

Biljke oplemenjene genetičkim inženjerstvom u komercijalnoj uporabi

Srećko Jelenić

Zavod za molekularnu biologiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet,
Sveučilište u Zagrebu, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, sjelen@zg.biol.pmf.hr

Uvod

Genetičko inženjerstvo ili tehnologija rekombinantne DNA uključuje cijeli niz tehnika kojima je moguće pronaći točno određeni gen u genomu neke vrste, izolirati ga, klonirati, odrediti redosljed nukleotida, promijeniti ga, te ugraditi u genom iste ili neke druge vrste. Odabirom odgovarajuće regulatorne regije (npr. promotora) gen se prema želji istraživača može u ciljanom organizmu aktivirati u točno određenim uvjetima ili pak u točno određenim tkivima. Ta se tehnologija primjenjuje vrlo uspješno već gotovo 30 godina u znanstvenim istraživanjima i u postizanju korisnih svojstava u različitim vrsta organizama.

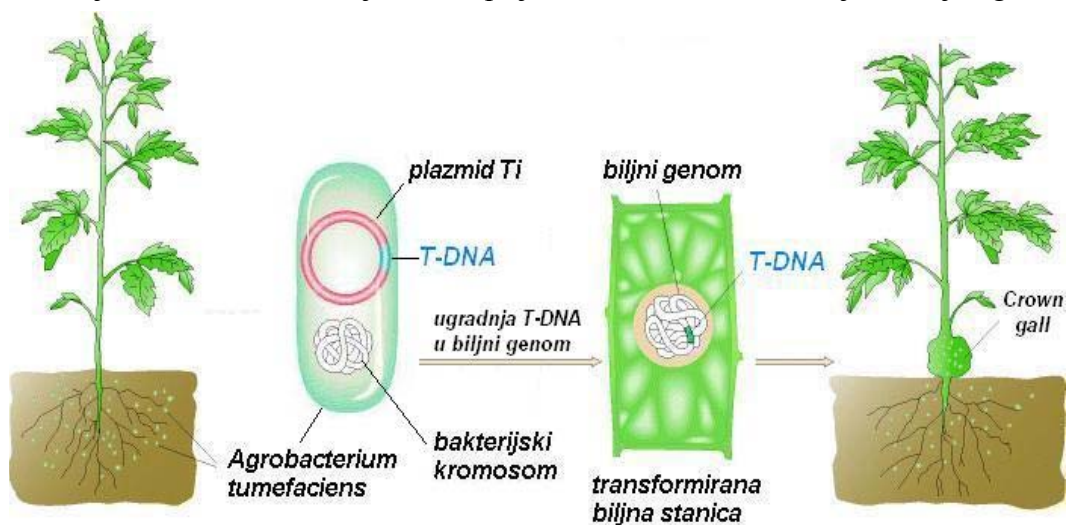
Bez obzira što je konačni cilj primjene genetičkog inženjerstva, znanstveno istraživanje ili postizanje korisnih svojstava u komercijalno vrijednih organizama, postupci su jednaki. Također, bez obzira provodi li se genetičko inženjerstvo na prokariotskim organizmima, biljkama ili životinjama, temeljne tehnike su vrlo slične i gotovo redovito uključuju ugradnju željenih fragmenata DNA u bakterijski plazmid pomoću restrikcijskih endonukleaza i DNA-ligaza. Fragment (gen) koji se želi ugraditi u genom ciljanog organizma priprema se, analizira i umnaža pomoću plazmida u bakteriji *Escherichia coli*. Ovisno o organizmu (bakterija, biljka ili životinja), postupci unošenja željenog gena u genom mogu se razlikovati. U biljaka se u tu svrhu najčešće primjenjuje bakterija *Agrobacterium tumefaciens* ili pak se željeni gen unosi u stanicu pomoću uređaja koji se naziva «gene gun». Nakon što se željeni gen ugradi u genom stanice određene biljke, iz takve se stanice regeneriraju čitave biljke koje se obično nazivaju transgene biljke.

Primjena bakterije *Agrobacterium tumefaciens* u genetičkom inženjerstvu

Bakterija *A. tumefaciens* živi u tlu gotovo svuda u svijetu. Genetički materijal te bakterije sastoji se od jedne velike kružne dvolančane molekule DNA (bakterijski kromosom) i jednog relativno velikog plazmida (plazmid Ti). Ta je bakterija tijekom evolucije razvila pomalo neobičan oblik ponašanja – kada se na biljci u blizini tla dogodi ozljeda (npr. aktivnošću kukaca), bakterije se kemotaksijom kreću prema tom mjestu, ulaze u međustanične prostore, vežu se za zdrave biljne stanice, te prenesu i ugrade u biljni genom točno određeni dio svog plazmida (taj dio plazmida se naziva T-DNA). Na T-DNA se nalaze dvije skupine gena: geni za regulatore rastinja (biljne hormone) i geni za proizvodnju opina (svi geni sadrže eukariotske promotore, pa su transkripcijski aktivni u biljnoj stanici). Stanica u čiji genom je bakterija ugradila T-DNA naziva se transformirana stanica. Regulatori rastinja potiču transformiranu biljnu stanicu na nekontroliranu diobu, pa se iz takve stanice u relativno kratkom vremenu razvije nakupina identičnih stanica (tumor, engl. crown gall). Zbog druge skupine gena na T-DNA, sve stanice tumora proizvode i izlučuju u međustanični prostor opine, tvari koje bakterije koriste kao hranu (slika 1.).

Kako se bakterija *A. tumefaciens* primjenjuje u genetičkom inženjerstvu? Iz bakterije se izolira plazmid Ti, te se iz T-DNA izrežu svi geni koji se tamo nalaze – ostave se samo rubne sekvence T-DNA dugačke u prosjeku 25 nukleotidnih parova (ti

rubni dijelovi T-DNA su ključni za prijenos T-DNA iz bakterije u biljni genom).



Slika 1. U prirodi bakterija *Agrobacterium tumefaciens* ugrađuje dio svojih gena u genom biljne stanice. Pod utjecajem tih gena takve se biljne stanice intenzivno dijele (formiraju tumor) i proizvode opine, tvari koje bakterije koriste kao hranu.

Umjesto originalnih gena u T-DNA se pomoću restrikcijskih endonukleaza i DNA-ligaze ugradi željeni gen, koji je prije toga pripremljen i umnožen pomoću drugog plazmida u bakteriji *E. coli*. Takav, rekombinantni plazmid Ti se unese u bakteriju *A. tumefaciens*, bakterije se uzgoje u tekućoj podlozi, te se u tu bakterijsku suspenziju dodaju stanice (komadići tkiva) biljke u čiji genom se žele ugraditi određeni geni –



Slika 2. Bakterija *A. tumefaciens* primjenjuje se za unošenje željenih gena u biljni genom tako da se u T-DNA umjesto originalnih gena ugrade geni koji se žele unijeti u biljni genom.

geni koji su prije toga ugrađeni u T-DNA plazmida Ti. Budući da bakterija ne razlikuje originalnu T-DNA od T-DNA u koju su ugrađeni željeni geni, ona će ugraditi željene gene u genom biljne stanice istim mehanizmom kojim to radi u prirodi. Iz biljnih stanica u koje je ugrađen željeni gen, regeneriraju se na

odgovarajućoj hranidbenoj podlozi biljke koje se potom zakorjene i sade u zemlju (slika 2.).

Razvijena je i nešto jednostavnija metoda za proizvodnju transgenih biljaka primjenom bakterije *A. tumefaciens*. Naziva se transformacija *in planta*. Tom se metodom zaobilazi regeneracija biljaka u kulturi tkiva i stanica tako što se biljke u koje se želi unijeti određeni gen uzgoje u zemlji u standardnoj posudi, te se cvjetni pupovi urone u bakterijsku suspenziju na nekoliko desetaka minuta i nakon toga se biljka ostavi da proizvede sjeme. Određeni postotak sjemenki sadrži zametak u čijim se stanicama nalazi ugrađen željeni gen, pa se izravno iz tih sjemenki razvijaju transgene biljke.

«Gene gun»

Druga po važnosti tehnika za unošenje željenih gena u biljni genom temelji se na primjeni uređaja koji se naziva «gene gun». Uređaj je veličine prosječne kutije osobnog računala (slika 3.). Kao i tijekom primjene bakterije *A. tumefaciens*, potrebno je najprije prirediti veliki broj kopija željenog gena. To se najčešće radi pomoću plazmida bakterije *E. coli*.



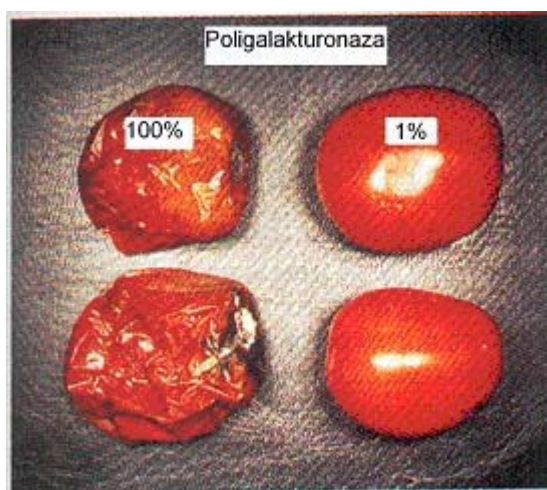
Slika 3. «Gene gun»

Zatim se iz plazmida izreže (pomoću endonukleaza) dio koji se želi ugraditi u biljni genom, te se veliki broj kopija željenog gena veže reverzibilno, relativno jednostavnim postupkom, za sitne zlatne ili volframove čestice. Te se čestice stave u cijev uređaja i jednostavno ispucavaju pod visokim pritiskom na pripremljeno biljno tkivo (stanice). Tijekom prolaska čestica kroz tkivo, u nekim stanicama željeni geni dospiju u jezgru, te ih stanični enzimi zaduženi za popravak DNA ugrade u genom.

Nakon toga se iz takvih stanica regeneriraju biljke istim postupkom kao i u prethodnoj metodi.

Komercijalne kulture oplemenjene genetičkim inženjerstvom

Sve trenutno komercijalno dostupne biljke oplemenjene genetičkim inženjerstvom dobivene su opisanim metodama. Prva takva biljka odobrena je za komercijalni uzgoj 1995. godine. Bila je to rajčica u koje je smanjena aktivnost gena za enzim poligalakturonazu za 99%. Taj se protein počinje proizvoditi u plodu rajčice nakon sazrijevanja i uzrokuje brzo mekšanje (slika 4.). Zbog toga rajčica s utišanim genom za



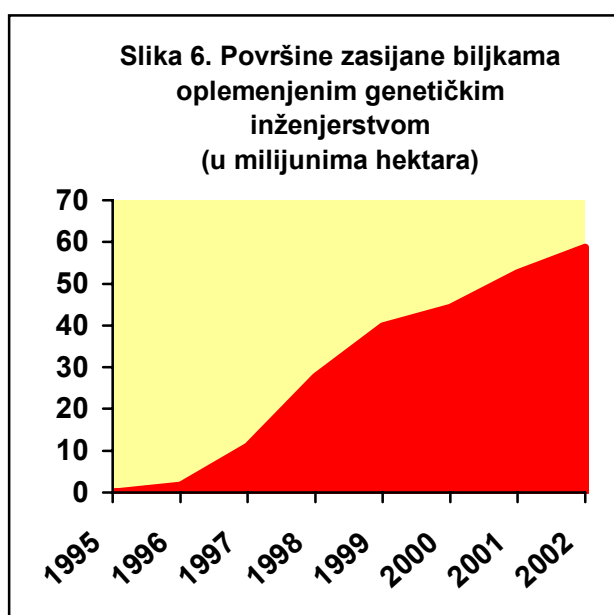
Slika 4. Na lijevoj strani fotografije prikazani su plodovi izvorne sorte, a na desnoj plodovi rajčice u koje je genetičkim inženjerstvom smanjena aktivnost gena za enzim poligalakturonazu.

poligalakturonazu mekša značajno sporije u odnosu na ostale sorte, te se zbog toga može ubrati zrela i takva transportirati na tržište.

U proteklih osam godina odobreno je još 68 sorti različitih kultura za komercijalni uzgoj. Većina tih kultura promijenjena je tako da olakšava uzgoj farmerima – dominiraju sorte otporne na različite štetočine (npr. kukce i viruse) i sorte tolerantne na određene herbicide (uglavnom glifosat i glufosinat). Upravo zbog tih svojstva u uzgoju mnogih kultura primjenjuje se značajno manje pesticida u usporedbi s uzgojem konvencionalnih sorti. Brojem sorti dominiraju kukuruz, uljana repica, pamuk i soja (slika 5.).

Kultura	Svojstva	Broj sorti
Kukuruz	otpornost na kukce, tolerantnost na herbicide,	18
Uljana repica	tolerantnost na herbicide, sterilnost, sastav ulja	14
Pamuk	otpornost na kukce, tolerantnost na herbicide	7
Soja	otpornost na viruse, sastav ulja tolerantnost na herbicide,	6
Rajčica	usporeno mekšanje ili sazrijevanje, otpornost na kukce	6
Krumpir	otpornost na krumpirovu zlicu, otpornost na viruse	4
Karanfil	produžen vijek trajanja, boja, tolerantnost na herbicide	3
Šećerna repa	tolerantnost na herbicide (glufosinat ili glifosat)	2
Bundeve	otpornost na viruse	2
Duhan	tolerantnost na herbicid, smanjeni sadržaj nikotina	2
Riža	tolerantnost na herbicid glufosinat	1
Cikorija	tolerantnost na herbicid glufosinat	1
Lan	tolerantnost na herbicid	1
Dinja	produženi vijek trajanja	1
Papaja	otpornost na virus	1
Ukupno		69

Slika 5. Biljke oplemenjene genetičkim inženjerstvom komercijalno dostupne 2002. godine.



U 2002. godini kulture promijenjene genetičkim inženjerstvom uzgajale su se na oko 60 milijuna hektara. U prosjeku se površine na kojima se u svijetu uzgajaju takve kulture povećavaju za oko 10% godišnje (slika 6.). Godina 2002. interesantna je zbog činjenice što je te godine soja oplemenjena genetičkim inženjerstvom dominirala u odnosu na konvencionalnu soju, jer se na 51% ukupnih svjetskih površina zasijanih sojom uzgajala soja oplemenjena genetičkim inženjerstvom (za 2003. godinu

službeni podatci još nisu poznati). Godina 2002. zanimljiva je i zbog činjenice što u državama u kojima su se uzgajale kulture oplemenjene genetičkim inženjerstvom živi polovica čovječanstva. Najveći uzgajivači bili su SAD, Argentina, Kanada i Kina (u ostalim zemljama površine zasijane takvim kulturama bile su manje od milijun hektara). Uzgajivači takvih kultura u našem zemljopisnom okruženju bili su Španjolska, Rumunjska, Bugarska i Njemačka.

Europska Unija nije odobrivala nove sorte od 1998. godine zbog pritisaka zastrašene javnosti. U proteklih pet godina uložila je ogromna sredstva u istraživanja zdravstvene ispravnosti i ekološke prihvatljivosti biljaka oplemenjenih genetičkim inženjerstvom i proizvoda dobivenih od takvih kultura. Budući da su utvrdili da su sve analizirane biljke i proizvodi zdravstveno ispravni, Unija će tijekom ove godine otvoriti tržište za takve proizvode i vjerojatno početi uzgajati interesantne i s ekološkog gledišta privlačne kulture.

Zaključak

Tehnologija rekombinantne DNA ili genetičko inženjerstvo pruža gotovo nevjerojatne mogućnosti za poboljšavanje svojstava organizama koje čovjek koristi u različite svrhe. Neka svojstva, koja se nastoje postići u poljoprivrednih kultura stotinama godina, moguće je na vrlo elegantan način dobiti primjenom te tehnologije. Genetičko inženjerstvo je trenutno jedina tehnologija koja se koristi u oplemenjivanju bilja, a čijom se primjenom točno zna kakva je promjena u genetičkom materijalu uzrok novom svojstvu.