

## Gensko spremenjene rastline naslednje generacije

Borut Bohanec

- 3. Gensko spremenjene rastline naslednje generacije
- 3.1 Izboljšana prehranska vrednost hrane
  - 3.1.1 Makrohranila
  - 3.1.2 Mikrohranila – vitamini in minerali
- 3.2 Druge novejšje aplikacije
  - 3.2.1 Tarčni proteini
  - 3.2.2 Transformacije plastidov
  - 3.2.3 Oralna cepiva in zdravila
  - 3.2.4 Odstranitev selekcijskih genov
  - 3.2.5 Nove kmetijstvu pomembne lastnosti
    - 3.2.5.1 Modificirana rast
    - 3.2.5.2 Odpornost na zmrzal, sušo, slana tla, senčenje
    - 3.2.5.3 Odstranjevanje nezaželenih snovi
    - 3.2.5.4 Odpornost na glivične bolezni
  - 3.2.6 Rastlinski produkti kot sodobni biomateriali
- 3.3 Viri

GENSKO SPREMENJENA HRANA

B. Bohanec, B. Javornik, B. Strel

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

### 3 Gensko spremenjene rastline naslednje generacije

Številne razprave o gensko modificirani hrani temeljijo na analizah trenutne, po ocenah mnogih prve »pionirske« generacije proizvodov transgenih rastlin. Že dalj časa pa so v razvoju številne druge aplikacije, za katere predvidevamo, da bodo sestavljale drugo in tretjo generacijo transgenih poljščin. Značilnost novih izdelkov bo predvsem velika raznolikost s stališča uporabnosti, ki ne bo več izključno namenjena izboljšanju kmetijske pridelave, temveč zlasti neposrednim koristim potrošnikov ali specifičnim potrebam industrije. V tem poglavju želimo kratko razčleniti nekatere vidike pričakovanih novosti.

Skupna značilnost prve generacije transgenih poljščin in vrtnin, ki smo jo podrobneje predstavili v poglavju 3 je med drugim ta, da večina aplikacij (odpornost na herbicide, viruse, škodljivce) prinaša korist pridelovalcem in seveda posredno semenarskim podjetjem. V zadnjem času pa prihajajo v ospredje še številne druge aplikacije, ki so usmerjene v najrazličnejše cilje, mnogi med njimi niso več toliko usmerjeni v izboljšave kmetijskih lastnosti novih sort kot v njihovo aplikativno vrednost za potrošnika, nekateri pa so namenjeni farmacevtski, kozmetični oziroma industriji nasploh.

#### 3.1 Izboljšana prehranska vrednost hrane

Genske transformacije z namenom izboljšave kakovosti hrane, točneje tiste spremembe, ki neposredno koristijo zdravju, so v središču zanimanja tako velikih družb kot akademskih laboratorijev. Lahko govorimo torej o novi generaciji hrane, ki ne bo le živilo temveč še bolj kot doslej tudi preventivno zdravilo. Področje je tudi s stališča sprejemljivosti GS hrane izjemnega pomena, saj tovrstni izdelki ne predstavljajo več koristi v prvi vrsti pridelovalcu, temveč porabniku neposredno. Na kratko bomo predstavili nekaj tovrstnih aplikacij, o katerih so že poročali v znanstveni literaturi oziroma v aplikacijah patentov ter so trenutno v različnih fazah sproščanja.

Monsanto, kot največje podjetje s področja GS hrane, napoveduje (Fralej, 2002) več različnih izboljšav tega tipa, tržišču naj bi jih ponudili čez 2-5 let. Študij, orientiranih v raziskave »zdrave hrane«, je mnogo, glede na spremenjene lastnosti pa jih razdelimo na več sklopov.

##### 3.1.1 Makrohranila

Med glavna makrohranila uvrščamo beljakovine, maščobe in ogljikove hidrate, poskusi genskih transformacij z namenom modifikacije njihovih sestavin se izvajajo pri vseh treh.

Beljakovine pogosto nimajo prehransko najugodnejše aminokislinske sestave. Denimo kvaliteto riževih beljakovin izboljšujejo z geni, ki določajo proteine v fižolu (beta-fazeolin), take beljakovine bodo imele več lizina, ki ga v večini žit primanjkuje. V soji naj bi podobno zvišali odstotek druge

esencialne aminokisliline metionina s povečano produkcijo lastnega gena glicinina, bogatega z metioninom. Sojine beljakovine se že sedaj veliko uporabljajo denimo kot nadomestek kravjega mleka, vendar trenutno postopek, s katerim soji izboljšajo okus, temelji na izločanju zaželenih proteinov po kemični poti. Z biotehnološko spremembo sestave sojinih proteinov želijo doseči zaželen okus ter/ali pozitiven učinek soje na lipide v krvi. Namen sprememb sojinih proteinov je torej možnost sestave bolj zdravih jedilnikov, denimo koristnih srcu in ožilju. S prehranskega vidika aminokislinska sestava beljakovin pri vodilnih poljščinah ni ekvivalentna potrebam ljudi ali živine, nekatere aminokisliline kot denimo lizin ali metionin so zastopane v premajhnem obsegu. Pregled uspehov vnosa genov za izboljšano sestavo beljakovin navajajo Hagan in sod. (2002). Za zdaj poročajo zlasti o uspehih pri koruzi (visokolizinska koruza) ter manj pri stročnicah. Pšenici je možno manipulirati gene za tvorbo gluteninov, to je skupine proteinov, ki dajejo kruhu elastičnost. Uspelih študij je precej, že leta 1997 so denimo Barro in sod. dokazali, da se iz tako spremenjene sorte pšenice napeče kruh z bistveno izboljšanimi pekarskimi lastnostmi. Ista raziskovalna skupina je kasneje poročala o pekarskih lastnostih dveh gluteninskih podenot, reguliranih s transformacijo dveh genov (Barro in sod., 2003), in sicer enote 1Ax1 in enote 1Dx5. V različnih transgenih linijah sta ta dva proteina predstavljala od 29 do 65% vseh gluteninov. Na osnovi testov pšenice, pridelane v poljskih poskusih, so ugotovili, da gluteninska podenota 1Ax1 izboljša pekarske lastnosti, medtem ko podenota 1Sx5 (podenota 1Dx5) poslabša pekarske lastnosti. Podobno je skupina dr. Loerza v Hamburgu (Loerz in sod., 2003) denimo pravkar uspela z vnosom genov za tvorbo glutenov, izoliranih iz pšenice v koruzo, takšna koruza ima izboljšane pekarske lastnosti. Podoben projekt poteka na Madžarskem (B. Jenes, osebna informacija) z vnašanjem pšeničnih genov v riž.

Poskusi modifikacij maščob v oljnicah potekajo že več let, večina aplikacij je namenjena koristim srca in ožilja. Kot vemo so prav raziskave povezane z zmanjšanjem kardiovaskularnih obolenj izjemnega pomena v razvitem svetu, kjer so prav te bolezni najpogostejši vzrok hudih bolezni in smrti. Zaželeno je, da olja vsebujejo čim manj nasičenih maščobnih kislin, kar je trenutno možno doseči s kemičnim postopkom, v katerem olja dehidrogeniramo, da s tem postanejo bolj stabilna in funkcionalna. Pri tem postopku žal nastajajo transmaščobne kisline, ki so kot kažejo zadnje klinične študije enako nezdrave kot nenasičene oljne kisline. Prav sodobne biotehnološke metode omogočajo spremembe encimov, ki so vključeni v izdolževanje oljnih molekul in njihovo nasičenost. Denimo soja, seme bombaža in oljnih palm so že bili modificirani na način, da so izražali visok nivo oleične kisline (mononenasičene kisline) ob hkratnem zmanjšanju polinenasičenih in mononenasičenih maščobnih kislin. Takšna olja so stabilna, imajo zaželeno funkcionalne karakteristike ter v njih, ker postopek denaturacije ni potreben, ne prihaja do nastanka nezdravih transmaščobnih kislin. Pri peki

Američanom pa tudi nam priljubljeni pečeni krompirček vsebuje okoli 45% nasičenih ali trans maščobnih kislin. Če bi ga cvrli v olju z omenjeno izboljšavo, bi ga lahko kupcem ponudili kot bistveno bolj zdravo živilo, ne da bi jih silili v spremembo prehranskih navad. Pojem kvalitete maščob so tako imenovane omega-3-maščobne kisline, za katere je znano, da jih vsebujejo ribe in druga hrana izvirajoča, iz morja. Kot zanimivost omenimo, da so bile številne klinične študije pozitivnega vpliva omega-3-maščobnih kislin stimulirane z opazovanjem Inuitov z Grenlandije, ki se hranijo z izrazito z maščobami bogato hrano, so mnogokrat prekomerne teže, a vendarle ne obolevajo za boleznimi srca in sladkorno boleznijo. Omega-3-maščobnim kislinam pripisujejo pozitiven vpliv na učenje in pomnjenje, še posebej pri razvoju možganov in vida otrok in pri boleznih povezanih s staranjem, vključno z Alzheimerjevo boleznijo, delujejo proti depresiji, imajo pomembno funkcijo pri kardiovaskularnih obolenjih ter vplivajo na pravilno delovanje inzulina pri prekomerni teži. Kisline dejansko nastajajo v algah, ki so hrana ribam, kot kaže (Cockburn, 2004)) so že uspeli izolirati ustrezne gene, kar nas vodi do številnih novih možnosti vključevanja teh zdravju primernih maščob v številna živila. Sedanja edina možnost je bila uživanje velikih količin morske hrane ali nakup kapsul z ribjim oljem.

V celoti gledano je bilo do sedaj uspešno gensko spremenjenih 16 različnih maščobnih kislin, ki so izvirale iz 19 različnih rastlin, vnešene pa so bile v različne rastlinske vrste. Denimo samo modificirana oleinska kislina (gen 18:1- $\Delta$ 12- desaturaza) je bila transformirana v sončnico, ogrščico, arašide, repico, gorjušico, bombaž in sojo.

Modificirati je mogoče tudi škrob, in sicer njegovo sestavo ali pridelano količino. Škrob ima lahko glede na sestavo najrazličnejše fizikalno-kemijske lastnosti in se uporablja v najrazličnejših aplikacijah v papirni in tekstilni industriji, pri proizvodnji plastike, hrane in v farmaciji. Aplikacije lahko razdelimo (Davis in sod, 2003 (več avtorjev)) na:

- sprememba metabolne poti za zvečanje količine nastalega škroba,
- škrob z mnogo fitoglikogenske oblike škroba (močno razvejane vodotopne oblike),
- fosforiliran škrob v žitih (za razliko od krompirjevega škroba žitni vsebuje malo fosforja),
- škrob s srednjo vsebnostjo amiloze (med normalnim in voskastim),
- zmanjšanje ali zvečanje velikosti škrobnih zrn,
- škrob s spremenjeno dolgimi verigami in vzorcem razvejanja,
- zmanjšana prebavljivost škroba z uvedbo beta vezi na amilozi in amilopektinu.

Poglejmo samo nekaj konkretnih primerov uspelih genskih sprememb. V rižu so želeli zmanjšati odstotek amiloze, da bi dobili prosojen lepljiv riž, kakršnega preferirajo azijski potrošniki. Z metodo protismiselne DNK so tako

Shimada in sod. (1993) znižali odstotek amiloze z 19 na 6%. Brezamilozen škrob tvori tudi dober gel, zaželeno lastnost v mnogih aditivih. Tak krompirjev škrob so denimo pridobili z enako metodo blokiranja gena za tvorbo amiloze (Visser in sod. 1997 a, b). Z vnosom bakterijskih genov za sintezo škroba so denimo izzvali v krompirju številne modifikacije - denimo škrobna zrna s spremenjenimi fizikalnimi lastnostmi ali bolj gosto razvejane amilopektinske verige. V razvoju so povsem novi produkti zlasti vnos genov za tvorbo encimov glukansaharaz (Kok-Jacon in sod., 2003).

Nekatere rastline ne shranjujejo ogljikovih hidratov v obliki škroba, temveč nekoliko drugače sestavljenih oligosaharidov, med njimi so zlasti vse podrobneje proučevani fruktani. Gre za ogljikove hidrate, kakršne v relativno nizki koncentraciji vsebuje denimo čebula, cikorija, topinambur in številne druge vrste. Podobno kot škrob se tudi fruktani sintetizirajo iz osnovnega disaharida saharoze, njihova funkcija v rastlinah pa je poleg vira rezervne energije, potrebne zlasti za hitro spomladansko rast, tudi obramba pred sušo in zmrzaljo. Hrani sestavljeni iz fruktanov, denimo inulinu iz cikorije, pripisujejo različne pozitivne lastnosti. Fruktani v hrani naj bi prispevali k izboljšani sestavi človeške mikroflore, denimo laktobacilov in bifidobakterij, prispevali pa naj bi tudi k izboljšani resorpciji kalcija in magnezija. Ob uživanju glikanov so tudi izmerili znižan nivo inzulina in holesterola, triacilglicerola in fosfolipidov v krvi. Sintezna pot fruktanov v rastlinah je dobro proučena, denimo geni za dvojce ključnih encimov 1-SST in 6-SFT so bili identificirani v več vrstah rastlin, kar omogoča regulacijo metabolne poti (Ritsema in Smeekens, 2003, v referenci je Smeekens). Transformacija čebulnega gena za sintezo fruktanov v radič (Vijn in sod., 1997) je sprožila nastanek čebulne oblike fruktanov v radiču, ječmenov gen v radiču pa je vplival na tvorbo inulina podobnega ječmenovi obliki. Tvorba fruktanov je uspela tudi pri rastlinah, ki sicer proizvajajo druge oblike ogljikovih hidratov. Sevenier in sod. (1998) so poročali o transformaciji sladkorne pese z genom za sintezo fruktanov iz topinamburja, krompir z genoma 1-SST in 1-FFT iz artičoke pa je produciral do 200 enot dolge polimerne inulinske molekule (Hellwege in sod., 2000).

### *3.1.2 Mikrohranila – vitamini in minerali*

Modifikacija hrane v smislu izboljšanja dostopnosti vitaminov in mineralov je žlahtniteljski cilj, ki ima največji pomen zlasti za nerazvite države sveta, kjer je jedilnik revnih ljudi sestavljen iz povsem neustreznih osnovnih živil, denimo riža in bistveno premalo mesnih izdelkov, sadja in zelenjave. Statistike kažejo, da je na svetu kar 2.4 milijarde žensk in otrok, ki trpijo pomanjkanje železa, ter 400 milijonov otrok, ki trpijo pomanjkanje vitamina A.

Zlasti skupini dr. Inga Potrykusa je uspelo uvesti v riž gene za zvišanje dostopnosti železa, za katerega pa se je v začetku pokazalo, da se njegov produkt s kuhanjem uniči, vendar poročajo o nadaljevanju raziskav (Lucca in

sod., 2002) ter bistvenem izboljšanju dostopnosti železa. Vsebnost železa so zvečali za dvakrat z vnosom gena za feritin iz fižola, biodosegljivost železa pa na dva načina, in sicer z vnosom termično odporne fitaze iz glive *Aspergillus fumigatus* in s prekomernim izražanjem obstoječega riževega gena, ki kodira metalotoneinski s cisteinom bogat protein. Pod vodstvom dr. Potrykusa je uspela tudi medijsko zelo odmevna genska transformacija riža, ki vsebuje bistveno zvišano vsebnost provitamina A (Al-Babili in sod., 2001, Beyer in sod., 2002, Hoa in sod., 2003). Tehnično gledano so za ta namen potrebovali tri proteine, katerih gene so izolirali, dva iz narcise (fitoen sintaza in likopen ciklaza) in enega iz bakterije *Erwinia* (fitoen/karoten dvojna-desaturaza). Ti trije encimi pretvarjajo obstoječ prekursor geranil-geranil-pirofosfat v beta karoten (= provitamin A). Okoli 200 gramov takega riža dnevno naj bi bilo dovolj, tudi če bi bil riž edini dnevni vir vitamina A, vendar klinični testi, ki bi to domnevo potrdili, še potekajo. Poleg riža so bile z genom za tvorbo provitamina A transformirane še druge kmetijske rastline, denimo v Indiji so transformirali gorjušico, ki je pri njih glavni vir rastlinskega olja. Ta dosežek je zanimiv tudi s tega vidika, ker se beta karoten raztaplja le v oljih in je možno pričakovati, da bo v tej obliki še posebej dostopen človeškemu organizmu.

Podobno je bilo več raziskav uspešnih tudi v modifikacijah produkcije vitamina C. V slovenskih medijih je bil denimo bolj kot provokacija omenjen gen, izoliran iz sesalcev, ki je vgrajen v špinačo povečal vsebnost vitamina C za trikrat. Dejansko je bil tak znanstveni dosežek (Jain in Nessler, 2000) precejšnje presenečenje, ker so navadno biosintezne poti pri rastlinah in živalih precej različne. Z vnosom ključnega gena za sintezo vitamina C iz podgane v tobak in solato avtorja poročata o zvišanju vsebnosti C-vitamina za 4-7-krat. Ker je vsaj v današnjih GS rastlinam nenaklonjenih razmerah logično, da geni iz sesalcev niso primerni za tržne aplikacije v rastlinah, ki jih uporabljamo kot živila, tovrstni poskus nima večje tržne aplikacije. Nasprotno pa je bilo precej študij posvečenih tudi razumevanju sintezne poti vitamina C pri rastlinah, kar je bilo raziskano šele nedavno (Smirnoff, 2003). Te študije so omogočile izolacijo rastlinskih genov z isto funkcijo. Konkretno so Agius (2003) in sodelavci že uspeli dvigniti vsebnost vitamina C z izolacijo gena za D-galakturonsko kislino reduktazo iz jagod. Gen vnesen v testno rastlino repnjakovca, je izražal 2-3 krat višjo vsebnost vitamina C.

Poleg vitamina A in C so uspeli tudi študije zvišanja tvorbe vitamina E in biotina. Vitamin E, oziroma izmed osmih sorodnih struktur najpomembnejši alfa tokoferol, prejmemo izključno z rastlinsko hrano, ker ga živali ne morejo sintetizirati in je zelo pomemben antioksidant. Dosežkov zvišanja vitamina E je bilo objavljenih že kar nekaj, eden novejših je uspeh ameriških znanstvenikov (Cahoon in sod., 2003), ki so dosegli povečano ekspresijo genov iz ječmena, pšenice in riža. Dosegli so denimo kar 10-15-kratno zvišano tvorbo tokoferola/tokotrienola v žitih oziroma šestkratno v testnem repnjakovcu. Slednje je še posebej zanimivo, kajti v naravi se E-vitamin sintetizira predvsem v enokaličnicah, torej v omenjenih žitih, bistveno manj pa

v dvokaličnicah, kamor spada repnjakovec. Zvišana vsebnost vitamina E v vlogi močnega antioksidanta bo lahko med drugim prispevala tudi k večji obstojnosti olj namenjenih prehrani.

Poleg vitaminov in mineralov so zdravju izjemno koristni še številni drugi rastlinski sekundarni metaboliti, denimo pigmenti. Posebno pozornost so leta 2002 pritegnile raziskave zvišanega likopena v paradižniku, opravljene na Univerzi Purdue. Likopen je pigment, ki obarva paradižnike rdeče in deluje v telesu kot močen antioksidant, denimo dvakrat uspešnejši od beta karotena. Že iz študije iz leta 1995, v kateri so primerjali prehrano 48.000 moških s harvardske univerze, je znano, da so bili tisti, ki so uživali več (predelanega) paradižnika manj izpostavljeni tveganju nastanka raka prostate. Likopenu pripisujejo tudi vpliv na znižanje holesterola. Izvleček likopena dodan hrani ni dosegel zaželenega učinka, zato je potrebno uživati paradižnik v sveži ali še bolje v procesirani obliki. Podobno kot z drugimi funkcionalnimi živili, denimo s čebulo, je problem velika količina zaužitega paradižnika, ki je potrebna za doseganje učinka. Roshni in sod. (2002) so dosegli trikratno povečanje tvorbe likopena, ko so v paradižnik vstavili gen, izoliran iz kvasovke za sintezo poliaminov. Predelana hrana (polivke, mezga itd.) narejena iz paradižnika z visoko vsebnostjo likopena bo torej lahko bistveno vplivala na preventivo določenih bolezni.

Že dolgo vemo, da zdravo prehrano sestavljajo jedilniki iz zadostnih količin sadja in zelenjave. Precejšnjo vlogo imajo v teh živilih flavonoidi, ki jim pripisujejo številne pozitivne funkcije, delovali naj bi zlasti kot antioksidanti in imeli pozitiven učinek na zmanjšanje nevarnosti obolenj kardiovaskularnega sistema. Pomembno vlogo pa imajo tudi v rastlinah samih. Zvišan odstotek flavonoidov v hrani bi zato izboljšal zdravstveno vrednost živil, podobno kot zvišan odstotek vitaminov. Jung in sod. (2000) so poročali o uspehu te vrste, konkretno so prvi izrazili sojin gen za tvorbo izoflavona v testnem repnjakovcu. Paradižnik denimo izraža flavonoide le v manjši količini v kožici plodov. Muir in sod. (2001) so gen za kalkonizomerozo, izoliran iz petunije, izrazili v paradižniku in dosegli 78-kratno povečanje vsebnosti skupnih flavonolov. Kasneje so Bovy in sod. (2002) v paradižniku izrazili koruzna gena *LC* in *CI* ter dosegli tvorbo flavonola kemferola in flavanona naringenina.

Rastlinski fitosteroli, denimo beta sitosterol, so se uporabljali kot zdravilo za znižanje holesterola, dodatke fitosterolov najdemo danes v margarinah, propagiranih kot zdravju primerne. Venkatramesh in Chopra (2000) so z gensko transformacijo dosegli povečanje fitosterolov v oljnicah.

Preglednica 3.1: Proizvodi, povezani z izboljšavo prehranske vrednosti hrane v različnih stopnjah razvoja

Produkt	Vnešena lastnost	Razvojna faza	Zadnja referenca
<b>Izboljšane beljakovine</b>			
Izboljšane beljakovine v krompirju	Gen iz ščira za izboljšavo proteinov krompirja, namenjen indijskim potrošnikom; Zvišan lizin za 15-krat (dihidrodipikolinat sintaza)	V razvoju na Univerzi v New Delhiju; Plant Res. Inst, Wage-ningen, NI	Coghian, 2003; Sevenier in sod., 2002
Izboljšane beljakovine sladkega krompirja	Količina in kvaliteta beljakovin povečana	Dosežek testiran	Prakash in sod., 2000
Izboljšane beljakovine riža	Izražen sojin protein v rižu za izboljšano kvaliteto beljakovin	V razvoju	Momma in sod., 2000
<b>Izboljšani ogljikovi hidrati</b>			
Škrobna sintaza II in III	Spremenjena viskoznost škroba v krompirju	Dosežek testiran	Jobling in sod., 2004
Škrob s spremenjeno sestavo	Modificiran škrob v krompirju za uporabo v papirni industriji (98% amilopektina in le 2% amiloze – sicer 15%)	Plant Science Sweden, vloga pri EU za tržno sproščanje	G. Cahlin (2004), sporočilo za javnost
Pesa z zvišanimi fruktani	Oblika oligosaharidov koristna za prebavo	Dosežek testiran	Sevenier in sod., 2002
Radič s čebulnimi fruktani	Spremenjena oblika ogljikovih hidratov	Dosežek testiran	Vijn in sod., 1997
<b>Izboljšave rastlinskih olj</b>			
Visoka vsebnost laureatov	Rastlinsko olje s povečanim deležem laurične kisline, ki lahko služi kot nadomestek tropskim oljem	Proizvod na tržišču, družba Monsanto	Voelker, 1997
Olje z visokimi oleinskimi kislinami	Rastlinsko olje primernejše za kardiovaskularni sistem z manj nasičenimi kislinami brez potrebe po hidrogenizaciji in brez trans maščobnih kislin	Sojino olje: komercializirano, družba Dupont; Olje iz bombažnih semen,CSIRO	Kinney, 1997 Facciotti in sod., 1999



Produkt	Vnešena lastnost	Razvojna faza	Zadnja referenca
Visoka vsebnost stearatov	Zmanjšana potreba po hidrogeniranju ter nastanku trans-maščobnih kislin	Olje iz bombažnih semen – v razvoju CSIRO, Avstralija; Sojino olje – razvoju na Univerzi v Iowi; Olje ogrščice – dosežek testiran, Monsanto	Liu in sod., 2002  Neff in List, 1999  Facciotti in sod., 1999
Visoka vsebnost omega-3 maščobnih kislin	Rastlinsko olje kot vir stearidonske kisline	Dosežek testiran, Monsanto	Froman in Ursin, 2002
Nasičene maščobne kisline	Olje ogrščice z zdravju primernejšo sestavo	Dosežek testiran, Monsanto	Dehesh, 2002
Srednje dolge maščobne kisline	Olje ogrščice s srednje dolgimi maščobnimi kislinami za prehranske ali zdravstvene aplikacije	Dosežek testiran, Monsanto	Dehesh in sod., 1996

#### Izboljšana sestava vitaminov ali mineralov

Zlati riž	Zagotavlja karoten v rižu, glavni močni jedi Azijcev	V zaključni fazi testiranje pri IIRI inštitutu z namenom proste oddaje revnim kmetom JV Azije	Beyer in sod., 2002
Zlata gorjušica	Zagotavlja beta karoten v olju, lokalno razširjenem v vzhodni Indiji	V razvoju TERI, Indija	Dhavan, 2001
Olje z visoko vsebnostjo tokoferola	Zagotavlja alfa tokoferol; sprememba iz gama oblike v alfa obliko, ki je prehransko primernejša	Dosežek testiran	Rocheford in sod., 2002
Jagode z visoko vsebnostjo C-vitamina	Zvišan nivo C-vitamina	Razvojna faza	Agius in sod., 2003

Produkt	Vnešena lastnost	Razvojna faza	Zadnja referenca
Riž z visoko vsebnostjo železa	Prekomerno izražanje sojinega feritina je zvečalo vsebnost železa v rižu za 2-3-krat	V razvoju, testiranje na živalih	Goto in sod., 1999
Izboljšava absorpcije visokega nivoja železa v rižu	Kombinacija visoke vsebnosti železa ter fitaze in prekomernega izražanja beljakovin, bogatih s cisteinom za izboljšano absorpcijo železa	Dosežek testiran	Lucca in sod., 2002
Semena z visoko vsebnostjo mineralov	Žita z izboljšano vsebnostjo esencijskih mineralov – kalcija, cinka in železa	Razvojna faza	Grusak, 2002

### Izboljšane funkcionalne sestavine

Riž z beljakovinami iz človeškega mleka (laktoferin, lizozim in alfa antitripsin)	Za otroško prehrano namenjeno izboljšani imunosti, kakršno izzove človeško mleko	Dosežek testiran	Lonnerdal, 2002
Olje s fitosterolom	Vir rastlinskih sterolov kot način za znižanje ravni holesterola	Dosežek testiran	Venkatramesh in Chopra, 2000
Paradižnik in krompir z visoko vsebnostjo likopena in drugih karotenoidov	Likopenu pripisujejo preventivni učinek proti raka  Zvišan karotenoid zeaksantin v krompirju	Dosežek testiran	Romer in sod., 2000; Fraser in sod., 2001 Romer in sod., 2002
Paradižnik z visoko vsebnostjo flavonoidov	Flavonoidi so antioksidanti in zmanjšujejo verjetnost pojava kardiovaskularnih obolenj	Dosežek testiran	Sevenier in sod., 2002
Soja z visoko vsebnostjo izoflavonov	Izoflavonom pripisujejo vpliv na znižanje holesterola in druge možne ugodne učinke	Dosežek testiran	Jung in sod., 2000

Produkt	Vnešena lastnost	Razvojna faza	Zadnja referenca
---------	------------------	---------------	------------------

### Zmanjšana količina nezaželenih komponent

Znižana količina kofeina v čaju	Brez potrebe po kemijski dekofeinizaciji	Razvojna faza	Kato in sod., 2000
Odstranjeni alergeni v arašidih	Odstranjen protein, ki je znan alergen	Razvojna faza	Rabjohn in sod., 2002
Zmanjšani alergeni v pšenici	Znižan nivo beljakovin, ki povzročajo celiakijo, alergijsko bolezen	Razvojna faza	Buchanan in sod., 1997
Zmanjšani alergeni v krompirju	Modifikacija alergenega proteina patatina	Razvojna faza	Alibhai in sod., 2000
Zmanjšani alergen v soji	Izločen alergen protein P 34	Razvojna faza družba DuPont	Jung in Kinney, 2001

### Izboljšave krmnih žit in stročnic

Zrnje izboljšano sestavo esencielnih aminokislin in/ali povečano vsebnostjo olja	Koruza in soja s povečano količino aminokislin in/ali maščob odpravi potrebo po dodajanju teh komponent krmilom	Razvojna faza Rennessen in DuPont	O'Quinn in sod., 2000 Galili in sod., 2002
Zrnje glivično fitazo	Krmilo, pripravljeno iz semen (soja, pšenica, lucerna), ki vsebujejo fitazo, omogoči dostopnost fosforja in zmanjša njegovo izločanje v okolje	Razvojna faza	Galili in sod., 2002
Reducirani glukozinolati v kapusnicah	Glukozinolati v živinski krmi so toksični in znižajo prebavljivost	Razvojna faza	Vageeshbabu in Chopra, 1997

## 3.2 Druge novejšje aplikacije

### 3.2.1 Tarčni proteini

Visok nivo izražanja transgena je včasih zaželen, ne toliko v aplikacijah namenjenih pridelavi oziroma prehrani temveč bolj pri proizvodnji posamičnih snovi, ki jih nato uporabljamo v najrazličnejše namene, denimo v farmaciji, kozmetiki, industriji. Trenutno je na voljo več sistemov, ki vodijo do zaželenega cilja visoke produkcije določenega proteina oziroma njegovega produkta. Zvišano produkcijo testnega GUS proteina so dosegli Mallory in sod. (2002) z manipulacijo elementov virusnih genov, kjer jim je del kasete krompirjevega PVX virusa služil za dvig ekspresije, drug delno modificiran element Y virusa (HcPro) pa za preprečitev mehanizma, ki sicer delovanje virusnih genov močno zmanjša. Na ta način so dosegli, da je nivo ekspresije testnega gena (to OK?) sestavljal okoli 3% vseh celičnih beljakovin. Gre za lep primer, ko od bazične raziskave do aplikacije ni daleč. Na ta način bi bilo mogoče na primer povečati tudi odstotek založnih beljakovin v poljščinah, kjer bi bilo to za prehrano ali za krmo zaželeno. Še posebej učinkovit pristop za doseganje zelo visoke produkcije tarčne snovi pa je transformacija kloroplastov. O izjemno visoki produkciji tarčnega proteina poročajo De Cosa in sod. 2001, produkcija insekticidnih Bt-kristalov gena *cry2Aa2* je predstavljala kar 45% vseh celičnih proteinov.

Visoka produkcija proteinov, namenjenih kasnejši ekstrakciji in uporabi v najrazličnejše namene, ima lahko mnogo aplikacij, denimo že leta 1997 so uspeli (Chong in sod. 1997) tvoriti beta kazein, eno osnovnih sestavin človeškega mleka. Kazeini enaki človeškim bi bistveno izboljšali obroke otroške hrane, kakršnih današnji pripravki, temelječi na kravjem mleku ali sojinih izvlečkih, ne morejo nuditi. Nedvomno lahko pričakujemo precej diskusij pred eventualno uporabo tovrstnih izdelkov, znanstveno gledano pa možnost v rastlinah tvorjenih sestavin človeškega mleka ni več tako oddaljena.

Nekateri proteini lahko delujejo kot naravno sladilo. Iz nekaterih tropskih rastlin denimo ekstrahirajo monelin in taumatin, ki jih nato dodajajo kot sladilo, vendar je njihova cena zelo visoka. Brazein je denimo 500 do 2000-krat slajši od sladkorja, torej za enak okus zadoščajo že zelo majhne koncentracije. V več študijah genskih transformacij je tako uspelo izraziti monelin v paradižniku in solati, taumatin v paradižniku, brazein v koruzi. V patentni prijavi Fisher in sod. (1998) navajajo, da bi bilo na ta način možno zmanjšati dodatek sladkorja jabolčnemu soku ali jedem iz buč, saj bi dodani geni že osnovno živilo (jabolka ali buče) dovolj osladili.

### 3.2.2 Transformacije plastidov

Omenjene raziskave transformacije plastidov dobivajo v zadnjih letih čedalje večji pomen. Da pojasnimo, normalno z gensko transformacijo mislimo vnos DNK konstrukta v jedrni kromosom. Rastlinske celice poleg jedrne DNK vsebujejo tudi DNK v plastidih, to je v mitohondrijih (te imajo tudi živalske celice in omogočajo celično dihanje) in v kloroplastih. Posamična celica vsebuje eno jedro, a vendar več plastidov. Zelo pomemben je način dedovanja. Geni jedra se dedujejo seveda po obeh starših, medtem ko se plastidi dedujejo večinoma le po enem staršu, največkrat po materi. Tako običajno jajčna celica prispeva polovico jedrnih genov ter citoplazmo, v kateri so mitohondriji in kloroplasti. Obstojata tudi nekaj izjem, denimo pri melonah in kumaricah se mitohondriji dedujejo po očetu, vsekakor pa je ta lastnost vrstno specifična. Povejmo takoj, da vsaj za zdaj genska transformacija mitohondrijev še ni uspela, morda predvsem zato, ker je bilo mnogo več raziskav usmerjenih v transformacije kloroplastov. Transformacije plastidov omogočajo nekatere lastnosti, ki jih ne moremo pričakovati od transformacij jedrnih genov. Prej omenjena visoka produkcija določenega vnešenega gena je lahko rezultat velikega števila kopij gena v posamični celici, ki je lahko celo do 10.000. Razlog je v tem, da ima lahko ena celica 10-100 plastidov ter da ima vsak plastid po 10-100 kopij krožne kromosomske DNK. Geni plastidov so podobno kot pri bakterijah urejeni v operone, zato lahko ena transformacija kodira po več izraženih genov. Bistveno različen je tudi vpliv na mesto vnosa, saj pri transformaciji plastidov lahko računamo na homologno rekombinacijo, ki je tudi značilnost bakterij. Na ta način vnesemo DNK na točno določeno mesto na kromosomu. Kljub večjemu številu kopij genoma in večjemu številu plastidov v celicah pa je značilnost kloroplastov zelo velika genetska izenačenost, posamična celica torej vsebuje kloroplaste, ki imajo vsi enako strukturo DNK, v primeru transformacij so vsi nosilci vnešenih genov (homoplastičnost). Kloroplasti imajo precej bakterijskih lastnosti, a za razliko od bakterij tvorijo proteine v rastlinskih celicah enako kot živali (zvižanje, disulfidni mostički), torej je končni produkt uporabnejši - denimo kot farmacevtik. Velika prednost izražanja genov v kloroplastih je lahko tudi tkivna specifičnost tvorbe kloroplastov. V primeru vnosa genov za odpornost denimo največkrat želimo zaščititi zelene dele rastlin, ki seveda vsebujejo kloroplaste in ne nujno tudi drugih (sadeže, semena, korenine), kjer zato do izražanja genov sploh ne pride.

Kot smo omenili v poglavju 1.2.3 manipuliranje dedovanja po materi že več desetletij omogoča požlahtnitev hibridnih sort več kmetijskih rastlin. Podobno velja danes za genske transformacije kloroplastov, da je prav dedovanje po materi lahko velika prednost. Dedovanje po materi namreč pomeni, da pelod ne vsebuje novo vnešenih genov, torej oprašitev sosednjih rastlin s pelodom sicer transgene sorte ne vpliva na njihovo potomstvo. Na ta način si lahko v prihodnje bistveno lažje obetamo tudi ob kontroverznih

polemikah, vezanih za GS živila, lažje sobivanje transgenih in netransgenih poljščin. S tem pristopom denimo onemogočimo prenos genov s pelodom na sosednja polja ali na divje sorodnike, kar je lahko za določeno vrsto rastlin ali za določeno okolje problematično. Omeniti sicer velja, da tako kot v skoraj vseh primerih v živem svetu tudi to pravilo (dedovanje kloroplastne DNK po materi) pozna izjeme, v zelo majhnem odstotku so denimo dokazali prenos kloroplastne DNK na jedrne gene, ki se seveda dedujejo tudi po očetu. Kot kaže gre v tem primeru za redko izjemo, dodatna proučevanja tovrstnih pojavov pa seveda zaslužijo resno znanstveno pozornost.

### 3.2.3 Oralna cepiva in zdravila

Cepiva, ki jih lahko prejmemo oralno namesto intramuskularno, imajo več prednosti, denimo odpade strah otrok (in odraslih) pred injekcijami, zlasti v nerazvitih državah pa je lahko razdeljevanje cepiva bistveno olajšano, ker niso potrebne hladilnice. Primer take uporabe je bilo cepivo proti otroški paralizi, kjer so tovrstni pristop uporabili v številnih državah. Žal je večina cepiv še vedno dostopna v obliki, ki se aplicira z injiciranjem. Da je oralno cepivo učinkovito, je potrebna precej večja količina (tudi sto krat večja), s tem pa se cena doze cepiva zelo poveča. Da bi zagotovili uporabo oralnih cepiv, je potrebno identificirati ali modificirati del virusa, ki zagotovi učinkovito imunizacijo, proizvesti zadostno količino v primernem gostitelju in pridobiti velike količine cepiva. Sodobna cepiva narejena na osnovi genske tehnologije so sestavljena iz podenot, kar jih po eni strani naredi še bolj varne, a tudi težje za ekspresijo v odsotnosti virusa. Mikroorganizmi so cenovno zelo primeren proizvodni sistem, vendar morajo biti mnogi proteini, ki se uporabljajo kot cepiva, v glikozilirani obliki. Tega ne dosežemo v bakterijah, kvasovke pa mnogokrat proteine hiperglikozilirajo in tudi produkta ni vedno možno dobiti v zadostni količini. Idealno okolje so tkivne kulture sesalcev, vendar so stroški okoli 100-krat večji kot v primeru mikrobne fermentacije. Druga možnost so tudi transgene živali, ki lahko izločajo cepivo v mleku, a vsaj za zdaj komercialnih uspehov s tega področja še ni bilo (Streatfield in Howard 2003).

Iz naštetih razlogov se prav proizvodnja cepiv v rastlinah ponuja kot zelo primerna rešitev. Prednosti proizvodnje v rastlinah so zlasti že omenjena zmožnost post translacijskih modifikacij, možnost hitre razmnožitve in proizvodnje zelo velikih količin produkta ob hkratni bistveni pocenitvi ter odsotnost bojazni pred okužbo s človeku nevarnimi patogeni. Dodatna prednost je možnost preproste priprave oralnega odmerka ne da bi bilo potrebno predhodno čiščenje in predpriprava farmacevtika za oralno uživanje. Negativna stran je seveda bojazen pred nezaželenim razširjanjem izključno zdravstvu namenjenih sort ter bojazen pred nekontrolirano uporabo.

V preteklih letih je bilo izvedenih mnogo poskusov, številni so bili že tudi testirani na poskusnih živalih, nekateri pa že tudi pri ljudeh. Preizkušajo cepiva proti bakterijskim in virusnim infektom ljudi, domačih in divjih živali.

Ocenjujejo, da so oralna cepiva zlasti primerna za preprečevanje infektov, ki jih prejmemo po prebavni poti, denimo povzročiteljev diareje ali tistih, ki se prenesejo po sluznici kot hepatitis B ali HIV, možna pa je tudi uporaba proti boleznim, ki se normalno prenašajo s krvnim obtokom, denimo proti steklini. Poseben pomen imajo lahko oralna cepiva pri preprečevanju obolenj domačih živali, denimo virusnega gastroenteritisa pri prašičih. Poceni oralna zaščita goveda proti enterohemoragični različici bakterije *Escherichia coli*, ki se lahko z goveda prenese na človeka, bi preprečila številne okužbe, ki so možne pri uživanju premalo obdelanega mesa. Tudi imunizacija divjih živali, ki so mnogokrat vir sporadičnih okužb ljudi, bi bila na tak način bistveno olajšana.

Obstoja mnogo znanstvenih člankov s tega področja, od starejših, ko so zaželeni protein pretežno pridobivali s klasično gensko transformacijo rastlin, do sodobnejših, ko izražanje proteina zlasti vnašajo, kot smo omenili, v kloroplastni genom. Geni so bili vnešeni v številne poskusne rastline, denimo v tobak, repnjakovec, krompir, koruzo, solato, sojo, paradižnik, korenček, banane, lupino, lucerno in deteljo. Vsaj nekateri poskusi so bili tudi že opravljeni na ljudeh, denimo oralna zaščita proti *E. coli* in steklini.

V nedavno objavljenih raziskavah je skupina dr. Jevnikarja (Ma in sod., 2004) objavila uspeh v boju proti diabetesu, in sicer so za zdaj pri miših preprečili pojav diabetesa tipa I, če so miši hranili s transgenim tobakom, ki je vseboval en človeški in en gen glodalcev za sintezo dveh proteinov - avtoantigena hGAD65 in citokina mL-4. Oba proteina, tvorjena v rastlinah, sta bila biološko aktivna, za terapije pri ljudeh pa predvidevajo, da bo potrebno še doseči višjo stopnjo ekspresije in primeren način aplikacije.

### 3.2.4 Odstranitev selekcijskih genov

Precej sodobnih študij je bilo usmerjenih v odstranitev markerskih genov. Kot smo razložili v poglavju 1.3.2.1 markerske gene potrebujemo ob vnosu genov, ker nam olajšajo selekcijo med pozitivnimi in negativnimi regeneranti. Seleksijski geni namreč uničijo netransgene celice ali pa dajejo transformiranim metabolno prednost. Kasneje markerskih genov dejansko ne potrebujemo več. Trenutno jih na trgu dostopne transgene sorte vključujejo, trend novih tržnih aplikacij pa je, tudi glede na zakonodajo v evropski uniji, sprostiti nove sorte, ki bi vsebovale le tarčne gene ne pa tudi markerske gene. Ne glede na dejstvo, da so pomisleki proti uporabi selekcijskih genov znanstveno neutemeljeni, obstaja vrsta praktičnih razlogov, zaradi katerih bi bila odstranitev selekcijskega gena zaželena. Med njimi so denimo drag postopek preverjanja sprejemljivosti vnešenega gena, odstranitev več kopij istega promotorja in nenazadnje možnost ponovne transformacije rastlin z dodatnimi genskimi konstrukti.

Najpreprostejša rešitev je, da markerskih genov niti ne vključujemo v konstrukt, torej da dosežemo transformacijo brez uporabe selekcijskega gena. Ta možnost dejansko že obstoja pri tistih vrstah rastlin, kjer je sam postopek

genske transformacije tako razvit, da denimo transgeni predstavljajo 5 in več odstotkov vseh regenerantov. Pozitivne regenerante prepoznamo kar z genskimi testi. Pri večini vrst vsaj za zdaj ta pristop ni mogoč, ker je število pozitivnih regenerantov premajhno.

Novе strategije torej temeljijo na odstranitvi že vnešenega gena. V zadnjih letih je bilo razvitih kar več alternativnih možnosti. Naj kratko opišemo le nekatere med njimi. Prvi (Lu in sod., 2001) temelji na konstrukt, vnešenem v agrobakterijev binarni vektor, katerega T-DNK ima na eni strani dvoje desnih mejnih sekvenc, ki jima sledi dvoje T-DNA sekvenc s selekcijskim genom, ponovljena desna mejna sekvenca, tarčni gen ter leva mejna sekvenca. Če pridobimo večje število regenerantov, je na ta način možno med potomci odbrati take, ki imajo vnešena oba gena (selekcijski in tarčni gen) ter take, pri katerih je zaradi segregacije ostal le tarčni gen.

Zuo in sod. (2001) so opisali sistem eliminacije vnešenih genov, ki temelji na principu inducibilne mestno specifične rekombinaze, danes poznan po oznaki *cre/lox* sistem. Rekombinaze (Cre, Flp, R) so encimi, ki jih poznamo pri prokariontih in nižjih eukariontih in so zmožne sprožiti mestno specifično rekombinacijo na določenih tarčnih mestih. Denimo rekombinaza Cre prepozna 34 baznih parov dolgo sekvenco imenovano *loxP*. Na kompleksu, sestavljenem iz dveh *lox* sekvenc v istosmernem zaporedju, pride do izreza DNK vnešene med ti dve mesti. Gen za rekombinazo (ki se tudi izreže) običajno reguliramo s promotorjem, ki se izrazi ob določenem kemičnem dražljaju. Sistem je bil razvit pri kvasovkah in tkivih sesalcev, z modifikacijami pa je uporaben tudi pri rastlinah in omogoča eliminacijo tako jedrnih kot plastidnih transgenov.

Sistemov, ki uporabljajo inducibilne promotorje in rekombinaze, je več, najbolj poznan je sistem CLX (Cre/*loxP* DNA izrez). V tem primeru je inducibilni promotor tako imenovan XVE hibridni transaktivator, ki se aktivira v prisotnosti beta estradiola. Dve transkripcijski enoti, potrebni za delovanje rekombinaze, in selekcijski gen so vnešeni med *loxP* mesta, delovanje rekombinaze pa izzovemo z beta-estradiolom. Genetsko gledano je v *cre* genu potreben še intron, ki preprečuje delovanje v *E. coli* – sicer bi se vnešeni geni lahko izrezali že v bakterijah. Kot kaže je bilo možno z opisanim kompleksnim sistemom doseči za zdaj najuspešnejšo odstranitev nezaželenih genov, saj poročajo o odstotku odstranitve genov iz meristemskih celic z 29-66% učinkovitostjo. Sistem ne zahteva dodatnih križanj in selekcije v naslednjih generacijah.



### 3.2.5 Nove kmetijstvu pomembne lastnosti

Med novimi lastnostmi, ki jih prinaša tretja generacija transgenih poljščin, omenjajo zlasti odpornost na mraz, sušo, slana tla ter spremenjen habitus rastlin, spremenjen čas cvetenja, izboljšano kvaliteto semen, njihovo velikost in število, izboljšano fotosintetično učinkovitost, izboljšano asimilacijo hranil ter izrabo heteroze in apomiksisa pri samoprašnicah.

#### 3.2.5.1 Modificirana rast

Odkritje genov za nizko rast je bilo eno od ključnih elementov »zelene revolucije«, znižanje pšenice ali riža je omogočilo bistveno višje pridelke in preprečilo poganje na dodatno pognojnih zemljiščih. Prav v zadnjih letih je bilo opravljenih več genetskih študij, v katerih so bili geni za nizko rast tudi izolirani in poskusno vnešeni v različne vrste žit. Sakamoto in sod. (2003) (referenca manjka) so denimo raziskali več različnih genov, ki so vključeni v delovanje rastlinskih hormonov giberelinov, ki uravnavajo višino rasti riža. Modifikacija izražanja giberelinov lahko poleg nizke rasti vpliva tudi na slabo fertilnost in nizek pridelek. Šele ustrezna kombinacija močnega promotorja in ustreznega gena (*Act:OsGA2ox1*) je rezultirala z genotipom riža ustrezno nizke rasti ter neprizadete fertilnosti. Zanimivo je bilo tudi denimo odkritje učinka regulacije giberelinov pri vinski trti. Boss in Thomas (2002) sta denimo poročala o pritlikavi sorti pinoja, kjer mutirani gen *VvGAI1* povzroča tudi nastanek grozdov na celotni dolžini vejice in ne ob prvih listih, kot nastajajo na nemodificirani sorti.

#### 3.2.5.2 Odpornost na zmrzal, sušo, slana tla, senčenje

Številne raziskave so tako pri klasičnem žlahtnjenju kot v biotehnoloških aplikacijah usmerjene tudi v lažje premagovanje stresnih abiotičnih dejavnikov, kakršni so zmrzal, dolgotrajna suša, rast na slanih tleh, učinkovitost fotosinteze in druge dejavnike. Od tovrstnih raziskav si lahko obetamo tudi povsem nove možnosti, denimo odpravo stalnih pomladanskih pozeb sadnih rastlin ali lažje premoščanje klimatskih sprememb (vročina, suša). Rastlinske vrste so zelo različno odporne na premoščanje abiotičnih stresov, v času, ko denimo cveti dren, so zmrzali običajne, vendar ne pozebe, podobno tudi številne rastline bistveno lažje premoščajo sušo in podobne neugodne dejavnike. Podrobna študija genov, ki obstojajo pri tovrstnih rastlinah, nas torej lahko privede do izolacije ustreznih genov in vključitve v tarčne kmetijske rastline.

Naj navedemo le nekaj tovrstnih študij. V obsežni analizi funkcije genov testne rastline repnjakovca (preko 155.000 cDNK klonov) so Shinozaki in sod. (2003) poročali o analizi ekspresije teh genov pod vplivom suše, mraza in visoke vsebnosti soli. Gene, ki so se izrazili ob stresih, so izolirali in preizkušali kako delujejo, če so prekomerno izraženi. Kot najperspektivnejši

posamičen gen so izolirali gen DREB1A, ki je prekomerno izražen povzročil zvišano izražanje reguliranih genov tudi v nestresnih pogojih in s tem izzvano odpornost tako na zmrzal kot na sušo. Odpornost na visoke temperature so (Murakami in sod. 2000) dosegli z utišanjem gena za tvorbo trienočnih maščobnih kislin, ki so močno izražene pri rastlinah, ki rastejo pri nižjih temperaturah. Transgen tobak je bolje rasel pri višji temperaturi. Prekomerno izražanje gena, ki regulira transport natrijevih ionov, pa je v testnem repnjakovcu omogočilo zvišano odpornost na slana tla (Apse in sod. 1999, v referencah je 2000).

Song in Kim (2003) sta proučevala regulacijo fiziološko dobro proučenega sistema odzivanja na svetlobo, ki je reguliran s fitokromi. Ti pigmenti zaznavajo svetlobo oziroma temo in temu prilagodijo rast. Prekomerno izražanje citokroma P450 izzvanega z vključitvijo gena Pra2 iz graha je v repnjakovcu izzvalo rast hipokotila tudi v neobičajnih svetlobnih pogojih. Vključitev tega gena v trave, uporabljane na športnih igriščih, pa je pripomogla k primernejši rasti tudi sicer zasenčenih rastlin, od česar si obetajo manjšo potrebo po košnji in zalivanju.

### 3.2.5.3 Odstranjevanje nezaželenih snovi

Že prva generacija transgenih poljščin je vključevala preprečitev delovanja nekaterih nezaželenih genov. Poleg zvišanja zaželenih snovi, denimo makro- ali mikronutrientov, je prav z metodami genskega inženiringa mnogokrat prvič omogočeno znižanje ali popolna izključitev vsebnosti določenih nezaželenih snovi.

Metodološko je potrebno pojasniti nekaj načinov, s katerimi je mogoče obstoječe gene utišati oziroma izključiti nastanek nezaželenih produktov. Prvotno je bil najučinkovitejši pristop za izključitev (utišanje) genov transformacija s protismiselno verigo DNK tarčnega gena. Protismiselni gen kodira mRNA, ki hibridizira s tarčno RNA in jo na ta način blokira. S to danes že nekoliko manj uspešno metodo je bilo doseženih precej uspehov, denimo tudi prvi komercialni transgeni rastlinski proizvod - paradižnik - je dosegel počasnjeno dozorevanje z vnešenim protismiselnim genom za poligalakturonazo. Podobnih aplikacij je mnogo, novozelandska skupina (CD Eady in sod., osebna informacija) pravkar preizkuša čebulo z utišano aliinazo, to je encimom, odgovornim za soljenje ob rezanju čebule.

V zadnjih letih pa je bil odkrit povsem nov princip delovanja, ki je prisoten pri rastlinah, živalih in glivah ter ga opišemo z interferenčno RNA ali RNAi. Višji organizmi imajo najverjetneje za obrambo pred virusi razvit mehanizem prepoznavanja dvoverižne RNA. Pojav dvoverižne RNA v citoplazmi sproži celični mehanizem, ki jo prepozna, razreže na kratke 21-23 baznih parov dolge odseke in razgradi. Ključnega pomena pri tem mehanizmu pa je nepričakovano odkritje, da celični mehanizmi po prepoznavanju teh kratkih odsekov poiščejo tudi enaka mesta vseh ostalih tudi enoverižnih RNA

molekul ter jih tudi razgradijo. Z genskim inženiringom je seveda možno namenoma konstruirati nastanek dvoverižne RNA (denimo s konstruktom, ki vsebuje insert gena v smiselni in protismiselni obliki, kar tvori po prepisu mRNA zanko, torej dvojnoverižno RNA). Prav na principu RNAi temelječe utišanje genov se je pokazalo kot bistveno bolj učinkovit mehanizem, ki je hkrati tudi izjemno tarčno specifičen. Kot praktično aplikacijo si lahko obetamo izključevanje številnih nezaželenih genov, denimo genov, ki povzročajo alergije (žita, arašidi, jagode, kivi) ali genov, ki sprožajo predčasno venenje, nezaželeno rast itd. Loerz in sod. (2003) so že uspeli z uporabo RNAi tehnike bistveno znižati tvorbo enega od gliadinov v pšenici, klinične študije primernosti take pšenice za bolnike s celiakijo pravkar potekajo. Drug namen RNAi metode je lahko tudi obramba rastlin pred virusi, denimo Pooggin in sod. 2003 so poročali o učinkovitosti uporabe RNAi strategije v preprečitvi okužbe z rastlinskimi virusi, katerih dednina je sestavljena iz DNK molekul.

Zelo zanimiva aplikacija zavrte ekspresije gena se denimo obeta pri kavi ali čaju, kajti geni, odgovorni za sintezo kofeina, so bili podrobno raziskani (Kato in sod. 2000). Brezkofeinska kava je sicer že dalj časa na tržišču, vendar so zlasti v ZDA določene polemike, vezane s kemijskim načinom ekstrakcije, ki zdravstveno ni nesporen, mnoge potencialne potrošnike odvrnile od uživanja tovrstnega napitka. Brezkofeinska kava torej ne bi potrebovala kemijskega postopka za izločanje kofeina ter bi lahko bila bistveno sprejemljivejša.

#### 3.2.5.4 Odpornost na glivične bolezni

S področja zaščite rastlin pred boleznimi in škodljivci vemo, da je prva generacija transgenih poljščin vključevala zlasti gene za odpornost na virusne bolezni in insekte. To je sicer zelo pomembno področje, ki povzroča kmetijstvu zelo veliko škodo ter nenazadnje škoduje tudi okolju, vendar so škode vseeno manjše od tistih, ki jih denimo v Sloveniji povzročajo glivične bolezni. Kar nekaj kmetijskih rastlin brez uporabe fungicidov sploh ni možno pridelovati, npr. vinske trte. V zadnjih letih je bil dosežen velik napredek pri izolaciji genov, ki omogočajo zaščito rastlin pred škodljivci.

Možne načine genskega reguliranja odpornosti na glivične bolezni je Punja (2001) razčlenil v pet kategorij:

- Izražanje genov, katerih produkti so za patogene neposredno toksični, denimo proteini za zaviranje patogeneze, hidrolitski encimi, protiglivični proteini, antimikrobni peptidi, inaktivatorji ribosomov in fitoaleksini.
- Izražanje genskih produktov, ki uničijo ali nevtralizirajo komponento patogena kot denimo poligalakturonaza.
- Izražanje genov, ki okrepijo strukturno obrambo rastlin, denimo zvišan nivo peroksidaz in lignina.
- Izražanje genskih produktov, ki signalizirajo regulacijo obrambnih mehanizmov, denimo elicitorjev kot so salicilna kislina, etilen in vodikov peroksid.

- Izražanje genov odpornosti (R genov) odgovornih za hipersenzitivnostno reakcijo ali za interakcijo z avirulentnimi faktorji.

Pristopi ter raziskani geni se močno razlikujejo. Samo vnos genov za tvorbo hidrolitičnih encimov je bil denimo izveden pri 19 različnih rastlinskih vrstah, vključeval pa je različne rastlinske hitinaze in glukanaže. Ekspresijo proteinov, povezanih s patogenezo, so proučevali v 7 različnih rastlinskih vrstah, denimo grahovo hitinazo izraženo v ogrščici. Izražanje antimikrobnih proteinov ali peptidov so proučevali v osmih ter fitoaleksinov v šestih različnih rastlinskih vrstah z zelo velikim naborom (> 24) različnih genov. Zaviranje virulence je bilo testirano v štirih rastlinskih vrstah, strukturna obramba v treh in regulacija rastlinskih obrambnih mehanizmov v petih rastlinskih vrstah. Tri raziskave so uporabile tudi kombiniran vnos dveh različnih genov hitinaze in glukanaže v proučevane rastline z namenom trajnejše zaščite odpornosti.

Za ilustracijo navedimo nekaj konkretnih raziskav. Osusky in sod. (2000) so poročali o transformaciji krompirja s sintetičnim genom (*MsrA1*), ki je kodiral kratek cekropin-melitin kationski peptid. Krompir je bil odporen na kar tri pomembne bolezni, in sicer na dve glivični bolezni fitoftoro in fuzariozo ter na bakterijsko bolezen ervinijo. O drugem uspehu, s katerim je bila dosežena zelo učinkovita zaščita krompirja pred fitoftoro, pa so poročali nedavno (Song in sod. 2003), le da so v tem primeru tarčni gen izolirali iz divje v Mehiki rastoče krompirju sorodne vrste (*Solanum bulbocastanum*). Fitoftora je najnevarnejša bolezen krompirja, ki je v preteklosti povzročila tudi veliko lakoto v Evropi, tudi med sodobnimi kultivarji pa povsem odpornih na to bolezen še ne poznamo.

Nekaterih glivičnih bolezni ne moremo uspešno tretirati s fungicidi in jih zato obravnavamo kot karantenske bolezni, kjer lahko le z zadrževanjem vnosa preprečimo veliko škodo. Taka glivična bolezen je denimo *Verticillium*, ki tudi pri nas povzroča veliko škodo mnogim vrstam. O uspešni determinaciji gena *Ve*, izoliranega iz divjega sorodnika paradižnika (*Solanum lycopersicoides*) poročajo Chai in sod. (2003).

Kaj si torej lahko obetamo od tega sklopa raziskav? Zlasti reševanje tistih žlahtniteljskih problemov, ki jih z dosednjimi pristopi kljub večjim žlahtniteljskim prizadevanjem nismo uspeli rešiti. Morda najpomembnejša dilema je nujnost hkratnega vnosa, ne le enega, ampak več genov za odpornost, kar so denimo priporočali že leta 1991 na konferenci »Žlahtnjenje rastlin v devetdesetih« (Severna Karolina, ZDA). Vnos enega samega gena namreč lahko vodi do pojava rezistence, podobno kot to velja za pristope klasičnega žlahtnjenja ali za uporabo le ene vrste fungicida. Z vnosom več genov je možno pričakovati trajnostno odpornost proti določenemu patogenu.

### 3.2.6 Rastlinski produkti kot sodobni biomateriali

Posebno poglavje transgenih rastlin predstavljajo proizvodi, ki so povsem nov rastlinski produkt in so namenjeni neprehrambenim izdelkom. Imenujemo jih novi biomateriali, njihov namen pa je proizvodnja najrazličnejših polimerov, ki lahko nadomestijo sedanje sintetične plastične materiale, vlaknine in elastomere, do sedaj pridobivane iz nafte. Prednost je očitna, saj novi biomateriali obetajo obnovljivost, trajnost in biorazgradljivost.

Največ raziskav biomaterialov je bilo opravljenih z dvema skupinama materialov, z biomateriali na osnovi proteinov in polihidroksialkanotov. Prednost uporabe specifičnih beljakovin kot polimernih materialov je povzeta po uporabi v živem svetu. Nekatere morske živali, denimo školjke, tvorijo močna lepiva, z nenavadnimi lastnostmi – npr. čvrstim pritrtilnim mestom in elastičnim nasprotnim koncem. Številne žuželke tvorijo niti, najbolj poznamo sviloprejke in pajke. Pajčevina je močnejša od jekla in ima podobno moč kot kevlar, le da je mnogo bolj raztegljiva. Aminokislinska sestava številnih proteinov, ki sestavljajo biološke niti je dobro raziskana, ekspresija tarčnih genov v bakterijah pa je problematična zaradi neustrezne podpore celičnih sistemov, potrebnih za sintezo neobičajne sestave proteinov. Uspešnejša je bila poskusna proizvodnja v kvasovkah, uspel pa je že tudi vnos genov za sintezo pajčje niti v tobak in krompir (Scheller in sod. 2001). Nastajali so do 100 kDa veliki proteini, ki jih je bilo mogoče enostavno ekstrahirati, oblikovanje niti pa še ni uspelo. Podobne študije potekajo tudi za sintezo elastina, sestavine ligamentov.

Posebej obetavne so študije polihidroksialkanoatov (PHA), poliestrov hidroksi kislin. V naravi jih tvorijo številne bakterije kot založni vir ogljika in energije. (Moire in sod., 2003). PHA-ji se uporabljajo v medicini kot biorazgradljivi elementi (inplantati, gaze), vendar je njihova sinteza v bakterijah draga. Sintezne poti v rastlinah so zato možnost cenejšega vira PHA, za zdaj je uspela proizvodnja v repnjakovcu in redkvi (Slater in sod., 1999, Mittendorf in sod., 1999).

### 3.3 Viri

- Agius F, Gonzalez-Lamothe R, Caballero JL, Munoz-Blanco J, Botella MA, Valpuesta V(2003)Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology* 21: 177-181
- Al-Babili S, Ye XD, Lucca P, Potrykus I, Beyer P (2001)Biosynthesis of beta-carotene (provitamin A) in rice endosperm achieved by genetic engineering. V: *Rice Biotechnology: Improving Yield, Stress Tolerance and Grain Quality* Novartis Foundation Symposium 236: 219-232
- Alibhai M, Astwood J, Joyces E, Pershing J, Sampson H, Purcell J (2000) Re-engineering patatin (Sol t 1) protein to eliminate IgE binding. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105: 239, Part 2, Suppl. S

- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (2000) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in Arabidopsis. *Science* 285: 1256-1258
- Barro F, Barcelo P, Lazzeri PA, Shewry PR, Ballesteros J, Martin A (2003) Functional properties of flours from field grown transgenic wheat lines expressing the HMW glutenin subunit 1Ax1 and 1Dx5 genes. *Molecular Breeding* 12: 223-229
- Barro F, Rooke L, Bekes F, Gras P, Tatham AS, Fido R, Lazzeri PA, Shewry PR, Barcelo P (1997) Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. *Nature Biotechnol* 15: 1295-1299
- Beyer P, Al-Babili S, Ye XD, Lucca P, Schaub P, Welsch R, Potrykus I (2002) Golden rice: Introducing the beta-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *Journal of Nutrition* 132: 506S-510S
- Boss PK, Thomas MR (2002) Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature* 416: 847-850
- Bovy A, de Vos R, Kemper M, Schijlen E, Pertejo MA, Muir S, Collins G, Robinson S, Verhoeyen M, Hughes S, Santos-Buelga C, van Tunen (2002) High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes LC and C1. *Plant Cell* 14: 2509-2526
- Brimmer TA, Gallivan GJ, Gerald R, Stephenson GR (2004) Influence of herbicide-resistant canola on the environmental impact of weed management. *Pest Management Science*, online September 2004
- Buchanan BB, Adamidi C, Lozano RM, Yee BC, Momma M, Kobrehel K, Ermel R (1997) Thioredoxin-linked mitigation of allergic responses to wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 5372-5377
- Cahoon EB, Hall SE, Ripp KG, Ganzke TS, Hitz WD, Coughlan SJ (2003) Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nature Biotechnology* 21: 1082-1087
- Chai YR, Zhao LX, Liao ZH, Sun XF, Zuo KJ, Zhang L, Wang SG, Tang KX (2003) Molecular cloning of a potential *Verticillium dahliae* resistance gene SIVe1 with multi-site polyadenylation from *Solanum lycopersoides*. *DNA SEQUENCE* 14: 375-384
- Chong DKX, Roberts W, Arakawa T, Illes K, Bagi G, Slattery CW, Langridge WHR (1997) Expression of the human milk protein beta-casein in transgenic potato plants. *Transgenic Research* 6: 289-296
- Cockburn A (2004) Commercial plant breeding: What is in the biotech pipeline? *Journal of commercial biotechnology* 10: 209-233
- Coghian A (2003) "protato" to feed Indian's poor. *New Scientist* 177 (2376):7
- Davis JP, Supatcharee N, Khandelwal RL, Chibbar RN (2003) Synthesis of novel starches in planta: Opportunities and challenges. *Starch-Starke* 55: 107-120

- DeCosa B, Moar W, Lee SB, Miller M, Daniell H (2001) Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nature Biotechnology* 19: 71-74
- Dehesh K (2002) Nucleic acid sequences encoding beta-ketoacyl-ACP synthase and uses thereof. Patent application WO 02/08403
- Dehesh K, Jones A, Knutzon DS, Voelker TA (1996) Production of high levels of 8:0 and 10:0 fatty acids in transgenic canola by overexpression of Ch FatB2, a thioesterase cDNA from *Cuphea hookeriana*. *Plant Journal* 9: 167-172
- Dhavan V (2001) Biotechnology and the promise for control of vitamin A deficiency. Presentation at the XX meeting of the International Vitamin A Consultative Group, Feb. 15, Vietnam
- European Commission (2000) Communication from the Commission on the Precautinary Approach/Principle. COM, Brussels, 2. February 2000, P. 1
- Facciotti MT, Bertain PB, Yuan L (1999) Improved stearate phenotype in transgenic canola expressing a modified acyl-acyl carrier protein thioesterase. *Nature Biotechnol* 17: 593-597
- Fisher R, Kim SH, Cho JM, Pennarubia L, Giovannoni L, Kim R (1998) Endogeneously sweetened transgenic plant products. US patent 5,739,409
- Fraley TR (2002) Improving the nutritional quality of plants. V. IK Vasil (ur.) *Plant Biotechnology 2002 and Beyond*, s. 61-68
- Fraser PD, Romer S, Kiano JW, Shipton CA, Mills PB, Drake R, Schuch W, Bramley PM (2001) Elevation of carotenoids in tomato by genetic manipulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 822-827
- Froman B, Ursin V (2002) Genetic modification of oils for improved health benefits: production of long omega-3 fatty acids in plants. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc* 233: 031-AGFD Part 1
- Galili G, Galili S, Lewinsohn E, Tadmor Y (2002) Genetic, molecular, and genomic approaches to improve the value of plant foods and feeds *Critical Reviews In Plant Sciences* 21: 167-204
- Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, Toki S, Takaiwa F (1999) Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene *Nature Biotechnology* 17: 282-286
- Grusak MA (2002) Enhancing mineral content in plant food products. *Journal Of The American College Of Nutrition* 21: 178S-183S, Suppl. S
- Hagan ND, Tabe LM, Molvig L, Higgins TJV (2002) Modifying the amino acid composition of grains using gene technology. V: IK Vasil (Ur.) *Plant Biotechnology 2002 and Beyond*, 305-308
- Hellwege EM, Czaplá S, Jahnke A, Willmitzer L, Heyer AG (2000) Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (15): 8699-8704
- Hoa TTC, Al-Babili S, Schaub P, Potrykus I, Beyer P (2003) Golden indica and Japonica rice lines amenable to deregulation. *Plant Physiology* 133 (1): 161-169
- Jain AK, Nessler CL (2000) Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants. *Molecular Breeding* 6: 73-78

- Jobling, SA, Westcott RJ, Schwell GP, Martin CR, Edwards EA, Smith AM. (2004) Plants and plant products. United States Patent Application 20040025204 A1
- Jung R, Kinney A (2001) Hypoallergenic transgenic soybeans. World Intellectual Property Organization. WO 01/6887 A2
- Jung W, Yu O, Lau SMC, O'Keefe DP, Odell J, Fader G, McGonigle B (2000) Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nature Biotechnology* 18: 208-212
- Kato M, Mizuno K, Crozier A, Fujimura T, Ashihara H (2000) Plant biotechnology - Caffeine synthase gene from tea leaves. *Nature* 406: 956-957
- Kinney AJ (1997) Genetic engineering of oilseeds for desired traits. *V JK Setlow, (Ur.) Genetic engineering*, 19: 149-166
- Kok-Jacon GA, Ji Q, Vincken JP, Visser RGF (2003) Towards a more versatile alpha-glucan biosynthesis in plants. *Journal of Plant Physiology* 160: 765-777
- Liu Q, Singh S, Green A (2002) High-oleic and high-stearic cottonseed oils: Nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing. *Journal of the American College of Nutrition* 21: 205S-211S, Suppl. S
- Loerz H, Kranz E, Scholten S, Girgi M, Becker D (2003) From single cell to transgenic crops. *V: T. Adachi (Ur.) Proceedings of the International colloquium on Plant Biotechnology, Osaka, Japan*, s. 5-6
- Lonnerdal B (2002) Expression of human milk proteins in plants. *Journal of the American College of Nutrition* 21: 218S-221S, Suppl. S
- Lonnerdal B (2003) Genetically modified plants for improved trace element nutrition. *Journal of Nutrition* 133 (5): 1490S-1493S, Suppl. 1
- Lu HJ, Zhou XR, Gong ZX, Upadhyaya NM (2001) Generation of selectable marker-free transgenic rice using double right-border (DRB) binary vectors. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 241-248
- Lucca P, Hurrell R, Potrykus I (2002) *Journal of the American College of Nutrition Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice* 21: 184S-190S
- Ma S, Huang Y, Yin ZQ, Menassa R, Brandle JE, Jevnikar AM (2004) Induction of oral tolerance to prevent diabetes with transgenic plants requires glutamic acid decarboxylase (GAD) and IL-4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 5680-5685
- Mallory AC, Parks G, Endres MW, Baulcombe D, Bowman LH, Pruss GJ, Vance VB (2002) The amplicon-plus system for high-level expression of transgenes in plants *Nature Biotechnology* 20: 622-625
- Mittendorf V, Bongcam V, Allenbach L, Coullerez G, Martini N, Poirier Y (1999) Polyhydroxyalkanoate synthesis in transgenic plants as a new tool to study carbon flow through beta-oxidation *Plant Journal* 20: 45-55
- Moire L, Rezzonico E, Poirier Y (2003) Synthesis of novel biomaterials in plants. *Journal of Plant Physiology* 160: 831-839
- Momma K, Hashimoto W, Yoon HJ, Ozawa S, Fukuda Y, Kawai S, Takaiwa F, Utsumi S, Murata K (2000) Safety assessment of rice genetically modified with soybean glycinin by feeding studies on rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 64: 1881-1886



- Muir SR, Collins GJ, Robinson S, Hughes S, Bovy A, De Vos CHR, van Tunen AJ, Verhoeyen ME (2001) Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nature Biotechnology* 19: 470-474
- Murakami Y, Michito Tsuyama, Yoshichika Kobayashi, Hiroaki Kodama, Koh Iba (2000) Trienoic Fatty Acids and Plant Tolerance of High Temperature. *Science* 287: 476-479
- Neff WE, List GR (1999) Oxidative stability of natural and randomized high-palmitic- and high-stearic-acid oils from genetically modified soybean varieties  
*Journal of the American Oil Chemists Society* 76: 825-831
- O'Quinn PR, Nelsens JL, Goodband RD, Knabe DA, Woodworth JC, Tokach RD, Lohrmann TT (2000) Nutritional value of a genetically improved high-lysine, high-oil corn for young pigs. *Journal Of Animal Science* 78: 2144-2149
- Osusky M, Zhou GQ, Osuska L, Hancock RE, Kay WW, Misra S (2000) Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nature Biotechnology* 18: 1162-1166
- Prakash CS, Egnin M, Jaynes J (2000) Increasing the protein content in sweet potato using a synthetic storage protein gene. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 219: 69-AGFD, Part 1
- Punja ZK (2001) Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens - a review of progress and future prospects. *Canadian Journal of Plant Pathology*.23: 216-235
- Rabjohn P, West CM, Connaughton C, Sampson HA, Helm RM, Burks AW, Bannon GA (2002) Modification of peanut allergen Ara h 3: Effects on IgE binding and T cell stimulation. *International Archives of Allergy And Immunology* 128: 15-23
- Ritsema T, Smeekens SCM (2003) Engineering fructan metabolism in plants. *Journal of Plant Physiology* 160: 811-820
- Rocheford TR, Wong JC, Egesel CO, Lambert RJ (2002) Enhancement of vitamin E levels in corn *Journal of The American College of Nutrition* 21: 191S-198S, Suppl. S
- Romer S, Fraser PD, Kiano JW, Shipton CA, Misawa N, Schuch W, Bramley PM (2000) Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. *Nature Biotechnology* 18: 666-669
- Romer S, Lubeck J, Kauder F, Steiger S, Adomat C, Sandmann G (2002) Genetic engineering of a zeaxanthin-rich potato by antisense inactivation and co-suppression of carotenoid epoxidation *Metabolic Engineering* 4: 263-272
- Roshni A. Mehta, Tatiana Cassol, Ning Li, Nasreen Ali, Avtar K. Handa, Autar K. Mattoo (2002) Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life *Nature Biotechnology* 20, 613 – 618
- Scheller J, Guhrs KH, Grosse F, Conrad U (2001) Production of spider silk proteins in tobacco and potato *Nature Biotechnology* 19: 573-577

- Sevenier R, Hall RD, van der Meer IM, Hakkert HJC, van Tunen AJ, Koops AJ (1998) High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet. *Nature Biotechnology* 16: 843-846
- Sevenier R, van der Meer IM, Bino R, Koops AJ (2002) Increased production of nutriment by genetically engineered crops. *Journal of the American College of Nutrition* 21: 199S-204S, Suppl. S
- Shimada H, Tada Y, Kawasaki T, Fujimura T (1993) Antisense regulation of the rice waxy gene-expression using a pcr-amplified fragment of the rice genome reduces the amylose content in grain starch. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 665-672
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Molecular mechanisms of plant response and tolerance of drought and cold stress. V: IK Vasil (ur.) *Plant Biotechnology 2002 and Beyond*, s. 31-37
- Slater S, Mitsky TA, Houmiel KL, Hao M, Reiser SE, Taylor NB, Tran M, Valentin HE, Rodriguez DJ, Stone DA, Padgett SR, Kishore G, Gruys KJ (1999) Metabolic engineering of *Arabidopsis* and *Brassica* for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production. *Nature Biotechnology* 17: 1011-1016
- Smirnoff N (2003) Identification and manipulation of a new enzyme from strawberry demonstrates the feasibility of engineering vitamin C synthesis in plants. *Nature Biotechnology* 21: 134-136
- Song JQ, Bradeen JM, Naess SK, Raasch JA, Wielgus SM, Haberland GT, Liu J, Kuang HH, Austin-Phillips S, Buell CR, Helgeson JP, Jiang JM (2003) Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 100: 9128-9133
- Song PS, Kim YS (2003) Generating stress (shade and disease)-tolerant lawn grass and hot pepper. PS Song & YS Kim: T. Adachi (Ur.) *Proceedings of the International colloquium on Plant Biotechnology*, Osaka, Japan, s. 105-108
- Streatfield SJ, Howard JA (2003) Plant-based vaccines. *International Journal for Parasitology* 33: 479-493
- United Nations (1992) Rio Declaration on Environment and Development. UN Doc. A/CONF.151/5/rev. 1. United Nations, New York.
- Vageeshbabu HS, Chopra VL (1997) Genetic and biotechnological approaches for reducing glucosinolates from rapeseed-mustard meal. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 6: 53-62
- Venkatramesh HS, Chopra VL (2000) Transgenic plants containing altered levels of sterol compounds and tocopherols. *International Patent Publication No. WO 00/61771* 19. Okt. 2000
- Vijn I, vanDijken A, Sprenger N, vanDun K, Weisbeek P, Wiemken A, Smeekens S (1997) Fructan of the inulin neoseries is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L) harbouring onion (*Allium cepa* L) fructan:fructan 6G-fructosyltransferase. *Plant Journal* 11: 387-398
- Visser RGF, Suurs LCJM, Bruinenberg PM, Bleeker I, Jacobsen E (1997) Comparison between amylose-free and amylose containing potato starches *Starch* 49 (11): 438-443

- Visser RGF, Suurs LCJM, Steeneken PAM, Jacobsen E (1997) Some physicochemical properties of amylose-free potato starch *Starch* 49: 443-448
- Voelker T (1997) Transgenic manipulation of edible oilseeds. V: T Johns in JT Romeo (Ur.) *Functionality of Food Phytomedicals*, Plenum Publication Corporation, New York NY
- Zuo JR, Niu QW, Moller SG, Chua NH (2001) Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nature Biotechnology* 19: 157-161