

# Osnove rastlinske biotehnologije

Borut Bohanec

- 1 Uvod: kaj je biotehnologija in kaj so gensko spremenjene rastline
- 1.1 Nekaj osnovnih pojmov
- 1.2 Primerjava klasičnega in biotehnološkega žlahtnjenja rastlin
- 1.2.1 Žlahtnjenje rastlin je glavni vir napredka kmetijstva
- 1.2.3 Hibridi ter terminator tehnologija – od kod povezava
- 1.2.4 Mutacije
- 1.2.5 Mikropropagacija
- 1.2.6 Sekundarni metaboliti so uporabni v zdravstvu, kozmetiki in živilstvu
- 1.2.7 Haplidi
- 1.2.8 Medvrstna križanja, protoplasti
- 1.3 Genske transformacije
- 1.3.1 Osnove tehnologije
- 1.3.1.1 Restriksijski encimi
- 1.3.1.2 Plazmidi
- 1.3.1.3 Izolacija in detekcija genov
- 1.3.1.4 Načini iskanja zaželenih genov
- 1.3.1.5 Promotorji
- 1.3.2 Vnos genov v rastline (transformacija)
- 1.3.2.1 Metode genskih transformacij rastlin
- 1.3.2.2 Vgrajeni geni in njihova karakterizacija
- 1.4 Študijska literatura

GENSKO SPREMENJENA HRANA

B. Bohanec, B. Javornik, B. Strel

© 2004, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. Vse pravice pridržane

## **1 Uvod: kaj je biotehnologija in kaj so gensko spremenjene rastline**

Danes tudi v dnevnem tisku vse večkrat prebiramo vesti o novih tehnologijah, ki posegajo v svet živega na način, ki se je še pred nedavnim zdel nemogoč. Naslovi člankov so dostikrat prav alarmantni ter vzbujajo občutek, da nam nove genske tehnologije prinašajo vrsto nevarnosti, pojavljajo se tudi zahteve po prenehanju 'igranja z naravo', po uničevanju poskusov in podobno. Namen knjižice je podrobnejša razčlemba razlogov, zakaj potrebujemo gensko tehnologijo pri kreaciji sodobnega sortimenta ter opis postopkov, ki omogočajo prenos genov med različnimi organizmi. Precejšen poudarek je namenjen razlagi dosežkov prve generacije transgenih rastlin, ki so že osmo leto dostopne na tržišču, pa tudi temu, kakšne nove proizvode lahko pričakujemo v prihodnje. Obsežneje so razloženi tudi mehanizmi preverjanja varnosti genske tehnologije, stopnje v eksperimentalnem delu ter kompleksnosti elaborata, potrebnega za pridobitev soglasij, ki jih sodobne sorte potrebujejo pred morebitno tržno pridelavo. Podrobneje pa je tudi predstavljena zakonska in patentna regulativa, ki ureja to področje.

Namen publikacije je, prvič tudi v našem prostoru, celovito seznanjanje bralcev z razlogi, ki govorijo v prid uporabe sodobnih tehnologij pridelave rastlin ter njihovi uporabi v prehrani ljudi in živali, kar je na tem mestu prvič predstavljeno v celoti. Glede na obsežnost področja biotehnologije, ki zajema tudi genske manipulacije mikrobov ter živali, smo se avtorji namenoma omejili predvsem na razlago rastlinske biotehnologije, ker je prav hrana, pridobljena iz gensko modificiranih rastlin, najpogosteje predmet medijskih razprav. Da bi bolje razložili področje, smo uvodoma opisali tudi nekatere standardne (nesporne) postopke žlahtnjenja rastlin, s katerimi kreiramo običajne sorte kmetijskih rastlin. Poudarjamo tudi omejitve dosedanje tehnologije, ki jih lahko prav z uporabo genske tehnologije odpravimo.

Namen publikacije je torej širši od preprostega naštevanja prednosti ali slabosti uporabe gensko spremenjenih rastlin v kmetijstvu in živilstvu. Vodilna misel knjižice je, da se lahko le dobro informiran potrošnik ali pridelovalec, seznanjen s celotno problematiko, pravilno opredeli do novosti.

### **1.1 Nekaj osnovnih pojmov**

Za opis novih tehnologij se uporablja več izrazov, med najpogostejšimi so rastlinska biotehnologija, genski inženiring, gensko spremenjene rastline, rastlinske tkivne kulture, meristemske kulture in podobno.

O tem, kaj vse spada pod pojem biotehnologija, so mnenja deljena tudi med strokovnjaki. Če gledamo na problematiko širše, pravimo, da je biotehnologija 'Uporaba tehnologij, osnovanih na živih sistemih, ki razvijajo tržne procese ali proizvode'. V ožjem smislu pod biotehnologijo razumemo predvsem 'Uporabo metod rekombinantne DNK za genetsko spreminjanje ali karakterizacijo živih organizmov'. Seveda tudi ta ožja definicija ne zajema

nekaterih pomembnih biotehnoloških metod, denimo niti najbolj razvpitega kloniranja živali ne, zato velja smiselno uporabiti več možnih razlag področja. Povedano preprosto, če gledamo širše, lahko tako pod streho biotehnologije uvrstimo že dolgo znane postopke, kakršna je uporaba bakterij, kvasovk ali gliv v raznih fermentacijah, če pa gledamo najožje, s tem izrazom opisujemo le tehnologijo spreminjanja dednine na molekularnem nivoju. Tudi v sklopu rastlinske biotehnologije običajno poznamo dva sklopa, prvi se nanaša na tako imenovane tehnike rastlinskih tkivnih kultur, ki so lahko same sebi namen ali pa so osnova za uporabo drugega sklopa - genskih manipulacij- to je prenosa izoliranih genov med vrstami. Iz sklopa biotehnoloških manipulacij rastlin samo rastline z vnešenimi izoliranimi geni (transformirane rastline, sinonim transgene rastline) praviloma označujemo tudi kot gensko spremenjene organizme (GSO), gensko spremenjene rastline (GSR) oziroma iz njih pridobljeno živilo - gensko spremenjena (GS) hrana.

Podobno je z izrazom genske manipulacije. Vemo, da je vsako spolno razmnoževanje samo po sebi genska manipulacija (sprememba), torej bi s tem izrazom lahko zajeli tudi vsa križanja, tudi medvrstna, ki so ustvarila številne dosedanje sorte kmetijskih rastlin. Seveda pa s tem izrazom lahko zajamemo tako genomske manipulacije (ko spreminjamo ali združujemo celoten genom rastline), kromosomske manipulacije (ko rastlini dodamo ali odvzamemo določen kromosom ali del kromosoma) kot genske manipulacije (ko iz različnih organizmov izoliramo posamezne gene, da bi jih prenesli v druge organizme). Kot rečeno so le slednje predmet obravnave večine polemik in zakonodaje s področja rastlinske biotehnologije.

Z izrazom rastlinske tkivne kulture mislimo na način gojenja rastlin ali njihovih tkiv na sterilnih gojiščih v posebnih laboratorijskih pogojih in je podoben načinom, s kakršnim gojimo mikroorganizme. Izraz meristemske kulture je skoraj enak, le da tu mislimo na s tkivnimi kulturami razmnožene rastline, ki smo jih v začetku pridobili iz drobnih vršičkov, ki jim pravimo tudi meristemi.

Te nekoliko suhoparne definicije bomo poskušali v naslednjih poglavjih, predvsem s pomočjo preprostih primerov ter pregleda doseženega, čim preprosteje predstaviti. Posebej bomo opozorili na dejstvo, da sodobne tehnologije lahko le nadgradijo dosedanje dosežke žlahtnjenja rastlin, ko pomagajo iz obstoječih ustvariti nove, še boljše sorte kmetijskih rastlin ali izboljšati dosedanje postopke pridelovanja. Poskušali bomo tudi pojasniti, da genski inženiring lahko kreira tudi povsem nove proizvode, ki po svojem namenu služijo kozmetični, farmacevtski ali splošni industriji.

## 1.2 Primerjava klasičnega in biotehnološkega žlahtnjenja rastlin

### 1.2.1 Žlahtnjenje rastlin je glavni vir napredka kmetijstva

Žlahtnjenje rastlin je tisto gibalo, ki je človeštvu vse od davnine dalje omogočilo napredek in blagostanje. Domestifikacija nekoč divjih rastlinskih vrst, med prvimi žit, je omogočila razvoj poljedeljstva in konec nomadskih civilizacij. S preprosto odbiro vse boljših odbrank je še v času Majev iz teosinta nastala koruza, v naših krajih iz listnatih križnic glavno zelje in grenčični hmelj. Dolga stoletja so metode žlahtnjenja temeljile na več ali manj naključnih križanjih in odbiri ter razmnožitvi pridelovalcu najprimernejših rastlin. O znanstvenem pristopu k žlahtnjenju lahko govorimo pravzaprav šele od leta 1900 dalje, ko so ponovno odkrili zakone genetike in jih vse bolj pričeli tudi uporabljati v sistematičnem pristopu k žlahtnjenju rastlin. Kot bomo spoznali v prihodnjih poglavjih, je velika večina dosežkov rastlinske biotehnologije dejansko nadgradnja klasičnih tehnik žlahtnjenja rastlin, zato je prav, da se v prvem delu nekoliko posvetimo pregledu osnovnih možnosti žlahtnjenja, da bi nato lažje razumeli, katerih ciljev žlahtnjenja na standarden način ni bilo mogoče doseči in čemu sploh potrebujemo metode sodobne biotehnologije.

Uveljavljeno je mnenje, da je prav napredek pri žlahtnjenju rastlin, torej ustvarjanje vedno boljših sort, prispeval kar 50 odstoten delež k dvigu pridelkov in kakovosti v dvajsetem stoletju. Napredek je bil seveda povezan s spremembami agrotehnike, na primer z uvedbo zvečane pognojenosti tal, s strojno obdelavo, s povečanim številom rastlin na hektar, z razvojem fitofarmaceutskih sredstev in podobno. Mnogokrat je bilo potrebno skladno s spremembo agrotehnike spreminjati sortiment, na primer, če smo jablane želeli obrezovati in obirati s tal, je bilo potrebno požlahtniti ustrezno šibke podlage ali požlahtniti sorte s krajšimi vejami. Spreminjale so se tudi zahteve po kakovosti pridelkov, jagoda naj ne bo le velika, ampak tudi okusna, pridelek pšenice naj ne bo le velik, ampak naj iz nje napečemo tudi dober kruh.

Vemo tudi, da napredek ni bil enako hiter pri vseh kmetijskih vrstah, na primer od poljščin so se pridelki pšenice v tem stoletju dvignili za vsaj 5-krat, pridelki krompirja za 2-krat, pridelki ajde pa morda le za polovico. Podobno je bilo v sadjarstvu, kjer so nekatere vrste, recimo breskve ali jagode, hitreje napredovale kot na primer hruške. Večina razlogov za počasnejši napredek tiči prav v genetskih značilnostih vrste in z njimi določenem možnem načinu žlahtnjenja. Vemo tudi, da so spremembe rodnosti kmetijskih rastlin močno spremenile strukturo posevkov, pridelovanje nekaterih vrst se vse bolj širi, medtem ko se pridelovanje drugih vse bolj opušča.

Za primer si podrobneje pogledjmo, kako je pri nas odziv na žlahtnjenje spreminjal razmerja med pšenico in ajdo. Podatki iz 17. stoletja kažejo, da je ajda dajala večje pridelke kot pšenica. Hektarski pridelki pšenice in ajde so bili še ob koncu devetnajstega stoletja skoraj izenačeni, kasneje pa so pridelki

pšenice izjemno napredovali, pridelki ajde pa so ostali skoraj nespremenjeni. V tem času so se izjemno povečali še pridelki drugih poljščin, denimo hibridne koruze. V Sloveniji smo še leta 1939 pridelovali ajdo na skoraj 32.000 hektarjih, sedaj jo pridelujemo le še na skromnih 500 ha. Kaj se je torej dogajalo in kako so te spremembe povezane z žlahtnjenjem obeh poljščin?

Odgovoriti si moramo predvsem na vprašanje, zakaj so postajale nove sorte pšenice vedno rodnejše, kvalitetnejše in odpornejše in zakaj tega ni bilo mogoče doseči pri ajdi? Razlogov je seveda več, naštejmo le nekatere:

*Način žlahtnjenja:* Pšenica je samoprašnica, za katero so že v začetku stoletja na Švedskem odkrili osnovne principe križanja in individualnega spremljanja potomcev, razvitih je bilo vse več metod, ki so hitro vodile k nastanku novih izenačenih sort. Nasprotno je ajda izrazita tujeprašnica z zapletenim sistemom oprashaevanja, osnovna oblika žlahtnjenja je še vedno preprosta masovna selekcija, s katero je možno genetski napredek le počasi povečevati.

*Odzivnost na umetna gnojila:* Izhodiščni položaj je bil podoben, tako pšenica kot ajda sta se ob povečanem odmerku gnojil, še posebej dušičnih, polegali. V začetku stoletja so bile sorte pšenice visoke tudi meter in pol. Z vnosom genov za pritlikavo rast (*rht* geni), zlasti po drugi svetovni vojni, je bilo možno pšenico mnogo bolj pognojiti, večina novih sort pa se je tudi odzvala z zvečanim pridelkom zrnja. Pri ajdi so bili geni za zvečano odpornost na poleganje odkriti šele pred kratkim in še niso v množični pridelavi. Tudi če ajda ne polega, pa ni nujno, da ob povečanem odmerku gnojil pridelamo več zrnja.

*Sprememba žetvenega indeksa:* Pšenica se v teh letih ni le manjšala, hkrati z nižanjem stebela so žlahtnitelji večali klas, razmerje med slamo in zrnjem je postajalo vse ugodnejše, s tem se je izboljševal tudi izkoristek dosegljive vlage - rastline z manjšo vegetativno maso so odpornejše na sušo. Ugodnejše razmerje v prid zrnju je pri ajdi le malo izboljšano pri najnovejših sortah.

*Odpornost na bolezni:* V pšenico je bilo postopno uvedenih mnogo posameznih genov, ki so zelo povečali odpornost na večino pomembnejših bolezni pšenice, zato kljub pridelavi na velikih površinah in večkratni zaporedni setvi večjih izpadov pridelkov zaradi rastlinskih bolezni ni.

*Zanesljivost pridelka:* To je najšibkejša točka ajde v primerjavi s pšenico in drugimi poljščinami in glavni razlog za opuščanje pridelovanja. Nezanjsljivost pridelka ajde je največkrat povzročena z neoploditvijo ali abortiranjem plodov zaradi suše, redkeje zmrzali, nasprotno pa pšenica zelo redko povsem odpove, številne sorte prenesejo tudi najostrejše zimske razmere in tudi daljša sušna obdobja. Številni žlahtnitelji pšenice so namreč v svetovnem genofondu pšenice ali njenih sorodnikov (tudi rži) našli dovolj genov, ki so jih vključili v sodobne sorte in s tem močno zvišali zanesljivost pridelkov.

*Prilagodljivost lokalnim klimatskim razmeram:* Prilagodljivost kmetijskih rastlin, žlahtnjenih v enem talnoklimatskem področju in pridelanih v drugem je zelo različna, pšenica je primer rastline, ko introdukcija druge požlahtnjenih sort ni težka, nasprotno pa poskusi uvajanja ajde, žlahtnjene na Poljskem, Rusiji ali na Japonskem, večinoma niso uspeli. Z uspešnostjo introdukcije je seveda povezano tudi število žlahtniteljskih hiš, ki delajo z neko kmetijsko rastlino, vemo, da se z žlahtnjenjem pšenice ukvarja izjemno veliko število žlahtniteljev po vsem svetu, žlahtnitelji ajde pa so bolj redki.

*Tehnologija pridelave:* Ajdo in pšenico sejemo in žanjemo z isto strojno opremo, le da pri ajdi potrebujemo še sušilnico, ker se zrnje jeseni ne posuši dovolj na polju. Resen problem sodobne agrotehnike pa je uporaba selektivnih herbicidov. Ti so na voljo pri pšenici ne pa tudi pri ajdi, za katero ni registriran noben pripravek. Ajda lahko sicer uspešno ohranja nezapleveljenost njivskih površin, vendar na že zapleveljenih njivah ne more konkurirati plevelu. Ta lahko posevek ajde tudi povsem uniči ali pa ga zmanjša vsaj za polovico. Nedavne zastrupitve z ajdovimi izdelki v Sloveniji so odraz prav tega problema, le da plevel kristavec v Sloveniji ne uspeva na področjih, kjer pridelujemo ajdo, kar pa za sosednje države ne velja. Vnesen gen za odpornost ajde, denimo na enega od širokopasovnih okolju naklonjenih herbicidov, bi vsekakor ugodno prispeval k oživitvi pridelave ajde.

Navedeni primer nam torej kaže na nekaj razlogov, ki so v preteklih desetletjih, zaradi večje ali manjše odzivnosti na žlahtnjenje, močno spreminjali razmerja med poljščinami na naših njivah. Ajdi vsaj za zdaj tudi ugotovitev o njeni veliki prehranski vrednosti ni veliko pomagala, saj se zdi mnogim pridelovanje preveč negotovo. V postopkih žlahtnjenja so vsaj z dosedanjim načinom dela obstojale omejitve, ki jih ni bilo mogoče preseči. V zadnjem desetletju pa je bila na primer ajda proučevana s stališča zanimivega vira založnih beljakovin. Nekaj tovrstnih genov, katerih produkt so visokokakovostne beljakovine, so že izolirali ter jih bo v kratkem mogoče vnesti v kako drugo rastlinsko vrsto, denimo pšenico. Vsaj z znanstvenega vidika je povsem mogoče pričakovati, da bo na ta način požlahtnjenih nekaj novih sort pšenice ali drugih žit, ki bodo imeli določene lastnosti ajdovega zrnja. Možno je, da bo na tak sodoben način presežen dosedanji neuspeh ohranjanja ajde kot sodobne poljščine.

### **1.2.3 Hibridi ter terminator tehnologija – od kod povezava**

Eden od bistvenih elementov zelene revolucije, ki je po svetu podvojevala pridelke in v mnogih državah odpravila lakoto, je bila 'iznajdba' hibridov. Ne glede na to, da jih pridelujemo in uporabljamo že desetletja še danes marsikateri pridelovalec ali potrošnik ne vesta, kaj hibridi pravzaprav so in čemu služijo. Preprosto rečeno: za hibridno seme so zainteresirani pridelovalci – njim omogoči večji, kakovostnejši in bolj izenačen pridelek - kot tudi semenarske družbe, katerim hibridno seme zagotovi najučinkovitejšo

“protipiratsko” zaščito. Iz besednjaka GSO debate izvira izraz ‘terminator tehnologija’, ki je s hibridi tesno povezana. Gre za sistem genskih transformacij, ki so mu popularno nadeli to ime, njegov namen pa je bil doseči nekalivost semena v naslednji generaciji. Poskusimo razložiti, za kaj gre pri klasični ‘hibridni’ in sodobni ‘terminatorski’ zaščiti semenarskih podjetij.

Mnogim ni povsem jasno, kaj pravzaprav pomeni beseda hibrid. Zadeva je nekoliko zapletena, kajti v najširšem pomenu je hibrid vsak križanec dveh genetsko različnih rastlin. Taki hibridi seveda ne bi bili izenačeni ali rodnejši od nehibridnih vrst. V žlahtnjenju rastlin z besedo hibrid navadno označujemo potomce dveh čistih linij, torej križamo dve liniji, ki sta genetsko izenačeni (homozigotni), vendar med seboj močno različni, potomci, tako imenovani  $F_1$  hibridi, so genetsko heterozigotni, vendar so vsi med seboj enaki, ker so bile starševske rastline genetsko izenačene. Heterozigotnost na nek način povzroča veliko bujnost teh rastlin in po pridelku največkrat močno prekaša nehibridne sorte. Sorte so tudi neprimerno bolj izenačene, kar ima v sodobnem kmetijstvu izjemen pomen. Genetska neizenačenost se izrazi šele tedaj, ko hibridno seme še enkrat posejemo. Tedaj pridelek upade, sorta pa je neizenačena. To je torej razlog naravne zaščite semenarja, ki s hibridnim semenom doseže, da pridelovalec vsako leto kupi njegovo seme, saj mu shranjeno ne prinaša nobene koristi. Ni presenetljivo, da so prav vrste, pri katerih je bilo možno požlahtniti hibridno seme, med tistimi, ki so doživele največji tržni uspeh in hiter napredek dviga pridelkov. Najbolj tipičen predstavnik te skupine je seveda koruza.

Sama tehnologija, kljub temu da je sedaj stara že nekaj desetletij, pa sploh ni preprosta. Dejali smo, da se pri hibridih izrazi hibridna bujnost ali heteroza. Vedeti moramo, da heterozni efekt ne nastane s križanjem katerih koli linij, temveč moramo z zapletenim postopkom najprej izmed več tisoč linij najti dve najprimernejši, katerih križanci dajejo ustrezne pridelke, za taki liniji pravimo, da imata dobro kombinacijsko sposobnost. Pri nekaterih rastlinah še vedno ni možno linij genetsko povsem izenačiti, tako so na primer hibridi čebule križanci le dva do trikrat samooprašenih linij. Ti hibridi niso povsem izenačeni, so pa boljši od nehibridnih vrst, izražen pa je tudi efekt heteroze.

Ko žlahtnimo hibride in jih preizkušamo v majhnem obsegu, je možno križanja linij izvesti ročno, eni liniji odstranimo prašnike in jo oprašimo z drugo linijo. Tak način ni možen, ko želimo seme pridelovati za prodajo, obstaja le nekaj redkih izjem, kakršni sta denimo paradižnik in koruza, kjer tudi ročno odstranjevanje prašnikov ali rezanje metlic ni prezamudno. Pri vseh drugih vrstah rastlin pa pridobivamo hibride z uporabo genskih mehanizmov, ki omogočajo avtomatično medsebojno križanje izbranih linij.

Med klasičnimi metodami sta najbolj uporabna dva mehanizma. V prvem izkoriščamo že opisano lastnost tujeprašnic, da same sebe ne oprašujejo, temveč je opraševanje med linijami z različnimi oblikami “S” genskih oblik navzkrižno. Drug način, kjer izkoriščamo tako imenovano citoplazemsko moško sterilnost (CMS), je mnogo popolnejši, a tudi bolj zapleten. Odkrili so

ga v 30. letih pri čebuli, danes pa je znan že pri mnogih vrstah kmetijskih rastlin. Bistvo načina je odkritje, da se lastnost sterilnosti prašnikov v tem primeru deduje le po materini liniji. Kasneje so odkrili, da sterilnost povzročajo geni, ki niso v jedru, ampak na mitohondrijih, le-ti pa se dedujejo skupaj s celotno citoplazmo le po materi. Če najdemo rastlino s takšno lastnostjo, pravimo, da je to vir CMS, z njim večkrat povratno križamo eno od dveh linij (s tem postanejo jedrni geni skoraj enaki naši liniji). Ko takšno moško sterilno linijo posejemo hkrati z drugo linijo, jo ta oprašči, seme, ki ga pobere le na prvi, pa je v celoti hibridno. Zgodba je še bolj zapletena, saj pri nekaterih rastlinah (na primer pri čebuli, zelju ali pesi) ne potrebujemo nastanka semena, ker uživamo vegetativne dele, pri drugih (na primer pri koruzi, rži ali pšenici) pa uživamo seme. V tem primeru mora naša opraševalna linija vsebovati poseben gen, ki kljub sterilnostnemu genu v citoplazmi povzroči fertilitetno potomstvo. Celoten postopek lahko traja pet ali več let.

In kaj ima pri vsem tem opraviti biotehnologija? V tem prispevku smo opisali osnovne načine, ki so se razvili pred znanjem o biotehnoloških postopkih. Pri številnih vrstah obstojajo določene težave, ki jih je bilo mogoče premestiti šele z uporabo biotehnoloških tehnik. Na primer pri beluših nastajajo danes hibridi kot križanci dveh dihaploidnih linij in so vsi moškega spola. S tehniko protoplastov so omogočili uporabo CMS sistema tudi pri kapusnicah. Najsodobnejše metode vključujejo tudi uporabo genskih transformacij za vnos genov, ki v eni liniji povzročijo moško sterilnost. Hibridna oljna ogrščica, opremljena z elementi, izoliranimi iz prašnic tobaka (regija, ki kontrolira, kje naj se gen izrazi), z geni za uničenje tarčnih pelodnih celic ali njihovo ohranitev (barstar-barnaza) in z geni za selekcijo nesterilnih rastlin (herbicidna odpornost), je že tržno uporabljena zlasti v Kanadi. Taka sorta oljne ogrščice ima seveda veliko prednost pred ostalimi na trgu, ki so izključno nehibridne in s tem manj izenačene.

‘Terminator’ tehnologija je na nek način tehnologija, ekvivalentna hibridom, le da je zasnovana za žlahtnjenje samoprašnic. Namen je bil doseči enakovredno biološko zaščito sodobnih sort, kot je mogoče pri hibridih ne pa tudi pri sortah samoprašnic. Vedeti moramo, da je med samoprašnicami mnogo zelo pomembnih kmetijskih rastlin kot so pšenica, ječmen, riž, fižol, grah, solata in mnogo drugih, za katere pa do zdaj hibridne tehnologije ni bilo mogoče uporabiti, kajti manipulacija moške sterilnosti (opisana zgoraj) ni bila mogoča, inkompatibilnosti peloda pa pri teh rastlinah ni. Z gensko transformacijo so torej želeli doseči, da bi najsodobnejše sorte, npr. pšenice, kalile le eno sezono, kar bi semenarskim hišam omogočilo primerljivo stopnjo zaščite, kakršno jim prinaša uporaba hibridov.



### 1.2.4 Mutacije

Ko danes govorimo o novih postopkih žlahtnjenja rastlin s pomočjo tehnik rastlinske biotehnologije, kaže spomniti, da se je podobna "revolucija" v žlahtnjenju rastlin enkrat že zgodila, in sicer v 50. in 60. letih dvajsetega stoletja, ko je bila velika novost uporaba žarčenja za izzivanje mutacij. Z raziskavami so se ukvarjale številne raziskovalne skupine, sklicanih je bilo mnogo znanstvenih posvetov, ustanovljena pa je bila tudi posebna mednarodna agencija, ki še danes skrbi za, kot pravi, miroljubno uporabo jedrske energije za korist kmetijstva. To delo spremlja oddelek mednarodne agencije za atomsko energijo, ki ima sedež na Dunaju ter deluje v sodelovanju z organizacijo FAO. Agencija prireja vsakoletne tečaje, delno finansira izmenjavo znanstvenikov in plačuje manjše raziskave s tega področja. Članicam (med njimi je tudi Slovenija) tudi zastoj opravi določene usluge, na primer obsevanje poslanih vzorcev in podobno. Zelo zanimivi so podatki o številu novih sort, nastalih samo s to metodo, ki jih agencija še vedno zbira in objavlja. Seznam je impresiven, na primer z mutacijami požlahtnjenih sort kmetijskih rastlin je več kot 2000. Ko po cvetličarnah občudujete številne nove sorte okrasnega cvetja, ste lahko prepričani, da je precejšen del nastal z uporabo te metode. Podobno impresivna so poročila iz posameznih držav, na primer s Kitajske leta 1996 poročajo o 345 novih kultivarjih, od tega je 75% poljščin, zlasti žit, v zadnjih 5 letih so take sorte pridelovali na 10 milijonih hektarjev. Na primer le en kultivar pšenice (Yuandong No. 3), nastal z obsevanjem z gama žarki, je odporen na mnoge bolezni, uši ter bolje prenaša slana ali bazična tla, zato so ga leta 1986 pridelovali na 1000 ha, leta 1989 pa že na 200.000 ha, s čimer so povečali pridelek za 270.000 ton.

Poskusimo pojasniti na čem temelji učinkovitost mutacijske metode. Nasploh velja, da so prav mutacije genov tisti dejavnik, ki je omogočil evolucijske spremembe. Značilnost mutacij je, da nastajajo spontano v kateri koli celici organizma, njihovo število pa je v normalnih pogojih zelo nizko. Nizko je tudi zato, ker so živi organizmi razvili celo vrsto obrambnih mehanizmov, ki lahko veliko število novonastalih napak DNK popravijo. Mutacije so lahko prav majhne in prizadenejo le en gen ali pa zelo obsežne, ko se kromosomi preurejajo, izgubljajo ali podvajajo. Pojav spontanih mutacij je večkrat nezadosten, da bi ga lahko uporabili za žlahtnjenje rastlin, zato so iskali načine, da bi število mutacij povečali. Najprej so raziskali uporabo sevanja, tako neionizirajočega (UV žarki) kot ionizirajočega (X žarki, gama žarki) ali sevanja delcev (elektroni, nevtroni, helijeva jedra). Ker UV žarki ne prodrejo globoko, so uporabni le za tretiranje peloda ali drobnih tkiv, mnogo bolj uporabni so gama žarki (vir sevanja je največkrat kobalt 60), poseben efekt pa dosežemo v jedrskih reaktorjih, kjer lahko rastline obstreljujemo z nevtroni. Šibkejši tipi žarčenja povzročajo bolj točkovne mutacije, močnejši, kakršni so nevtroni, pa lahko kromosome razrežejo in s tem povzročijo večje spremembe. Dodatno so raziskali tudi uporabo različnih kemikalij, ki imajo

mutagene učinke. Mutagenih snovi je mnogo, največ se uporabljajo analogi nukleinskih baz, antibiotiki, alkilirajoče snovi in azidi.

Kaj je torej bistvo izzvanih mutacij? Za vse vrste mutacij velja nekaj skupnih značilnosti. Prva je ta, da mutacij ne moremo usmerjati, lahko se zgodijo na katerem koli delu genoma in v kateri koli celici. V žlahtnjenju rastlin nas največkrat zanimajo le celice, ki prispevajo k nastanku novih organizmov, med mnogimi nezaželenimi pa želimo odbrati le tiste, ki odgovarjajo našemu cilju žlahtnjenja. Druga značilnost izzvanih mutacij je, da se večina mutiranih genov v primerjavi z obstoječimi deduje recesivno, torej se izrazi le v organizmu, ki ima obe obliki tega gena enaki. Razlog je preprost, mutacije gene predvsem poškodujejo, zato ne proizvajajo več učinkovitih produktov, gen se torej ne izrazi. Mutacije pravzaprav ne ustvarjajo novih genov, temveč le spreminjajo obstoječe stanje. Pojav dominantnih (delujočih) genov je možno pojasniti z uničenjem regulatornega gena, ki je prej inhibiral delovanje nekega drugega gena. Tudi ta lastnost žlahtnjenja otežuje, zmanjšuje pa tudi obseg koristnih novonastalih genov. Prav to dvoje – naključnost in recesivnost – sta pomembni razliki med mutacijskim žlahtnjenjem in biotehnološkim vnosom genov. Genske transformacije niso naključne spremembe in vnešeni geni se izrazijo dominantno.

Metoda žlahtnjenja z izzvanimi mutacijami danes ni več v središču znanstvene pozornosti. Razlogov je več, eden glavnih je tudi ta, da so se v zadnjih desetletjih razvile uspešnejše metode, med njimi zlasti tiste s področja biotehnologije. Ena glavnih slabosti te tehnike je nedvomno nezmožnost usmerjenega povzročanja genskih sprememb, zato nastaja predvsem zelo veliko neprimernih sprememb, često pa imajo odbranke poleg zaželene tudi vrsto nezaželenih lastnosti. Usmerjenost izzivanja mutacij na povsem določeno sekvenco gena je možna šele z uporabo metod genskega inženiringa, vendar z manipulacijo DNK izven organizma.

Kot vsake raziskave so tudi te obrodile mnogo stranskih uporabnih produktov. Z obsevanjem peloda lahko na primer premostimo težave pri medvrstnem križanju, lahko izzovemo nastanek haploidnih rastlin, lahko pa obsevanje kombiniramo s tehnikami tkivnih kultur ter z njihovo pomočjo tretiramo posamične celice ter bolj usmerjeno odbiramo zaželene mutante. Nekaj izjemno koristnih novonastalih genov (na primer genov za odpornost žit proti poleganju) je vključenih v večino sodobnih sort, mnoge spontano nastale mutacije pa še vedno odkrivamo na primer pri sadnih vrstah, kjer je znanih veliko različic najbolj razširjenih sort.

V luči današnjih razprav okoli gensko spremenjene hrane velja primer žlahtnjenja z uporabo izzvanih mutacij podrobneje analizirati in postaviti vzporednice. V filmu "Kontroverzni geni" (Biotrend) primerjajo kromosome v jedru z dolgim filmskim trakom. Izzvane mutacije razložijo s strojnico, ki prerešata genom in po naključju uniči to ali ono sliko na filmu, genske transformacije pa delujejo kot škarje, s katerimi vključimo na filmski trak neko novo sliko. Metoda žlahtnjenja z izzvanimi mutacijami je bila manj pogosto

medijsko odzivna, morda se spomnimo le 'afere', ki je leta 2001 zapolnjevala zlasti nemški in italijanski tisk in naj bi opozarjala na vsaj tako 'nevarno' hrano kot je tista, spremenjena z gensko transformacijo. V resnem nemškem časniku je namreč izšel članek, da so italijanski špageti, pridelani iz trde pšenice, sumljivega porekla, saj so bile sorte požlahtnjene z uporabo radioaktivnega sevanja. Užaljenost samega italijanskega kmetijskega ministra je bila velika, vendar se je afera kmalu polegla, ker 'srhljivi podatek' ni naletel na zeleni odmev med bralci.

### 1.2.5 Mikropropagacija

Osnovna tehnika rastlinske biotehnologije je nedvomno mikropropagacija, čeprav s tem izrazom ne mislimo nič drugega kot razmnoževanje (kloniranje) rastlin v zaprtih "in vitro" pogojih. Vzporedno z razvojem metod mikropropagacije so namreč odkrili številne zakonitosti manipulacij rastlinskih tkiv, ki se sedaj lahko uporabljajo za različne zahtevnejše biotehnoške postopke in s tem omogočijo tudi genske transformacije.

V kmetijstvu vegetativno razmnožujemo rastline že od nekdaj, zato mikropropagacija ni nekaj povsem novega, kot je na primer kloniranje pri živalih. Razlika od klasičnega razmnoževanja je le v tem, da s tem načinom lahko vegetativno razmnožujemo skoraj vse vrste rastlin, da je hitrost razmnoževanja lahko zelo velika ter da sedaj lahko ohranjamo v vegetativni fazi tudi rastlinske vrste, ki sicer v naravi hitro zaključijo razvoj. Končni izdelek, ukoreninjena sadika, je torej povsem enak dosedanjim sadikam, postopek, kako do nje pridemo, pa je povsem drugačen.

Za razliko od običajnega dela v kmetijstvu postopki mikropropagacije potekajo v laboratorijih, ki morajo biti opremljeni za delo s postopki, pri katerih je zagotovljena sterilnost, ter vegetacijskimi komorami za gojenje rastlin. Sterilnost gojišča mora biti zagotovljena zato, ker bi sicer gojišče, v katerem je tudi mnogo sladkorjev, zelo hitro prerasle bakterije ali plesni, ki bi rastlinsko tkivo povsem uničili. Postopki za zagotavljanje sterilnosti so podobni kot jih poznamo že na področju mikrobiologije. Gojišča razkužujemo s pregreto vodno paro v avtoklavah, steklovino razkužimo v suhih sterilizatorjih ali kupimo že sterilne plastične posodice za gojenje, orodje, s katerim delamo, pa razkužujemo sproti, najbolje z električnimi visokotemperaturnimi grelci. Poseben problem je razkuževanje rastlinskega tkiva ob štartu mikropropagacije, rastline so mnogokrat obdane z glivicami ali bakterijami, odstranimo jih z razkužili kakršna je vsem poznana Varekina in podobnimi načini. Da zagotovimo sterilnost tudi med presajanjem, delamo v posebnih komorah, v katere vpihavamo zrak skozi zračne filtre, ki odstranijo tudi tako majhne delce kot so bakterije.

Mikropropagacija ima več faz, v prvi vcepimo izseček izhodiščne rastline, v drugi ga razmnožimo v obliki poganjkov, v tretji te poganjke ločimo in ukoreninimo ter v četrti prilagodimo na rast v nesterilnih pogojih. Bistvena

lastnost mikropropagacije je velika sposobnost razmnoževanja posamičnih rastlinic. Poganjki navadno zrastejo v enem mesecu toliko, da jih lahko razdelimo na več delov, na koliko, je odvisno od vrste. V najboljših primerih je možno razdeliti nastale poganjke tudi na deset in več delov, kar lahko ponavljamo iz meseca v mesec. V zelo kratkem času tako razmnožimo tudi na stotisoče posameznih poganjkov. Rast poganjkov uravnava predvsem rastlinski hormoni, ki so sestavina gojišča. Ko imamo dovolj poganjkov, jih ukoreninimo in postopno prilagodimo rasti na prostem.

Pri nekaterih rastlinah, zlasti pri orhidejah, je možno tudi bolj preprosto pridobivati sadike neposredno iz semena. Seme orhidej je namreč tako drobno, da v rastlinjaku navadno ne vzkljuje, potrebuje v gojišče dodana hranila. Če razmnožimo orhideje iz semena, seveda niso vsi potomci enaki, temveč variirajo odvisno od starševskih lastnosti. Orhideje pa lahko tako kot druge rastline z mikropropagacijo tudi kloniramo, v tem primeru so sadike seveda povsem enake izhodiščni rastlini. Mikropropagacija se največ tržno uporablja prav pri okrasnih rastlinah, sadike okrasnih rastlin namreč prenesejo nekoliko večje stroške pridelave. Številke mikropropagiranih sadik gredo v milijone, danes zelo težko kupimo kakšno lončnico, ki svoje mladosti ne bi preživela v epruveti, podobno je s sadikami rezanega cvetja.

Glavni strošek mikropropagacije predstavlja cena ročnega dela, potrebnega za obvladovanje postopka, zato iščejo številne načine, s katerimi bi potrebo po ročnem delu zmanjšali. Taki postopki so zlasti avtomatizacija (tudi robotizacija) procesa ali razvoj posebne vrste mikropropagacije, ki ji pravimo somatska embriogeneza.

Mikropropagacija je danes že povsem uveljavljen sestavni del pridelovanja rastlin, ki pa zahteva precej specialističnega znanja. Prav razvoj metod mikropropagacije je bil eden od temeljev, ki je omogočil genske transformacije rastlin, ki v bistvenih elementih potekajo *in vitro* na zelo podoben način kot pravkar opisani postopki razmnoževanja.

### **1.2.6 Sekundarni metaboliti so uporabni v zdravstvu, kozmetiki in živilstvu**

Ko uporabljate ličila ali vam predpišejo zeleno zdravilo, je povsem mogoče, da uporabljate proizvod, nastal v rastlinskem bioreaktorju. O čem govorimo?

Mnoge rastline tvorijo poleg snovi, ki jih potrebujejo za gradnjo organizma ali za založna hranila, tudi snovi, ki niso neposredno potrebne za njihov obstoj, temveč imajo lahko različne funkcije, največkrat povezane z odvrčanjem škodljivcev ali patogenih glivic, lahko pa so namenjene tudi privabljanju opraševalcev. Takim snovem pravimo sekundarni metaboliti, mnogi med njimi so zelo zanimivi, ker imajo zdravilne učinke ali so uporabni v kozmetični industriji. Običajen način izločanja sekundarnih metabolitov poteka z ekstrakcijo snovi iz na prostem raslih rastlin ali njihovih delov. Za ta

namen moramo torej pridelati dovolj zahtevane rastlinske vrste in iz nje izločiti zaželene snovi.

Podobno so farmacevtske tovarne na poljih "pridelovale" tudi nekatere snovi, ki jih tvorijo glivice. V Sloveniji je še dobro znan primer okuževanja rži z glivico *Claviceps purpurea*, rženim rožičkom. Ta glivica je za ljudi izjemno strupena, vendar je nekaj alkaloidov, ki jih proizvaja, v primerni koncentraciji lahko uspešno zdravilo. V Sloveniji smo zato še nedavno okužili kar več kot 2000 hektarjev rži izključno za potrebe farmacevtske industrije. Kolegom mikrobiologom gre zahvala, da sedaj na teh površinah ponovno pridelujemo hrano, kajti uspeli so proučiti postopek, po katerem lahko glivico gojijo v laboratorijskih pogojih brez njenega naravnega gostitelja rži. Takim posodam pravimo bioreaktorji, v njih potekajo postopki rasti večinoma sterilno na tekočih gojiščih, ki vsebujejo ogljikove hidrate in mineralne snovi, zagotovljeno pa je tudi dovajanje kisika. V takih pogojih lahko celo leto "pridelujejo" zaželen organizem ter iz njega izločajo industriji potrebne snovi.

Glede na uspeh tvorbe sekundarnih metabolitov kot izločkov gliv so mnoge raziskave usmerjene v proučevanje vzgoje rastlinskih celic, ki bi prav tako v bioreaktorjih neprekinjeno tvorile zaželene snovi, torej nam jih tudi ne bi bilo potrebno gojiti na poljih. Da bi to dosegli je seveda potrebno "prepričati" rastlinske celice, da se neomejeno razmnožujejo ter ob tem tvorijo industriji zaželene snovi.

Razmnoževanje posameznih celic ali njihovih skupkov je možno zagotoviti na relativno preprost način. Delček rastline, navadno vzeti iz ene od faz mikropropagacije prestavimo na gojišče, ki stimulira neorganizirano rast celic. Tako nastalemu tkivu pravimo kalus, enako kot pravimo tkivu, ki ga rastline tvorijo v naravi ob ranitvi. Gojišča za tvorbo kalusa največkrat vsebujejo zvišane koncentracije rastlinskih hormonov, največkrat avksinov, lahko tudi citokininov ali kombinacijo obojih. Kalus je skupek celic brez posebne oblike, vendar ločimo bolj kompaktno in manj kompaktno oblike kalusa, kalus je lahko tudi organogen (na njem nastajajo embriji, poganjki ali koreninice) ali neorganogen (ohranja le svojo neorganizirano rast). Po nekaj mesecih lahko kalus raste tudi brez dodatka rastlinskih hormonov, takemu kalusu pravimo habituiran kalus. Kalus je pomemben za nastanek sekundarnih metabolitov, zato ker zlasti drobljiv habituiran kalus lahko s stresanjem razdelimo na posamezne celice ali njihove manjše skupke. Take celice gojimo v tekočih gojiščih, zelo podobno kot smo opisali rast mikroorganizmov v bioreaktorjih. Z menjavanjem ali dohranjevanjem gojišča lahko rastlinske celice v obliki celične suspenzije rastejo skoraj neomejeno. Tak sistem bi torej bilo možno izkoriščati podobno kot poteka razmnoževanje gliv.

Ko obvladamo opisani postopek in znamo razmnoževati določeno vrsto rastlin v obliki celičnih suspenzij, nas seveda zanima, koliko sekundarnih metabolitov tvori in na kakšen način jih lahko izločimo iz njih. Izločanje je možno tako, da občasno vso nastalo biomaso "požanjemo", ekstrahiramo zaželene snovi in postopek začnemo ponovno, lahko pa celice zaželeno snov

tudi izločajo v gojišče, iz katerega ga neprekinjeno odstranjujemo. V obeh primerih je glavna težava ta, da mnogokrat rastlinske celice, gojene v obliki celičnih suspenzij ne tvorijo dovolj zaželenih sekundarnih snovi, torej se ne obnašajo enako kot v naravi. V takem primeru seveda postopek ni ustrezen in poiskati moramo njegovo izboljšavo. V zadnjih letih vzgojo celičnih suspenzij zlasti zamenjuje vzgoja koreninskih šopov, na primernem gojišču namreč lahko tudi korenine ohranjajo neomejeno rast. Za izločanje zaželenih snovi je pomembno, da imajo v bioreaktorjih gojene korenine čim več koreninskih laskov. Za pospešeno rast razraslih korenin je možno rastline tudi gensko transformirati (jim vnesti posamične tuje gene) z bakterijo *Agrobacterium rhizogenes*. Več o postopkih transformacije je navedeno v poglavju 3.3.2.1. Tu le omenimo, da je s pomočjo tega naravnega "bioinženirja" sedaj možno pri mnogih rastlinskih vrstah izzvati primerno rast lasnih korenin, ki ohranjajo stabilno proizvodnjo izbranih sekundarnih metabolitov.

Na poti do uporabe rastlinskih sistemov za nemoteno proizvodnjo zaželenih snovi je še precej ovir. Ena glavnih je, da se rastlinski organi in korenine ne odzivajo povsem enako v majhnih laboratorijskih sistemih kot v velikih industrijskih bioreaktorjih. Zato je več raziskav usmerjenih v mehanične izboljšave bioreaktorjev, namenjenih izključno gojenju rastlin. O tovrstnih uspehih mnogokrat tudi ni zadostnih informacij, saj mnoge tovrstne raziskave potekajo v industrijskih laboratorijih, ki zaradi konkurenčnih razlogov svojih rezultatov večkrat ne objavijo.

### 1.2.7 Haploidi

Opisali smo že, kako žlahtnimo rastline z ozirom na to, kako se oprašujejo ter kateri tip sorte želimo kreirati. Za večino sodobnih sort velja, da potrebujemo čim večjo genetsko izenačenost tako sorte (linije) pri samoprašnicah kot sorte hibrida pri tujeprašnicah. Žlahtnjenje nove sorte vedno začnemo z genetsko pestro populacijo, največkrat dobljeno z načrtnim križanjem več staršev. Da bi iz te genetsko mešane populacije pridobili genetsko izenačene linije, jih moramo, kot smo že opisali, vzgajati v ozkem sorodstvu, če je to mogoče, najbolje samoopraševati. Po petih do desetih generacijah take vzgoje postanejo linije dovolj izenačene (homozigotne) za nadaljnje preizkuse, popolnoma izenačene pa kljub temu še niso (take bi teoretično postale šele po nekaj sto generacijah samoopraševanja).

Povsem drugačen pristop do pridobivanja homozigotnih linij sedaj ponuja uporaba tehnike rastlinske biotehnologije, ki ji pravimo vzgoja haploidov. Spolne celice ali gamete vseh višjih organizmov, torej tudi rastlin, imajo polovično število kromosomov, šele združitve očetove in matere gamete tvori embrij z obema garniturama kromosomov. Pri rastlinah so moške gamete pelod, ženske gamete pa so skrite v semenskih zasnovah plodnic. Peloda je običajno veliko več kot jajčnih celic v semenskih zasnovah, pelod je tudi mnogo lažje izločiti iz prašnic. Sredi šestdesetih let so odkrili nenavadno

lastnost kristavčevih prašnic. Ko so jih *in vitro* gojili na gojišču za mikropropagacijo, so iz prašnic zrasle nenavadne rastlinice, ugotovili so, da so nastale iz nezrelega peloda. Ko so prešteli število kromosomov tako nastalih rastlin, so ugotovili, da jih imajo le eno garnituro, toliko kot pelod ali pol manj kot običajne rastline. Takim organizmom pravimo haploidi za razliko od običajnih organizmov, ki so največkrat diploidni.

In zakaj potrebujemo haploidne rastline v žlahtnjenju rastlin? Opisali smo, da je za nastanek izenačenih homozigotnih linij potrebno veliko časa ter mnogokrat tudi mnogo ročnega dela. Če pa lahko pridobimo haploidne rastline iz gamet, imajo te le eno garnituro kromosomov, torej le eno od več možnih oblik posameznega gena. Haploidne organizme je mogoče podvojiti, in sicer tako, da iz njih s podvojitvijo obstoječih kromosomov ponovno dobimo diploidne organizme. Ker smo obstoječo garnituro kromosomov podvojili, sta si oba para homolognih kromosomov enaka, torej so tudi vsi geni obeh garnitur kromosomov povsem identični. S tem smo torej formirali povsem homozigotne organizme, mnogo bolj izenačene od tistih, ki jih pridobimo na običajen način s samoopraševanjem linij, in s tem pridobili na kvaliteti in času, potrebnem za nastanek čiste linije. Pridobitev na času je toliko večja v kolikor naša izbrana vrsta potrebuje daljše obdobje za zaključitev ene generacije. Jari ječmen na primer lahko tvori do 3 generacije na leto, čebula eno v dveh letih, mnogo rastlin pa od semena do tvorbe cvetov in plodov potrebuje kar nekaj let. Mnogih tujeprašnic pa niti ni mogoče samoopraševati, denimo dvodomnih rastlin kot so špinača, beluši ali hmelj, druge pa imajo prisotne genske ovire, ki preprečujejo kalitev lastnega peloda. Pri takih rastlinah pridobivamo čiste linije z opráševanjem v sorodstvu, kar pa traja vsaj še enkrat dlje kot samoopraševanje. Haploidi torej omogočajo večjo kvaliteto (višjo stopnjo izenačenosti) in hitrejše žlahtnjenje.

Možnost nastanka haploidnih rastlin so poznali že pred uvedbo biotehnologije. Take rastline so lahko pridobili predvsem s pomočjo nepravilne oprášitve, ko je lahko manjši del semen (na primer koruze) nastal brez oploditve in je bil torej haploiden. Tak način pridobivanja haploidov pa se ni zaradi premajhnega števila pridobljenih haploidnih linij nikoli širše uveljavil. Nekoliko uspešnejši je drug način, ki temelji na uporabi opráševanja s tujim ali obsevanim pelodom, ki stimulira haploidno rast embrijev. Postopek uporabe obsevanega semena je še zdaj na primer edini način, s katerim pridobivamo haploidne rastline buč ali aktinidij.

Večinoma se danes uporablja za nastanek haploidnih rastlin nezrel pelod, povsem zrel namreč ni več primeren za tvorbo haploidnih rastlinic. Haploidne rastlinice lahko nastanejo z vzgojo prašnic ali pelod iz njih izločimo ob nastavitvi kulture. V kolikor pri določeni rastlinski vrsti ti dve tehniki nista uspešni, preizkušamo še možnosti pridobitve haploidnih rastlin iz ženskega dela cveta, torej nastavljamemo semenske zasnove, pestiče ali kar cele cvetove.

Kot rečeno *in vitro* ne gojimo le haploidnih celic gamet, temveč je mnogo celic tudi nehaploidnih (stene prašnic, ostanki prašničnih niti, somatski

deli cvetov), zato je potrebno preveriti, če so nastale rastlinice res haploidne in bodo iz njih nastale izenačene dihaploidne linije, ali je regeneracija nastala iz običajnega tkiva izhodiščne genetsko mešane rastline. Testi, s katerimi to preverimo, so relativno zapleteni, temeljijo pa na ugotavljanju ploidnosti, najbolje s posebno aparaturo za pretočno citometrijo, ki meri velikost jeder nastalih rastlin. Ugotavljamo pa tudi homozigotnost, in sicer z genetskimi testi, med katerimi se največ uporablja izoencimska elektroforeza, s katero lahko ločimo heterozigotne starše od homozigotnih potomcev. Tudi do podvajanja števila kromosomov s haploidnega na diploidni nivo lahko pride samo od sebe ali pa moramo to izvesti s pomočjo določenih snovi, kakršni sta kolhicin ali orizalin in druge. Bolj zaželene so tiste linije, ki se podvojijo spontano, izzvana podvojitev lahko povzroči tudi nezaželene genetske spremembe.

Tako kot velja za vse druge načine *in vitro* postopkov tudi za tvorbo haploidov še posebej velja, da opisani postopki nikakor niso enako uspešni pri vseh rastlinskih vrstah in tudi znotraj neke vrste so lahko določene sorte zelo odzivne druge pa sploh ne. Takšne razlike se nato poskušajo odpraviti s preizkušanjem najrazličnejših sestavin gojišč ali s spremenjenimi postopki vzgoje. Že kmalu so na primer ugotovili, da določeni šoki, kot je tretiranje cvetov z mrazom ali povišanimi temperaturami, lahko močno izboljšajo odstotek regeneracij, podobno učinkovit je lahko izbor gojišč denimo že samo izbor ogljikovih hidratov ali njihova koncentracija lahko povzročita dramatične razlike v odzivnosti. Kljub velikemu napredku na tem področju pa še vedno ne moremo pri vseh rastlinskih vrstah ali pri vseh izbranih sortah (genotipih) pridobiti tolikšnega števila haploidnih rastlin kot bi ga potrebovali za namene žlahtnjenja. Zato potekajo številne raziskave, ki iz leta v leto izboljšujejo postopke ali uvajajo povsem nove pristope za rešitev preostalih problemov.

Posebej nenavadne značilnosti je uvedla uporaba tehnike pridobivanja haploidov pri beluših. Beluši so namreč dvodomne rastline, ene imajo le moške in druge le ženske cvetove. Zaradi načina dedovanja spola dobimo iz peloda sicer polovico moških in polovico ženskih linij, le da je gen, ki vpliva na spol potomstva pri moških rastlinah, v taki obliki, da je vse njihovo potomstvo moškega spola. Pri beluših zato sedaj najnovejše hibridne sorte niso le bolj izenačene od prejšnjih, temveč so tudi istega spola, kar seveda olajša agrotehnične ukrepe.

Če omenimo še nekaj izkušenj, dobljenih v našem laboratoriju. Precej časa smo razvijali postopek pridobivanja haploidnih rastlin pri ajdi, kar nam je po nekaj letih dela tudi uspelo, a le v omejenem obsegu, zato teh metod še ne uporabljamo pri žlahtnjenju ajde. Pri zelju smo imeli velike težave s pridobivanjem pri nas zaželenih tipov zelja, kakršna sta varaždinsko in ljubljansko zelje, ti dve populaciji namreč ne vsebujeta genov, potrebnih za tvorbo večjega števila haploidnih organizmov. Rešitev smo dosegli šele s križanjem z odzivnim angleškim hibridom. Sedaj z izboljšanim postopkom kulture mikrospor lahko tvorimo več tisoč linij zelja, pravzaprav več kot smo jih zmožni proučiti kasneje na polju. Pri čebuli je možno dobiti haploidne linije



čebule le iz ženskih gamet, postopek smo z začetnega 1-2% uspeha izboljšali tudi na preko 20% odzivnost, ta je sicer močno odvisna od izhodiščne sorte, vendar je nekaj linij možno pridobiti tudi iz slovenskih sort čebule. Poseben problem pri čebuli predstavlja izrazita inbriding depresija, ki se izrazi zlasti v omejeni tvorbi semen homozigotnih linij.

Možnosti pridobitve haploidnih linij so torej zelo pomembne za sodobno žlahtnjenje rastlin, saj omogočijo hitrejšo in kvalitetnejšo pridobivanje linij. Pri vrstah, kjer so ti postopki že nekaj let dobro raziskani, je na trgu že precej novih sort, nastalih s to metodo, vendar način požlahtnitve ni posebej označen. Med njimi so tako poljščine kot zelenjadnice, pri nekaterih vrstah, na primer pri oljni ogrščici, so trenutno prav dihaploidne sorte vodilne v Evropi.

### 1.2.8 Medvrstna križanja, protoplasti

S stališča genskih transformacij, katerih osnovni namen je vnesti nove, prej kmetijskim rastlinam nedosegljive gene, je seveda potrebno osvetliti dosedanje možnosti vnosa genov, ki bi bili mogoči brez genskih transformacij, torej z uporabo klasičnih žlahtniteljskih metod ali z uporabo tkivnih kultur.

Številni žlahtniteljski cilji, denimo vnos odpornosti na bolezni ali škodljivce, so mnogokrat težko dosegljivi. Ko želimo izboljšati te zelo pomembne lastnosti, seveda potrebujemo gene, ki so odgovorni za te lastnosti. Na voljo imamo več možnih pristopov. Ustrezne gene lahko najdemo v genofondu obstoječih sort, ki so že v pridelavi in jih z običajnim križanjem vgradimo v potomce. Ta način se seveda največkrat uporablja, saj žlahtnitelju povzroča najmanj težav. Potomci so križanci dveh adaptiranih sort, v potomstvu nastaja mnogo kvalitetnih odbrank z majhnim številom drugih nezaželenih lastnosti. Denimo, tudi zelo veliki žlahtniteljski programi, npr. pšenice v sosednji Madžarski, temeljijo izključno na rekombinacijah lastnosti obstoječih sort. Če se zgodi, da genov za neko želeno lastnost ni možno najti pri že obstoječih sortah, je navadno naslednji korak iskanje genov v starejših sortah ali populacijah. Te so danes predvsem dosegljive v genskih bankah, to je ustanovah, ki prav za namene žlahtnjenja rastlin hranijo stotisoče vzorcev. S tem pristopom smo hitrost požlahtnitve nove sorte že nekoliko oddaljili, saj prva generacija potomcev mnogokrat po pridelku ali drugih lastnostih ni primerljiva z vodilnimi sortami, potrebna so nadaljna križanja potomcev z vnešenimi lastnostmi z adaptiranimi sortami. Ko je pred desetletjem v Sloveniji propadal ves krompir v skladiščih, ker se je razširila nova različica virusa, je bilo v sortimentu izmed več kot stotih sort krompirja le zelo majhno število odpornih ali tolerantnih sort in še najodpornejša med njimi je imela zelo slabo jedilno kakovost. Te sorte so sicer reševale trenutno težko situacijo, rešitev pa je prišla s sortami, katerim so bile te izhodiščne sorte starši v križanjih. Kasnejša analiza rodovnika odpornih sort je pokazala, da gre za potomce krompirja križanega z njegovim divjim sorodnikom, ki je v jedilni krompir vnesel poleg drugih lastnosti tudi tedaj tako želeno lastnost odpornosti

na uničujoč virus. Križanje z divjim sorodnikom, kot na primeru krompirja, je namreč tretja in več ali manj zadnja možnost, ki je žlahtniteljem na voljo. Večina gojenih vrst namreč ima tudi v naravi prisotne sorodne vrste, ki rastejo prosto in so mnogokrat vir dragocenih novih genov, kot velja za opisani primer. Težava je seveda v tem, da se v naravi različne vrste med seboj ne križajo ali pa imajo sterilno potomstvo. Tak primer je mnogim bolj znan iz živalskega sveta, ko se konj in osel v naravi ne parita, če pa to vendarle dosežemo, so potomke - mule - sterilne. Kako torej dosežemo medvrstno križanje rastlin? Precej uspehov je bilo doseženih že brez uporabe biotehnoloških metod in številne tehnike, kot so souporaba obsevanega peloda, obojesmerna oploditev, nanos hormonov na brazde, CO<sub>2</sub>, slanica, nanos peloda na nedozorel cvet in podobno so orožarnica klasičnih pristopov, ki rešijo nekompatibilnost peloda in pestiča. Prav iz tega več desetletij uporabljane pristopa izvirajo številne sodobne sorte kmetijskih rastlin. Če navedemo le en primer, prav malo potrošnikov denimo ve, da paradižnik danes ne bi bil kulturna rastlina brez pomoči genov, vgrajenih iz več kot desetih divje rastočih vrst iz rodu *Lycopersicum*.

Ko je izčrpana tudi ta 'orožarna' ter križanja ne uspejo, je na vrsti biotehnologija. Pomagamo si lahko z dvema tehnikama s področja rastlinskih tkivnih kultur, in sicer uporabimo lahko reševanje nastalih embrijev v *in vitro* kulturi ali spajanje dveh somatskih celic po poti protoplastov. Embrije rešujemo tedaj, ko do oploditve pride, vendar končno fertilno seme ne bi nastalo. Tedaj embrij izrežemo, ga prestavimo na ustrezno gojišče ter regeneriramo rastline. Zgodba je sicer nekoliko bolj zapletena, večkrat je namreč, zlasti pri genetsko oddaljenih križancih, za doseganje fertilnega potomstva potrebno še podvajanje genoma. Za primer, številne povsem nove vrste citrusov, ki jih srečujemo na naših policah, so nastale s to metodo. Drugo metodo, zlitje (fuzijo) dveh somatskih celic povsem različnih rastlin, so intenzivno proučevali zlasti v 70. in 80. letih. Metoda temelji na izolaciji posameznih celic, razgraditvi celične stene do nastanka 'protoplastov', ki jih povezuje le še notranja celična stena. Protoplasti se pod učinkom električnega sunka ali ustreznih kemikalij lahko združijo in v določenih primerih je možno tak združeni organizem tudi regenerirati. Če združimo protoplasta dveh različnih vrst, smo s tem izvedli somatsko fuzijo in na ta način pridobili novo vrsto kmetijske rastline. Ta metoda je sicer kljub navidezni prednosti dejansko rezultirala z nekaj manj praktičnimi uspehi kot so sprva predvidevali, a vendar je nekaj uspehov zelo uporabnih. Denimo le redki vedo, da sedaj skoraj vse sodobne sorte zelja temeljijo na vključkih citoplazme (mitohondrijski DNK), prejetih iz redkve prav na način fuzije protoplastov. V celoti vzeto lahko povzamemo, da je bilo z obema biotehnološkima pristopoma možno močno razširiti obstoječi genofond, kar je v preteklosti že rešilo številne žlahtniteljske zaplete. Omejitve so seveda precejšnje, kajti brez določene skladnosti obeh vrst potomci ne rastejo ali pa so sterilni. Prav tako velja, da določenih genov pač ne moremo najti niti v gojenih rastlinskih vrstah niti v njihovih divjih sorodnikih.

Do sedaj opisane metode torej temeljijo na združevanju genomov dveh rastlinskih organizmov, ki sta si med seboj bolj ali manj oddaljena. Posledica te združitve je seveda prenos ne le zaželenih, temveč tudi mnogokrat številnih nezaželenih genov. Kot smo že opisali, je to manjši problem, kadar križamo dve sodobni sorti, je pa lahko nepremostljiv problem, ko križamo z divjim sorodnikom. Kako se pravzaprav 'znebimo' nezaželenih genov? Postopku pravimo povratna križanja. Preprosto rečeno, večkrat povratno križamo z adaptirano sorto, nosilko ugodnih genov. Z vsakim povratnim križanjem se število genov adaptiranega genotipa poveča, darovalca genov pa prepolovi, v peti generaciji je prispevek genov adaptiranega genotipa 97%. Seveda je potrebno ob vsakem ponovnem križanju na nek način preveriti, ali so lastnosti, ki jih prinašajo vnešeni geni, še vedno prisotne v potomstvu. Taka križanja so seveda zamudna, potekajo 5-6 generacij, kar je lahko tudi več kot 10 let. Poleg tega ni vseeno, na kak način se deduje neka lastnost, ali gre za monogensko dominantno ali recesivno dedovanje ali celo za poligensko dedovanje. V zadnjem primeru sploh ni rečeno, da povratna križanja uspejo, saj se geni lahko preveč razcepijo v potomstvu.

Tudi tu je možno pričakovati velik napredek prav z uporabo biotehnoloških metod. Genom, ki jih želimo vnesti, namreč lahko sledimo z genskimi markerji, zato lahko v en organizem, čeprav s klasičnim križanjem, tokrat prvič vnašamo tudi po več genov hkrati, ne da bi katerega po naključju izgubili. Lahko vnesemo tudi več kodominantnih genov (gensko piramidenje), od česar si lahko pri jablanah obetamo ne kratkotrajno temveč dolgoročno odpornost tovrstnih križancev na škrlup. Prav ta možnost je trenutno med vodilnimi aplikacijami v sodobnem žlahtnjenju rastlin, ker pri vnosu uporabljamo križanje in ne genski inženiring, končni rezultat, kljub sodobni metodi, ni sporen.

S stališča GSO razprave je seveda posebej pomembno dejstvo, da tudi po opravljenem postopku povratnih križanj, denimo sorta krompirja z vneseno odpornostjo na nevaren virus nima vnesenih le zaželenih genov, temveč smo iz divjega sorodnika nedvomno vnesli tudi večje (neugotovljivo) število drugih genov. Razlog za to so ali nezadostno število povratnih križanj ali močne povezave med zaželenimi in nezaželenimi geni tako v fizičnem smislu (lokacija genov blizu skupaj na kromosomu) kot v smislu povezav v metabolnem ciklu, ko eni brez drugih ne delujejo. Koliko je nezaželenih genov ter kakšni so njihovi proteinski produkti, ne moremo preveriti. Enako velja tako za prve produkte genov - beljakovine - kot za metabolite, ki jih ti sintetizirajo. V prej opisanem primeru krompirja bi preverili le eventualno zvečano prisotnost znanih strupenih substanc, denimo solaninov in čakoinov, ne pa tudi morda novih neznanih substanc, ki pred tem v človeški prehrani še niso bili prisotne. Torej nam niso znani alergološki testi, prebavljivost, toksičnost kot tudi ne količina novovnesenih snovi.

## 1.3 Genske transformacije

### 1.3.1 Osnove tehnologije

Za boljše razumevanje sicer zapletenih, a po svoje vendarle lahko dojemljivih zakonitosti, ki omogočajo genski inženiring, je dobro poznati nekaj osnovnih značilnosti, ki omogočijo celoten proces genskih transformacij. To poglavje bomo nekoliko podrobneje predstavili, vendar je namenjeno predvsem tistim bralcem, ki ob nakupu novega avtomobila pokukajo tudi pod pokrov motorja, da bi o njegovem delovanju vedeli kaj več. Podobno kot pri avtomobilu, podrobno poznavanje tehnologije ni nujno potrebno za razumevanje pomena, zato lahko manj zahtevni bralci poglavje tudi mirno preskočijo. Avtorji ocenjujemo, da malo podrobnejše spoznavanje osnovnih principov dela na področju genske tehnologije, pomaga lažje dojeti bistvene značilnosti področja. Lažje tudi razumemo, kateri elementi v postopku so dejansko le modifikacija procesov, ki jih je razvil najuspešnejši genski inženir, narava.

Osnovne metode genskega inženiringa so bile razvite najprej pri bakterijah, in sicer že v 60. letih prejšnjega stoletja, seveda pa se še danes neprestano dopolnjujejo. Od srede osemdesetih metode niso več omejene le na bakterije, temveč jih je možno z manjšimi modifikacijami uporabljati pri praktično vseh živih organizmih.

Osnove rekombinantne tehnologije lahko razčlenimo na tri stopnje:

- 1) DNK molekulo (uporabljamo izraze: klonirana DNK, insertna DNK, tarčna DNK, tuja DNK) izoliramo iz donorskega organizma, razrežemo z encimi, ki jim pravimo restriktivske endonukleaze, ter ponovno združimo (zlepimo) z drugo DNK iz tako imenovanega klonskega vektorja. S tem nastane nova rekombinantna DNK molekula, ki ji rečemo tudi DNK konstrukt.
- 2) Ta DNK konstrukt vnesemo v gostiteljsko celico, ob čemer vnosu v bakterijsko ali rastlinsko celico pravimo transformacija. S tem se vnešena DNK ohrani in namnožuje.
- 3) Gostiteljske celice, ki so sprejele naš konstrukt, moramo identificirati in jih ločiti od celic, ki tega vključka nimajo.

#### 1.3.1.1 Restriktivski encimi

Omenili smo, da so pri delu z genskim inženiringom ključnega pomena restriktivski encimi, točneje endonukleazne restriktaze tipa II. Če želimo izvesti kloniranje, moramo namreč tako tarčno kot gostiteljsko DNK prerezati na specifičen način, ki nato omogoči precizno zlepljanje na točno določenih mestih. Eden prvih restriktivskih encimov je bil encim iz bakterije *Escherichia coli*, zato so mu dali ime *EcoRI* (I = rimska ena). Za ta kot za mnoge druge

restriksijske encime (kasneje so jih odkrili še več stotin) velja značilnost, da DNK molekulo prerežejo "palindromno" na točno določenem mestu, na katerem se nahaja neko, za ta encim specifično, zaporednje nukleotidov. Palindromno pomeni razrez na mestu, kjer so določena zaporedja baz tako razporejena, da se na obeh komplementarnih verigah, ki sestavljata dvojno vijačnico, prebere isto zaporedje v eno oziroma v drugo smer. V primeru encima *EcoRI* so to baze GAATTC, katerih komplementarna veriga se v nasprotni verigi prebere CTTAAG, torej palindromno. Nekateri encimi razrežejo DNK molekule na različne načine, denimo tako, da molijo navzven 5' ali 3' konci DNK oziroma naredijo "topi" rez, s čimer prerežejo DNK naravnost. Restriksijski encimi se ločijo tudi po številu nukleotidov na prepoznavnem mestu, mestu, ki ga mora prepoznati določen encim in to je lahko štiri, pet, šest, osem ali več nukleotidnih parov. Značilnost nekaterih encimov je, da genom nekega organizma cepijo na mnogih mestih, drugih pa, da je število razrezov precej manjše. Po razrezu se DNK molekula raztrga, prosto mesto pa postane "lepljivo" in se lahko združi z drugim mestom z enakim zaporedjem komplementarnih baz. Za zaključek operacije je potreben še encim ligaza, ki prej razrezano okostje verige DNK ponovno združi.

### 1.3.1.2 Plazmidi

Ko govorimo o gostiteljski DNK in gostiteljskih organizmih, je vsaj na prvi stopnji gostitelj največkrat bakterija, kjer se DNK vgradi na bakterijsko plazmidno DNK. Bakterije imajo seveda svojo kromosomsko DNK, ki je sicer precej preprosteje, a po drugi strani morda učinkoviteje sestavljena od genoma višjih organizmov, poleg nje pa večina rodov bakterij vsebuje še plazmidno DNK. S tem izrazom mislimo precej krajše ciklične DNK, ki se v celicah bakterij podvajajo izven osnovne kromosomske DNK. Velikost plazmidne DNK je med 1 in 500 kilobaznimi nukleotidnimi pari, vsaka bakterijska celica pa lahko vsebuje malo (od 1 do 4) ali mnogo (10-100) plazmidnih molekul. Največkrat plazmidna DNK v bakterijski celici predstavlja od 0,1 do 5% celotne DNK. V celici lahko koeksistira tudi po več različnih tipov plazmidov, nekateri pa se med seboj izključujejo. Funkcije plazmidov v bakterijskih celicah so različne, denimo lahko se na njih deduje informacija za njihov lastni prehod v druge celice, odpornost na antibiotike oziroma vključujejo serijo genov, ki bakteriji omogočijo izrabo nenavadnih metabolitov. Nekateri plazmidi se lahko množijo le v določeni vrsti, drugi pa v mnogih vrstah bakterij. Glede na to, da so plazmidi avtonomni, samopodvajajoči se genetski elementi relativno majhne dolžine, imajo s tem vse lastnosti potencialnih vektorjev klonske DNK. Z uporabo v genskem inženiringu pa je bilo potrebno v naravi prisotne plazmide močno modificirati. Denimo, za uspešno delo je bilo potrebno, da so bili odbrani majhni plazmidi, obstoj enega samega specifičnega mesta, ki ga restriksijski encimi lahko prerežejo, dodajanje "polilinker" mest za preprost vnos novih genov ter nenazadnje vključitev vsaj

enega gena, uporabnega za selekcijo bakterij z vnesenimi izbranimi DNK vključki.

Omeniti še velja, da poleg bakterijskih plazmidov poznamo še druge možne vektorje kot so bakteriofagi, kozmidi, fagemidi, vektorji kvasovk in drugi. Nekateri od njih se uporabljajo v specifične namene, denimo za tvorbo genskih knjižnic.

### *1.3.1.3 Izolacija in detekcija genov*

Če hočemo gene izrezati iz enega organizma ter jih pripraviti za vnos v drug organizem, je potrebno izmed mnogih genov, ki jih ima prav vsak, tudi najpreprostejši organizem, izbrati tistega, ki kodira določeno zaželeno lastnost. Prva faza izolacije uporabnih genov največkrat vključuje konstrukcijo genske knjižnice. V principu govorimo o knjižnici DNK sekvenc, ki jih vgradimo v vektorje. Proučevana DNK je lahko različnega izvora - genomska ali cDNK. Genomska knjižnica vsebuje z restrikcijskimi encimi na kratke delčke prerezano kromosomsko DNK, cDNK pa dobimo s pomočjo encimov, ki izražene gene v obliki mRNK pretvorijo v komplementarno DNK obliko. Genomska knjižnica torej predstavlja osnovno informacijo, zapisano v jedru, cDNK knjižnica pa le del izraženih genov brez intronskih mest in promotorskih sekvenc. Pri bakterijah je genom relativno majhen, geni pa so dokaj pogosto razporejeni na kromosomu in večinoma ne vključujejo nekodirajočih zaporedij (intronov). Obratno imajo vsi višji organizmi bistveno večji genom ter njihovi geni se prepisujejo v zahtevnem večstopenjskem procesu, v katerem se nekodirajoči deli odstranijo. Govorimo o knjižnicah YAC (umetni kromosom kvasovk), BAC (umetni kromosom bakterij), cDNK (izraženi geni) in EST (deli izraženih genov). Te so prilagojene velikosti vključene DNK oziroma načinu priprave. V bistvu so knjižnice genov sestavljene iz številnih kolonij bakterij (oziroma kvasovk), katerih vsaka vključuje drug DNK segment. Vse skupaj pa naj bi v primeru genske knjižnice predstavljale celoten genom oziroma v primeru cDNK knjižnice vse izražene gene v določenem metabolnem stanju celic oziroma v določenem tkivu.

### *1.3.1.4 Načini iskanja zaželenih genov*

Kot rečeno nas pri genskem inženiringu ne zanima celoten genom, temveč želimo v njem poiskati zaželjene posamične gene. Pripravljene knjižnice genov so pretežno osnova, načini iskanja genov pa se močno razlikujejo. Kratko pojasnimo nekaj največkrat uporabljenih.

- 1) Iskanje specifičnih sekvenc, ki predstavljajo gen, lahko izvedemo z DNK hibridizacijo posamičnih DNK klonov iz knjižnice genov. Hibridizacija temelji na lastnosti DNK, da se enoverižna DNK pari s

komplementarno enoverižno sekvenco, ki ima vsaj približno enako (komplementarno) zaporednje baz. DNK torej razklenemo (denaturiramo), nato največkrat nepovratno naneseemo denimo na najlonsko membrano ter izpostavimo parjenju (hibridizaciji) s sondami - zaželeno komplementarno enoverižno DNK. Sonde so opremljene z radioaktivnimi ali fluorescentnimi molekulami, kar nam po hibridizaciji omogoči prepoznati pozitivna mesta. Pomembno pri tem načinu je seveda, kako izberemo sonde. Načelno so te lahko izbrane na osnovi že znanih sorodnih genov, denimo tistih že ugotovljenih pri sorodnih vrstah. V tem primeru postavimo ne pretirano stroge pogoje hibridizacije, kar omogoči parjenje tudi ne povsem komplementarnih zaporedij. Druga možnost kreiranja sonde je možna, če poznamo genski produkt – beljakovino. V tem primeru sestavimo sondo sintetično glede na predvideno zaporedje DNK, zasnovano glede na ugotovljeno aminokislinsko zaporedje. Tu je treba opozoriti na težavo, ki izhaja iz značilnosti genskega koda, v katerem eno aminokislino lahko kodira več možnih zaporedij baz, torej je potrebnih več alternativnih sond, kar ni preprosto.

- 2) Sprehod po kromosomu je manj uporabljana možnost, ki jo lahko uporabimo, če imamo za naš proučevani organizem izdelano dovolj gosto gensko karto. Ko ugotovimo, da se iskani gen nahaja nekje dovolj blizu med dvema znanima markerjema, prvo sondo sestavimo na osnovi znanih sekvenc markerja, nato pa jih podaljšujemo glede na prekrivajoče se regije terminalnega dela vsake znane sekvence. Na tak način počasi pridemo do iskanega gena, vendar je na poti precej omejitev, knjižnica pa mora biti sestavljena iz zelo velikih fragmentov DNK.
- 3) Označevanje transpozonov je ena od variant, ki temelji na mutacijah genov. Ti naravni mobilni elementi, najdeni v večini organizmov, se lahko po genomu selijo in v genih, kamor se vrinejo, puščajo svoje “prstne odtise”. Znana sekvenca transpozona se tedaj, ko transpozon iskani gen izključi, uporabi kot sonda za določitev iskanega gena.
- 4) Diferencialno presejevanje je zelo sodobna metoda za lociranje genov in temelji na izolaciji setov genov izraženih v določenem tkivu ali ob določenem odzivu organizma, recimo ob napadu patogenov, pri določenih metabolnih poteh itd. Iz inducirane tkiva najprej izoliramo cDNK knjižnico, ki jo nato ločeno hibridiziramo z dvema setoma označenih sond. Recimo, da bi določili gene, ki se izrazijo le v cvetovih, najprej iz njih izoliramo mRNK in jih pretvorimo v cDNK. Te nato naneseemo in ločeno hibridiziramo denimo s cvetnimi in listnimi mRNK sondami. Mesta (geni), ki dajo signale le pri hibridizaciji z mRNK iz cvetov ne pa tudi pri mRNK iz listov, uporabimo kot specifične za cvetove, tiste, ki pa se izrazijo pri obeh hibridizacijah, pa za gene, potrebne za osnovni metabolizem celice. Na ta način ni nujno, da

neposredno odkrijemo posamičen iskani gen, lahko pa zožimo izbor več zelenih genov. V veliko pomoč pri tem delu so v zadnjih letih razvite posebne aparature (mikromreže), kjer na majhno površino naneseemo mnogo proučevanih fragmentov, odčitavanje pa poteka s pomočjo fluorescence, izzvane z lasersko svetlobo. Do rezultata pridemo z računalniško analizo podatkov.

### *1.3.1.5 Promotorji*

Strukturni geni, torej sekvence DNK, ki kodirajo beljakovine, same po sebi niso dovolj. Nekoliko pred njimi je namreč na kromosomski DNK potrebno še specifično zaporedje baz, ki uravnavajo prepis DNK v mRNK. Takim mestom rečemo promotorji. Promotorji dejansko določajo kdaj, kje in v kakšnem obsegu bo prišlo do prepisa določenega gena in s tem nastanka proteina. Obstaja mnogo vrst promotorjev, ki se glede na način regulacije genov močno razlikujejo. Načeloma bakterijski promotorji ne delujejo v višjih organizmih in obratno. Promotorje v grobem delimo na konstitutivne in inducibilne. Za prve menimo, da regulirajo gene, ki se izražajo neprekinjeno, taki so na primer "house keeping" geni, to je geni, ki skrbijo za osnovni metabolizem celice. Ostali geni, regulirani z inducibilnim promotorjem, pa se izrazijo le v določenem tkivu ali ob določeni fazi razvoja ali ob določenem dražljaju. V genskem inženiringu so prav promotorji odločilnega pomena. Omogočijo nam, da lahko bakterijske gene, opremljene s promotorjem, ki ustreza rastlinskim celicam, izrazimo v rastlinah. Omogočajo močno ali šibko izražanje vnešenih genov. Omogočijo izražanje genov izključno le v določenih tkivih ali ob določenih pogojih - denimo le v enem sloju celic nekega organa ali le ob napadu patogena. Največkrat uporabljan konstitutiven promotor pri rastlinskih transformacijah je bil izoliran iz virusa kumaričnega mozaika in se pod imenom CaMV-35S uporablja trenutno pri okoli 80% na tržišču sproščenih transgenih vrst. Podobno kot smo prej opisali pri strukturnih genih velja tudi za promotorje. Te regulatorne sekvence moramo izolirati in jih spojiti v pravem zaporedju v konstrukt, ki lahko šele ob vključitvi v rastlinski genom proizvede tarčni protein. K sreči ni vedno potrebno na novo izolirati promotorjev, saj določeni promotorji delujejo podobno v različnih rastlinskih vrstah.

### **1.3.2 Vnos genov v rastline (transformacija)**

Ko smo na zgoraj opisani način locirali in izolirali tarčni gen, ki smo ga izolirali iz določenega organizma, ga moramo za delovanje v rastlinah (ali drugih organizmih) ustrezno opremiti ter vnesti v tiste rastlinske celice, iz katerih se organizem regenerira.



### 1.3.2.1 Metode genskih transformacij rastlin

Gene, ki jih želimo vnesti v rastline, pripravimo v obliki plazmidne DNK, ki se namnožuje v bakterijah, največkrat v bakteriji *Escherichia coli*, iz katere jih lahko v zadostni količini tudi naknadno izločimo. Namnožen genski konstrukt želimo vnesti v rastlinske celice, kjer želimo, da se vgradi na kromosomsko DNK. Pri rastlinah za razliko od živali nekateri možni prenašalci, denimo retrovirusi, niso znani. Celice, iz katerih se rastline reproducirajo – torej apikalne meristemske celice, spolne celice ali zarodki so navadno dobro skrite in težko dosegljive. Nekatero dosegljivejše celice, denimo zrel pelod, niso primerne za integracijo tuje DNK. Rastlinske celice za razliko od živalskih tudi obdaja trdna celična stena, ki lahko vnos močno ovira.

Prvi poskusi genskih transformacij rastlin so uspeli pred dvema desetletjema, od tedaj se je razvila cela vrsta različnih postopkov, ki so rezultirali z današnjo stopnjo obvladovanja postopka, ki je bil učinkovit že pri več kot stotih vrstah rastlin, med njimi so tudi vse pomembnejše kmetijske vrste. Uspeh je dejansko kombinacija dvojega: izboljšanih postopkov vnosa in modifikacij postopkov tkivnih kultur, ki zagotovijo ustrezno tarčno tkivo in kasneje regeneracijo rastlin. Postopke vnosa navadno delimo na dve vrsti - neposreden način (vnos gole DNK) in posreden način (vnos s pomočjo vektorjev).

Z neposrednim načinom mislimo postopke, ko golo DNK molekulo (v obliki plazmida) vnašamo v rastlinske celice. Da predremo rastlinsko steno je na voljo več možnosti. Prva je v poglavju 1.2.8 omenjena možnost izolacije protoplastov, torej celic, ki smo jim celulozno-pektinsko steno razgradili, vnos DNK je sedaj mogoč denimo z elektroporacijo. Tovrstne postopke so razvijali skoraj celo desetletje predvsem pri najpomembnejših vrstah žit, dokler niso bili razviti uspešnejši postopki neposrednega vnosa. Teh poznamo več kot deset, vendar se v praksi prednostno uporablja predvsem obstreljevanje z delci težkih kovin - biolistika in bolj redko uporaba karbidnih vlaken. S slednjimi suspenzije celic ob močnem mešanju predremo z drobnimi karbidnimi vlakni, ki delujejo kot iglice in s tem omogočimo vstop DNK. Metoda je sicer poceni in nezahtevna, vendar omejena na določena tkiva, sama vlakna pa so nevarna za operaterja. Največji uspehi neposrednega vnosa so bili doseženi, ko je skupina znanstvenikov z ameriške univerze Stanford razvila postopek biolistike z aparaturo, ki ji v žargonu pravimo genska pištola. Postopek temelji na nanosu DNK na drobne (0,1-1,5  $\mu\text{m}$ ) delce zlata ali volframa. Delce naneseemo na membrane ali na plastične "izstrelke", jih nato s pomočjo potisnega plina (helij ali dušik) močno pospešimo in "ustrelimo" v tarčno tkivo. Delci zlata predrejo celične stene in omogočijo vnos DNK. Ta metoda je trenutno najbolj konkurenčna metoda posrednemu vnosu s pomočjo vektorjev in se uporablja tam, kjer drugi načini (predvsem transformacija z *Agrobacterium tumefaciens*) še niso uspeli.

Posredni način pri transformacijah rastlinskih tkiv omogoča predvsem omenjena bakterija *Agrobacterium tumefaciens* oziroma njeni sorodniki, npr. *A. rhizogenes*. *A. tumefaciens* je nekoliko nenavadna talna bakterija, ki v naravi vdre v rastline na ranjenem mestu ter na njih izzove nastanek neke vrste tumorjev (kalusnega tkiva). Ta njena lastnost je dedovana na večjem plazmidu imenovanem Ti plazmid. Bakterija vključi del plazmidne DNK ob pomoči več beljakovin, ki jih tudi kodira isti plazmid v rastlinske celice, kjer pride do vgraditve v genom. V tem primeru torej ne govorimo o vnosu gole DNK, temveč nekoliko zavarovane z omenjenimi beljakovinami, ki tudi olajšajo prehod citoplazme in vstop v jedro. Za namene genskih transformacij je bil naravni plazmid seveda povsem modificiran, tako da so ostale ohranjene le tiste regije, ki omogočajo replikacijo in vnos tarčne DNK na mesto, kjer so bili prej kodirani bakteriji koristni geni, pa sedaj vstavimo naš genski konstrukt. Metoda ima prednost pred neposrednim vnosom tudi v tem, ker rezultati kažejo, da med transgenimi regeneranti pri tej metodi vnesemo relativno manjše število kopij genov, ki so pogosto tudi manj poškodovani.

Kot smo omenili v uvodu tega poglavja, tako pri konstrukciji bakterijskih plazmidov kot pri genskih transformacijah rastlin, potrebujemo nek način, s katerim lahko preverimo, da je vključen gen res prisoten. Seleksijski gen daje celicam, ki vključujejo vnešeni gen, določeno prednost pri razvoju. Za ta namen vnašamo poleg tarčnega gena tudi seleksijski ali markerski gen. Seleksijski geni bakterijskih plazmidov so pretežno geni za odpornost na določen antibiotik, na gojišču, ki vključuje določen antibiotik, preživijo le tiste bakterije z vključenim plazmidom. Podobno velja za selekcijo rastlinskih celic. Tu so seleksijski geni nekoliko drugačni. Možno je tudi uporabljati iste gene za odpornost proti nekaterim antibiotikom (denimo kanamicinu), ki delujejo toksično na rastlinsko tkivo. Kot bo razložene kasneje je vsaj v tržnih aplikacijah uporaba antibiotične rezistence v zadnjem času omejena. Možni pa so še drugi seleksijski geni. Geni, ki sprožijo odpornost na določene herbicide, so lahko hkrati seleksijski geni. Zelo sodobni seleksijski geni so denimo gen *xylA*, ki kodira ksilozno izomerazo (seleksijski agens je D-ksiloz), gen *manA*, ki kodira fosfomanozno izomerazo (seleksijski agens je manoza 6-fosfat) ter špinačni gen *BADH*, ki kodira betain aldehyd dehidrogenazo (seleksijski agens je betain aldehyd). Ti trije geni omogočajo metabolno prednost celicam na substratu, na katerem netransformirane celice ne uspevajo. Markerski geni so geni, pri katerih je možno genski produkt vizuelno prepoznati. Starejši markerski gen je denimo gen za beta-glukoronidazo (GUS), kjer se tkivo, z izraženim markerskim genom, obarva temno modro. Slabost tega markerskega gena je ta, da pri tem proučevano tkivo uničimo. Novejši markerski gen "zeleno fluorescenčni protein" (GFP) je pridobljen iz meduze *Aequorea victoria* in povzroča fluorescenco živega transformiranega tkiva, kar lahko opazujemo pod fluorescentnim mikroskopom. Markerski geni se večinoma uporabljajo pri študijah ekspresije genov, GFP gen pa lahko tudi nadomesti seleksijski gen, ker preprosto

regenerante odberemo na osnovi izražene fluorescence. Razvitih je tudi nekaj strategij, s katerimi je mogoče naknadno selekcijski gen izločiti iz genoma, da v naslednjih generacijah ostane vključen le tarčni gen (poglavje 3.2.4).

Po vnosu genskega konstrukta v gostiteljsko celico lahko že v nekaj urah pride do ekspresije vnašanega gena. S tem sicer še nismo dosegli trajne vključenosti v genom, temveč morda le prehodno transformacijo. Stabilnost vključitve in nehimernost - genetsko izenačenost tkiv regenerantov preverimo zato kasneje. Na voljo nam je več genskih testov, med njimi je poleg eventualnega vizuelnega spremljanja markerskih genov predvsem testiranje prisotnega fragmenta z metodo, temelječo na polimerazni verižni reakciji (PCR). Ker s to metodo težje dokažemo vključenost v genom, navadno izvedemo še več drugih testov, z analizo po Southernu ugotovimo število kopij ter dokažemo vključenost v genom, s testi izražanja mRNK in proteina pa dokažemo delovanje vnešenega gena. Pri vrstah, ki jih množimo s semeni, je seveda dodatni test stabilne vključitve izražanje vnešenih genov pri potomcih naslednjih generacij.

#### *1.3.2.1 Vgrajeni geni in njihova karakterizacija*

Posledica genske transformacije je, z izjemo plastidne transformacije, naključna vključitev genskega konstrukta v genom rastline. Na mesto vključitve oziroma na število vnešenih kopij v jedrni genom sicer nimamo neposrednega vpliva, vendar pa naknadno izmed številnih regenerantov odberemo tiste, ki imajo vnešeno čim manjše število kopij (denimo le eno). Želimo tudi, da je gen vnešen v rastlinski genom na mestu, ki mu zagotavlja ustrezno delovanje. Transformirani DNK v rastlini pravijo v angleščini "transformation event", kar bi lahko prevedli kot transformacijski element. S tem izrazom razumemo dejansko vnešeno DNK v določeni transgeni rastlini. Ne glede na sestavo izhodiščnega plazmida se namreč v primeru zelene sprostitve preveri sekvence vnešene tuje DNK, ki pa ni nujno povsem enaka plazmidni. Pogosto se denimo zgodi, da se vnese le del izbrane regije plazmidne sekvence ali denimo celotni gen ter delno okrnjena sekvenca drugega gena in podobno. Želimo seveda odbrati tako transgeno linijo, ki ima vključen nepoškodovan tračni gen brez nepotrebnih spremljajočih sekvenc. Želimo tudi, da je število kopij vnašanega gena čim manjše. Ena sama vgrajena kopija je še posebej pomembna v primeru, ko želimo transformirane rastline uporabiti komercialno. Po dolgotrajnem postopku "deregulacije" namreč navadno vnešeni gen z običajnim povratnim križanjem (glej poglavje 1.2.8) prenesemo v številne sorte, prilagojene zahtevam lokalne klime in agrotehnike, vnašanje več kot enega gena pa je zelo zahtevno. V praksi to pomeni selekcijo izmed tudi večtisoč transformiranih rastlin, da bi med njimi našli takšno, ki ima le eno kopijo vnešenega gena, le-ta pa se izraža z vso potrebno intenziteto.

## 1.4 Študijska literatura

- Christou P, Klee H Ur. (2004) Handbook of plant biotechnology, Vol 1, in Vol. 2, John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, USA, 1420 str.
- Bojwani SS, Soh WY Ur. (2003) Agrobiotechnology and plant tissue culture. Science Publishers, Enfield, USA, 197 str.
- Kun LY Ur (2003) Microbial biotechnology. World Scientific, New Jersey USA, 724 str.
- Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (2003) Doubled haploid production in crop plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht NL, 428 str.
- Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS (2002) Molecular techniques in crop improvement. Kluwer Academic publishers Dordrecht, NL, 616 str.
- Chawla HS (2002) Introduction to plant biotechnology. Science Publishers, Enfield, USA, 538 str.
- Chahal GS, Gosal SS (2002) Principles and procedures of plant breeding. Alpha Science Int., Pangbourne India, 604 str.