaign against Golden Rice specifically, and crops and foods improved through biotechnology in general; and to do everything in their power to oppose Greenpeace's actions and accelerate the access of farmers to all the tools of modern biology, especially seeds improved through biotechnology. Opposition based on emotion and dogma contradicted by data must be stopped.

How many poor people in the world must die before we consider this a **“crime against humanity”**?

Sincerely,

110 Laureates Supporting Precision Agriculture (GMOs)

Zhores I. Alferov	2000	Physics
Sidney Altman	1989	Chemistry
Hiroshi Amano	2014	Physics
Werner Arber	1978	Medicine
Richard Axel	2004	Medicine

David Baltimore	1975	Medicine
Paul Berg	1980	Chemistry
Bruce A. Beutler	2011	Medicine
Elizabeth H. Blackburn	2009	Medicine
Gunter Blobel	1999	Medicine
Paul D. Boyer	1997	Chemistry
Sydney Brenner	2002	Medicine
Mario R. Capecchi	2007	Medicine
Thomas R. Cech	1989	Chemistry
Martin Chalfie	2008	Chemistry
Steven Chu	1997	Physics
Aaron Ciechanover	2004	Chemistry
Claude Cohen-Tannoudji	1997	Physics
Leon N. Cooper	1972	Physics
Elias James Corey	1990	Chemistry
Robert F. Curl Jr.	1996	Chemistry
Johann Deisenhofer	1988	Chemistry
Peter C. Doherty	1996	Medicine
Richard R. Ernst	1991	Chemistry
Sir Martin J. Evans	2007	Medicine
Eugene F. Fama	2013	Economics
Edmond H. Fischer	1992	Medicine
Jerome I. Friedman	1990	Physics
Andre Geim	2010	Physics
Ivar Giaever	1973	Physics
Walter Gilbert	1980	Chemistry
Alfred G. Gilman	1994	Medicine
Sheldon Glashow	1979	Physics

Roy J. Glauber	2005	Physics
Joseph L. Goldstein	1985	Medicine
David J. Gross	2004	Physics
Roger Guillemin	1977	Medicine
Sir John B. Gurdon	2012	Medicine
John L. Hall	2005	Physics
Lars Peter Hansen	2013	Economics
Serge Haroche	2012	Physics
Leland H. Hartwell	2001	Medicine
Harald zur Hausen	2008	Medicine
James J. Heckman	2000	Economics
Dudley R. Herschbach	1986	Chemistry
Avram Hershko	2004	Chemistry
Gerardus 't Hooft	1999	Physics
H. Robert Horvitz	2002	Medicine
Robert Huber	1988	Chemistry
Tim Hunt	2001	Medicine
Louis J. Ignarro	1998	Medicine
Elfriede Jelinek	2004	Literature
Daniel Kahneman	2002	Economics
Eric R. Kandel	2000	Medicine
Wolfgang Ketterle	2001	Physics
Aaron Klug	1982	Chemistry
Brian K. Kobilka	2012	Chemistry
Roger D. Kornberg	2006	Chemistry
Herbert Kroemer	2000	Physics
Finn E. Kydland	2004	Economics
Leon M. Lederman	1988	Physics

Yuan T. Lee	1986	Chemistry
Robert J. Lefkowitz	2012	Chemistry
Anthony J. Leggett	2003	Physics
Jean-Marie Lehn	1987	Chemistry
Michael Levitt	2013	Chemistry
Tomas Lindahl	2015	Chemistry
Rudolph A. Marcus	1992	Chemistry
Barry J. Marshall	2005	Medicine
Eric S. Maskin	2007	Economics
John C. Mather	2006	Physics
Craig C. Mello	2006	Medicine
Robert C. Merton	1997	Economics
Hartmut Michel	1988	Chemistry
James A. Mirrlees	1996	Economics
Paul L. Modrich	2015	Chemistry
William E. Moerner	2014	Chemistry
Mario J. Molina	1995	Chemistry
Edvard Moser	2014	Medicine
May-Britt Moser	2014	Medicine
Kary B. Mullis	1993	Chemistry
Ferid Murad	1998	Medicine
Erwin Neher	1991	Medicine
Ryoji Noyori	2001	Chemistry
Sir Paul Nurse	2001	Medicine
Christiane Nusslein-Volhard	1995	Medicine
Arno Penzias	1978	Physics
Stanley B. Prusiner	1997	Medicine
Jose Ramos-Horta	1996	Peace

Sir Richard J. Roberts	1993	Medicine
Bert Sakmann	1991	Medicine
Bengt I. Samuelsson	1982	Medicine
Randy W. Schekman	2013	Medicine
Brian P. Schmidt	2011	Physics
Richard R. Schrock	2005	Chemistry
Phillip A. Sharp	1993	Medicine
Hamilton O. Smith	1978	Medicine
Oliver Smithies	2007	Medicine
Thomas A. Steitz	2009	Chemistry
Joseph H. Taylor Jr.	1993	Physics
Daniel C. Tsui	1998	Physics
Harold E. Varmus	1989	Medicine
Sir John E. Walker	1997	Chemistry
J. Robin Warren	2005	Medicine
Arieh Warshel	2013	Chemistry
James Watson	1962	Medicine
Eric F. Wieschaus	1995	Medicine
Frank Wilczek	2004	Physics
Robert Woodrow Wilson	1978	Physics
Ada E. Yonath	2009	Chemistry

CIP - Каталогизација у публикацији -
Народна библиотека Србије, Београд

604.6:582

НЕШКОВИЋ, Мирјана, 1925-2017

Genetički modifikovane biljke : biološke
osnove - biotehno­loške perspektive / Mirjana
Nešković, Slavica Ninković, Jovanka Miljuš
Đukić ; [ilustracije Jovana Perišić, Dimitrije
Ninković, Marija Stojisavljević]. - Beograd
: Institut za biološka istraživanja "Siniša
Stanković", 2022 (Beograd : Službeni glasnik). -
406 str. : ilustr. ; 24 cm

Tiraž 100. - Bibliografija uz svako poglavlje.

ISBN 978-86-80335-18-6

1. Нинковић, Славица, 1965- [аутор] 2.
Миљуш-Ђукић, Јованка, 1961-2019 [аутор]

а) Генетски модификоване биљке

COBISS.SR-ID 73576969



9 788680 335186 >