

## Tržna pridelava gensko spremenjenih rastlin

Branka Javornik

- 2 Tržna pridelava gensko spremenjenih rastlin**
- 2.2 Pregled gensko spremenjenih rastlin v poljskih poskusih**
  - 2.2.1 *Število poljskih poskusov*
  - 2.2.2 *Rastlinske vrste v poljskih poskusih*
  - 2.2.3 *Testirane gensko spremenjene lastnosti v poljskih poskusih*
- 2.3 Pregled gensko spremenjenih rastlin v tržni pridelavi**
  - 2.3.1 *Obseg gensko spremenjenih rastlin in lastnosti v tržni pridelavi*
  - 2.3.2 *Gensko spremenjene rastline in lastnosti z dovoljenjem za tržno pridelavo*
  - 2.3.3 Viri**
- 2.4 Gensko spremenjene rastline s toleranco na herbicide**
  - 2.4.1 Gensko spremenjene rastline s toleranco na glufosinat**
    - 2.4.1.1 *Delovanje herbicida*
    - 2.4.1.2 *Geni in encimi za toleranco na glufosinat*
    - 2.4.1.3 *Vplivi izražanja transgena v rastlini*
  - 2.4.2 Gensko spremenjene rastline s toleranco na glifosat**
    - 2.4.2.1 *Delovanje herbicida*
    - 2.4.2.2 *Geni in encimi za toleranco na glifosat*
    - 2.4.2.3 *Vpliv izražanja transgena v rastlini*
  - 2.4.3 Okoljska tveganja gensko spremenjenih rastlin tolerantnih na herbicide**
  - 2.4.4 Viri**
- 2.5 Gensko spremenjene rastline z odpornostjo na škodljivce**
  - 2.5.1 Gensko spremenjene rastline z Bt-geni**
    - 2.5.1.1 *Bacillus thuringiensis - vir insekticidnih proteinov (genov)*
    - 2.5.1.2 *Mehanizem insekticidnega delovanja Bt-proteinov*
    - 2.5.1.3 *Vplivi izražanja transgena v rastlini*
  - 2.5.2 Okoljska tveganja gensko spremenjenih rastlin z vključenimi Bt-geni**
    - 2.5.2.1 *Razvoj odpornosti na Bt-toksin pri občutljivih populacijah škodljivcev*
    - 2.5.2.2 *Tveganja pridelovanja GSR z odpornostjo na škodljivce za druge (ne-ciljne) organizme*
  - 2.5.3 Viri**
- 2.6 Gensko spremenjene rastline z odpornostjo na viruse**
  - 2.6.1 *Mehanizmi delovanja virusnih sekvenc v rastlini*
  - 2.6.2 *Vpliv izražanja transgena v rastlini*
  - 2.6.3 *Okoljska tveganja gensko spremenjenih rastlin z odpornostjo na viruse*
  - 2.6.4 Viri**

GENSKO SPREMENJENA HRANA

B. Bohanec, B. Javornik, B. Strel

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

## 2 Tržna pridelava gensko spremenjenih rastlin

Gensko spremenjene rastline (GSR) so rezultat uporabe novejšega molekularno biološkega znanja v žlahtnjenju kmetijskih rastlin in jih uvrščamo med gensko spremenjene organizme (GSO). Skupna značilnost gensko spremenjenih organizmov je, da imajo v svojem dednem materialu vključene gene s pomočjo metod genskega inženiringa in ti novi geni imajo zapis za nove proteine, ki pogojujejo neko izboljšano lastnost organizma. Druga skupna značilnost GSO je mednarodno dogovorjena zahteva o obvezni presoji tveganja njihove uporabe, ker je gensko spreminjanje lastnosti relativno nov pristop v vzgoji izboljšanih organizmov, in ker zaenkrat razpolagamo le z omejenimi izkušnjami pri uporabi takšnih organizmov. Presoje tveganja eventuelnih škodljivih vplivov GSO na zdravje ljudi in na okolje so osrednji predmet mednarodnih sporazumov in nacionalnih predpisov, ki urejajo njihovo uporabo v kmetijstvu, prehrani ter zdravstvu in tako se zagotavlja njihova varna uporaba. Vzporedno z razvojem sodobne biotehnologije se vzpostavljajo tudi novi odnosi do uporabe različnih organizmov v proizvodnji dobrin in se odpirajo nova sociološka, etična in zakonodajna vprašanja. Ta vprašanja se odražajo v obsegu uporabe GSO s strani potrošnikov, ki jih pogojujejo različna percepcija, ne toliko glede varnosti ali nevarnosti GSO, pač pa sprejemljivost sodobne biotehnologije kot nove tehnologije, ki s svojim ogromnim potencialom in kompleksnostjo večkrat zbuja nezaupanje.

Aplikacije sodobne biotehnologije so v kmetijstvu najbolj izrazite v žlahtnjenju rastlin, kjer genski inženiring omogoča hitro in uspešno izboljšanje kmetijskih rastlin glede njihovega prilagajanja na spreminjajoče pridelovalne pogoje in zahteve potrošnikov. Danes so gensko spremenjene rastline po obsegu takoj za aplikacijami sodobne biotehnologije v medicini. Pot do današnjih uspehov je bila relativno dolga in zahtevna. Po prvih uspešnih kloniranjih bakterijskih genov in prenosu tuje DNA med različne bakterije v sedemdesetih letih so se tudi raziskave na področju rastlin začele intenzivneje ukvarjati z možnostjo vnosa tujih genov v rastline. Eden izmed pomembnih ciljev teh raziskav je bil iskanje metod za vnos genov v rastlinsko celico in rešitve so se pokazale na področju proučevanja biologije in molekularnih mehanizmov raka pri dvokaličnicah povzročene s patogeno bakterijo *Agrobacterium tumefaciens*. Po prvem uspešnem vnosu bakterijskega gena v tobak leta 1983 je naravna sposobnost *A. tumefaciens* za vključevanje genov v rastlino postala najbolj razširjena metoda transformacij rastlin. Druga učinkovita metoda, ki se je razširila v prvi polovici devetdesetih, posebno za transformacijo žit, kjer sistem *A. tumefaciens* ni bil učinkovit, je biolistika. To je neposreden vnos genov v rastlino s pomočjo obstreljevanja celic ali tkiv s pospešenimi mikroprojektili, na katerih je biološko aktivna DNA. Fizična narava obstreljevanja lahko premosti biološke ovire rastlinskih celic za sprejem zunanjih molekul. Po vstopu mikroprojektila v celico se DNA sprosti in vključi v genom.

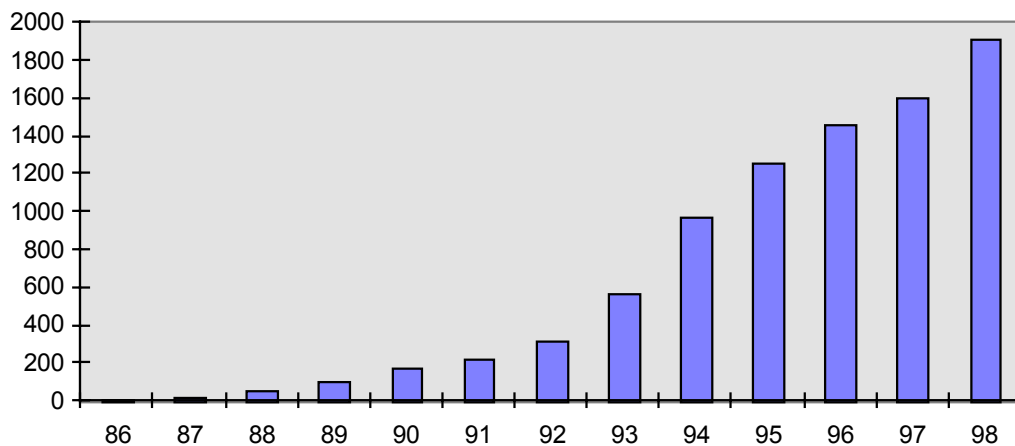
Metode transformacije so pomemben del genskega spreminjanja rastlin, postopka, ki v celoti zajema vrsto enako pomembnih različnih znanj in metod, od izbire genotipa, regeneracijskih sposobnosti rastline v *in vitro* pogojih, izbire genov in priprave genskih elementov za vnos v rastlino, vzgoje transformiranih rastlin in testiranje učinkovitosti ter stabilnosti vnešenih genov. V rastlino je načeloma možno vnesti najrazličnejše gene, vendar je za njihovo stabilno vključitev, izražanje in zanesljivo spremembo lastnosti potrebno natančno poznavanje delovanja genov, lastnosti in biološke vloge s temi geni kodiranih proteinov ter interakcij novih lastnosti z že znanimi lastnostmi rastline in pogoji v okolju. Pri tem so zelo pomembni eksperimentalni poskusi v naravnem okolju, s katerimi testiramo tako genske spremembe kot tudi agronomske lastnosti GSR. Kot predpogoj za uveljavitev gensko spremenjene sorte na trgu pa je, da na samem začetku dela upoštevamo njeno biološko varnost. Nivo današnjega znanja ter metod na področju genskega spreminjanja rastlin je razviden iz uspešnih protokolov za transformacijo pri več kot 100 rastlinskih vrstah, dinamika postopnega uvajanja GSR v prakso pa se kaže v postopnosti poljskih poskusov in v omejenem številu registriranih gensko spremenjenih sort.

## 2.2 Pregled gensko spremenjenih rastlin v poljskih poskusih

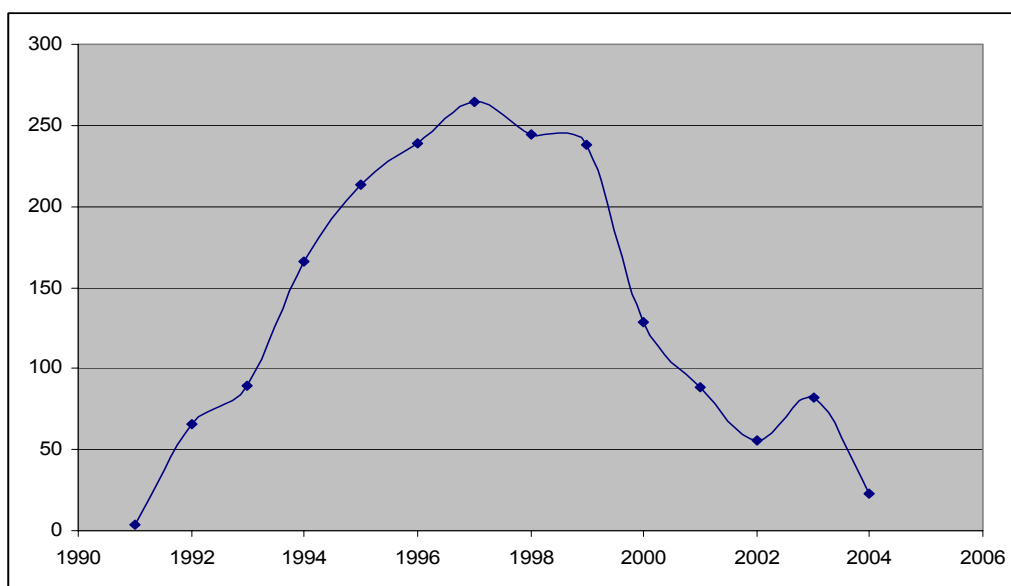
### 2.2.1 Število poljskih poskusov

Prvi eksperimentalni poljski poskusi z GSR so bili izvedeni leta 1986, in sicer dva v Franciji in trije v ZDA s preizkušanjem odpornosti transgenega tobaka na glifosat. Število odobritev je postopoma naraščalo (Slika 2-1) in do leta 1995 je bilo izdanih skupaj že 3650 dovoljenj. To število poskusov zajema število uradnih dovoljenj, izdanih od pristojnih organov za sproščanje GSO v posameznih državah, z upoštevanjem, da se večletni poskusi z enako rastlino in enako lastnostjo štejejo ločeno po letih. Dejansko število lokacij, kjer so se ti poskusi izvajali, je seveda večje, saj je na primer na Nizozemskem v povprečju 5-10 lokacij izvajanja poskusa za eno dovoljenje v enem letu. Po letu 1995 je preizkušanje GSR skokovito naraslo in število lokacij je samo v letih 1995-97 znašalo 10.000, poskusi pa so se izvajali že v 45 državah. Največ poskusov je bilo v ZDA in Kanadi, ki sta vodilni državi na področju agrobiotehnologije. Tako je bilo že do leta 1995 samo v ZDA izdanih več dovoljenj za poljske poskuse GSR kot v vseh državah članicah Evropske unije skupaj v obdobju 1991-2004. V EU je število poljskih poskusov v začetku devetdesetih postopno naraščalo in v letih 1996-1999 je bilo letno odobrenih največ različnih prijav (Slika 2-1). Vendar se je ta trend naraščanja števila poljskih poskusov z GSR v državah EU po letu 1999 ustavil, saj je bilo v letu 2004 odobrenih le še 23 prijav (Slika 2-2). Takšna dinamika izvajanja poljskih poskusov z GSR v Evropski uniji je predvsem odraz zadržanega odnosa javnosti v nekaterih državah EU do gensko spremenjenih rastlin. Do leta 1999 je bil delež ZDA v

obsegu izvedenih poljskih poskusov 78,0%, sledijo Kanada (8,5%) in Francija (3,5%) ter Italija, Nizozemska, Velika Britanija, Belgija z nekaj več kot 1% in manj kot odstotkom Španija, Nemčija, Avstralija, Brazilija in Nova Zelandija.



Slika 2.1: Postopno naraščanje števila odobrenih poljskih poskusov z gensko spremenjenimi rastlinami v svetu v obdobju 1986-1998

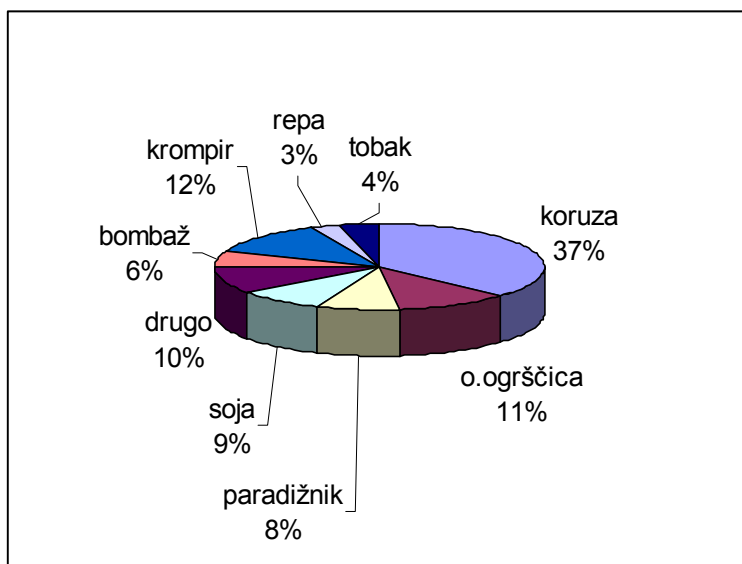


Slika 2.2: Število odobrenih poljskih poskusov za testiranje gensko spremenjenih rastlin v državah članicah Evropske unije v obdobju 1991-2004

### 2.2.2 Rastlinske vrste v poljskih poskusih

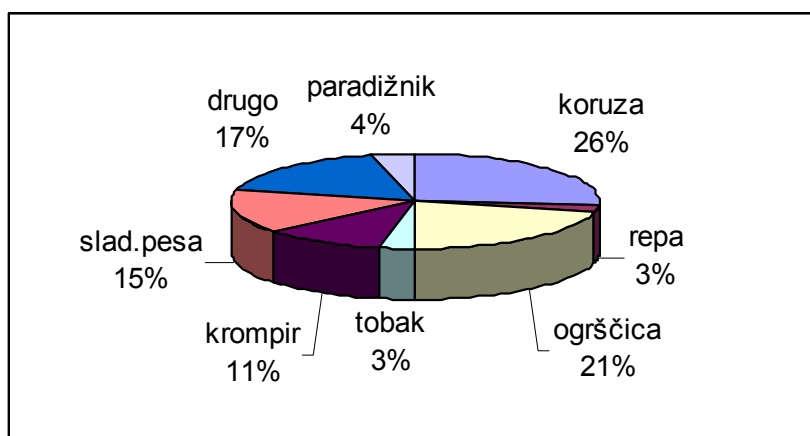
V poljske poskuse je bilo vključenih že več kot 70 različnih rastlinskih vrst in to število narašča glede na uspešnost genske spremembe in ekonomske

zanimivosti rastline. Največji delež pripada koruzi (37%), sledijo krompir, oljna ogrščica, soja in paradižnik z okoli 10% deležem, nato sledijo bombaž, tobak, sladkorna pesa in v nižjih deležih še riž, melone, lucerna, topol, buče ter nekatere druge rastline (Slika 2.3).



Slika 2.3: Delež rastlinskih vrst v poljskih poskusih

V Evropi se obseg najpogostejših rastlin v poljskih poskusih razlikuje od svetovne razporeditve zaradi strukture kmetijske pridelave. Sicer je bilo največ poljskih poskusov s transgeno koruzo (26%), vendar je delež oljne ogrščice (21%) in sladkorne pese (15%) kot tudi drugih transgenih rastlin (Slika 2.4) veliko višji kot je v svetovnem obsegu.



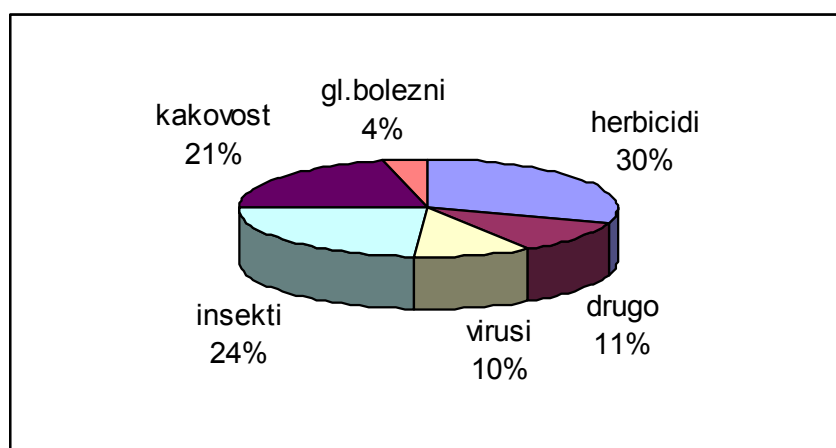
Slika 2.4: Delež posameznih rastlin v poljskih poskusih držav EU

Okoli 17% namreč zavzemajo različne poljščine (pšenica, sončnice, soja, ječmen), zelenjadnice (cikorija, bučke, cvetača, jajčvec itd.), sadno drevje

(jablane, češnje), vinska trta itd. Ta pestrost različnih transgenih rastlin je delno povezana tudi z rastočim deležem prijaviteljev poljskih poskusov GSR iz javnih inštitucij v primerjavi s privatnim sektorjem, ki prevladuje v ZDA.

### 2.2.3 Testirane gensko spremenjene lastnosti v poljskih poskusih

Pri prvi generaciji transgenih rastlin so se preizkušale predvsem agronomsko pomembne lastnosti, povezane z zmanjšanjem velikih izgub pridelkov zaradi škodljivcev, bolezni in plevelov. Poznavanje učinkov insekticidnih proteinov iz *Bacillus thuringiensis* (Bt) in vnos nekaterih Bt-genov v različne poljščine je omogočilo učinkovito odpornost rastlin na nekatere škodljivce (koruzna vešča, koloradski hrošč). Znani mehanizmi delovanja herbicidov na metabolizem rastlin so pripomogli k izolaciji ustreznih genov, ki kodirajo encime neobčutljive na herbicide (toleranca na glifosat) ali encime, ki razgradijo aktivno komponento herbicida (toleranca na glufosinat). Z vnosom teh genov je bila dosežena toleranca oziroma popolna odpornost rastlin na posamezne herbicide. Pri vzgoji transgenih rastlin z odpornostjo na viruse je bil upoštevan princip križne zaščite za odpornost, in sicer so v rastline vnesli najprej gene za virusni proteinski plašč, pozneje pa tudi druge virusne gene. Odvisno od vnešenega gena so tako transgene rastline odporne na okužbe predvsem s specifičnimi virusi. Z vnosom genov hitinaz ali glukanaz, encimov, ki lahko razgrajujejo celične stene glivičnih patogenov, je bila dosežena dobra odpornost na nekatere glivične bolezni. Spreminjajo pa se tudi nekatere lastnosti, pomembne za kakovost pridelkov. Dobro poznavanje biokemijskih in genetskih mehanizmov metabolnih poti je omogočilo gensko spremembo upočasnjenega mehčanja plodov (paradižnik), spremembo strukture škroba (krompir) in spremembo razmerja maščobnih kislin v rastlinskih oljih (oljna ogrščica, soja).



Slika 2.5: Najpogostejše lastnosti gensko spremenjenih rastlin v poljskih poskusih

V poljske poskuse je bilo vključenih okoli 15 različnih lastnosti. Največji delež zavzema toleranca na herbicide (30%), nato sledi (24%) odpornost na škodljivce, izboljšanje kakovosti (večinoma modifikacija zorenja plodov in sprememba razmerja maščobnih kislin, 21%), odpornost na viruse (10%), odpornost na glivične bolezni (4%) in druge lastnosti (11%) kot so modifikacija moške sterilnosti, odpornost na bakterije ali strune, kot tudi vnešeni geni, ki so pomembni samo za metodologijo transformacije rastlin (Slika 2.5).

Iz kratkega pregleda poljskih poskusov je razvidno, da je število poskusov od leta 1986 počasi rastlo in doživelo velik obseg šele po letu 1995, saj je bilo največ poljskih poskusov dejansko registriranih v tem obdobju. To kaže na postopno uvajanje gensko spremenjenih rastlin v okolje v skladu z rastočim znanjem in pridobljenimi izkušnjami tako glede samega spreminjanja lastnosti kot tudi biološke varnosti gensko spremenjenih rastlin. Postopnost preizkušanja je posebej razvidna iz relativno majhnega števila lastnosti in rastlin v preizkušanju. Prevladujejo koroza s toleranco na herbicid (glufosinat) in odpornostjo na žuželke (koroza vešča) ter bombaž s podobnimi lastnostmi, soja s toleranco na herbicid (glifosat), oljna ogrščica s toleranco na herbicide in spremenjeno sestavo maščobnih kislin, krompir z odpornostjo na koloradskega hrošča in odpornostjo na viruse, paradižnik z upočasnjenim mehčanjem. Preizkuša se seveda še vrsto drugih lastnosti v različnih rastlinah, vendar so ta testiranja v manjšem obsegu ali na začetni, eksperimentalni stopnji in šele nadaljni poskusi bodo pokazali dejansko vrednost teh genskih sprememb tako glede biološke varnosti kot ekonomske uspešnosti.

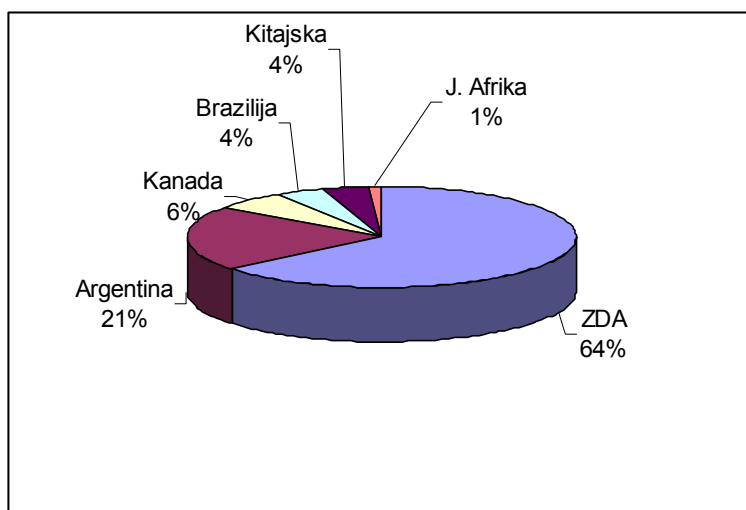
## **2.3 Pregled gensko spremenjenih rastlin v tržni pridelavi**

### *2.3.1 Obseg gensko spremenjenih rastlin in lastnosti v tržni pridelavi*

Leta 1994 so bila izdana prva dovoljenja za komercialno pridelovanje paradižnika (upočasnjeno mehčanje), soje (toleranca na glifosat), bombaža (toleranca na oksinil), oljne ogrščice (sprememba olja) v ZDA in tobak (toleranca na oksinil) v EU. Tem rastlinam so sledila druga dovoljenja in v letu 1996 že beležimo površine v obsegu 2,8 milijonov hektarjev, posejanih s transgenimi poljščinami. Trend večanja površin se je nadaljeval od leta 1996 dalje in v letu 2003 so skupne površine posejane s transgenimi poljščinami dosegle 67,7 milijonov hektarjev (Preglednica 2.1). Največja pridelovalka gensko spremenjenih rastlin je ZDA, saj njihove površine zavzamejo več kot 60% vseh svetovnih površin z GS rastlinami. Po površini je druga največja pridelovalka GS rastlin Argentina z okoli 20% vseh svetovnih površin in nato sledijo z manj kot 10% Kanada, Brazilija, Kitajska in druge države (Slika 2-6).

Preglednica 2.1: Svetovne površine posejane s transgenimi poljščinami v različnih letih

Leto	Mio ha
1996	2,8
1997	12,8
1998	27,8
1999	39,9
2000	44,5
2001	52,6
2002	58,7
2003	67,7

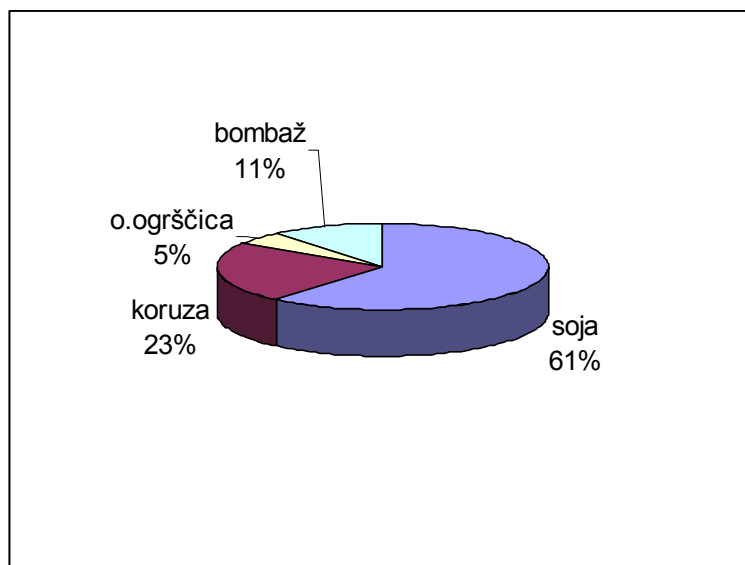


Slika 2.6: Delež držav pridelovalk transgenih rastlin leta 2003. Do 1% (ostalo) predstavljajo površine v Avstraliji in Indiji (do 100.000 ha) ter v Mehiki, Španiji, Romuniji, Nemčiji, Bolgariji, Indoneziji, Kolumbiji, Urugvaju in Hondurasu in na Filipinih (do 50.000 ha)

Tržna pridelava transgenih poljščin je v porastu, kar je predvsem odraz njihove ekonomske uspešnosti. Prednost pridelovanja sedanjih transgenih kultivarjev, ki dosegajo enak ali višji pridelek v primerjavi s klasičnimi kultivarji, je predvsem v manjših stroških za insekticide in herbicide ter za njihovo aplikacijo. Seveda pri tem ne gre zanemariti zelo pomemben okoljski vidik zmanjševanja uporabe različnih sredstev za varstvo rastlin. Najuspešnejša genska sprememba glede na obseg tržne pridelave je toleranca na *glifosat* v soji, saj Rounup-Ready soja predstavlja samo v ZDA okoli 80% celotnega pridelka soje. Sledijo koruza, oljna ogrščica in bombaž (Slika 2.7) ter v veliko



manjšem deležu rastline, katerih pridelava je na manjših površinah tudi pri konvencionalnih sortah (krompir, paradižnik, buče).



Slika 2.7: Delež posameznih rastlin v svetovni proizvodnji gensko spremenjenih rastlin leta 2003

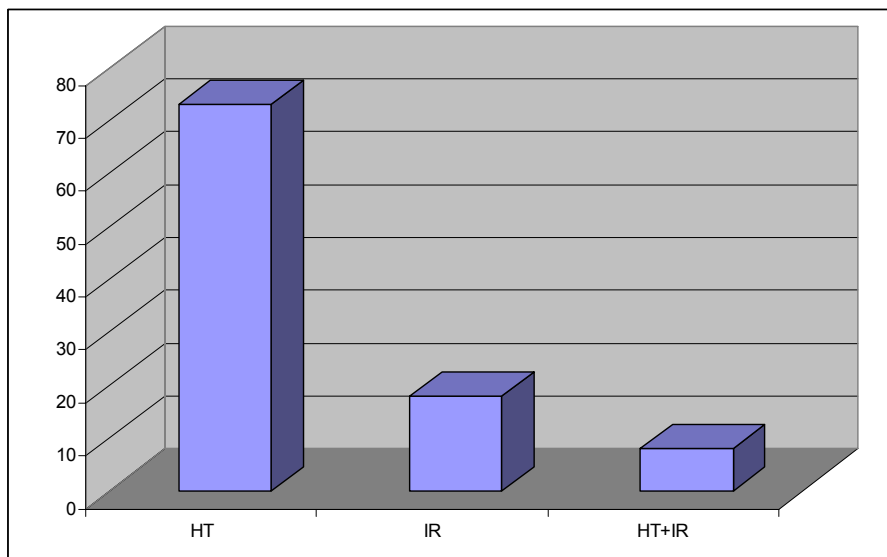
Glede na celokupne svetovne kmetijske površine je zaznati precejšen porast deleža površin, posejanih s štirimi najbolj razširjenimi transgenimi poljščinami; ta delež je leta 2001 znašal 19%, leta 2003 pa že 25% (Preglednica 2.2).

Preglednica 2.2: Deleži kmetijskih površin transgenih poljščin v deležu celokupne svetovne površine za sojo, bombaž, oljno ogrščico in koruzo v letu 2003.

GS poljščina	Površine z GSR/vse kmetijske površine poljščine
Soja	55%
Bombaž	21%
Oljna ogrščica	16%
Koruza	11%
<i>Povprečje</i>	<i>25%</i>

Najbolj razširjena gensko spremenjena lastnost v tržni pridelavi je toleranca na herbicide (73%), nato pa sledi odpornost na žuželke (18%), v porastu pa sta

obe lastnosti skupaj (toleranca na herbicid in odpornost na škodljivce), vključeni v eno sorto s 5% deležem v letu 2003 (Slika 2.8). Ostale prej omenjene lastnosti (odpornost na viruse, izboljšana kakovost) so zastopane v manjšem obsegu.



Slika 2.8: Obseg gensko spremenjenih lastnosti v tržnem pridelovanju v letu 2003 (HT: toleranca na herbicid, IR: odpornost na škodljivce)

Iz pregleda tržnega pridelovanja transgenih rastlin je razvidno, da so se uspešno uveljavile predvsem soja, koruza, oljna ogrščica in bombaž s toleranco na herbicide, temu pa sledijo v veliko manjšem obsegu koruza in bombaž z odpornostjo na škodljivce. Čeprav so že v večletnem preizkušanju tudi druge rastline z zanimivimi lastnostmi za pridelovalce in potrošnike, je njihova uveljavitev na trgu počasnejša, čemur botrujejo različni razlogi, kot na primer zahtevnost in visoka cena postopkov testiranja biološke varnosti transgenih rastlin, vprašanja avtorskih pravic patentiranih postopkov ali genov in sprejemljivost transgenih rastlin s strani potrošnikov.

### 2.3.2 Gensko spremenjene rastline in lastnosti z dovoljenjem za tržno pridelavo

Na osnovi priporočil mednarodnih organizacij na področju kmetijstva in prehrane (FAO), okolja (UNEP), zdravstva (WHO) in ekonomskega razvoja (OECD in UNIDO) o varni uporabi gensko spremenjenih organizmov so oblikovani nacionalni predpisi, pri katerih so aktivno participirala tudi strokovna združenja in nevladne organizacije. Pred vsako uporabo (poljski poskusi ali trženje) gensko spremenjenih rastlin je potrebno pridobiti ustrezno dovoljenje, s čimer se zagotavlja, da uporaba GSR ne bo imela drugačnih vplivov kot enaka ne-transgena rastlina. Dovoljenja za posamezno rastlino s specifičnim transgenim elementom, ki pogojuje posamezne lastnosti, izda

pristojni upravni organ v posameznih državah. Do marca 2002 je bilo v svetu skupaj izdanih 85 dovoljenj za transgene elemente, vključene v 16 različnih rastlinskih vrst (Preglednica 2.3).

Preglednica 2.3: Gensko spremenjene rastline z dovoljenjem za okoljska sproščanja ali za uporabo v prehrani živali ali ljudi. (HT: toleranca na herbicide, IR: odpornost na škodljivce, VR: odpornost na viruse, MS: moška sterilnost; Q: kakovost)

	HT	IR	HT+IR	VR	IR+VR	MS	Q	Skupaj
Bombaž	3	1	1					5
Buče				2				2
Cikorija						1		1
Koruza	10	2	6			3		21
Krompir		1		1	4			6
Lan	1							1
Melone							1	1
Nageljni							10	10
O. ogrščica	8					5	3	16
Papaja				1				1
Paradižnik		1					5	6
Pšenica	1							1
Riž	1							1
Slad. pesa	2							2
Soja	5						5	10
Tobak	1							1
Skupaj	32	5	7	4	4	9	24	85

Največ odobritev je bilo za toleranco na herbicide (HT) s skupno 32 različnimi genskimi elementi, ki se razlikujejo v strukturi genskih elementov in v ciljnih genih, ki pogojujejo toleranco na različne herbicide. Najpogostejši herbicidi so glufosinat in glifosat ter imidazolinoli. S 24 različnimi transgenimi elementi sledijo spremenjene lastnosti kakovosti (Q), kot so na primer upočasnjeno zorenje (paradižnik), sprememba sestave maščobnih kislin v oljih (soja, oljna ogrščica) ter podaljšana svežost in sprememba barve (nageljni). Devet različnih transgenih elementov za kontrolirano opravevanje pri proizvodnji hibridov (MS) vključuje kombinacije treh genov za moško sterilnost, obnovo fertiliteti ter odpornost na herbicid. Ta sistem se uspešno uporablja pri oljni ogrščici, koruzi in cikoriji. Za odpornost na škodljivce (IR), pogojeno z različnimi geni iz *Bacillus thuringiensis*, je odobreno 5 samostojnih transgenih elementov ter 7 oz. 4 genski elementi skupaj z geni za toleranco na herbicide (koruza) oz. odpornostjo na viruse (krompir). Več vključenih genov skupaj je poznano tudi

pri odpornosti na viruse, kot na primer pri bučah, kjer so združeni trije virusni geni, ki pogojujejo odpornost na tri različne viruse.

Odobritveni postopki so vezani na posamezne primere, to je na genski element in rastlinsko vrsto. Na primer, genski element z oznako T25 (Preglednica 2.4), ki pogojuje odpornost na glufosinat, je lahko vključen le v koruzo.

Preglednica 2.4: Genski element T25 z opisom DNA zaporedij

Gen in izvor	Protein	Promotor	Terminator	Oblika	Število kopij
<i>pat</i> <i>S.viridochromogenes</i>	fosfinotricin-N-acetiltransferaza (PAT)	CaMV35S	CaMV35S, signal poly(A)	modificiran gen, višja ekspresija	1
<i>bla</i> <i>E.coli</i>	beta laktamaza	bakterijski promotor		na 5' koncu gen <i>bla</i> za 25% krajši; ni ekspresije	

Preglednica 2.5: Izdana dovoljenja uporabe genskega elementa T25 v koruzi

Transgeni element	<b>T25</b>					
Namen uporabe	Pridelovanje koruze za zrnje in silažo.					
Lastnik	AgrEvo Inc.					
Uradna dovoljenja	Država	Okolje	Hrana/Krma	Hrana	Krma	Trženje
	Argentina	1998		1998	1998	
	EU	1998	1998			1998
	Japonska	1997		1997	1997	
	Kanada	1996		1997	1996	
	ZDA	1995	1995			

Gensko spremenjena koruza z elementom T25 je bila tako odobrena v različnih državah (Preglednica 2.5) v različnih letih in za različne namene uporabe glede na regulatorni postopek držav. S temi dovoljenji, ki zagotavljajo, da takšna koruza ni škodljiva za okolje ali za zdravje ljudi, se T25 nato s križanji prenese v druge sorte koruze, ki se lahko po registraciji pridelujejo v državah z izdanim dovoljenjem. Tako je na primer genski element MON810, ki pogojuje odpornost na škodljivca koruzno večšo, vnešen v enajst sort koruze v Španiji in šest sort koruze v Franciji in te GS sorte koruze so na nacionalni sortni listi od septembra 2004.

### 2.3.3 Viri

- EU (2004) Deliberate releases and placing on the EU market of Genetically Modified Organisms (GMOs). European Commission, Joint Research Centre, Bruselj. [http://gmoinfo.jrc.it/gmp\\_browse\\_geninf.asp](http://gmoinfo.jrc.it/gmp_browse_geninf.asp)
- James C, Krattiger AF (1995) Global Review of the Field Testing and Commercialization of Transgenic Plants. 1986 to 1995: The First decade of Crop Biotechnology. ISAAA Briefs No.1: ISAAA: Ithaca, New York , 31 str. <http://www.isaaa.org>
- James C (1997) Global Status of Transgenic Crops in 1997. ISAAA Briefs No.5: ISAAA: Ithaca, 30 str. <http://www.isaaa.org>
- James C (1999) Global Review of Commercialized Transgenic Crops: 1999. ISAAA Briefs No.12: Preview. ISAAA: Ithaca, New York , 8 str. <http://www.isaaa.org>
- James C (2003) Global Review of Commercialized Transgenic Crops: 2003. ISAAA Briefs No.30, Preview: <http://www.isaaa.org>
- OECD (1999) BioTrack data base of field trials (zadnja dopolnitev december 1999). Organization for Economic Cooperation and Development, Pariz. <http://www.oecd.org/ehs/summary.htm>.
- Agbios (2004), GM Database. Agriculture and Biotechnology Strategies (Kanada). <http://www.agbios.com/dbase.php>

### 2.4 Gensko spremenjene rastline s toleranco na herbicide

Herbicidi pri intenzivni kmetijski pridelavi nadomeščajo ročno ali mehansko odstranjevanje plevela in omogočajo nadzor nad pojavom različnih plevelov v posevkih kmetijskih rastlin. Pleveli so nezaželjene rastline na kmetijskih površinah, ker močno vplivajo na višino pridelka. Zaradi zapljeveljenosti je v svetovnem povprečju pridelava kmetijskih rastlin zmanjšana za okoli 20%.

Herbicidi preprečujejo rast in razvoj rastlin oziroma povzročijo njihovo uničenje zaradi delovanja na encimatske funkcije v rastlini. Na primer sulfonilurea, imidazolinoli ali triazopirimidini blokirajo delovanje acetolaktat sintaze (ALS), ciljnega encima, ki je vključen v sintezo razvejanih aminokislin. Rastline so različno občutljive na delovanje herbicidov, ki se uporabljajo v kmetijstvu. Poznane so nekatere vrste, ki imajo precejšnjo toleranco na določen herbicid. Na primer nekatere ALS-herbicide tolerirajo žita in soja, kar omogoča uporabo takšnih herbicidov v njihovih posevkih.

Znanih je nekaj mehanizmov, s katerimi se lahko rastlina obvaruje pred vplivi herbicida:

- 1) rastlina sintetizira spremenjen ciljni encim, na katerega herbicid ne učinkuje,
- 2) rastlina sintetizira encim, ki razgradi herbicid,
- 3) rastlina ima fizične ali fiziološke pregrade, ki onemogočajo sprejem herbicida v rastlinsko tkivo ali celice.

Rastline s toleranco na herbicide je mogoče tudi vzgojiti z različnimi žlahtniteljskimi pristopi, kot na primer z *mutacijo ciljnega encima* (obsevanja ali uporaba somaklonske variabilnosti) ali z *genskim spreminjanjem* (vnos mutiranega gena za ciljni encim ali vnos detoksifikacijskih genov, ki razgradijo/onesposobijo aktivno komponento herbicida. Pri uporabi sort s toleranco na herbicide so le sorte, pridobljene z genskim inženiringom, podvržene posebni presoji tveganja zaradi možnih škodljivih vplivov na zdravje ljudi in okolje po zahtevah predpisov za gensko spremenjene organizme. Izjema so Kanadski predpisi, ki vključujejo v postopke presoje tveganja za GSO tudi lastnosti, pridobljene z mutacijo. Takšni primeri so pšenica, oljna ogrščica in koruza z mutiranim encimom acetolaktat sintazo.

Gene za toleranco na herbicide pri genskem spreminjanju rastlin lahko uporabimo kot selekcijske gene, katerih namen je ločevanje transformiranih in netransformiranih rastlin v postopkih genske manipulacije (pri tkivnih kulturah ali na polju), za selekcijo, kot del moško sterilnega sistema pri proizvodnji hibridov ali za agronomsko rabo pri sortah s toleranco na herbicide (aplikacija herbicidov).

Pri gojenju GSR s toleranco na herbicid je najbolj razširjena uporaba dveh herbicidov, glufosinata (Basta, Liberty, Finale, Radical) in glifosata (Roundup), ki bodo v nadaljevanju natančneje opisani.

## **2.4.1 Gensko spremenjene rastline s toleranco na glufosinat**

### *2.4.1.1 Delovanje herbicida*

Glufosinat ali fosfinitricin (PTT) je neselektiven herbicid in deluje tako na kmetijske rastline kot na plevela. Uporablja se kot herbicid širokega spektra, pred vznikom in tudi kot desikant pri krompirju, stročnicah in oljni ogrščici pred spravilom.

PTT izvira iz dveh talnih mikroorganizmov, *Streptomyces viridochromogenes* in *S. hygroscopicus* iz skupine askomicet. Industrijsko je sintetiziran kot DL-racemska mešanica (glufosinat amonij), v kateri je herbicidno aktiven le L-PPT. Po kemični zgradbi je PPT aminokislina (D,L,-homoalanin-4-il(metil)fofonat), njegovo herbicidno delovanje pa je osnovano na inhibiciji encima glutaminska sintetaza (GS), ki v evkariotih in prokariotih sintetizira glutamin iz glutaminske kisline in amoniaka. GS je edini encim v rastlini, vključen v detoksifikacijo amoniaka, ki se sprosti pri redukciji nitrata, fotorespiraciji ali deaminaciji. Ker je L-PPT strukturni analog glutamata, ireverzibilno inhibira GS. Inhibicija GS povzroči visoko akumulacijo amonijaka v rastlini, kar povzroči prekinitev fotosinteze in razgradnjo kloroplastov, na rastlini pa je opaziti porumenenje nekaj ur po aplikaciji herbicida in odmrtnje po nekaj dneh. Več kot štirideset enokaličnic in preko stopetdeset dvokaličnic je občutljivih na L-PPT.

### 2.4.1.2 Geni in encimi za toleranco na glufosinat

Pri rastlinah ni znane absolutne odpornosti na glufosinat, ampak le določena stopnja tolerance, pogojene s količino apliciranega herbicida. Za vzgojo PPT tolerantnih rastlin je mehanizem sposojen od bakterij, ki sintetizirajo PPT in se morajo zato zaščititi pred njegovim delovanjem. Te bakterije sintetizirajo encim fosfinitricin-N-acetiltransferazo (PAT), ki z acetilacijo proste amino skupine PPT povzroči njegovo inaktivacijo.

Gena za PAT encim sta bila izolirana iz *S. viridochromogenes* - **pat gen** in *S. hygroscopicus* - **bar gen**. Oba gena kodirata PAT encim s 183 aminokisljinami s 85% podobnostjo v nukleotidnem zaporedju, razlike pa so v njihovih 5' koncih nekodogene regije. Vendar sta oba PAT encima, kodirana z *bar* ali *pat* genom, funkcionalno enaka in visoko specifična za njun substrat.

S prireditvijo PAT genov za ekspresijo v rastlini in z vnosom teh genov v rastline s standardnimi transformacijskimi tehnikami so vzgojili transgene rastline s toleranco na glufosinat. Vrsta GSR ima vključen *pat* ali *bar* gen in nekatere so že v tržni pridelavi (oljna ogrščica, koruza, bombaž, soja, sladkorna pesa, riž in cikorija). V poljskih poskusih pa so med drugim sledeče na glufosinat tolerantne rastline: ječmen, zemeljski orešek, sladkorna pesa, zelje, korenček, bombaž, oves, paradižnik, detelja, gladiole, melone, topol, krompir, riž, soja, sirek, sladkorni trs, tobak, pšenica.

### 2.4.1.3 Vplivi izražanja transgena v rastlini

Fosfinitricin-N-acetiltransferaza je nov encim za rastlino, vendar ne vpliva negativno na njeno rast in razvoj. To je bilo dokazano s številnimi primerjalnimi študijami in poskusi med rastlinami različnih rastlinskih vrst z vključenim *pat* ali *bar* genom ter rastlinami brez genske spremembe. *Pat* in *bar* gen se tudi široko uporabljata kot selekcijska gena pri drugih transformacijah rastlin. PAT z acetilacijo spremeni glufosinat (L-PPT) v neaktivno in netoksično spojino N-acetil-glufosinat. Raziskave so pokazale, da ima PAT encim izjemno visoko specifičnost za L-PPT in demetilfosfinitricin (DMPT), ne more pa acetilirati L-PPT analoga L-glutaminske kisline ali druge aminokisljine.

GSR tolerantne na herbicid so v rastni dobi izpostavljene vplivu herbicida le ob aplikaciji in v primeru glufosinata bo nov encim PAT omogočil rastlini toleranco na ta herbicid. Vsebnost PAT encima v rastlini je nizka in zadošča za dobro toleranco rastline na glufosinat pri 4-10 krat višjih odmerkih herbicida kot pri kontrolnih rastlinah.

Obsežne študije so potrdile predpostavko, da sta toksičnost PAT encima za človeka in živali ter alergenost zanemarljiva. PAT encim se namreč zelo hitro razgradi v *in vitro* gastričnih razmerah, njegovo aminokisljinsko zaporedje ne izkazuje podobnosti z zaporedji znanih alergenov ali toksinov, toksikološki testi niso potrdili toksičnosti PAT encima in prehranski testi so na primer pri

oljni ogrščici izkazali prehransko enakovrednost med transgenimi in ne-transgenimi semeni. Pri presoji prehranskega tveganja uporabe rastlin s toleranco na glufosinat se vrednotijo tudi ostanki PPT in PPT metabolitov po njegovi razgradnji s PAT encimom v transgeni rastlini, živilih ali krmi.

Iz zaključkov številnih študij in iz odločitev regulatornih agencij je razvidno, da prisotnost PAT encima v GSR ne povzroči takšne spremembe, ki bi imele škodljive vplive za prehrano ljudi ali živali. Pri vprašanju ostankov herbicida oz. njegovih metabolitov pa je potrebno pozornost presoje usmeriti v proučevano rastlinsko vrsto, ekspresijo *bar* oz. *pat* gena, agronomsko prakso (aplikacija herbicida) in namen uporabe pridelka.

## 2.4.2 Gensko spremenjene rastline s toleranco na glifosat

### 2.4.2.1 Delovanje herbicida

Glifosat je herbicid širokega spektra in je registriran v mnogih državah. Visoka občutljivost rastlin na glifosat omejuje njegovo uporabo v kmetijstvu za zatiranje plevela pred vznikom poljščine ali eventuelno kot desikant. Glifosat ni naravna komponenta in se proizvaja le industrijsko. Po kemični zgradbi je glifosat N-fosfinometil-glicin, njegovo herbicidno delovanje pa bazira na inhibiciji encima 5-enolpiruvil-3-fosfošikimat sintaze (EPSPS). Encim EPSPS je pri rastlinah in mikroorganizmih vključen v biosintezo aromatskih aminokislin, vitaminov in mnogih sekundarnih metabolitov. Encim kondenzira fosfoenolpiruvično kislino in 3-fosfošikimsko kislino v 5-enolpiruvil-3-fosfošikimat, ki je prekursor v različnih encimatskih stopnjah za aromatske aminokislino. Posledica inhibicije EPSPS je zavrta sinteza aromatskih aminokislin in posledično proteinov, kar rezultira v postopnem odmrtju rastline.

### 2.4.2.2 Geni in encimi za toleranco na glifosat

Glede na poznavanje delovanja herbicida sta se razvili dve uspešni strategiji za vzgojo rastlin z odpornostjo na glifosat, in sicer z vnosom gena za *epsps*, ki je tolerantan na glifosat, ter z vnosom gena za glifosat oksidoreduktazo (GOX), ki inaktivira herbicid. S tradicionalnimi žlahtniteljskimi metodami do sedaj še ni uspelo vzgojiti glifosat tolerantnih rastlin v glavnem zato, ker so vsi mutirani EPSPS encimi imeli poleg tolerance na glifosat tudi zmanjšano afiniteto do svojega substrata in posledično zmanjšano biosintezo aromatskih aminokislin.

V komercialnih kultivarjih so v glavnem vključeni **trije geni**, ki omogočajo toleranco na glifosat:

- Gen (***aroA(cp4)***), ki kodira na glifosat tolerantan EPSPS encim, je izoliran iz talne bakterije *Agrobacterium*. Bakterijski encim EPSPS je visoko tolerantan na glifosat in v rastlino vnešen *aroA(cp4)* gen kodira



encim, ki izpolni vlogo v biosintezi aromatskih aminokislin kljub prisotnosti herbicida, medtem ko rastlinski, endogen EPSPS, ostaja občutljiv na glifosat. Ta gen je v uporabi največ za vzgojo rastlin s toleranco na glifosat.

- Gen **gox** za encim glifosat oksidoreduktazo (GOX), ki razgradi glifosat, je bil izoliran iz *Ochrobactrum anthropi*. GOX encim deaktivira herbicidni učinek glifosata s konverzijo glifosata v aminometilfosfonsko kislino (AMPA) in glioksilat.
- Gen **epsps**, ki kodira na glifosat toleranten EPSPS encim, je bil izoliran iz koruze in spremenjen z *in vitro* mutagenezo.

Ciljni EPSPS encim za glifosat se sintetizira v citoplazmi in se nato transportira v kloroplaste s pomočjo kloroplastnega prehodnega peptida CTP. Za učinkovito toleranco na glifosat se zato vključi sekvenca za CTP v genski konstrukt, ki poleg prirejenega herbicidnega gena (optimizacija kodonov za prevajanje v rastlini) vključuje tudi ustrezne regulatorne sekvence (promotor, terminator, ojačevalce in introne) za uravnavanje izražanja transgena. Opisani na glifosat tolerantni geni so bili vnešeni posamično ali skupaj z drugimi transgeni v veliko število rastlinskih vrst za namene uporabe herbicida ali kot selekcijski geni. V tržni proizvodnji s temi geni je najbolj znana soja (gen *aroAcp4*, Roundup Ready soja), v poljskih poskusih pa so številne rastline: repa, koruza, bombaž, solata, topol, krompir, ogrščica, soja, tobak, paradižnik, pšenica.

#### 2.4.2.3 Vpliv izražanja transgena v rastlini

Pri rastlinah, tolerantnih na glifosat, se s transgenom *aroAcp4* sintetizira dodaten EPSPS encim, ki se od rastlinskega EPSPS encima razlikuje le po neobčutljivosti na glifosat. Pozornost pa je potrebno usmeriti v nivo ekspresije transgena, ker bi lahko v primeru zelo visoke ekspresije nastale eventuelne spremembe v metabolitih, ki nastanejo z delovanjem EPSPS ter na vsebnost glifosata v rastlini.

V primeru vnosa *gox* gena je situacija drugačna, ker ta gen kodira encim GOX, ki spremeni glifosat v aminometilfosfonsko kislino (AMPA) in glioksilat. Glioksilat je naravni rastlinski metabolit, vključen v ogljikov cikel, AMPA pa se lahko pretvori v glicin.

Obširni poskusi so pokazali, da izražanje GOX in glifosat tolerantnega EPSPS v rastlini ne učinkuje zavirajoče na njeno rast in razvoj, tako da ima GSR s toleranco na glifosat zelo podobne lastnosti kot primerjalne ne-transgene rastline, razen seveda v toleranci na herbicid.

Študije ugotavljanja toksičnosti in alergnosti encimov EPSPS in GOX za sesalce so pokazale zanemarljiva prehranska tveganja. Noben od encimov nima aminokislinske sekvenčne podobnosti z znanimi alergeni ali toksini, oba se hitro inaktivirata s toploto ali v blago kislih pogojih ter se hitro razgradita v *in vitro* gastričnih razmerah in nista glikolizirana. Akutni oralni toksikološki testi

niso pokazali toksičnosti na poskusnih živalih, hranjenih z bakterijsko EPSPS ali GOX.

Iz zaključkov različnih poskusov in odločitev regulatornih agencij je razvidno, da prisotnost spremenjenega EPSPS encima in novega GOX encima v GSR ne vpliva na rast in razvoj rastline in ne spremeni rastline tako, da bi bila neprimerna za prehrano ljudi ali živali.

### **2.4.3 Okoljska tveganja gensko spremenjenih rastlin, tolerantnih na herbicide**

Pri sproščanju gensko spremenjenih rastlin, tolerantnih na herbicide se postavlja več vprašanj, povezanih z varno uporabo takšnih rastlin za okolje. Vprašanja lahko razdelimo v dve skupini:

1. tveganja za okolje, povezana s pridelovanjem GSR s toleranco na herbicid,
2. tveganja za okolje, povezana z uporabo herbicida pri pridelovanju GSR s toleranco na herbicid.

V regulatornih postopkih sta to dve ločeni področji. Prvo sodi med člene genskega zakona o obravnavi za izdajo soglasja za izvedbo eksperimentalnih poskusov ali za pridobitev dovoljenja za trženje obravnavane GSR s toleranco na herbicid (po EU zakonodaji, Smernica 2001/18/EC). Drugo področje pa obravnavajo predpisi o rabi sredstev za varstvo rastlin (po EU zakonodaji, Smernica 414/91).

Med najpomembnejšimi tveganji za okolje, povezanimi s pridelovanjem GSR s toleranco na herbicide, obravnavamo predvsem potencialno zmožnost povečanja kompetitivnosti GSR zaradi nove lastnosti, eventualne vplive gojenja GSR s toleranco na herbicide na uveljavljene metode zatiranja plevelov ter možne posledice, nastale zaradi pretoka oziroma introgresije transgenov v spolno kompatibilne kulturne rastline, plevelne vrste ali divje rastlinske vrste.

Nova lastnost v rastlini - toleranca na herbicid - lahko prispeva h *kompetitivnim prednostim* GSR in takšna GSR bi lahko preživela daljši čas v okolju kot enaka ne-transgena rastlina. S takšno prednostjo bi lahko GSR potencialno povečala zapleveljenost kmetijskega prostora zaradi samosevcev ali pa bi se pojavile nove prosto rastoče populacije v semi-naravnih habitatih. Povečanje plevelnosti GS rastlin odpornih na glifosat ali glufosinat zavisi od interakcije med lastnostmi rastline in s specifičnimi razmerami, v katerih rastlina raste. Za presojo tveganja je relevantno predvsem povečanje zmožnosti rastline za prilagoditev. Edina selekcijska prednost za GSR s toleranco na herbicid je uporaba herbicida na pridelovalnem območju. Brez aplikacije herbicida se ta prednost izgubi kot tudi eventualna zmožnost povečanja plevelnosti. To so pokazali med drugim tudi poskusi kompetitivnosti transgene oljne ogrščice tolerantne na glufosinat v ne-selektivnih pogojih, v primerjavi z ne-transgeno linijo v različnih habitatih in klimatskih pogojih.

Toleranca na herbicid GSR lahko onemogoči *uporabo uveljavljenih metod za zatiranje plevela v posevkih* na njivah, ki sledijo pridelavi na herbicid

tolerantne GSR. To se lahko dogodi v primeru uporabe enake aktivne komponente herbicida v pripravku za zatiranje plevela kot je aktivna komponenta herbicida, na katero je tolerantna GSR. Takšni primeri so možni pri ALS-herbicidih, kjer vrsta različnih herbicidnih pripravkov učinkuje na isti ciljni encim (acetolaktat sintazo), ki pa je lahko v GSR spremenjen tako, da tolerira učinkovanje herbicida.

*Razširjanje transgena* iz GSR s toleranco na herbicid v spolno kompatibilne plevelne vrste lahko rezultira v križancih, ki jih je težko nadzorovati v kmetijskih okoljih ter semi-naravnih habitatih. V naravnih pogojih kmetijske rastline ter divje in plevelne vrste izmenjujejo gene in med njimi lahko nastanejo križanci, seveda ob vrsti ugodnih pogojev. Križanje plevelne divje vrste z GSR, ki ima vključene gene za toleranco na določen herbicid, lahko rezultira v plevelu, odpornem na ta herbicid. Problem se lahko pojavi zaradi zatiranja plevela, če se ta plevel-križanec razširi na polje, kjer se prideluje GSR, iz katere se je prenesel herbicidni transgen. Izven pridelovalnega območja pa bo takšen plevel brez nadzora le, če se bo ob zatiranju uporabljal herbicid, za katerega je plevel s križanjem pridobil odpornost. Vsekakor je potrebno poznati te možnosti in zato se vrednotijo možna tveganja gojenja GSR s toleranco na herbicide predvsem za različna območja pridelovanja.

*Prenos genov* lahko poteka tudi med spolno kompatibilnimi transgenimi rastlinami tolerantnimi na različne herbicide. Nastali bi lahko križanci, v katerih bi bili združeni različni herbicidni transgeni, kar bi vodilo do tolerance na več različnih herbicidnih pripravkov (multipla toleranca). V takšnih primerih bi bil nadzor zahtevnejši kot v primeru tolerance na en herbicid, na primer pri oljni ogrščici, kjer je pojav samosevcev pogost. Križanci z multiplo toleranco bi lahko tvorili tudi bazen (trans)genov za morebitni prenos v divje sorodnike.

Navedeni so nekateri primeri potencialnih tveganj pridelovanja gensko spremenjenih rastlin s toleranco na herbicide. Vsekakor je za relevantno presojo tveganja bistveno dobro poznavanje botanike transgene rastlinske vrste in ekološke razmere, v katerih bo teklo pridelovanje GS poljščine. Izmenjava genov med različnimi poljščinami in samosevci, podivjanimi populacijami ter divjimi sorodniki (oljna ogrščica, sladkorna pesa) je naraven proces ne glede na uporabo transgenih rastlin. V primeru GSR tolerantnih na herbicid je potrebno upoštevati možnost pretoka genov in vzpostaviti ustrezne kmetijske prakse (monitoring pretoka genov, izolacijske razdalje) za nadzorovanje nezaželenih pojavov.

#### **2.4.4 Viri:**

Carpenter JE, Gianessi L (2000) Herbicide use on Roundup Ready crops. *Science* 287(54): 803.

EU(1998) Policy and Consumers Health Protection. Scientific Committee on Plants:

opinion of the SCP regarding genetically modified, glufosinat-tolerant rape notified by the AgrEvo Company (Notification C/UK/95/M5/1). European Commission, DG XIV, Bruselj.

[http://europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scp/outcome\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scp/outcome_en.html) (EU)

OECD (1999) Consensus Document on General Information Concerning the Genes and Their Enzymes that Confer Tolerance to Phosphinothricin Herbicide. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 11. Organization for Economic Cooperation and Development, Pariz. [http://www.olis.oecd.org/olis/1999doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(99\)13](http://www.olis.oecd.org/olis/1999doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(99)13)

OECD (1999) Consensus Document on General Information Concerning the Genes and Their Enzymes that Confer Tolerance to Glyphosate Herbicide. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 10. Organization for Economic Cooperation and Development, Pariz. [http://www.olis.oecd.org/olis/1999doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(99\)9](http://www.olis.oecd.org/olis/1999doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(99)9)

OECD (2002) Module II: Herbicide Biochemistry, Herbicide Metabolism and the Residues in Glufosinate-Ammonium (Phosphinothricin)-Tolerant Transgenic Plants. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 25. Organization for Economic Cooperation and Development, Pariz. [http://www.olis.oecd.org/olis/2002doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2002\)14](http://www.olis.oecd.org/olis/2002doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2002)14)

Watkinson AR, Freckleton RP, Robinson RA, Sutherland WJ (2000) Predictions of biodiversity response to genetically modified herbicide-tolerant crops. *Science* 289: 1554-1557.

## 2.5 Gensko spremenjene rastline z odpornostjo na škodljivce

Škodljivci povzročajo velike izgube v pridelkih kmetijskih rastlin. Varstvo (integrirano) rastlin pred škodljivci predstavlja občuten strošek v pridelavi posameznih poljščin. Vzgoja sort kulturnih rastlin z odpornostjo na različne škodljivce je eden pomembnejših ciljev različnih žlahtniteljskih programov. V klasičnem žlahtnjenju se izkoriščajo naravni mehanizmi odpornosti rastlin na škodljive žuželke, ki jih v grobem delimo v tri sklope: morfološke prepreke za insekte (npr. dlakavost listov), prisotnost repelantov (odvrčanje insektov) in vsebnost strupenih snovi (odvrčanje ali toksičnost za insekte). Z biotehnološkimi metodami žlahtnjenja pa se odpirajo drugačne možnosti vključevanja genov za odpornost na škodljivce v rastline in proučujejo se različni, novi mehanizmi odpornosti. Rastlinski geni za lektine (rastlinski peptidni hormoni) ali za proteazne inhibitorje (za kimotripsin in tripsin) so bili transformirani v nekatere vrste za namen vzgoje rastlin z odpornostjo na določene škodljivce, vendar se tovrstni rezistentni geni niso uveljavili širše, večinoma zaradi preširokega spektra njihovega delovanja na različne žuželke. V iskanju učinkovitih mehanizmov za obrambo pred škodljivci se proučujejo tudi različni naravni strupi za žuželke ali sintetični proteini, dobljeni s proteinskim inženiringom. Vendar se je do sedaj najbolj široko in uspešno uveljavila le strategija za odpornost rastlin na škodljivce z vnosom genov izoliranih iz različnih podvrst bakterije *Bacillus thuringiensis* (Bt-geni).

## 2.5.1 Gensko spremenjene rastline z Bt-geni

### 2.5.1.1 *Bacillus thuringiensis* - vir insekticidnih proteinov (genov)

Vir insekticidnih genov oz. proteinov, na katerem temelji glavna strategija genskega spreminjanja rastlin odpornih proti škodljivcem, je bakterija *Bacillus thuringiensis*. Posebnost te bakterije je, da v obdobju sporulacije tvori insekticidni kristalni protein. Kristalni protein je sestavljen iz ene ali več proteinskih podenot, ki jih imenujemo protoksini, delta-toksini, Cry proteini ali Bt-proteini. Kristalni protein na osnovi *B. thuringiensis* je bil prvič registriran kot bioinsekticid leta 1961 v ZDA, danes pa je osnova 90% vseh bioinsekticidov. Bt-bioinsekticidi se po 40-letni prisotnosti na tržišču uporabljajo za zaščito rastlin proti več kot 300 vrstam škodljivcev. Ena od glavnih prednosti *B. thuringiensis* oz. kristalnega proteina za uporabo kot bioinsekticida je njegova neškodljivost za ljudi, sesalce in večino ne-ciljnih organizmov.

Bt-proteini ne delujejo insekticidno proti vsem žuželkam, temveč proti škodljivcem redov Lepidoptera (npr. koruzna večča), Coleoptera (npr. koloradski hrošč), Diptera (Preglednica 2.6). Bt-proteini oziroma njihovi *cry* geni so poenostavljeno razvrščeni glede na ciljne žuželke v 5 skupin in vsaka od teh skupin se nadalje deli v podskupine.

Preglednica 2.6: Poenostavljena klasifikacija genov Bt-proteinov

<b><i>cry</i> geni za Bt - protein</b>	<b>insekticidno delovanje</b>
<i>Cry</i> IA(a),(b),(c), B, C, D, E, F,G	Lepidoptera
<i>Cry</i> IIA, B, C	Lepidoptera in Diptera
<i>Cry</i> IIIA, B, B(b)	Coleoptera
<i>Cry</i> IVA, B, C, D	Diptera
<i>Cry</i> V- <i>Cry</i> X	Nematode in drugi škodljivci

Danes se uveljavlja nova klasifikacija, ki temelji na kemični sestavi oziroma aminokislinskem zaporedju Bt-proteinov. *B. thuringiensis* ponuja paleto različnih insekticidov, saj je znanih že več kot 50 različnih Bt-proteinov in natančno je bilo analiziranih že več kot 30 insekticidnih *cry* genov, izoliranih iz 14 različnih podvrst *Bacillus thuringiensis*. Posebno zanimive so raziskave identifikacije genov, ki kodirajo toksine za isto vrsto insektov, vendar je mehanizem njihovega delovanja različen.

V tržni pridelavi so razširjeni gensko spremenjena koruza in gensko spremenjena bombaž ter krompir, ki vključujejo native ali modificirane gene

*cry1Ab* (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*), *cry1Ac* (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*), *cry3A* (*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*), *cry9c* (*B. thuringiensis* subsp. *tolworthi*).

#### 2.5.1.2 Mehanizem insekticidnega delovanja Bt-proteinov

Pri hranjenju ličink s sporami *B. thuringiensis* insekticidni kristalni protein razpade na protoksine pod vplivom visokega pH prebavnih sokov in črevesnih proteaz. Proteaze nato specifično cepijo protoksine na več proteinskih podenot, od katerih manjši polipeptidi nosijo toksično aktivnost Bt-proteina in določajo njegovo specifičnost za insekte posameznih vrst.

Toksini se vežejo na visoko afinitetne receptorje v zunanjem delu epitelne membrane črevesa insekta in nato prodirajo v apikalno membrano epitelnih celic črevesja in s tem inducirajo nastanek ionskih kanalov ali pa nespecifičnih por v membrani. Posledica nastanka por je poškodba membrane in dokončen propad celotnega črevesa. Insekt se preneha hraniti in odmre. Bt-protein je toksičen za insekte le, če nastane interakcija med protoksinom in receptorjem v membrani epitelnih celic črevesa. Insekti, občutljivi na različne kristalne proteine, imajo receptorje specifične za posamezne Bt-toksine.

#### 2.5.1.3 Vplivi izražanja transgena v rastlini

Bt-proteini, kodirani z vnešenimi *cry* geni, se sintetizirajo v transgeni rastlini in imajo insekticidne lastnosti, torej so toksični za nekatere (ciljne) organizme. Zaradi šibkega izražanja nativnih *cry* bakterijskih genov v rastlini se tem genom spremeni nukleotidno zaporedje v prepoznavnejše zaporedje za rastlinski mehanizem, seveda ob nespremenjenem nizu aminokislin Cry proteina. Z izboljšanim izražanjem *cry* genov v rastlini se sintetizira zadostna količina Bt-insekticida, ki omogoči učinkovito zaščito rastline pred škodljivcem.

Bt-proteini so novi za rastlino in zato je potrebno s primerjalnimi fenotipskimi analizami ugotoviti morebitne škodljive vplive na rast in razvoj transgene rastline. Obsežni tovrstni testi z različnimi rastlinskimi vrstami in vključenimi *cry* geni so potrdili, da prisotnost Bt-proteina, običajno v nizkih koncentracijah, ki že zadostujejo za insekticidno delovanje, nima negativnih vplivov na rast in razvoj rastline. Glede na obsežne raziskave uporabe tako Bt-bioinsekticidov kot gensko spremenjenih rastlin z vključenimi Bt-geni regulatorne agencije zaključujejo, da Bt-proteini ne predstavljajo tveganja v prehrani ljudi ali živali. Toksikološke študije do sedaj niso potrdile nobenih strupenih učinkov Bt-proteinov. Podobno, primerjalne študije aminokislinskih zaporedij med Bt-proteini ter znanimi toksini in alergeni ne kažejo podobnosti in dosedanja široka uporaba Bt-bioinsekticidov v zadnjih 30 letih ni pokazala nobenih alergeni odzivov. S stališča varovanja okolja pa je prvenstveno potrebno ovrednotiti vpliv Bt-proteinov na druge (ne-ciljne) organizme, ki bi

lahko bili v stiku z gensko spremenjeno rastlino z vključenimi *cry* geni, ter oceniti posledice možnega razvoja odpornosti ciljnih organizmov (škodljivcev) za okolje in temu prilagoditi načine pridelovanja.

## 2.5.2 Okoljska tveganja gensko spremenjenih rastlin z vključenimi Bt-geni

### 2.5.2.1 Razvoj odpornosti na Bt-toksin pri občutljivih populacijah škodljivcev

S časom je pričakovati razvoj odpornosti na *cry* gen v občutljivih škodljivcih, saj je monogena lastnost in glede na mehanizem delovanja Bt-proteina na škodljivce je verjetno potrebno manjše število mutacij v genih škodljivca, ki kodirajo specifične receptorske proteine. Tudi poskusi v laboratoriju so pokazali razvoj rezistence na Bt-protein pri nekaterih občutljivih insektih. Populacijsko genetske študije napovedujejo razvoj odpornosti v manj kot petih generacijah prisotnosti škodljivca na Bt-rastlinah v pridelovalnih razmerah. Na polju je razvoj rezistence ugotovljen pri populacijah *Plutella xylostella* kot posledica pogostega tretiranja z Bt-bioinsekticidi, ki je potekalo v daljšem časovnem obdobju na geografsko izoliranem območju. Tveganje razvoja odpornosti v občutljivi populaciji škodljivcev raste z naraščanjem selekcijskega pritiska in v primeru GSR je to z velikostjo površine, z gostoto setve in s koncentracijo Bt-proteina v GSR. Geni (*r*) za odpornost na insekticide so redki in odpornost je večinoma recesivna lastnost, vendar se lahko ob visokem selekcijskem pritisku fiksirajo recesivni geni v populacijah škodljivcev.

Izdelane so različne strategije za ravnanje s tveganjem razvoja odpornosti s skupnim ciljem zmanjšanja verjetnosti fiksacije recesivnih genov za odpornost na Bt-protein v populaciji občutljivih škodljivcev. Med ta ravnanja vključujemo: strategijo visoke koncentracije toksina v rastlini, uporabo pribežališč (ne-transgene rastline), uporabo specifičnih promotorjev in "piramido toksinov".

Optimalni rezultati preprečevanja razvoja rezistence so bili doseženi s sočasnim upoštevanjem prvih dveh strategij (visoka koncentracija in pribežališče). Pri tem načinu je del populacije škodljivcev izpostavljen rastlinam z visoko koncentracijo Bt-proteina, del populacije pa rastlinam, ki niso odporne na škodljivce (pibežališče). Na polju z Bt-rastlinami se bodo s časom pojavili redki homozigotni (*rr*) rezistentni osebki, ki se bodo parili z neodpornimi (*RR*) osebki iz pribežališča, vendar bodo heterozigotni (*rR*) potomci odmrli na Bt-rastlinah. Občutljivost heterozigotov na insekticid je le nekoliko manjša od občutljivosti neodpornih homozigotov in zaradi tega lahko kontroliramo obe skupini organizmov ob dovolj visoki in konstantni koncentraciji toksina v rastni dobi GSR. Cilj strategije je, da vsi heterozigotni osebki v populaciji odmrejo, saj bi bila s križanjem dveh heterozigotov (*rR*) četrtnina potomcev homozigotnih (*rr*) za odpornost na Bt-protein. Pribežališče,

oziroma njive z rastlinami, neodpornimi na škodljivca, služi vzdrževanju in razmnoževanju neodpornih škodljivcev, ki so potrebni za obvladovanje homozigotnih odpornih osebkov. Ustvarjanje pribežališča je možno s setvijo mešanega semena (navadne in GS rastline) ali z ločenimi površinami navadne in GS rastline, pri čemer morajo biti škodljivci dovolj mobilni za gibanje med obema območjema.

Uporaba konstitutivnih promotorjev, ki omogočajo ekspresijo insekticidnega Bt-gena v vseh tkivih transformirane rastline, lahko povzroči močan selekcijski pritisk na populacijo občutljivih škodljivcev. S specifičnimi promotorji bi bili ciljni insekti lahko izpostavljeni delovanju insekticida le v določenih tkivih (tkivno-specifični promotorji), v občutljivih fazah razvoja rastline (časovno-specifični promotorji) ali pri prehranjevanju z rastlino (promotorji, ki jih inducira poškodba tkiva). Z uporabo specifičnih promotorjev bi tako lahko bila koncentracija in prisotnost insekticida v rastlini bolj racionalno porazdeljena. Strategija multiple rezistence oz. piramide toksinov pa temelji na občutljivosti ene vrste škodljivca na več insekticidov. V tem primeru se v rastlino vključi več različnih genov z enakim ciljnim delovanjem.

Naštete strategije ravnanja s tveganjem temeljijo na dosedanjih izkušnjah in znanjih, ki so pridobljena pri ravnanju s tveganjem razvoja odpornosti na konvencionalne insekticide, poljskih poskusih z GSR, računalniških simulacijah in komercialnem pridelovanju GSR. Pravilno ravnanje s tveganjem razvoja odpornosti pri občutljivih oz. ciljnih populacijah je za pridelovanje GSR z odpornostjo na škodljivce zelo pomembno. Za učinkovito pridelovanje Bt-rastlin je potrebno dosledno upoštevati priporočene tehnologije pridelovanja in voditi ustrezen monitoring škodljivcev. Med GSR z odpornostjo na škodljivce sta najbolj razširjeni Bt-koruza in Bt-bombaž, ki se pridelujeta že od leta 1996 in katerih površine se konstantno povečujejo, saj so leta 2003 narasle na 12,2 mio hektarjev. Z doslednim izvajanjem priporočenih tehnologij pridelovanja in ravnanja s tveganjem do sedaj še ni bilo obsežnejšega razvoja odpornosti pri ciljnih škodljivcih obeh rastlin.

#### *2.5.2.2 Tveganja pridelovanja GSR z odpornostjo na škodljivce za druge (ne-ciljne) organizme*

Bt-toksini učinkujejo na številne vrste iz reda *Lepidoptera*, vendar so različni laboratorijski testi pokazali velike razlike v občutljivosti posameznih vrst, tako da je priporočeno obravnavati vpliv različnih Bt-toksinov na native insekte po posameznem primeru.

V poljskih poskusih z Bt-rastlinami se proučuje eventuelni vpliv Bt-toksina na različne vrste členonožcev, prisotnih v različnih okoljih. Med vegetacijo in po spravilu pridelka so v stiku z Bt-rastlinami, ostanki rastlin ali še z ne razgrajenim Bt-toksinom v zemlji različnih vrst (ne-ciljnih) organizmov, na katere bi lahko imel Bt-toksin škodljiv vpliv. Za proučevanje



takšnih vplivov se izvajajo laboratorijski prehranski testi za ugotavljanje toksičnih učinkov Bt-toksina na posamezne vrste organizmov. Testi vključujejo hranjenje predstavnikov možnih ne-ciljnih organizmov, ki se pojavljajo v določenih okoljih in so lahko v posrednem ali neposrednem stiku z Bt-insekticidom. Med ne-ciljne organizme uvrščamo koristne žuželke, ki so lahko v stiku z Bt-pelodom (čebele, polonice, metulji, najezdniki, plenilske hrčice), ptice, ki se pogosto prehranjujejo s semeni, odmrliimi žuželkami ali deli rastlin, podobno tudi majhni sesalci. Talni organizmi (deževniki) so izpostavljeni delovanju transgene rastline s kontaktom in zaužitjem dela rastline, vodni organizmi (vodne bolhe) pa so lahko v stiku z Bt-pelodom, ki ga veter zanese na vodno gladino.

Pri presoji tovrstnih tveganj je smiselno upoštevati vrsto dejavnikov, kot so nivo ekspresije Bt-toksina v rastlini ali pelodu, količina rastlinskega tkiva, čas in obseg sprostitve peloda ter njegovega širjenja izven pridelovalnega območja, naravne gostitelje posameznih insektov in podobno. Vsekakor pa so potrebna sprotna raziskovanja vpliva Bt-toksinov sintetiziranih v GSR na ne-ciljne organizme, ki bodo lahko podala odgovore na morebitna, še nepoznana tveganja in bodo lahko služila za vzpostavljane ustreznih tehnologij ravnanja s tveganjem.

### 2.5.3 Viri:

- EPA (2001) Biopesticides Registration Action Document - *Bacillus thuringiensis* Plant-Incorporated Protectants. Environmental Protection Agency, Washington. [http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/pips/bt\\_brad.htm](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/pips/bt_brad.htm)
- Estruch JJ, Carozzi NB, Desai N, Duck NB, Waren WG, Koziel MG (1997) Transgenic plants: An emerging approach to pest control. *Nature Biotechnology*. 15: 137-141.
- Krattiger AF (1997) Insect resistance in crops: a case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries. ISAAA Briefs No.2. ISAAA: Ithaca, New York, str 42. <http://www.isaaa.org>
- Mazier M, Pannetier C, Tourneur J, Jouanin L, Giband M (1997) The expression of *Bacillus thuringiensis* toxin genes in plant cells. *Biotechnology Annual Review*, 3:313 - 347.
- Shelton AM, Tang JD, Roush RT, Metz TD, Earle ED (1999) Field tests on the managing resistance to Bt-engineered plants. *Nature Biotechnology* 18:339-342

## 2.6 Gensko spremenjene rastline z odpornostjo na viruse

Virusi povzročajo veliko škodo na pridelkih kmetijskih rastlin, ker zmanjšujejo količino in kvaliteto pridelka, slabšajo kalitev semen, ovirajo rast kalic in mladih rastlin ter povečajo stroške za omejevanje viroz. Pri večini rastlin se po virusni okužbi pojavijo različni bolezenski simptomi, ki so odvisni od lastnosti virusa, specifičnega različka virusa, okužbe z drugimi virusi, kultivarja gostiteljske rastline in od vplivov okolja. Te spremembe se kažejo predvsem v

spremembi barve rastlinskih tkiv, spremembi oblike rasti in spremenjeni vitalnosti rastlin, lahko pa uničijo celoten pridelek. Rastlinski virusi se lahko razširjajo na različne načine, odvisno od tipa virusa. Glavne oblike širjenja virusov so: s pomočjo vektorjev (žuželke, glive, ogorčice), s semeni in cvetnim prahom ter mehansko, z rastlinskim sokom ali z vegetativno razmnoženim okuženim rastlinskim materialom.

Rastlinski virusi so preprosti patogeni, zgrajeni iz virusnega proteinskega plašča in genoma, ki je DNA ali RNA molekula(e). Virusni genom ima zapise vsaj za lastni replikacijski encim, protein, potreben za razširjanje virusa znotraj rastline ter protein(e) proteinskega plašča. Po vstopu virusa v rastlinsko celico se ločita proteinski plašč in genom, ki se podvaja ter omogoči sintezo novih proteinov virusnega plašča. Nato se sestavijo nove enote genoma in proteinskega plašča v infekcijske agense, ki se lahko širijo po rastlini ali pa se z vektorji prenesejo na druge gostiteljske rastline.

V kmetijski praksi so virusi nadzorovani z vrsto bolj ali manj učinkovitih ukrepov, kot na primer izločanje okuženega rastlinskega materiala, uničevanje okuženih rastlin, certifikacija brezvirusnega rastlinskega materiala, uporaba različnih ukrepov za zmanjšanje razširjanja virusov, klasična križna zaščita in klasično žlahtnjenje na viruse odpornih kultivarjev. Žlahtnjenje odpornih kultivarjev je uspešno pri rastlinah, kjer so na razpolago naravni viri (geni) odpornosti, čeprav mehanizmi delovanja takšne odpornosti še niso popolnoma razjasnjeni. Prvi rastlinski gen za odpornost na rastlinski virus je bil namreč kloniran in sekvenciran šele leta 1994.

Biotehnološke metode žlahtnjenja oziroma genski inženiring ponuja nove pristope v žlahtnjenju kultivarjev odpornih na viruse z vnosom različnih virusnih sekvenc v genom rastline. Že leta 1986 je bila prikazana učinkovitost vzgoje rezistentnih rastlin s transformacijo gena za proteinski plašč tobakovega mozaika v tobak. Vnos genov za proteinski plašč v rastline se je pokazal v nekaterih primerih kot učinkovita zaščita rastlin pred virusi, proučujejo in transformirajo pa se tudi druge virusne sekvence, ki prav tako omogočajo dobro rezistenco transgene rastline na virus(e).

Danes so v komercialni pridelavi transgene buče, papaja in krompir, pri katerih je bila odpornost na določene viruse dosežena z vključitvijo enega ali več genov za proteinske plašče virusov.

## **2.6.1 Gensko spremenjene rastline z odpornostjo na viruse**

### *2.6.1.1 Mehanizmi delovanja virusnih sekvenc v rastlini*

Z vnosom patogenih – virusnih – sekvenc v rastlinski genom se pričakuje, da bodo izražene transformirane virusne sekvence ovirale infekcijski cikel virusa in s tem bo dosežena določena stopnja odpornosti rastline na viruse. Ta pristop se je razvil iz poznavanja “križne zaščite” pri virusih, pri katerih z okužbo rastline z manj virulentnim virusom induciramo odpornost na sorodni, vendar

bolj virulentni virus. Interakcije med transgenimi virusnimi sekvencami in infekcijskim ciklom virusa so lahko na nivoju sintetiziranih virusnih proteinov ali na nivoju virusnih RNA molekul.

Obseg in vrsta zaščite z genom za virusni proteinski plašč sta precej variabilna, odvisna od vrste virusa in posamezne transgene rastline. V laboratorijskih razmerah ali v poljskih poskusih je bila ta strategija preizkušena že proti več kot 50 različnim virusom. S proučevanjem mehanizmov delovanja odpornosti je bilo v nekaterih primerih ugotovljeno, da se z ekspresijo transgena za virusni proteinski plašč lahko prepreči sprostitvev virusne RNA iz virusnega plašča po vstopu v celico ali pa se ovirata procesa translacije oziroma replikacije virusnega genoma.

Z obrazložitvijo fenomena post-transkripcijskega utišanja genov je postalo jasno, da je najpomembnejši mehanizem odpornosti proti virusom povezan z inhibicijo ali razgradnjo virusnih RNA molekul, ki večinoma sestavljajo genome rastlinskih virusov. V večini organizmov je prisoten naravni obrambni mehanizem proti tujim parazitskim sekvencam kot so virusni genomi ali mobilni elementi in ta mehanizem se ob določenih pogojih sproži in razgradi nezaželjene RNA sekvence. Z vnosom virusnih sekvenc v genom rastline se s transkripcijo sintetizira transgena RNA, ki zaradi visoke vsebnosti ali pa zaradi specifičnih sekvenc sproži mehanizem razgradnje RNA molekul in s tem postanejo tarča razgradnje tudi genomske RNA sekvence virusa, ki napada rastlino. V primeru infekcije virusa, katerega gen je bil transformiran, lahko aktiviran celični sistem eliminira virusne RNA sekvence do takšne mere, da jih v celici ne moremo več zaznati, kar vodi do visoke stopnje odpornosti. Vendar virusi lahko kljub tako učinkovitemu obrambnemu mehanizmu inficirajo rastline in povzročajo različna bolezenska stanja ali odmrtnje rastline. Kot kažejo raziskave so virusi razvili strategije za premagovanje gostiteljskega mehanizma utišanja genov, na primer s sintezo nekaterih proteinov, ki lahko na različnih stopnjah zavirajo gostiteljski mehanizem razgradnje specifičnih RNA sekvenc.

### *2.6.1.2 Vpliv izražanja transgena v rastlini*

Izražanje virusnih genov v rastlini ne povzroča nastanka virusne bolezni pač pa omogoča odpornost na virusno infekcijo. Po uspešni transformaciji genov se gensko spremenjene rastline testirajo v rastlinjakih in v poljskih poskusih glede stabilnosti in učinkovitosti odpornosti na virus. Možni škodljivi vplivi vnešenih virusnih sekvenc in njihovih produktov (proteinov) na rast in razvoj rastline bi se lahko pojavili zaradi pleiotropnih učinkov, ki bi se pokazali, na primer v spremenjenem fenotipu rastline ali pa v drugih razlikah, ki bi odstopale od enakovrednosti v primerjavi z ne-transgeno rastlino.

Dokazov, da bi virusni transgeni oziroma njihovi produkti, predvsem virusni proteinski plašč, škodljivo vplivali na zdravje ljudi in živali, ni, saj so virusno okužene rastline v običajni prehrani in krmi že tisočletja. Primerjave

aminokislinskih zaporedij predvsem med virusnim proteinskim plaščem in znanimi toksini ali alergeni za ugotavljanje potencialne toksičnosti oziroma alergnosti so tudi pokazale, da ni podobnosti med njihovimi zaporedji, kar je dodaten dokaz o prehranski enakovrednosti gensko spremenjene rastline z odpornostjo na viruse z ne-transgenimi rastlinami.

### **2.6.2 Okoljska tveganja gensko spremenjenih rastlin z odpornostjo na viruse**

Gensko spremenjene rastline z odpornostjo na viruse so pomembne za kmetijsko prakso, ker v nekaterih primerih omogočajo gojenje rastlin, ki brez genske spremembe ne bi bilo mogoče, ker uveljavljeni preventivni ukrepi proti virusom niso učinkoviti, na razpolago pa tudi ni naravnih virov odpornosti. Takšen primer je znan pri papaji, ki je z vzgojo transgenih virusno odpornih rastlin omogočil nadaljevanje pridelovanja papaje na Havajih. Na splošno imajo transgene rastline precejšnje agronomske prednosti v smislu zmanjševanja stroškov pridelave, povezanih z zatiranjem virusov, kot tudi pozitivne ekološke vplive zaradi zmanjševanja uporabe insekticidov pri nadzoru insektov, ki so pomembni prenašalci virusov. Vendar pa je potrebno upoštevati nekatera okoljska tveganja, ki se lahko pojavijo pri obsežnejšem pridelovanju transgenih rastlin z odpornostjo na viruse zaradi eventualnih interakcij med vnešenimi virusnimi geni in virusi, ki okužijo transgeno rastlino. Takšne virusne interakcije so znane v naravi in se lahko pojavijo pri infekcijah rastline z več različnimi virusi. Pri GSR, ki izražajo proteine virusnega plašča, so možne interakcije, ki jih imenujemo transkapsidacija, sinergija in rekombinacija, pri GSR, ki imajo vnešene druge virusne sekvence, pa se lahko pojavi rekombinacija in sinergistični učinek. Od vseh treh pojavov predstavlja rekombinacija največji problem, ker je dedna in trajna sprememba in teoretično lahko povzroči nastanek novega virusnega genotipa in posledično nove virusne bolezni.

Transkapsidacija (enkapsidacija) bi se lahko zgodila, kadar transgeno rastlino, ki izraža proteinski plašč virusa A, okuži še virus B in se po njegovi replikaciji genom virusa B obda s proteinskim plaščem virusa A. Virusni proteinski plašč pogojuje karakteristike virusnega širjenja z vektorji ter razširjanje virusa po rastlini. Tako lahko transkapsidacija povzroči enkratno spremembo v načinu prenosa virusov z vektorji in eventualni razvoj bolezni na drugih rastlinah ter enkratno spremembo v načinu sistemičnega širjenja virusov. Heterologna enkapsidacija se lahko pojavi v primerih mešane infekcije, kot je bilo eksperimentalno prikazano za tri viruse pri ječmenu, vendar so bile tovrstne virusne spremembe v pogojih kmetijskega okolja redko zaznane. Prav tako je bil pojav transkapsidacije ugotovljen ekperimentalno pri transgenih rastlinah, ki so sintetizirale virusni proteinski plašč. Obseg posledic transkapsidacije zavisi predvsem od karakteristik virusnih proteinov, posameznega gostitelja in

okolja. Ker ni dedna sprememba, lahko povzroči le občasne spremembe v obnašanju virusov in okoljska tveganja transkapsidacije, povezane s transgenimi rastlinami, so primerljiva s tveganji nastanka transkapsidacije pri mešanih virusnih infekcijah.

Interakcija med dvema patogenima virusoma pri mešani infekciji rastlin je lahko antagonistična ali sinergistična. Antagonistična interakcija lahko, po okužbi enega virusa, povzroči odpornosti na drug, soroden virus (navzkrižna zaščita). Nasprotno pa lahko sinergizem dveh virusov vpliva negativno na razvoj bolezni s tem, da se poveča obseg virusnih simptomov. Veliko znanih rastlinskih bolezni povzroči ravno interakcija dveh nesorodnih virusov na isti rastlini. Virusni geni, ki se izražajo v transgeni rastlini za namene navzkrižne zaščite, lahko v interakciji z nesorodnim virusom povzročijo pojav sinergistične bolezni namesto pričakovane zaščite. Tveganja, povezana s sinergijo, je mogoče določiti eksperimentalno pred sproščanjem transgene rastline v okolje z inokulacijo rastline z virusi, ki se pojavljajo na določenem območju. Pojav hujših simptomov bolezni na transgeni rastlini v primerjavi z netransformirano rastlino bi nakazal možnost sinergizma in s tem zmanjšal praktično vrednost transgene rastline za pridelovanje.

Rekombinacija virusne RNA je naravni fenomen izmenjave nukleotidnih sekvenc med dvema različnima RNA molekulama. Rezultat je hibridna RNA, ki vsebuje segmente dveh virusnih RNA, zato je rekombinacija dedna in trajna sprememba virusnega genoma. Ohranjanje novonastalih rekombinantnih virusov je odvisno od selekcijske prednosti novo pridobljene lastnosti za virus. Do rekombinacije lahko pride med sintezo komplementarnih RNA molekul in za uspešno rekombinacijo mora torej potekati replikacija dveh virusov istočasno v istem celičnem predelu. Zmožnost rekombinacije med RNA molekulami enega virusa ali med RNA ozko sorodnih virusov je bila potrjena eksperimentalno kot tudi možnost nastanka rekombinantov med transgenimi RNA transkripti gensko spremenjene rastline in molekulami RNA virusa, iz katerega izhaja transgen. Glede na to, da lahko nastanejo rekombinacije v mešanih infekcijah kot tudi pri transgenih rastlinah z virusnimi transgeni je za okoljska tveganja pomembna predvsem eventualna zmožnost nastanka novih virusov z novimi, virulentnejšimi lastnostmi za rastlino. Do danes še ni znanih empiričnih dokazov o pojavu virulentnejših virusov zaradi rekombinacije v mešanih infekcijah in glede na to, da sta si rekombinaciji med virusnimi RNA molekulami v primeru mešanih infekcij ali v transgeni rastlini podobni, lahko predpostavimo, da gensko spremenjene rastline z odpornostjo na viruse ne predstavljajo novega ali večjega tveganja za okolje kot je okoljsko tveganje pri ne-transgenih rastlinah.

#### 2.6.4 Viri:

- Beachy RN (1997) Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 8:215-220
- Fuch M, Ferreira S, Gonsalves D (1997) Management of Virus Diseases by Classical and Engineered Protection. *Molecular Plant Pathology On-line*.  
<http://www.bspp.org.uk/mppol/1997/0116fuchs/index.htm>
- Gonsalves D, Gonsalves C, Ferreira S, Pitz K, Fitch M, Manshardt R, Slightom J (2004) Transgenic virus-resistant papaya: From hope to reality for controlling *Papaya ringspot* virus in Hawaii. <http://www.apsnet.org/online/feature/ringspot/>
- OECD (1996) Consensus Document on General Information Concerning the Biosafety of Crop Made Virus Resistant through Coat Protein Gene-Mediated Protection. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 5. Organization for Economic Cooperation and Development, Pariz.  
[http://www.olis.oecd.org/olis/1996doc.nsf/LinkTo/ocde-gd\(96\)162](http://www.olis.oecd.org/olis/1996doc.nsf/LinkTo/ocde-gd(96)162)
- Tepfer M (2002) Risk assessment of virus resistant transgenic plants. *Annual Review of Phytopathology*, 40:467-491
- Virus-resistant Transgenic Plants: Potential Ecological Impact (1997). Eds Tepfer M, Balasz E, Springer, IRNA Editions, Pariz, 198 str.