

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“-Скопје
Природно-математички факултет
Институт за биологија

Лабораторија за растителни *in vitro* култури

ГЕНЕТСКИ МОДИФИЦИРАНИ ОРГАНИЗМИ (интерна скрипта)



д-р Оливер Тушевски
д-р Соња Гацовска-Симиќ

Скопје, 2020

СОДРЖИНА:

1. МЕТОДИ ЗА ДОБИВАЊЕ НА ТРАНСГЕНИ РАСТЕНИЈА	1
1.1 Основни компоненти за успешен трансфер на гени во растителна клетка	1
1.1.1 Процес на трансформација	1
1.1.2 Трансфер на DNA	1
1.1.3 Целни растителни ткива	2
1.1.4 Селекција и регенерација	3
1.2 <i>Agrobacterium</i>	4
1.2.1 Формирање на туморно ткиво кај растенија под дејство на <i>Agrobacterium</i>	4
1.2.2 Примена на T-DNA трансфер за трансформација на растенија	6
1.2.3 Оптимизирање на процесот на DNA-трансфер кај растителните клетки	8
1.2.4 Агроинфилтрација	9
1.2.5 Потопување на цветови од <i>Arabidopsis</i> (<i>Arabidopsis</i> Floral Dip)	9
1.3 Бомбардирање со партикули	10
1.3.1 Историски развој на бомбардирање со партикули	10
1.3.2 Ефекти на интродуцирана DNA во растителниот геном	12
1.3.3 Предности и недостатоци на директната интродукција на DNA	13
1.3.4 Подобрувања во експресијата на трансгени	14
1.4 Други методи на трансформација	15
1.4.1 Протопласти	15
1.4.2 Електропорација	16
1.4.3 Кристали од силициум карбид	16
1.4.4 Вирусни вектори	17
1.4.5 Ласерска микропунктура	17
1.4.6 Низи од нановлакна	17
1.5 Критериуми за потврдување на генетската трансформација на растенија	18
2. РЕКОМБИНАНТНА DNA ТЕХНОЛОГИЈА: КОНСТРУКЦИЈА И ДИЗАЈН НА ВЕКТОРИ	21
2.1 Модификација на DNA	21
2.2 DNA вектори	25
2.2.1 DNA вектори за трансформација на растенија	27
2.2.2 Компоненти за ефикасна генска експресија кај растенија	30
2.3 Клонирање со примена на рекомбинација на DNA специфична за позиција	32
2.4 Дизајн на вектори	36
2.4.1 Вектори за функционална анализа	36
2.4.2 Вектори за RNA интерференција (RNAi)	38

2.4.3 Вектори кои потекнуваат од растителни секвенци	39
2.4.4 Вектори за мултигенски особини	40
2.5 Таргетиран инсерции на трансген	43
2.6 Безбедност при дизајн на вектори	43
3. ГЕНИ ОД ИНТЕРЕС КАЈ ТРАНСГЕНИ РАСТЕНИЈА	46
3.1 Идентификација на гени од интерес преку геномски студии	46
3.2 Особини од интерес за зголемување на приносот кај растенијата	48
3.2.1 Резистентност кон хербициди	48
3.2.2 Резистентност кон инсекти	52
3.2.3 Резистентност кон патогени организми	54
3.3 Особини за подобрување на растителни производи и квалитет на храна	57
3.3.1 Подобрување на нутритивниот квалитет	58
3.3.2 Модифицирани растителни масла	60
3.3.3 Фармацевтски производи	61
3.3.4 Биогорива	62
4. МАРКЕР ГЕНИ И ПРОМОТОРИ	64
4.1 Дефиниција на маркер гени	64
4.1.1 Селективни маркер гени	64
4.1.2 Репортер гени	68
4.2 Промотори	70
4.3 Типови на селективни маркер гени	73
4.3.1 Кондиционални позитивни селективни маркер гени	73
4.3.1.1 Селекција кон антибиотици	74
4.3.1.2 Селекција кон хербициди	75
4.3.1.3 Селекција со примена на нетоксични метаболички супстрати	75
4.3.2 Некондиционални системи на позитивна селекција	75
4.3.3 Кондиционални системи на негативна селекција	76
4.3.4 Некондиционални системи на негативна селекција	76
4.4 Типови на неселективни маркер гени или репортер гени	77
4.4.1 β -Глукуронидаза	77
4.4.2 Луцифераза	78
4.4.3 Зелен флуоресцентен протеин	79
4.5 Стратегии за ослободување од маркер гени	81
5. АНАЛИЗА НА ТРАНСГЕНИ РАСТЕНИЈА	84
5.1 Директни методи	84
5.2 Иницијален скрининг на потенцијални трансгени растенија	85
5.2.1 Скрининг на селективен медиум	85

5.2.2 Полимеразна верижна реакција (PCR).....	86
5.2.3 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) методи	87
5.3 Крајна молекуларна карактеризација	87
5.3.1 Интеграција на интактен трансген	87
5.3.2 Експресија на трансген преку транскрипција	91
5.3.3 Експресија на трансген преку транслација: Western блотинг анализи	94
5.4 Дигитално фотографирање	95
5.5 Фенотипски анализи	95
6. РЕГУЛАТИВИ И БИОБЕЗБЕДНОСТ НА ТРАНСГЕНИ РАСТЕНИЈА.....	96
6.1 Историски преглед на регулацијата на генетскиот инженеринг	97
6.2 Регулација на генетскиот инженеринг	99
6.2.1 Соединети Американски Држави	99
6.2.2 Европска Унија	102
6.2.3 Канада	103
6.3 Меѓународни перспективи	104
6.4 Недостатоци на регулаторните системи за генетски модифицирани организми	106
7. КОНТРОВЕРЗНОСТ НА ТРАНСГЕНИ РАСТЕНИЈА.....	109
7.1 Перцепција на ризици.....	109
7.2 Одговори кон страв	111
7.3 Студија на случаи	111
7.3.1 Компириите на Pusztai	111
7.3.2 Монарх пеперутки	112
7.4 Колку бенефити се неопходни за едногласно одобрување на генетски модифицираната храна?.....	113
7.5 Континуирани дебати.....	114
7.5.1 Процес или производ?	114
7.5.2 Загриженост за здравјето	115
7.5.3 Загриженост за животната средина	116
7.5.4 Избор на консументи	116
7.6 Бизнис и контрола	116
8. ЛИТЕРАТУРА	118

1. МЕТОДИ ЗА ДОБИВАЊЕ НА ТРАНСГЕНИ РАСТЕНИЈА

Трансгените растенија содржат дополнителни или модифицирани гени кои се интродуцираат во растенијата со примена на физички или биолошки методи. Интродуцираните DNA молекули (трансгени) соодветно се дизајнираат во лабораториски услови пред да се интродуцираат во целни растителни клетки. Постојат различни методи за интродукција на DNA во растителните клетки. Изборот на методите за добивање на трансгени растенија зависи од селектираниот растителен вид. Во текот на изминатиот период се спроведени голем број истражувања за да се развие ефикасна стратегија за интродукција на гени или да се воспостави технологија за генетска трансформација на растенијата. Методите за продукција на трансгени растенија сè уште се развиваат и неопходни се нови методи за трансфер на DNA во растителната клетка.

Иако постојат голем број методи за продукција на трансгени растенија, *Agrobacterium*-посредуваната генетска трансформација и бомбардирањето со партикули се најчесто користените методи во научно-истражувачките лаборатории за генетска трансформација на растенијата. Бактеријата *Agrobacterium* sp. е позната како „природен генетски инженер“ поради присуството на биолошки вектор за интродукција на трансгени кај растенијата. Бомбардирањето со партикули е физички метод за трансфер на DNA кој опфаќа забрзано движење на DNA-обложени метални партикули кон соодветно целно ткиво. Сепак, сите методи за генетска трансформација на растенијата се карактеризираат со одредени предности и недостатоци. Со цел подобро да се разберат предизвиците за добивање на трансгени растенија, неопходни се основни познавања за процесот на DNA трансфер во една целна растителна клетка и можностите за регенерација на цели трансгени растенија од единечна клетка.

1.1 Основни компоненти за успешен трансфер на гени во растителна клетка

1.1.1 Процес на трансформација

Пред да се објават првите студии за успешна продукција на трансгени растенија во средината на 1980-тите години (Horsch и сор., 1985), постоечките методи за подобрување на својствата на растенијата опфаќале класични техники за селекција на растенијата, како што се полова хибридизација и спонтани или индуцирани мутации. Иако методите на селекција претставуваат основа за подобрување на особините, вкрстосувањата на растенијата опфаќале мешање на иладници гени и сортирање на потомството со цел да се селектираат поединечни растенија кои ги поседуваат особините од интерес. Примената на генетскиот инженеринг овозможува интродукција на селектиран единечен ген од интерес во еден растителен организам за да се подобрат некои особини. Основниот концепт на генетскиот инженеринг опфаќа интродукција на единечен ген во единечна растителна клетка и регенерација на цело растение кое ја експресира особината од интерес. Добиеното трансгено растение е идентично како и почетниот растителен материјал со таа разлика што поседува нова или подобрена карактеристика.

1.1.2 Трансфер на DNA

Клеточниот сид, плазмалемата и јадрената мембрана претставуваат главни бариери при трансфер на DNA во растителните клетки. Површината на клеточниот сид може да се прикаже како цврст челичен оклоп изграден од густо распоредени метални влакна кои ги претставуваат целулозните микрофибрили. Всушност, клеточниот сид претставува ригидна структура составена од целулозни микрофибрили кои се вкрстено поврзани со

хемицелулоза, пектин и други молекули. Сепак, клеточниот сид (особено кај младите растителни клетки) покажува одреден степен на флексибилност која овозможува елонгација и движење на клетката. Иако во клеточниот сид постојат голем број отвори, плазмодезмите во овие отвори кои ја поврзуваат цитоплазмата на соседните клетки оневозможуваат отворен пристап за интродукција на DNA. Затоа е неопходно да се изврши физичко пробивање на клеточниот сид со цел да се овозможи трансфер на DNA во внатрешноста на клетката. Истиот принцип треба да се земе во предвид при трансфер на DNA преку цитоплазматската мембрана. Важно е да се напомене дека не треба да се предизвика силно пробивање на клеточниот сид за да спречат иреверзибилни оштетувања на целната клетка. Понекогаш е неопходно да се индуцира одреден степен на оштетување со цел да се обезбеди трансфер на релативно големи DNA молекули во клетката. Исто така, растителните клетки речиси секогаш се наоѓаат во тургоресцентна состојба, односно постои внатрешен притисок на цитоплазмата кон клеточниот сид кој ги одржува растителните клетки во ригидна состојба. Овој тургор притисок може привремено да се редуцира или елиминира преку инкубацијата на растителното ткиво во хипертоничен раствор кој предизвикува плазмолиза на клетките. Притоа, намаленото истекување на цитоплазматската содржина преку отворите на клеточниот сид може да ја зголеми ефикасноста за интродукција на DNA во клетките (Vain и сор., 1993).

Интродукцијата на DNA во клетката е само мал дел од целокупниот процес, бидејќи јадрото претставува крајна дестинација во повеќето случаи на генетска трансформација. Исто така, хлоропластите и митохондриите содржат генетска информација и можат да инкорпорираат DNA молекули независно од јадрениот геном. Сепак, трансформацијата на јадрениот геном има големо значење бидејќи има доминантна улога во продукцијата на трансгени растенија. Физичките методи на трансфер на DNA овозможуваат пренос на DNA молекули во непосредна близина или во внатрешноста на јадрото. При физичкиот трансфер, необложените или голи DNA молекули (интродуцираната DNA е речиси секогаш необложена или незаштитена во споредба со природната хромозомска DNA која е кондензирана и обложена со протеини) вообичаено не преживуваат долг временски период надвор од јадрото. При биолошките методи на генски трансфер, молекулите на DNA се природно обложени со протеини кои ја заштитуваат DNA од деградација и воедно ја насочуваат кон јадрото. Откако интродуцираната DNA ќе доспее во јадрото, природниот систем на растителната клетка за репарација, модификација и репликација на DNA има главна улога во инкорпорација на туѓата DNA во геномот на целната клетка. Нормалното функционирање и експресија на туѓите DNA секвенци во растителното јадро зависи од пристапноста до хромозомската DNA која претставува динамична хроматинска структура. Всушност, хромозомската DNA константно се ослободува од структурните протеини (хистони) и добива декондензирана форма која е достапна за други молекули, а потоа може повторно да се организира во кондензирана форма. Ако туѓата DNA се наоѓа на вистинското место за време на процесот на декондензација, тогаш при кондензацијата може да се инкорпорира во хромозомската DNA. Иако трансформацијата претставува случаен процес, туѓата DNA треба да има соодветна конфигурација и прецизно да се интродуцира, како и да поседува одредена функционалност како ендогена растителна DNA со цел да се задржи во целната клетка.

1.1.3 Целни растителни ткива

За успешна продукција на трансгени растенија неопходно е да се селектираат соодветни целни растителни клетки кои имаат способност за раст и диференцијација во цели растенија. Способноста на единечна клетка за регенерација во цело растение се нарекува тотипотентност. Во природни услови, оплодената јална клетка е тотипотентна.

Иако е познато дека речиси сите клетки имаат потенцијал да се регенерираат во цели растенија, овој потенцијал сè уште не е постигнат кај повеќето растителни клетки. Според тоа, трансгените растенија можат да се регенерираат само од специфични типови на клетки кај повеќето растителни видови. Голем број различни типови на клетки можат ефикасно да се регенерираат во цели растенија преку методите на култивирање на растителни клетки и ткива во *in vitro* услови. Успешната продукција на трансгени растенија зависи од координацијата на процесите на трансфер на DNA и регенерацијата на цело растение од единечна клетка во која е извршена интродукцијата на DNA.

Идеални целни клетки за генетска трансформација е оплодената јајна клетка или клетките на поленот кои ја оплодуваат јајната клетка. Сепак, овие идеални целни клетки кај повеќето растителни видови не се подложни на трансформација со исклучок на модел растението *Arabidopsis thaliana*. Исто така, меристемот на изданокот кој се развива во надземни органи на растението може да биде соодветен растителен материјал за трансфер на DNA. Сепак, овој растителен експлантат претставува комплексна мултицелуларна структура и повеќето целни клетки се обложени со неколку клеточни слоеви и се локализирани во внатрешноста на ткивото. Според тоа, површинските клетки на меристемот се повеќе достапни за интродукција на DNA во споредба со внатрешните клетки. Овие податоци покажуваат дека целното ткиво за продукција на трансгени растенија се состои од брзо растечки специјализирани клетки кои можат да се индуцираат за регенерација во цели растенија. Всушност, овие клетки треба да бидат физички достапни, активно да се делат (репликацијата на DNA ја забрзува интеграцијата на DNA во геномот) и да имаат способност за регенерација во цели растенија. Исто така, овие клетки треба да бидат резистентни кон механички повреди и да ги толерираат деструктивните процеси на пробивање на клеточниот сид и плазмалемата со цел да се овозможи трансфер на DNA.

1.1.4 Селекција и регенерација

При генетска трансформација на растенијата само мал процент од клетките содржат интродуцирана DNA и овие клетки се издвојуваат преку нивна селекција. Во растителните клетки покрај генот од интерес се интродуцира и друг селективен маркер кој кодира резистентност кон антибиотици или хербициди. Мешавината од трансформирани и нетрансформирани клетки се култивира во присуство на одреден антибиотик или хербицид и само оние клетки кои го содржат генот за резистентност имаат способност за преживување и натамошен раст. Селекцијата се базира на способноста на трансформираниите клетки за пролиферација во присуство на токсични селективни агенси. Гените за резистентност кодираат протеини кои имаат способност за детоксификација на токсинот или продуцираат алтернативна форма на ензим кој не реагира на дејството на токсинот. Најчесто користени гени за резистентност кон антибиотици се неомицин фосфотрансфераза и хигромицин фосфотрансфераза, кои се одговорни за резистентност кон канамицин и хигромцин, соодветно. Генот *bar* или *pat* кој кодира фосфинотрицин ацетил трансфераза е најчесто користен ген за резистентност кон хербициди. Овој ензим има способност за инактивирање на хербицидите глуфосинат и биалафос.

Трансформираниите растителни клетки можат да се селектираат и на други начини. Позитивната селекција се однесува на способноста на клетката да преживее преку користење на хранлив извор кој не е достапен за нетрансформираниите клетки. Така на пр., моносахаридот маноза не може да се метаболизира од страна на повеќето клетки, меѓутоа, манозата може да се конвертира во фруктоза под дејство на трансген кој кодира ензим фосфоманоза изомераза. Клетките кои го содржат овој ген можат да растат на

хранлив медиум кој содржи манитол како единствен извор на јаглерод, додека пак, нетрансформираните клетки немаат способност за раст. Друг пристап за селекција е користење на репортер гени кои овозможуваат идентификација и физичка изолација на трансформираните клетки. Интродукцијата на репортер гени овозможува идентификација на трансформираните клетки според некои уникатни карактеристики, како на пр. нова боја или емисија на флуоресценција или фосфоресценција. Интродукцијата на ген кој кодира зелен флуоресцентен протеин може да се потврди со појава на флуоресцентно зелена боја кај растителните клетки кога се набљудуваат под високо енергетска сина светлина или UV-светлина. На таков начин, клетките кои го содржат зелениот флуоресцентен протеин можат визуелно да се детектираат и физички да се изолираат. Селектираните трансформирани клетки се култивираат во *in vitro* услови и се применуваат различни методи за да се овозможи регенерација на цели трансгени растенија.

1.2 *Agrobacterium*

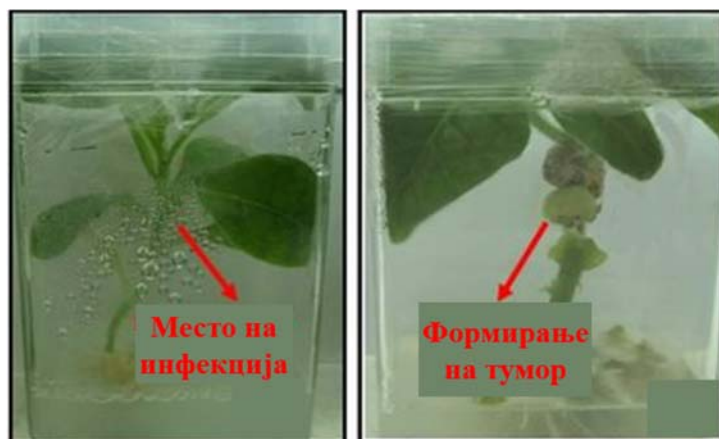
Agrobacterium е почвена бактерија која е позната како „природен генетски инженер“. Во текот на еволуцијата, оваа бактерија развила уникатна способност за трансфер на дел од сопствената DNA во растителните клетки. Оваа бактериска DNA која се пренесува во растителната клетка се нарекува T-DNA (трансфер DNA) и се наоѓа во екстрхромозмскиот Ti плазмид (тумор-индуцирачки плазмид). За разлика од физичките методи за трансфер на DNA кои се базираат на директно внесување на DNA во растителните клетки, *Agrobacterium*-посредуваната трансформација е комплексен процес кој вклучува два различни биолошки системи (бактерија и растителна клетка). Кај директните методи на интродукција на DNA неопходно е да се изврши трансфер на DNA до јадрото на целните клетки. Од друга страна пак, T-DNA од *Agrobacterium* поседува сигнали за трансфер до растителното јадро.

За реализација на директните методи за интродукција на DNA се користат скапи и софистицирани инструменти, додека пак, бактериската суспензија од *Agrobacterium* која се користи за инфекција на растителното ткиво може да се подготви на едноставен начин со култивирање на соодветен хранлив медиум. Во средината на 1980-тите години, научните сознанија за *Agrobacterium*-посредуваниот трансфер на DNA овозможиле широка примена на биолошките вектори за зголемување на ефикасноста на генетска трансформација на растенијата.

1.2.1 Формирање на туморно ткиво кај растенија под дејство на *Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens е фитопатогена бактерија која предизвикува заболување кај растенијата познато како тумор на врат на коренот (crown gall). Ова заболување претставува сериозен проблем кај голем број хортикултурни растенија (рози) и винова лоза. Главниот симптом на ова заболување е формирање на тумор на пресеченото стебло кај растенијата (Сл. 1.1) кое се јавува на границата помеѓу коренот во почвата и надземниот дел на растенијата. Натамошните истражувања покажале дека *Agrobacterium tumefaciens* може да има примена во генетскиот инженеринг на растенијата. Туморот на врат на коренот може да се развие при инфекција на повредени растителни ткива со див сој на *Agrobacterium*. Коренот на вратот или основата на стеблото е главно место за инфекција со бактеријата, бидејќи овој дел кај растенијата често е подложен на механички оштетувања. Бактериите можат да ги колонизираат мртвите клетки или да се прикрепат за површината на повредени живи клетки (Сл. 1.2). Хемиските соединенија (сигнали) кои се ослободуваат од повредените растителните клетки ги активираат

вирулентните гени кај бактериските клетки и се индуцира вирулентноста на бактериите. Активацијата на бактериските клетки предизвикува ексцизија и трансфер на T-DNA од бактерискиот плазмид до геномот на целната растителна клетка.



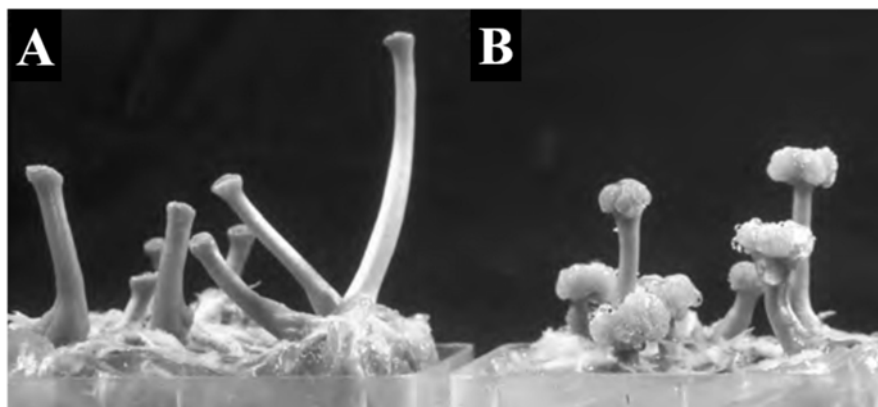
Слика 1.1 Формирање на тумор на врат на корен кај растенија од тутун инфицирани со *Agrobacterium tumefaciens*.



Слика 1.2 Раст на *Agrobacterium* на растително ткиво од соја.

Кај дивиот сој на *Agrobacterium*, T-DNA содржи гени кои кодираат ензими за продукција на фитохормони (ауксини и цитокини), како и опини кои претставуваат органски соединенија со азот како извор на енергија за бактериите. Туморите кај растенијата се формираат како резултат на продукцијата на фитохормони во растителните клетки, додека пак, продуцираните опини од туморите се користат од страна на бактериите кои се наоѓаат во почвата. Овие туморни клетки можат да се култивираат на вештачки хранлив медиум во *in vitro* услови без додавање на фитохормони. Мутантите на *Agrobacterium* кои имаат нарушена функција на гените за синтеза на хормони имаат големо значење за откривање на процесот на генетска трансформација на растенијата. Ако растенија од тутун се инокулираат со бактерии кои имаат нарушена функција на гени за биосинтеза на цитокинини, тогаш формираните тумори продуцираат маса на абнормални корени. Ако растенијата од тутун се инокулираат со бактерии кои имаат нарушена функција на гените за биосинтеза на

ауксини, тогаш се формираат тумори во форма на изданоци. Бактериите кои имаат нарушена функција на двата типа гени за биосинтеза на цитокинини и ауксини немаат способност за формирање на тумори кај растенијата (Сл. 1.3).



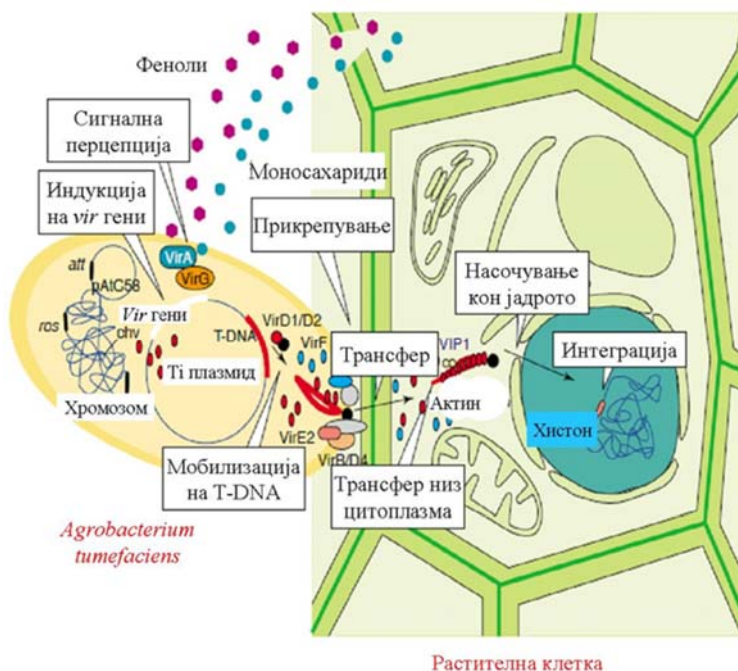
Слика 1.3 Хипокотили од изртени растенија на сончоглед инокуирани со *Agrobacterium* кој не поседува гени за биосинтеза на фитохормони (А) и *Agrobacterium* кој има нормална функција на гените за биосинтеза на фитохормони (В).

Овој ефект на хормоните е сличен како и формирањето на калусни култури од тутун во *in vitro* услови. Всушност, различните фенотипови на тумори што се јавуваат кај растенијата потекнуваат од промените во балансот на фитохормони во растителното ткиво.

1.2.2 Примена на T-DNA трансфер за трансформација на растенија

Основните процеси од механизмот на трансфер на T-DNA од *Agrobacterium* во геномот на растителната клетка се прикажани на Слика 1.4. Едниот плазмид кој се користи како вектор за *Agrobacterium*-посредувана трансформација се модифицира на таков начин што ги содржи само есенцијалните генетски компоненти. Векторите на *Agrobacterium* се нарекуваат бинарни вектори бидејќи во целокупниот процес на трансформација се користат два типа на вектори. Голем број од функциите за трансфер како што се *vir* гените се задржуваат во модифицираниот Ti плазмид во кој е отстранета T-DNA секвенцата. Вториот бинарен вектор содржи T-DNA, а воедно се отстранети генските секвенци за биосинтеза на опини и фитохормони. Кај бинарниот вектор се задржуваат левата и десната гранична секвенца од T-DNA регионот. Гените од интерес се клонираат помеѓу овие гранични секвенци кои се препознаваат од системот за обработка (ексцизија) на T-DNA. Гените од системот за обработка на T-DNA се наоѓаат на модифицираниот Ti плазмид, каде што ја регулираат ексцизијата на T-DNA од бинарниот плазмид. При инокулација на растително ткиво со *Agrobacterium*, бактериите го препознаат целното ткиво како домаќин, бидејќи бактеријата претставува патоген кој ги напаѓа растенијата. Повредените растителни ткива продуцираат ацетосирингон (фенолно соединение) како активатор на бактериските вирулентни (*vir*) гени, кои го иницираат системот за трансфер на T-DNA. Сепак, сите растителни ткива не продуцираат ацетосирингон. Слабата продукција на ацетосирингон кај клетките на монокотиледони растенија е главна причина за резистентноста на овие растенија за трансформација со *Agrobacterium*. Егзогената апликација на синтетски ацетосирингон

кај инокулираните растителни ткива предизвикува значајно зголемување на ефикасноста на *Agrobacterium*-посредувана трансформација кај монокотиледоните растенија. Откако бактеријата ќе го инфицира растителното ткиво, повеќето растенија индуцираат одбранбени одговори преку продукција на антипатогени соединенија или програмирана клеточна смрт околу инфицираниот регион за да се спречи ширењето на бактериската инфекција. Од друга страна пак, патогените бактерии имаат развиено механизми за интродукција на регулаторни соединенија во растителните клетки со цел да го инхибираат одбранбениот систем на целните клетки.



Слика 1.4 Шематски приказ на *Agrobacterium*-посредувана генетска трансформација кај растенијата на кој се прикажани главните стадиуми на процесот на трансформација како формирање на T-синцир во бактериската клетка, транспорт преку бактерискиот пилус и интеграција на T-DNA во растителниот геном.

При активирање на *vir* гените, T-DNA од бинарниот вектор се обработува за натамошен транспорт во целната растителна клетка. Некои од *vir* генските производи вршат ексцизија на T-DNA од бинарниот вектор како едноверижен DNA молекул, додека пак, други производи на *vir* гените ги обложуваат T-DNA молекулите за да се спречи нивна деградација. Дополнителни производи на *vir* гените се врзуваат за T-DNA и функционираат како сигнали за насочување на T-синцирот од бактеријата преку цитоплазмата на растителната клетка до растителното јадро. Всушност, T-синцирот претставува едноверижна T-DNA обложена со сигнални протеини за локализација на јадро. Дејството на останатите *vir* гени е поврзано со кодирање на протеини кои формираат транспортен пилус за трансфер на T-синцирот од бактеријата во целната растителна клетка. Овој транспортен пилус претставува протеински канал кој се протега од бактеријата до клеточниот сид и цитоплазмата на целната растителна клетка. Откако T-синцирот ќе се транспортира до јадрото, сигналните протеини од T-синцирот вршат пресекување на домаќинската DNA како инсерциско место за T-DNA. Се претпоставува

дека T-DNA примарно се инсертира во транскрипциски активни региони на растителната DNA кои се богати со гени бидејќи се лесно достапни и експонирани за интеграција.

1.2.3 Оптимизирање на процесот на DNA-трансфер кај растителните клетки

Деталното познавање на механизмите за *Agrobacterium*-посредувана трансформација на растителните клетки има големо значење за зголемување на ефикасноста на процесот. Ефикасноста на генетска трансформација на растенијата може да се подобри преку:

1. зголемување на преносот на бактериите до растителните клетки,
2. индукција на *vir* гените,
3. минимизирање на одбранбените одговори кај целните растителни ткива.

Денес се развиени голем број методи за зголемување на преносот на бактериите до целните растителни ткива. Со голем напор што бактериите инфицираат повредени растителни ткива, повеќето од овие методи опфаќаат зголемување на површината на местото на повреда или предизвикување на прецизни повреди. Повредата на целното ткиво најчесто се индуцира со користење на скалпел преку едноставно изолирање на растителните ткива. Всушност, пресеченото растително ткиво претставува соодветно место за прикрепување или влез на бактериските клетки. Исто така, повредата на растителните ткива може да се зголеми со повеќекратно стружење на целното ткиво со скалпел. Сепак, интензивното повредување може да предизвика губење на способноста на растителното ткиво за регенерација. Прецизното повредување со користење на ултразвук или бомбардирање со частици предизвикува голем број на екстремно мали повреди. Ако овие микроповреди се извршат соодветно без да настанат значајни оштетувања на структурата на ткивото, тогаш може значајно да се зголеми површината за прикрепување и влез на бактериите.

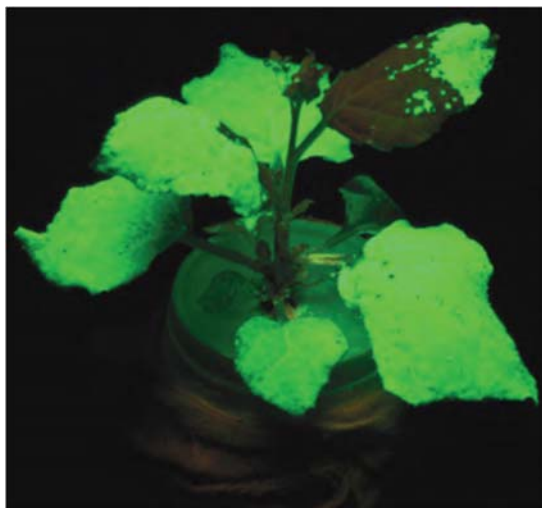
Индукцијата на *vir* гени преку додавање на ацетосирингон претставува рутинска пракса за трансформација на растенија кои се резистентни кон *Agrobacterium*-посредувана трансформација. Исто така, ацетосирингонот може рутински да се користи за време на периодот на ко-култивирање на растителните ткива со *Agrobacterium*. Ко-култивирањето е временскиот период кога се овозможува бактериските клетки да извршат инвазија, инфекција и трансформација на растителните клетки. Периодот на ко-култивирање завршува со додавање на соодветен антибиотик за да се елиминираат бактериските клетки по извршната трансформација на растителните ткива. Слични резултати можат да се постигнат со примена на мутантни соеви на *Agrobacterium* за *vir* гени кои можат да се активираат во отсуство на ацетосирингон.

Ефикасноста на *Agrobacterium*-посредуваната трансформација може да се зголеми преку индуцирање на промени во одбранбениот одговор на инфицираните растителни клетки кон бактеријата. При интеракцијата помеѓу *Agrobacterium* и растителните клетки настанува зголемување на активноста на ензимот пероксидаза, при што се интензивираат оксидациските процеси кои предизвикуваат потемнување на ткивата и клеточна смрт. Оваа состојба може да се спречи и да се зголеми фреквенцијата на трансформација преку додавање на редуцирачки агенси кои ги минимизираат ефектите на оксидирачките агенси кои се ослободуваат од страна на инфицираните растителни ткива. Најчесто користени редуцирачки соединенија се цистеин, сребро нитрат и аскорбинска киселина. Исто така се користат агенси кои ја елиминираат или редуцираат програмираната клеточна смрт (PCD) кај целните ткива како природен одбранбен одговор за ограничување или локализирање на инфекцијата. Според тоа, инхибирањето на овој процес овозможува зголемување на ефикасноста на трансформација. Постојат и други стратегии за оптимизирање на *Agrobacterium*-посредуваната трансформација.

Овие стратегии опфаќаат испитување на компатибилноста на растителниот генотип со различни соеви на *Agrobacterium*, оптимизирање на времетраењето на периодот на ко-култивирање и селекција на хранлив медиум за оптимален раст на растителното ткиво.

1.2.4 Агроинфилтрација

Во некои случаи, ефектите на интродукција на нов ген може да се одреди со примена на агроинфилтрација (агроинфекција). При методот на агроинфилтрација (Vaucheret, 1994), *Agrobacterium* се инјектира или инфилтрира во листови од целно растение (*Nicotiana benthamiana*) со цел да се изврши трансформација на голем број клетки на листовите. Овој метод се изведува на таков начин што суспензијата од *Agrobacterium* се инфилтрира во внатрешните воздушни простори на листовите преку поставување на шприц (без игла) на површината на листот и со притискање на клипот од шприцот.



Слика 1.5 Агроинфилтрација на растенија од *Nicotiana benthamiana* кои покажуваат висок степен на експресија на зелен флуоресцентен протеин (GFP). Методот на трансформација опфаќа потопување на надземните органи од растението на тутун во суспензија од *Agrobacterium*, а потоа растението е поставено во услови на вакуум за инфилтрација на бактериските клетки.

Модифицираниот метод на агроинфилтрација опфаќа потопување на растението во суспензија од *Agrobacterium*, а потоа се применува вакуум со цел да се инфилтрира бактеријата во внатрешните воздушни простори на листовите. Овој метод е многу ефикасен за продукција на трансген производ (Сл. 1.5) кај растенијата без да настане трансфер на гените во следните генерации.

1.2.5 Потопување на цветови од *Arabidopsis* (*Arabidopsis* Floral Dip)

Познато е дека *Arabidopsis* претставува модел-растение во молекуларната биологија и генетиката на растенијата. Овој растителен вид со мал геном и брзо генерациско време може лесно да се трансформира. Методот на потопување на цветови од *Arabidopsis* е развиен со примена на *Agrobacterium*-посредувана трансформација. Ниту едно друго растение не може да се трансформира со овој метод. Методот на потопување резултира со формирање на трансгено семе како резултат на *Agrobacterium*-посредувана трансформација на женскиот гаметофит или јајната клетка. При овој метод, растенијата

од *Arabidopsis* се култивираат до фаза на цветање и се потопуваат во суспензија од *Agrobacterium* која содржи детергент за редукција на површинскиот напон за да се овозможи подобар пристап на бактериите до порите на растението. По третманот на потопување, растенијата се одржуваат неколку дена во услови на висока релативна влажност на воздухот со цел да се обезбеди цветање и формирање на семе. Формираните семиња од *Arabidopsis* можат да се инокулираат на селективен медиум или да се изврши скрининг на изртените растенија според одредени карактеристики или фенотип за да се регенерираат цели трансгени растенија.

Примената на овој метод овозможува низок степен на пролиферација или мултипликација на бактериите кои ко-егзистираат во растителните ткива. Всушност, бактериите не вршат инвазија на растенијата како и другите патогени, туку се врзуваат за соодветни целни клетки за трансфер на DNA. Трансформацијата на клетки на лист или стебло (вегетативни клетки) со *Agrobacterium* предизвикува формирање на нова клетка на лист или стебло. За да настане регенерација на цели трансгени растенија неопходно е да се трансформираат герминативни клетки, односно клетки кои ќе овозможат формирање на оплодена јајна клетка. При *Agrobacterium*-посредувана трансформација на *Arabidopsis* најчесто се таргетира јајната клетка за да се продуцира трансгено семе. Вообичаено, секое трансгено семе се добива од различен настан на трансформација.

1.3 Бомбардирање со партикули

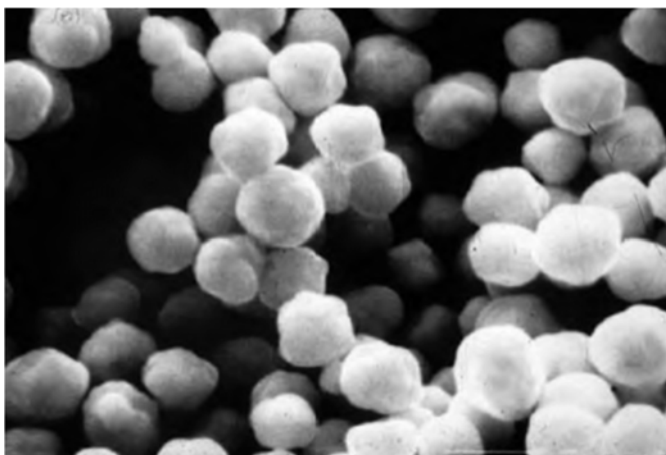
1.3.1 Историски развој на бомбардирање со партикули

Бомбардирање со партикули претставува метод на забрзано насочување на партикули од тешки метали (~1 μm злато или волфрам) обложени со DNA кон целно ткиво за да пенетрираат преку клеточниот ѕид и директно да навлезат во растителното јадро. Обложената DNA на партикулите го наоѓа својот пат до растителната DNA на целните клетки и се интегрира во хромозомот и на таков начин перманентно останува во геномот. Терминот бомбардирање со партикули може да се поистовети со термините бомбардирање со микропроектили, биолистика и технологија на генски пиштол.

За разлика од *Agrobacterium* како биолошки вектор за интродукција на DNA, бомбардирањето со партикули е физички процес на трансфер на DNA. При овој процес се врши физичко пеципитирање на DNA на метални партикули и овие обложени партикули забрзано се насочуваат кон целното ткиво. Партикулите пенетрираат во клетката преку правење на отвори во ригидната структура на клеточниот ѕид и продолжуваат да се движат додека не запрат поради густината на целното ткиво. Овој процес може да се визуелизира како пенетрирање на куршуми преку тенко парче на дрво за да навлезат во средина со вода. Притоа, парчето дрво го претставува клеточниот ѕид кој предизвикува нагло забавување на партикулите, додека пак, водата предизвикува постепено намалување на брзината на партикулите додека не запре нивното движење.

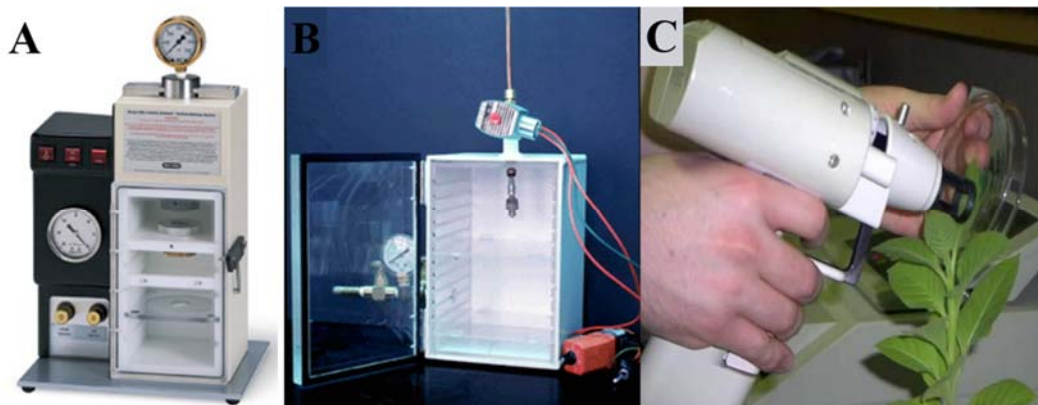
Иновацијата на методот бомбардирањето со партикули за прв пат била предложена во средината на 1980-тите години. Од концептуален аспект, пиштол со калибар од 22 mm исполнет со празни чаури од куршуми за прв пат бил користен за да се испитува повредата на растителното ткиво. Овој концепт на „пиштол“ со „куршуми“ бил искористен за воведување на првиот комерцијален апарат кој користел модифициран „пиштол“ со калибар од 22 mm исполнет со барут за да предизвика контролирана експлозија за забрзување на мали партикули од волфрам низ неговата цевка. Подоцнежните верзии на „пиштолите за партикули“ користеле други типови на сила за да ја произведат енергијата која е потребна за забрзување на малите партикули (Finer и

сор., 1999). Потребните сили за забрзување на партикулите можат да се создадат преку високо-волтажни електрични празнења низ празнина или со примена на компримиран воздух или CO₂. При изведување на експериментите со бомбардирање кај првите верзии на овие уреди неопходно е да се користат слушалки за пригушување на звукот. Денес, во повеќето лаборатории се користи хелиум под висок притисок за да се произведе потребната сила за забрзување на малите партикули од злато (Сл. 1.6) кон целното ткиво. Најпрвин се врши преципитација на DNA на партикулите, а подоцна овие обложени партикули се нанесуваат како единечен слој на пластична фолија или макроносач. Терминот макроносач се однесува на структурата (фолија) која ги носи партикулите, додека пак, малите партикулите кои се обложени со DNA се означуваат како микроносач. Контролираната експлозија која се користи за забрзување на макроносачот се обезбедува од страна на хелиум под висок притисок, кој се ослободува од мала комора по пробивањето на перфориран диск. Овој диск е дизајниран да се пробие само при одреден притисок. Макроносачот со партикулите поминува кратко растојание и се судира на екран, при што се стопира макроносачот и се овозможува натамошно движење на партикулите. Во повеќето случаи, целата процедура се одвива во услови на парцијален вакуум, поради тоа што присуството на воздух го забавува движењето на партикулите. Примената на парцијален вакуум за краток временски период најверојатно не предизвикува оштетување на биолошките целни ткива.



Слика 1.6 Златни партикули кои се користат за бомбардирање пред преципитација на DNA. Златните партикули имаат сферична форма и се поуниформни во споредба со волфрамовите партикули.

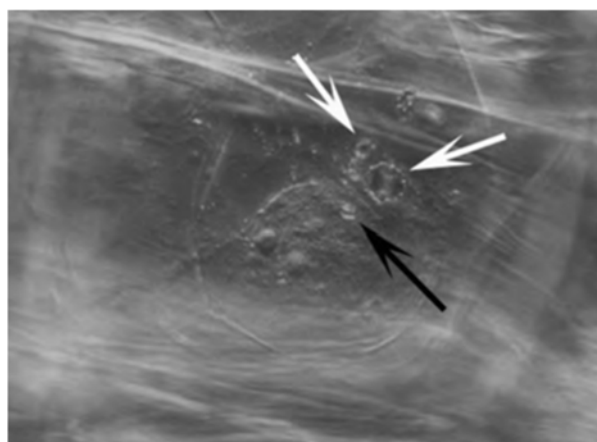
Иако постојат бројни верзии на апаратите за бомбардирање со партикули (Сл. 1.7), сите овие уреди го користат истиот принцип на функционирање и на сличен начин се патентирани. Главен производител на уредите за бомбардирање со партикули е Bio-Rad, кој нуди две верзии на уредот. Едната верзија на уредот (PDS-1000/He) со големи димензии и користење на вакуум се применува за лабораториски цели, додека пак, втората верзија може рачно да се управува и лесно се користи. Рачно-преносливиот Helios уред најчесто се употребува за генска терапија, додека пак, првата верзија на уредот е стандардна опрема во повеќето лаборатории за трансформација на растенија. Високата цена на овие уреди ја ограничува нивната употреба во академските истражувачки лаборатории со мали финансиски извори.



Слика 1.7 Уреди за бомбардирање со партикули: (A) комерцијално дотсапен PDS-1000/He уред (Bio-Rad), (B) некомерцијален уред со проток на партикули и (C) Helios генски пиштол.

1.3.2 Ефекти на интродуцирана DNA во растителниот геном

При интродукција на DNA со примена на методот на бомбардирање со партикули, преципитацијата на DNA се врши со калциум хлорид или етанол. Иако не е доволно познато колку цврсто DNA е прицврстена за партикулите, преципитираните DNA молекули треба да ја издржат силата на забрзување и пенетрацијата во клеточниот сид и цитоплазмата, а воедно да се ослободат од партикулите по извршениот трансфер во клетката. За време на бомбардирањето, повеќето метални партикули не завршуваат во целните клетки. Во тој контекст, партикулите можат да останат во клеточниот сид, да навлезат во вакуолата или да завршат во различни делови од цитоплазмата, а само мал број од партикулите навлегуваат во јадрото. Важно е да се напомене дека примената на овој пристап на бомбардирање овозможува трансфер на илјадници партикули. Анализата на клетките кои ја експресираат интродуцираната DNA покажува дека кај најголем процент од клетките (>90%) партикулите се прикрупени во близина на јадрото или се наоѓаат во јадрото (Сл. 1.8).



Слика 1.8 При успешна трансформација со методот на бомбардирање настанува трансфер на метални партикули во близина (бели стрелки) или директно во растителното јадро (црни стрелки).

При *Agrobacterium*-посредуваната трансформација, интеграцијата на DNA во растителната DNA се регулира од страна на бактериските протеини кои се поврзани за T-синцирот. Од друга страна, бомбардирањето со партикули резултира со интродукција на „гола DNA“ која е ослободена од протеини. Интеграцијата на DNA во растителните хромозоми претставува комплексен процес. Вообичаено, интродуцираната DNA се инсертира во единечно место (локус) од хромозомската DNA на растителната клетка. Исто така, интродуцираната DNA може да се инсертира на поголем број различни места или во секое место на интеграција се инсертираат поголем број копии од трансгенот. Овие копии на трансгенот можат да бидат делумни копии со различна ориентација или да се интерсперзираат во растителната геномска DNA (Pawlowski и Somers, 1998). Машинеријата за репликација и репарација на растителното јадро е сложен систем кој е одговорен за добивање на голем број на нови DNA синцири и постојано се врши репарација на различни мали грешки со цел да се добијат егзактни копии на хромозомите. Овој систем функционира беспрекорно додека во јадрото не навлезат огромни партикули (1 μm) кои носат DNA-молекули. Се претпоставува дека растителната DNA ги инкорпорира и интегрира овие DNA-молекули во сопствената машинерија. Како резултат на овие специфични услови и временското ограничување, репликацискиот систем ја реплицира севкупната хромозомска DNA пред да настане клеточна делба. При методот на бомбардирање со партикули не е доволно познато дали партикулите предизвикуваат оштетувања и прекини на хромозомската DNA или ја ослободуваат DNA во непосредна близина на реплицирачките делови од хромозомите. Познато е дека DNA-молекулите се инсертираат во хромозомската DNA преку комплексен механизам кој може да се контролира преку модифицирање на конфигурацијата на интродуцираната DNA.

1.3.3 Предности и недостатоци на директната интродукција на DNA

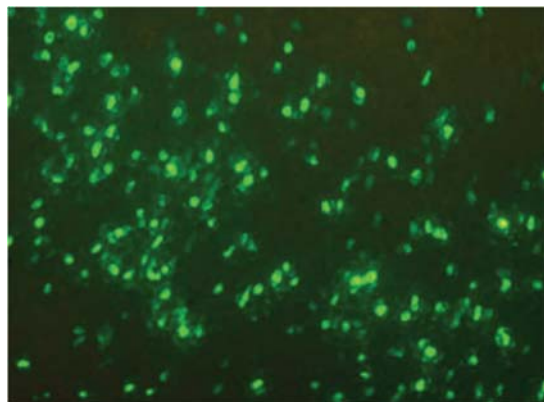
Бомбардирањето со партикули е физички метод за интродукција на DNA кој може да ги елиминира недостатоците на биолошкиот метод на *Agrobacterium*-посредувана трансформација. Голем број растителни ткива можат да се користат при методот на бомбардирање со партикули. Така на пр., целни растителни ткива за бомбардирање со партикули се ембриони, изртени растенија, врвови на изданоци, лисни дискови, микроспори, незрели поленови зрна, тубери и нодии (Altpeier и сор., 2005). Примената на методот на бомбардирање со партикули за интеграција на DNA во растителното јадро може да има голема предност. Различни DNA-молекули можат да се ко-интродуцираат со примена на методот на ко-трансформација. Така на пр., успешна ко-трансформација со 12-15 различни DNA-молекули е постигната кај растенија од соја (Hadi и сор., 1996) и ориз (Chen и сор., 1998). Овој пристап може да има голема примена во генетскиот инеженеринг на биосинтетските патишта кај растенијата каде што е неопходно истовремено интродуцирање на поголем број гени.

Бомбардирањето со партикули претставува единствен метод за трансформација на хлоропластниот и митохондријалниот геном. Трансформацијата на пластидите (Bock и Khan, 2004) се користи за да се добие големо количество на трансгени производи. Интеграцијата на туѓа DNA во пластидната DNA е едноставен процес, бидејќи настаните на трансформација се помалку комплексни во споредба со трансформацијата на јадрото. При трансформација на пластидите се врши прецизна конструкција на туѓата DNA која се рекомбинира со слични секвенци од целната пластидна DNA преку **хомологна рекомбинација**. Исто така, главна предност на трансформацијата на пластиди е елиминацијата на ослободувањето на трансгенот во природата преку поленот, бидејќи кај некои растителни видови пластидите се наследуваат само од женскиот родител.

Методот на бомбардирање со партикули се карактеризира со некои недостатоци и затоа се ограничува неговата примена при генетската трансформација. Главен недостаток е случајната интеграција на DNA и високиот број на интродуцирани копии на DNA. Позицијата и ориентацијата на трансгенот во растителните хромозоми се разликува при секој настан на трансформација. Локацијата на трансгенот во целниот хромозом може да влијае врз експресијата на трансгенот (позициони ефекти). Трансгените кои се инсертирани во транскрипциски активни региони на растителната DNA покажуваат висок степен на експресија, додека пак, интеграцијата во транскрипциски неактивни генски региони индуцира намалена експресија на трансгените. Исто така, бројот на интродуцирани копии на DNA може да влијае врз нивната експресија (Taylor и Fauquet, 2002). Се претпоставува дека присуството на голем број копии на одреден трансген резултира со висок степен на експресија. Сепак, во овие услови настанува намалена експресијата на трансгенот од страна на растителниот организам и овој феномен е познат како ко-супресија, RNA интерференција (RNAi) или RNA стивнување (Butaye и сор., 2005). Според тоа, огромно значење има селекцијата на растителни клетки или ткива кои покажуваат униформна експресија на трансгенот. Сепак, постојат неколку техники кои ја минимизираат варијацијата во експресијата на трансгенот при користење на методот на бомбардирање со партикули.

1.3.4 Подобрувања во експресијата на трансгени

Варијацијата во експресија на трансгенот кој е интродуциран во растителниот геном преку бомбардирање со партикули може да се редуцира преку модификација на интродуцираната DNA. Познато е дека високиот број на интегрирани генски копии предизвикува стивнување на трансгенот. Затоа се користат различни методи за контролирање на бројот на генски копии, при што се овозможува униформна експресија на трансгенот. Така на пр., намалувањето на концентрацијата на DNA може да го редуцира бројот на копии на трансгенот во целната растителна клетка. Од друга страна, користењето на висока концентрација на DNA резултира со високо ниво на **нестабилна експресија** која вклучува брза експресија на некои трансгени кои можат да се детектираат и квантификуват за време од 24 часа од интродукцијата на DNA (Сл. 1.9). Сепак, позитивните ефекти на ниската концентрација на DNA врз стабилноста на експресијата на трансгенот треба да се испитува за секое различно целно ткиво.



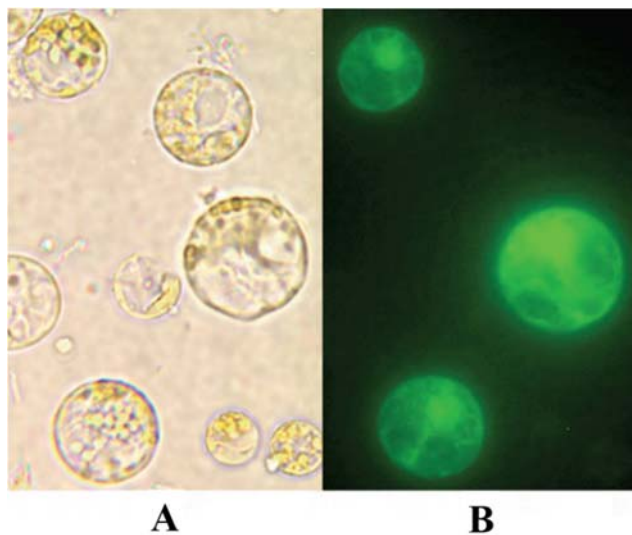
Слика 1.9 Нестабилна експресија на зелен флуоресцентен протеин (GFP) интродуциран во котиледони од *Phaseolus lunatus* со примена на бомбардирање со партикули. Котиледоните се непигментирани и затоа се идеални ткива за следење на експресијата на GFP кај индивидуални трансформирани клетки.

Бројот на копии на интродуцираниот трансген може да се намали и преку симплифицирање (упростување) на формата на интродуцирана DNA. Моделите на проста интеграција опфаќаат користење на DNA-фрагмент кој содржи само ген од интерес. На таков начин, отстранувањето на основата на клонирачкиот плазмид од преципитирачката мешавина за бомбардирање резултира со низок број на интегрирани копии на трансгенот (Agrawal и сор., 2005). Исто така, експресијата на трансгенот може да се стабилизира со користење на гени од некои вирусни протеини кои се означуваат како „супресори на стивнување“. Овие супресорни протеини се продуцираат од страна на вирусите за да се супресира одбранбениот систем на растенијата кон вирусите. Всушност, растителните клетки инфицирани со вируси се обидуваат да ги стивнат вирусните гени, додека пак, вирусот ги активира гените за супресија на механизмот на стивнување на растителната клетка. Според тоа, примената на вирусни супресори на стивнување може да овозможи високо ниво на експресија на трансгенот. Ефектот на овие вирусни протеини врз развитокот на растенијата сè уште не е доволно проучен.

1.4 Други методи на трансформација

1.4.1 Протопласти

Клеточниот сид претставува главна бариера за интродукција на DNA во растителните клетки. При ензимско или физичко отстранување на клеточниот сид на растителните клетки се добиваат протопласти (Сл. 1.10). Протопластите се поединечни клетки кои треба да се одржуваат во хранлив медиум со соодветна концентрација на осмотски и хранливи соединенија за да се спречи лизирање на протопластите. Протопластите се добиваат со користење на мешавина од ензимите целулази и пектинази за деградација на клеточниот сид, додека пак, манитолот најчесто се користи за одржување на осмотскиот интегритет на протопластите. Иако протопластите можат да се добијат од различни ткива, најчесто се користат младите ткива од лисниот мезофил и ембриогените култури. Протопластите најчесто се користат во научните истражувања за интродукција на DNA или добивање на фузионирани хибриди.



Слика 1.10 Протопласти од пченка со извршена електропорација со зелен флуоресцентен протеин (GFP) кои се прикажани на светлосен микроскоп (A) и со GFP филтер (B).

Интродукцијата на DNA во протопластите се врши со примена на два метода: **електропорација** и **третман со полиетилен гликол (PEG)**. При електропорација, протопластите се поставуваат во раствор на DNA помеѓу 2 електроди и се експонираат на кратки бранови од високо-волтажна струја. Овие електрични бранови предизвикуваат пори во мембраната на протопластите преку кои навлегуваат DNA-молекулите. Третманот со PEG се изведува во присуство на DNA, при што се формираат пори поради дестабилизација на мембраната на протопластите.

Манипулацијата на протопластите може да се изведува и на други начини кои не можат да се применуваат кај интактните растителни клетки. Така на пр., методот на микроинјектирање се користи за интродукција на DNA во протопластите. При микроинјектирањето се користат прецизни стаклени игли кои можат да се скршат доколку се користи интактна растителна клетка. Исто така, протопластите можат ефикасно да се трансформираат со користење на *Agrobacterium*. Бактериите имаат способност за ефикасно прикрепување и трансформирање на протопластите бидејќи протопластите можат да регенерираат нови клеточни сидови.

Трансформацијата на протопласти претставува ефикасен метод за добивање на генетски трансформирани растенија. Денес, постојат голем број податоци за регенерација на различни растенија со користење на трансформација на протопласти. Сепак, главниот недостаток на методот на трансформација на протопласти е потребата за оптимизирање на ефикасен протокол за регенерација на цели растенија од овие единечни клетки. Високата ефикасност на интродукција на DNA кај протопластите рутински се користи за анализа на факторите кои ја модифицираат генската експресија (Sheen, 2001).

1.4.2 Електропорација

Електропорацијата и апликацијата на електрични бранови може ефикасно да се користи за трансформација на протопласти, како и за цели растителни ткива. Сепак, електропорацијата на цели растителни ткива се карактеризира со понизок степен на ефикасност при интродукција на DNA (D'Halluin и сор., 1992). Интактниот клеточен сид претставува главна бариера на електропорацијата за формирањето на пори во клеточната мембрана и интродукција на DNA. Електропорација на цели растителни ткива успешно се користи кај брзо растечки ткива со тенки и новоформирани клеточни сидови. Парцијалната ензимска дигестија на цели ткива со користење на целулази и пектинази во комбинација со електропорација овозможува ефикасна интродукција на DNA во интактни ткива.

1.4.3 Кристали од силициум карбид

Кристалите од силициум карбид (карборундум) биле иницијално користени за интродукција на DNA кај јајца од инсекти, а подоцна биле користени за генетска трансформација на растителни клетки (Каерплер и сор., 1990). Кристалите од силициум карбид имаат стапчеста форма со микроскопски остри врвови (дијаметар од 1 μm и должина од 15-50 μm). Овие кристали се додаваат во мешавина од растителни клетки и DNA, а потоа се врши вортексирање. Оваа технологија се базира на оштетување на клетките како резултат на интензивното мешање во присуство на кристалите (вортексирање), при што се овозможува пенетрирање на DNA во клетката. Главните недостатоци на примената на кристали од силициум карбид се ниската ефикасност на трансформација на растителните клетки, како и специфичните услови за депонирање и отстранување на овие кристали кои се слични со условите за азбестот.

1.4.4 Вирусни вектори

Вирусните вектори можат да се користат како алтернативен „природен“ метод за интродукција на DNA кај растенијата. Со користење на нивниот сопствен транспортен механизам, вирусите можат самостојно да се шират во нивниот домаќин. Според тоа, интродукцијата на вирус во единечна клетка овозможува присуство на вирусни гени во речиси секоја клетка од инфицираното растение. Иако вирусните вектори можат да се користат за ефикасна интродукција и транспорт на вирусни гени, овие гени не се интегрираат во геномот на клетката домаќин. Според тоа, вирусните гени не се пренесуваат во следната генерација на растенија преку поленот или јајната клетка.

Инокулацијата на вируси во растителните клетки претставува едноставен метод кој опфаќа стружење на листот во присуство на вирус. Притоа, единечното место на инокулација со вируси може да предизвика експресија на вирусните гени кај повеќето клетки на растението. За успешна интродукција и експресија, генот од интерес треба соодветно да се инсертира во вирусниот геном. Сепак, вирусните геноми не покажуваат висок степен на прифаќање на туѓи DNA-молекули. Вирусните вектори се користат за брза продукција на протеини кај растенијата за кои не е потребно да се изврши регенерација цело растение од единечна трансформирана клетка.

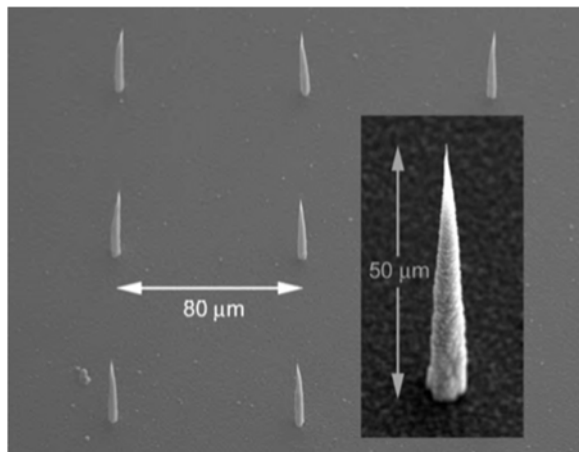
1.4.5 Ласерска микропунктура

Примената на микроласери за трансформација на растителните клетки се базира на формирање на пори во клеточниот сид со цел да се изврши трансфер на DNA (Badr и сор., 2005). Овој метод многу ретко се користи за интродукција на DNA во растителните клетки. Предноста на овој метод е прецизноста на ласерите во таргетирање на специфични клетки. Сепак, примената на ласерите за трансформација на растенијата е ограничена поради специфичната опрема за изведување на овој метод и нискиот број на таргетирани клетки. Од компаративен аспект, при едно „бомбардирање“ со партикули се добиваат околу 5000 клетки кои покажуваат нестабилна експресија на интродуцираниот трансген. При ласерска микропунктура или микроинјектирање на протопласти се врши поединечно таргетирање на клетките. Натамошните истражувања ќе овозможат широка примена на микроласерите за интродукција на DNA во растителните клетки.

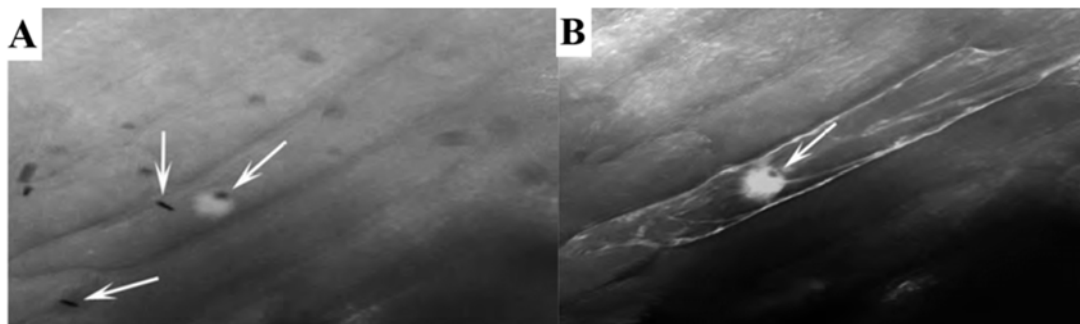
1.4.6 Низи од нановлакна

Успешна интродукција на DNA во растителни клетки со примена на низи од нановлакна сè уште не е постигната (Melechko и сор., 2005). Сепак, постојат научни сознанија за ефикасна трансформација на анимални клетки со примена на овој метод (McKnight и сор., 2003). Низите од нановлакна можат да се опишат како „кревет со шилци“ (Сл. 1.11). Способноста за прецизно добивање и соодветно распоредување на низите од нановлакна претставува нов концепт. Првите обиди за добивање на низи од нановлакна овозможиле формирање на структури во форма на пирамида (големина во nm) на силиконски чипови (Hashmi и сор., 1995). Според овој пристап, површината на чиповите се гравира за да се постават нановлакната во форма на пирамида. Денешните низи од нановлакна се составени од долги и тенки структури и можат да имаат потенцијална примена за интродукција на DNA во растителните клетки. Низите од нановлакна се поставуваат на чипови и прецизно се одредува нивниот состав, висина и меѓусебното растојание. Притоа, DNA може хемиски да се поврзе за влакната или

физички да преципитира на нановлакната. За успешна интродукција на DNA во анимални клетки (McKnight и сор., 2003), низите од нановлакна се стационарни, додека пак, анималните клетки се придвижуваат кон чипот. Потоа на чипот се овозможува раст на клетките кои сè уште се импрегнирани со нановлакна. Овие нановлакна се доволно силни за да можат да пенетрираат преку клеточните сидови на растителните клетки. Важно е да се напомене дека целата површина на чиповите е прекриена со нановлакна и затоа со користење на еден чип може да се таргетираат голем број клетки. Иако постојат прелиминарни резултати за примената на овој метод кај епидермални клетки од кромид (Сл. 1.12), главен недостаток на овој метод е ефикасноста за трансфер на DNA-обложените нановлакна до јадрото на растителните клетки.



Слика 1.11 Низи од нановлакна со поединечно нановлакно прикажано на високо зголемување.



Слика 1.12 Интродукција на DNA во клетки од кромид со примена на низи од нановлакна. Белите стрелки покажуваат дислоцирани нановлакна од растителното јадро (A), додека пак, белата стрелка покажува едно вкано вградено во јадрото на клетката која го експресира интродуцираниот ген за зелен флуоресцентен протеин (B).

1.5 Критериуми за потврдување на генетската трансформација на растенија

Успешната интродукција на трансген во растенијата може да се потврди со примена на различни методи. Валидацијата на трансформација се базира на потврдување на присуството на туѓа DNA во растителниот геном или експресија на трансгенот во форма на нов ензим или протеин.

Гени за резистентност. Еден од најчестите методи за лажно потврдување на експресијата на трансгенот е да се испитаат растителните ткива или изртените растенија за резистентност кон хербициди (соединенија кои се токсични за растителните ткива). Познато е дека гените за резистентност кон хербициди речиси секогаш се користат како селективна стратегија. Сепак, концентрацијата на хербициди која се користи за селекција на трансформирани растенија често пати е на најниско ниво на токсичност. На таков начин може да се селектираат растенија кои преживуваат во присуство на хербицидот, а воопшто не го содржат трансгенот. При овие експерименти на трансформација многу ретко се добиваат растенија кои не се афектирани или умираат во присуство на хербицидот. Во повеќето случаи, растителните ткива покажуваат појава на жолта или темна боја што претставува потврда за ефектите на слаба токсичност на хербицидот. Способноста на растителното ткиво да преживее во присуство на токсични агенси зависи од енергичноста и виталноста на растителното ткиво, хранливиот медиум што се користи за раст на целните клетки, како и стабилноста на селективниот агенс. Сепак, растот на ткивата или изртените растенија на селективен медиум не е веродостојна стратегија за да се потврди присуството и експресијата на трансгенот за резистентност кон хербициди.

Маркер гени. Експресијата на маркер гените резултира со директно или индиректно формирање на производ кој може хемиски да се анализира или визуелно да се потврди. Во експериментите за трансформација најчесто се користат маркер гените кои можат да се потврдат со визуелизација. Присуството на ензимот β -глукуронидаза (GUS) кодиран од *uidA* генот се анализира со поставување на растителното ткиво во присуство на вештачки супстрат кој се разградува под дејство на ензимот за да се добие сино обоен производ. Ако е присутен GUS ензимот, растителните ткива кои го експресираат трансгенот се обојуваат со сина боја. Често пати, синиот производ е тешко да се забележи кај зелени растителни ткива. Сепак, оваа интерференција на зелената боја од хлорофилот може да се елиминира преку соодветен третман на ткивата. Исто така, неопходно е да се контролира времето на инкубација на растителното ткиво со вештачкиот супстрат, бидејќи пролонгирање на инкубацијата може да предизвика сино обојување на целиот растителен материјал и да се добијат лажно позитивни резултати.

Широка примена во експериментите за трансформација на растенијата има маркер генот кој кодира зелен флуоресцентен протеин (GFP). Растителните ткива кои го експресираат генот за GFP продуцираат протеин кој емитира флуоресцентна зелена светлина при осветлување со UV или високо енергетска сина светлина (Сл 1.5, 1.9, 1.10, 1.12). Детекцијата на GFP се врши со специјална апаратура и соодветни филтри. Главен недостаток при детекцијата на GFP кај растенијата е присуството на други растителни соединенија кои можат да интерферираат при детекцијата или флуоресценцијата. Така на пр., хлорофилот флуоресцира со светло црвена боја под UV или силна сина светлина. Восоците и други соединенија на лисните влакна или трихомите, како и нечистотиите на листовите можат да флуоресцираат на сличен начин како и GFP.

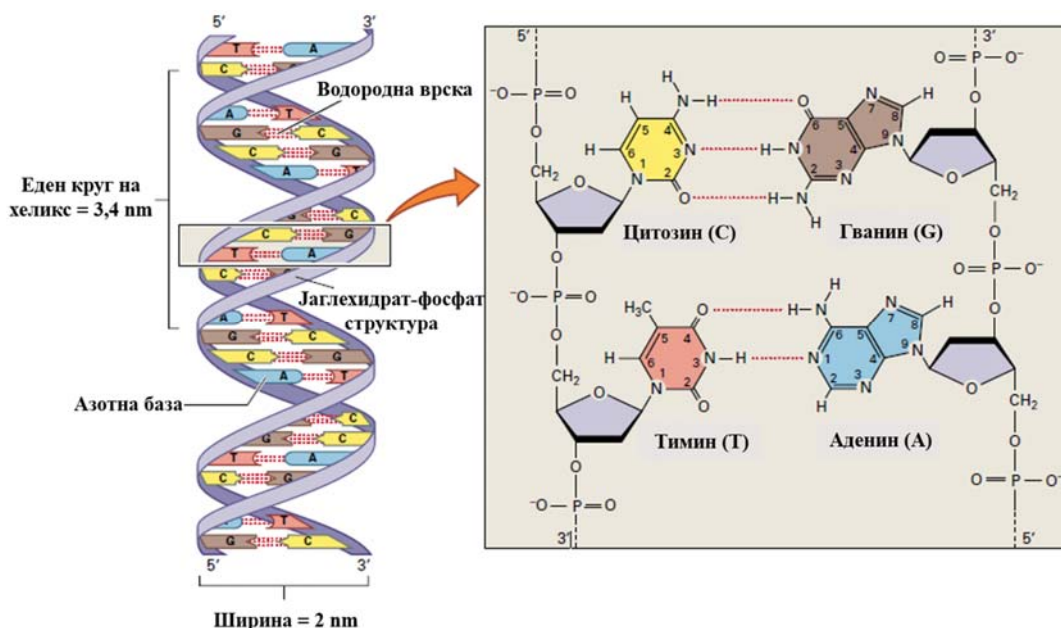
Трансгени DNA-молекули. Трансгената природа на растенијата се базира на детекција на нов трансген преку анализа на DNA. Анализата на DNA е сензитивен метод бидејќи мало количество на контаминанти може да даде лажно позитивни резултати. Исто така, методот на полимеразно верижна реакција (PCR) може да даде лажно позитивни резултати, поради тоа што PCR-методот не се користи за потврдување на интеграцијата на трансгени DNA-молекули, туку само нивното присуство во примерокот. Така на пр., лажно позитивни резултати можат да се добијат ако испитуваните растенија не се ослободат од инфекцијата со *Agrobacterium* или примероците се контаминираат со DNA од некои соседни растенија.

Southern хибридизацијата е најсоодветен метод за молекуларна анализа и потврдување на интеграцијата на трансгена DNA во испитуваните растенија. Во глем број на научни публикации се презентираат Southern блотови со бандови кои имаат иста големина кај сите клонови. Примената на рестрикциски ензими кои го сечат трансгенот на две локации овозможува добивање на единечен банд. Исто така, единечен банд може да се добие ако испитуваната DNA потекнува од некоја бактерија или DNA која го контаминира примерокот. Примената на рестрикциски ензим кој ја сече туѓата DNA на само една локација може да предизвика сечење и на растителната DNA и на таков начин се добиваат фрагменти со различна димензија од секој различен настан на трансформација. Анализите со Southern хибридизацијата покажуваат дека растенијата кои се добиени со директна интродукција на DNA се карактеризираат со голем број различни бандови, додека пак, при *Agrobacterium*-посредуваната трансформација се добиваат мал број бандови со униформна должина. Независно од методот за интродукција на DNA, бројот на бандови и присуството на бандови со уникатна должина треба да се користи за потврдување на интеграцијата на трансгенот од секој настан на трансформација. Исто така, важно е да се анализира наследувањето на потенцијалните трансгени растенија. Трансгените растенија го пренесуваат трансгенот во потомството преку Менделовото наследување.

2. РЕКОМБИНАНТНА DNA ТЕХНОЛОГИЈА: КОНСТРУКЦИЈА И ДИЗАЈН НА ВЕКТОРИ

2.1 Модификација на DNA

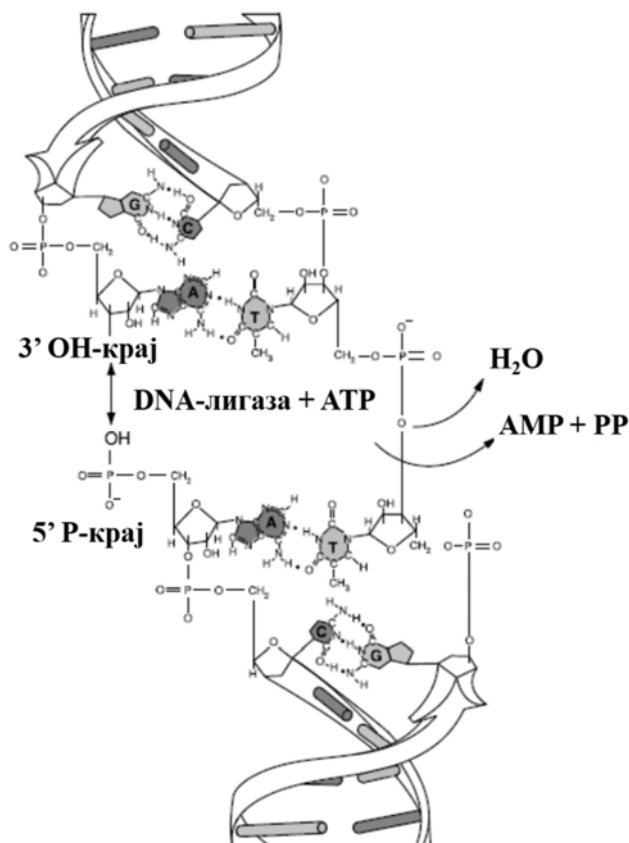
Рекомбинантната DNA технологија опфаќа техники на манипулација на DNA со примена на специфични ензими за модификација на нуклеинските киселини. Овие ензими биле за прв пат изолирани во 1953 година, односно кратко време по откривањето на двојно спиралната структура на DNA. Структурата на DNA е претставена со два комплементарни синцири составени од јаглехидратот деоксирибоза и фосфатни групи кои наизменично се протегаат во спротивни правци. За секој молекул на деоксирибоза се поврзува азотна база. Азотните бази аденин (A), тимин (T), гванин (G) и цитозин (C) се поврзуваат со водородни врски за соодветните азотни бази од другиот синцир и формираат базни парови (A-T и G-C). Комплементарната природа на нуклеотидните синцири покажува дека секој синцир претставува модел за синтеза на другиот синцир (Сл. 2.1).



Слика 2.1 Двојната спирална структура на DNA ги содржи генетските инструкции за развиток на еден организам. Специфичниот распоред на азотните бази G, A, T и C кодира регулаторни особини, како што се промоторните и терминаторните секвенци на гените, додека пак, триплет кодонот ја одредува аминокиселинската секвенца на протеините. Кај растенијата и останатите еукариоти, DNA е спакувана во хромозоми и се наоѓа во клеточното јадро. Кај бактериите и останатите прокариоти, DNA се наоѓа директно во цитоплазмата и најчесто има циркуларна форма.

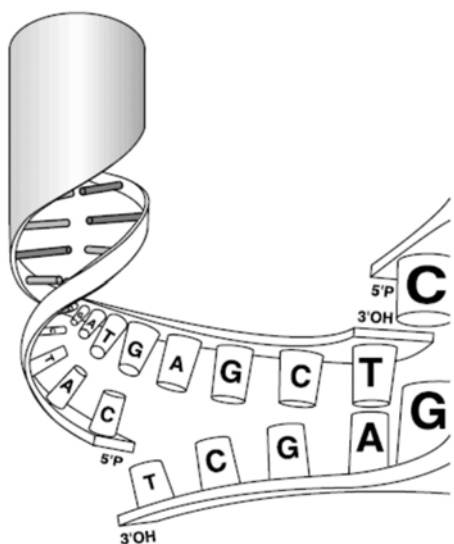
Ензимот DNA полимераза I за прв пат е изолиран во 1955 година и може да се користи за *in vitro* синтеза на DNA во присуство на четирите азотни бази во форма на деоксирибонуклеозидни трифосфати (dNTP). Иако DNA полимераза I е првиот откриен ензим со полимеразна активност, DNA полимераза III има примарна улога во репликацијата на DNA.

DNA полимеразите можат да вршат репликација на DNA, меѓутоа, овие ензими не можат меѓусебно да ги спојат краевите на DNA-молекулите. Постојат ензими за спојување на DNA било потврдено со откривањето на циркуларни DNA молекули (плазмиди). Во 1966 година за прв пат бил изолиран ензимот DNA лигаза кој овозможува поврзување на DNA молекули преку формирање на фосфодиестерска врска (Сл. 2.2).



Слика 2.2 Поврзување на два линеарни DNA-фрагменти под дејство на DNA-лигаза преку формирање на фосфодиестерски врски помеѓу 3'-хидроксилната група од еден нуклеотид со 5'-фосфатната група од друг нуклеотид.

Истражувањата кај бактериите овозможиле откривање на ендонуклеази во клетките кои можат да деградираат туѓи DNA-молекули. Првите пурифицирани „рестрикциски ензими“ се *EcoRI* од *Escherichia coli* и *HindIII* од *Haemophilus influenzae*. Рестрикциските ензими (рестрикциски ендонуклеази) се продуцираат кај голем број прокариотиски организми. Овие ензими препознаваат специфични палиндромски нуклеотидни секвенци со големина од 4-8 bp во DNA и катализираат специфично раскинување на фосфодиестерските врски во двата синџири на DNA. Метилацијата на овие специфични нуклеотидни секвенци од DNA на клетката-домаќин има заштитна улога од дејството на сопствените рестрикциски ензими. Постојат голем број различни рестрикциски ензими кои се специфични за одредена позиција. Рестрикциските ензими се именуваат според бактерискиот вид и потеклото на сојот. Така на пр., ендонуклеазата *EcoRI* е првата ендонуклеаза која е идентификувана кај бактеријата *Escherichia coli* сој RY13 (Табела 2.1). Овие ензими препознаваат специфична двојноверижна DNA-секвенца и катализираат прекинување на синџирите, при што се формира 5'-протрузија или 3'-протрузија или т.н. „лепливи краеве“ (Сл. 2.3).

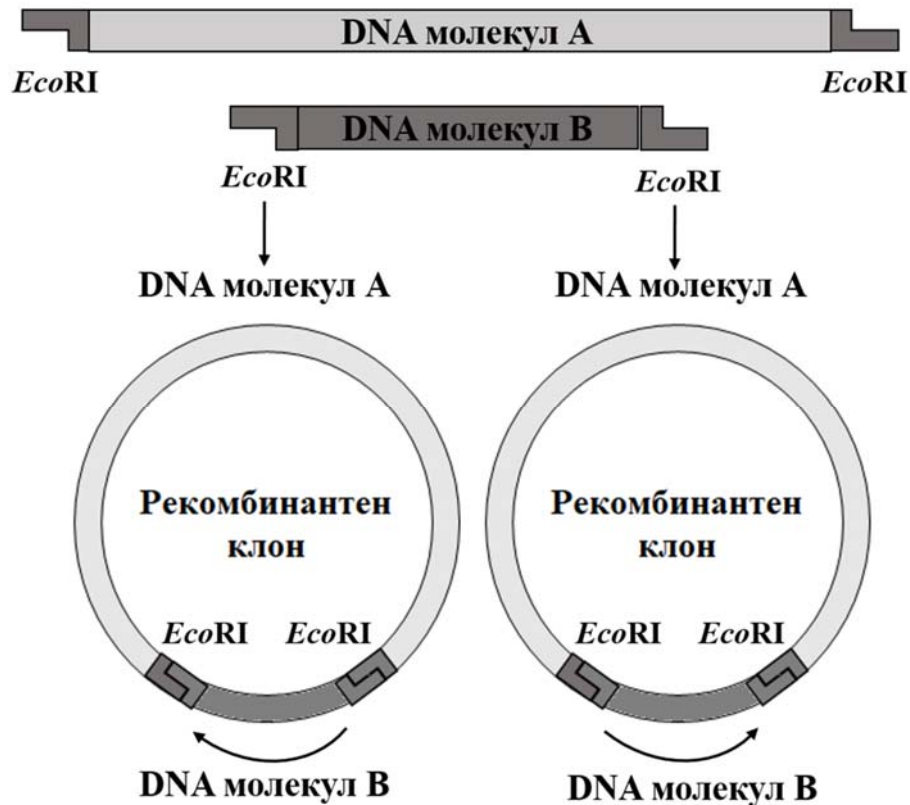


Слика 2.3 Рестрикцискиот ензим (ендонуклеаза) *SacI* препознава специфична палиндромска секвенца од 6 нуклеотиди на било кое место во DNA и асиметрично ја сече DNA на специфични фосфодиестерски врски, при што се формира 3'-протрузија или „лепливи краевии“.

DNA фрагментите кои содржат едноверижни протрузии („лепливи“ краевии) можат многу лесно меѓусебно да се спојат. Всушност, компатибилните едноверижни протрузии на два DNA-молекули можат да хибридизираат и настанува поврзување на 5' фосфатната структура со 3' хидроксилната група, при што се формира фосфодиестерска врска со помош на ензимот DNA лигаза (Сл. 2.2). На таков начин можат да се комбинираат два DNA-молекули од различни извори и да се добие вештачки или „рекомбинантен“ DNA молекул (Сл. 2.4). Со користење на два рестрикциски ензима со различни ориентации на препознавање, едниот може да комбинира два DNA молекули според претходно одредена ориентација (Сл. 2.5).

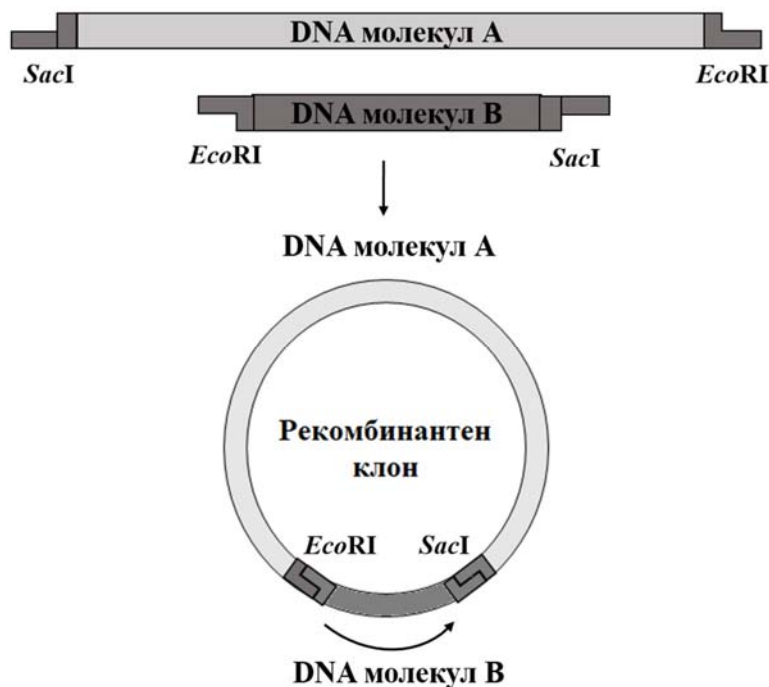
Табела 2.1 Рестрикциски ензими

Ензим	Извор	Секвенца	Пресечување	Краевии
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	GAATTC CTTAAG	G AATTC CTTAA G	5'-протрузија
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	GGATCC CCTAGG	G GATCC CCTAG G	5'-протрузија
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenza</i> Rd	AAGCTT TTCGAA	A AGCTT TTCGA A	5'-протрузија
<i>KpnI</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>	GGTACC CCATGG	GGTAC C C CATGG	3'-протрузија
<i>NotI</i>	<i>Nocardia otitidis</i>	GCGGCCGC CGCCGGCG	GC CGCCGG GGCCGC CG	5'-протрузија
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>	CCCGGG GGGCCC	CCC GGG GGG CCC	„тапи“ краевии
<i>SacI</i>	<i>Streptomyces achromogenes</i>	GAGCTC CTCGAG	GAGCT C C TCGAG	3'-протрузија
<i>TaqI</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>	TCGA AGCT	T CGA AGC T	5'-протрузија
<i>XbaI</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>badrii</i>	TCTAGA AGATCT	T CTAGA AGATC T	5'-протрузија



Слика 2.4 DNA фрагментите добиени под дејство на единечен *EcoRI* рестрикциски ензим се карактеризираат со компатибилни краеве (протрузии) кои можат да анилираат во двата правци, при што се поврзуваат 5'-фосфатната група и 3'-хидроксилната група на секој синцир. Ензимот DNA лигаза катализира формирање на фосфодиестерни врски и спојување на двете молекули.

Во 1972 година е конструиран првиот рекомбинантен DNA молекул. Една година подоцна, овој пристап е искористен за добивање на првиот генетски модифициран организам. Научните сознанија за плазмидите и рестрикциските ендонуклеази биле искористени за да се изврши сечење на DNA и нејзино инкорпорирање во плазмид, а потоа овој рекомбинантен DNA молекул бил реплициран во бактеријата *E. coli*. Трансферот на овие рекомбинантни DNA молекули во клетка-домаќин со цел да се изврши нивна амплификација се постигнува преку процесот означен како трансформација. Истражувањата покажале дека во бактериите се одвиваат ретки настани на природна трансформација. Фреквенцијата на овие настани се зголемува кога бактериските клетки се третираат со ладен раствор на CaCl_2 кој ја зголемува нивната компетенција за трансформација, пред да се изврши краток температурен шок на висока температура (42°C). Денес се користат алтернативни стратегии на електропорација за трансформација на клетки. Овие стратегии се користат за добивање на висока фреквенција на трансформација, како и успешно примање на бактериски артифицијални хромозоми (BAC) кои се премногу големи за конвенционална трансформација на бактериските клетки (Sheng и сор., 1995). Оваа процедура ја претставува основата за клонска пропација или амплификација на DNA, при што се иницира развитокот на DNA клонирачки вектори.



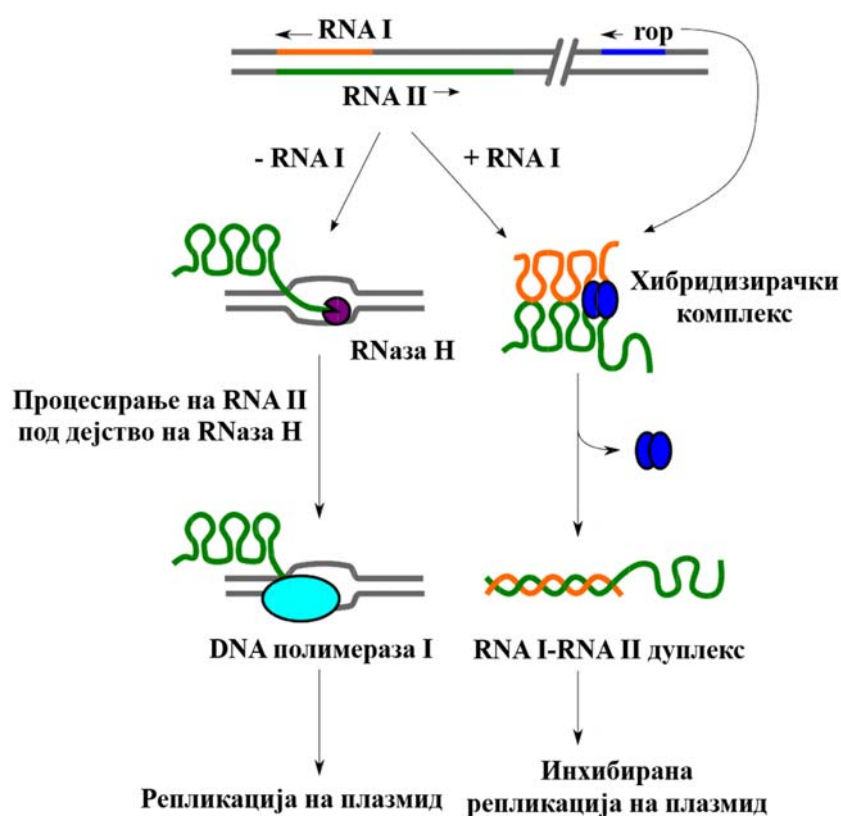
Слика 2.5 DNA фрагментите кои се добиени под дејство на два рестрикциски ензими *EcoRI* и *SacI* се карактеризираат со протрузии кои можат да анилираат само во еден правец, при што двете молекули се спојуваат само во еден правец.

2.2 DNA вектори

Клонирачки вектор е DNA молекул кој носи туѓи DNA фрагменти во клетка-домаќин со цел да се овозможи нивна репликација. Клонирачките вектори најчесто потекнуваат од плазмиди, кои претставуваат екстрахромозомски наследни елементи. Важно е да се напомене дека само бактериските плазмиди се соодветни вектори кои се користат за манипулација на DNA при генетскиот инеженеринг. Плазмидите се откриени во бактериите како двојноверижни и ковалентно затворени циркуларни екстрахромозомски DNA молекули. Во текот на еволуцијата, плазмидите развиле механизми за одржување на стабилен број на копии во клетките-домаќини.

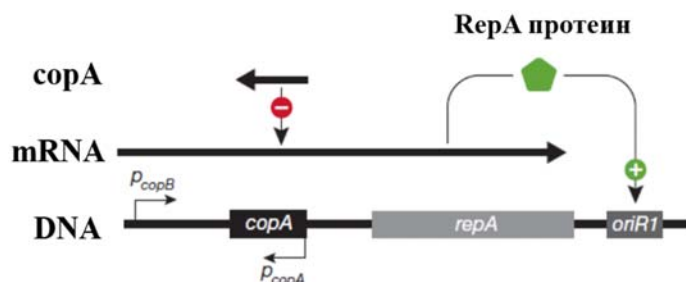
Репликацијата на DNA го одредува бројот на копии на плазмидите и овој процес е строго контролиран и координиран со клеточниот циклус. Процесот на репликација на DNA се иницира на различни места познати како извори на репликација (*ori*) и продолжува да се одвива во двата правци по должината на DNA. Кај простите организми како на пр. *E. coli* постои само еден извор на репликација (*oriC*). Сепак, комплексните организми со големи геноми имаат потреба од повеќе извори на репликација со цел да се изврши комплетно реплицирање на DNA пред клеточната делба. Изворите на репликација се дефинираат како сегменти на DNA од неколку стотини базни пара за кои се врзува DNA полимераза и други протеини кои се неопходни за синтеза на DNA. Исто така, неопходно е да се изврши репликација на плазмидната DNA во организмот-домаќин за да се обезбеди копија на плазмидот во секоја клетка-ќерка. Според тоа, регулацијата на процесот на репликација го одредува бројот на копии на плазмиди во секоја клетка. Изворите на репликацијата го одредуваат степенот на регулација на репликацијата на плазмидите. Плазмидите со строга регулација на репликацијата имаат мал број на копии и овие плазмиди се реплицираат паралелно со домаќинскиот хромозом

(еднаш при секој клеточен циклус). Од друга страна пак, плазмидите со слаба регулација на репликацијата имаат голем број копии на плазмиди (стотини копии во клетка) и се реплицираат во текот на клеточниот циклус на клетката-домаќин. Регулацијата на синтеза на плазмидната DNA овозможува одржување на рамнотежа со репликацијата на DNA во клетката-домаќин. Слабата регулација на репликација на плазмидите се контролира преку снабдување со RNA молекул познат како RNA II кој е неопходен за започнување на DNA синтеза (Сл. 2.6). Снабдувањето со RNA II се регулира од страна на друг RNA молекул познат како RNA I, кој е комплементарен на RNA II. Хибридизацијата на овие две RNA молекули со посредство на протеинот означен како Rop протеин предизвикува спречување на синтезата на DNA. Според тоа, репликацијата на плазмиди се инхибира при намалено снабдување со RNA II.



Слика 2.6 Бројот на копии на плазмидот ColE1 се регулира под дејство на два RNA транскрипти означени како RNA II и RNA I. RNA II транскриптот е неопходен за иницијација на репликацијата, додека пак, RNA I функционира како инхибитор на репликацијата. Насцентниот RNA II транскрипт хибридизира со плазмидната DNA во близина на изворот на репликација (ori). RNase H го прекунива RNA транскриптот и ја експонира 3'-хидроксилната група. Процесираниот RNA II транскрипт може да служи како прајмер за синтеза на DNA под дејство на DNA полимераза I. Формирањето на овој прајмер се инхибира под дејство на RNA I како пократок транскрипт кој е комплементарен со 5'-крајот на RNA II. Во присуство на RNA I се формира хибридирачки комплекс со RNA II под дејство на Rop протеинот. На таков начин се спречува формирањето на DNA-RNA II комплексот и процесирањето на RNA II.

Строгата регулација на репликација на плазмидите се одвива преку различен механизам. При овој механизам, бројот на копии на плазмидите се регулира преку снабдување со RepA протеин кој се кодира од плазмидот и негативно ја регулира сопствената транскрипција, а позитивно го регулира изворот на репликација (Сл. 2.7).



Слика 2.7 Основниот репликон кај плазмидот R1 содржи извор на репликација (*oriR1*), структурен ген *repA* одговорен за кодирање на RepA протеин кој се врзува за *oriR1* и *CorA* кој негативно ја регулира транслацијата на *repA* mRNA.

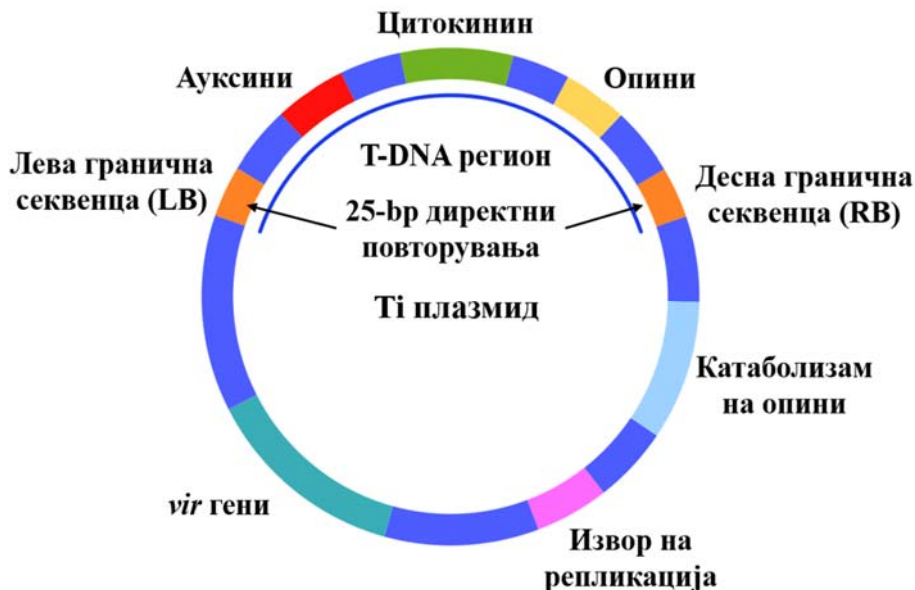
Плазмидите со висок број на копии кои се добиваат при слаба регулација на репликацијата се најчесто корисени вектори за добивање на големи количества на клонирани рекомбинантни DNA молекули. Од друга страна пак, плазмидите со низок број на копии кои се добиваат при строга регулација на репликацијата се користат како вектори за репликација на големи и нестабилни туѓи DNA фрагменти (пр. BAC) или гени кои имаат летални ефекти при висок број на копии. За разлика од хромозомската DNA, плазмидната DNA нема есенцијално значење за клетката домаќин. Сепак, плазмидните DNA молекули обезбедуваат селективна предност на клетките-домаќини во однос на нивните конкуренти. Така на пр., плазмидната DNA кодира гени за бактериоцини и антибиотици кои имаат важна улога кај клетката-домаќин за ефикасно убивање на другите конкуренти за хранливи материи. Првиот идентификуван бактериски плазмид бил факторот на фертиленост (F-фактор) кај *E. coli*. Овој F-фактор има значајна улога кај бактериите за пренесување на гени кај реципиентни клетки преку процесот на конјугација (Clark и Warren, 1979). На таков начин се обезбедува механизам за адаптивна еволуција, како на пр., плазмид-посредуван трансфер на гени за резистентност кон антибиотици или гени за патогеност.

2.2.1 DNA вектори за трансформација на растенија

Гените за патогеност кај голем број фитопатогени бактерии се кодираат во плазмидите и поради тоа имаат способност за инфекција и паразитирање кај растенијата. Карактеристичен бактериски фитопатоген организам е *Agrobacterium tumefaciens* кој поседува тумор-индуцирачки (Ti) плазмид (Сл. 2.8) и предизвикува тумор на вратот на коренот (crown gall disease) кај голем број растенија.

Способноста на *A. tumefaciens* кој содржи Ti плазмид да изврши генетски инженеринг на клетката-домаќин претставува основа за развиток на плазмидни вектори за *Agrobacterium*-посредувана трансформација на растенијата. Векторите за трансформација на растенијата се конструираат на таков начин што најпрвин се отстрануваат сите фитоонкогени или тумор-индуцирачки гени, а во T-DNA фрагментот се инсертираат гените од интерес за трансфер во јадрениот геном на растителна клетка (Сл. 2.9).

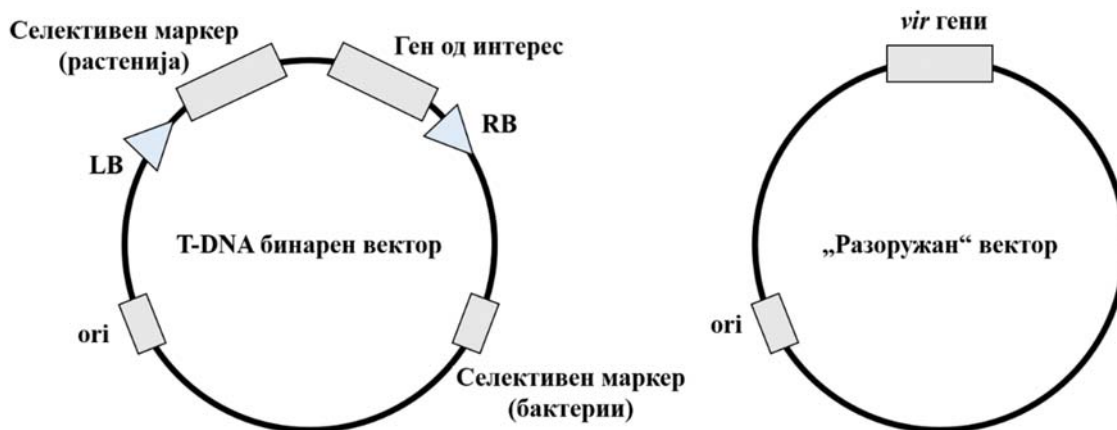
Овие растителни вектори се познати како **бинарни вектори** бидејќи стапуваат во интеракција со втор „разоружан“ Ti-плазмид кој не поседува T-DNA. Вториот „разоружан“ плазмид содржи *vir* регион кој е неопходен за трансфер и стабилна интеграција на T-DNA фрагментот од бинарниот вектор во јадрениот геном на клетката домаќин (Сл. 2.10).



Слика 2.8 Шематски приказ на Ti-плазмид кај *Agrobacterium tumefaciens* на кој се прикажани изворот на репликација, регион кој кодира вирулентни (*vir*) гени и трансфер DNA (T-DNA). Регионот на T-DNA е ограничен со 25-бр директни репетитивни секвенци кои се познати како лева и десна гранична секвенца (LB и RB, соодветно). *Vir* гените се неопходни за процесирање и трансфер на T-DNA во растителната клетка. Фрагментот на T-DNA стабилно се интегрира во јадрениот геном на растителната клетка, а гените од овој фрагмент кои кодираат биосинтеза на растителни хормони (цитокинини и ауксини) овозможуваат формирање на карактеристичен туморен раст и развиток на заболување познато како тумор на вратот на коренот. Исто така, T-DNA кодира опини (нопалин и октопин) кои претставуваат ексклузивен извор на азот за *Agrobacterium*. Според тоа, *Agrobacterium* кој поседува Ti-плазмид има конкуритивна предност над останатите бактерии од родот *Agrobacterium* кои не го поседуваат овој плазмид.



Слика 2.9 Фрагментот на T-DNA кој се користи за генетски инженеринг кај растенијата содржи селективен маркер ген под контрола на конститутивно активен промотор заедно со ген од интерес кој овозможува добивање на нов фенотип кај растителниот организам.



Слика 2.10 Шематски приказ на T-DNA бинарни вектор системи. Гените од интерес се одржуваат во рамки на T-DNA регионот на бинарниот вектор. *Vir* гените се наоѓаат во посебен репликон познат како „разоружан“ плазмид кој учествува во процесирање на T-DNA од бинарниот вектор и трансфер на T-DNA од бактеријата во клетката-домаќин. Бинарниот вектор содржи селективен маркер за потврдување на трансформацијата кај растителните клетки, како и селективен маркер за селекција на бактериските клетки кои го содржат T-DNA бинарниот вектор.

Растителните бинарни вектори се конструираат и амплифицираат со помош на бактеријата *E. coli*, која се користи како модел организам во молекуларната биологија. Откако ќе се конструираат векторите во *E. coli*, овие плазмидни вектори се пренесуваат во бактеријата *A. tumefaciens* која е одговорна за трансферот на гени во јадрениот геном на растителните клетки. Овие вектори содржат извори на репликација кои функционираат во *A. tumefaciens* и *E. coli*. Изворот на репликација pVS1 потекнува од плазмид на *Pseudomonas* и може стабилно да се одржува кај голем број протеобактерии, како што се претставниците од родовите *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* и *Burkholderia*. Поради тоа, изворот на репликација pVS1 има широка примена за конструкција на клонирачки вектори кои се соодветни за употреба кај бактерии кои стапуваат во интеракција со растенија. Притоа, *A. tumefaciens* го користи *repABC* оперонот за строга контрола на репликација на плазмидот и делба на плазмидната DNA за клетките ќерки. Овој оперон е присутен кај големите плаزمиди со низок број на копии кои потекнуваат од *Agrobacterium*, а се кодира од страна на хромозомските гени на *Agrobacterium*. Сепак, *E. coli* не го користи *repABC* оперонот за репликација на плазмидот и затоа плазмидите кои содржат само pVS1 извор на репликација не се реплицираат во клетките на *E. coli*. Затоа е неопходно бинарните вектори за размена помеѓу *E. coli* и *A. tumefaciens* да се дизајнираат на таков начин да содржат и ColE1 извор на репликација кој е компатибилен во *E. coli* и обезбедува слаба регулација на репликацијата (Сл. 2.11).

Со оглед на тоа што растителните бинарни вектори не обезбедуваат селективна предност за бактериите, неопходно е да се изврши генетски инженеринг на векторите со цел да се овозможи да кодираат селективни маркер гени за нивна пропација во *E. coli* и *A. tumefaciens*. Некои карактеристични селективни маркер гени кај бактериите се прикажани во Табела 2.2.



Слика 2.11 Растителен бинарен вектор со два извори на репликација. Едниот извор на репликација означен како pVS1 ori се користи за пропација кај *Agrobacterium*, додека пак, вториот извор на репликација означен како ColE1 ori се користи за пропација кај *Escherichia coli*. Исто така, векторот содржи ген за резистентност кон антибиотици (резистентност кон канамицин) и T-DNA фрагмент кој содржи растителен селективен маркер и ген од интерес.

Табела 2.2 Карактеристични селективни маркер гени кај бактериите.

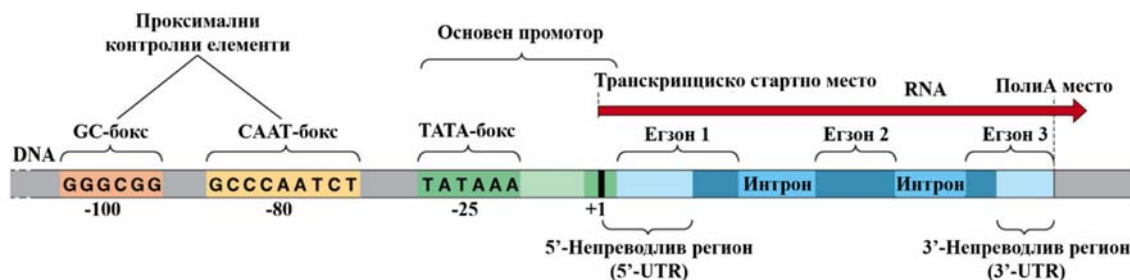
Антибиотик	Ген за резистентност кон антибиотици	Ген
Стрептомицин (спектиномицин)	Ген за аминокликозид аденил трансфераза	<i>aadA</i>
Канамицин	Ген за неомицин фосфотрансфераза	<i>nptII (neo)</i>
Хлорамфеникол	Ген за хлорамфеникол ацетил трансфераза	<i>cat</i>
Ампицилин	В-Лактамаза	<i>bla</i>
Тетрациклин	Тетрациклин/H ⁺ -антипортер	<i>tet</i>

При конструкција на векторите се користи активен бактериски промотор за транскрипција на генот за резистентност кон антибиотици. Затоа, бактериите кои го содржат овој вектор можат да преживеат и да ја амплифицираат рекомбинантната DNA. Истиот критериум за селекција се користи за *E. coli* и *A. tumefaciens*. Сепак, T-DNA фрагментот кој се пренесува во растителната клетка треба да содржи селективен маркер кој ќе биде под контрола на активен растителен промотор со цел да се овозможи идентификација и пропација на трансформирани растителни клетки (Сл. 2.11).

2.2.2 Компоненти за ефикасна генска експресија кај растенија

Во последните неколку децении е направен голем напредок во генетската трансформација на растенијата и идентификацијата на сите компоненти кои се неопходни за успешна интродукција и експресија на туѓи гени во растителните клетки. Првите конструирани химерни гени поседувале 5' и 3' нопалин синтаза (*nos*) регулаторни секвенци, односно *nos* промотор и *nos* терминатор. Иако *nos* промоторните и терминаторните секвенци имаат бактериско потекло од T_i плазмидот, овие

регулаторни секвенци имаат многу повеќе заеднички карактеристики со еукариотските гени отколку со прокариотските гени. Промоторот содржи слични секвенци на СААТ- и ТАТА-бокс кои се одговорни за мобилизирање на RNA полимераза II (RNAP II) и иницијација на транскрипцијата спротиводно од транскрипциското стартно место (Сл. 2.12). Секвенците на терминаторот содржат ААТАА полиаденилатна секвенца, која претставува сигнал за прекинување на транскриптот за околу 30 bp низводно од оваа сигнална секвенца. По ова прекинување на транскриптот се врши додавање на голем број аденински остатоци за да се формира полиА опашка на 3' крајот од транскриптот. Оваа полиА опашка има големо значење за стабилноста на mRNA.



Слика 2.12 Шематски приказ на растителен промотор. Транскрипциските фактори се врзуваат за промоторните секвенци и се иницира формирањето на транскрипциски комплекс. Компонентите на транскрипцискиот комплекс се врзуваат за СААТ-бокс и ТАТА-бокс и овозможуваат мобилизирање на RNA полимераза II со цел да се иницира процесот на транскрипција.

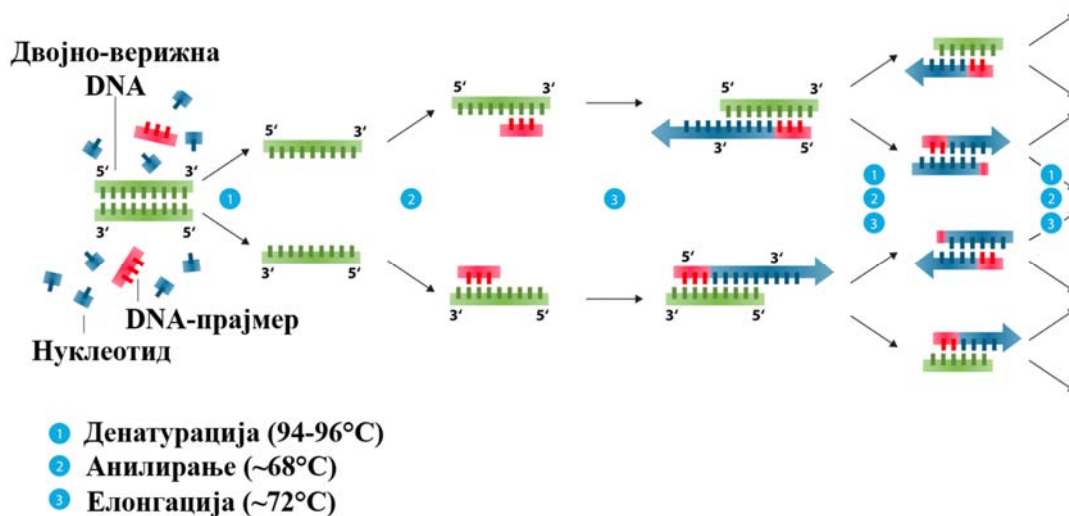
Ефикасноста на експресија на трансгенот кај растенијата зависи од бројни фактори кои влијаат врз акумулацијата и стабилноста на mRNA. Покрај промоторот, експресијата на трансгенот зависи од 5'- и 3'-непереводливите секевенци (UTR) на генот, користење на кодони (фреквенција со која одреден организам ги користи достапните кодони во гени), криптични сплајсинг места, незрели полиаденилатни места, како и секвенците и позициите на интроните. Затоа е неопходно да се земат во предвид сите овие фактори при дизајнирање на вектори за експресија на трансгени кај растенијата. Промените што се извршуваат на промоторната секвенца можат да влијаат врз начинот на експресија на трансгенот, односно дали трансгенот ќе се експресира на конститутивен или индуцибилен начин во сите клетки или во специфични клетки од растението. На сличен начин може да се одреди и количеството на генскиот производ во зависност од тоа дали е потребен низок или висок степен на експресија на трансгенот. Често пати се користи omega секвенцата од 5'-UTR на мозаичниот вирус на тутунот (TMV) со цел да се зголеми степенот на транслација кај растенијата. Оваа omega секвенца содржи поли(САА) регион како врзувачко место за heatshock протеинот HSP101, кој е неопходен за зголемување на степенот на транслација. Исто така, ефикасноста на иницијација на транслацијата зависи од други структури на mRNA, како што е должината на 5'-UTR (водечка секвенца). Притоа, кратките водечки секвенци предизвикуваат редуцирана ефикасност на транслацијата. Секундарните структури на mRNA кои се локализирани спротиводно или низводно од стартниот AUG кодон можат да го инхибираат врзувањето на рибозомите и да ја редуцираат транслацијата. Консензусната нуклеотидна секвенца околу стартниот AUG кодон кај дикотиледоните растенија е aaA(A/C)aAUGGCGu, додека пак, кај монокотиледоните растенија е c(a/c)(A/G)(A/C)cAUGGCG. Присуството на спротиводни AUG кодони кај некои гени може да ја редуцира ефикасноста на транслација (Kozak, 2005).

Често пати, туѓите гени содржат нуклеотидни секвенци кои не се користат од страна на растенијата за кодирање на аминокиселини. Невообичаената зачестеност во користење на кодони може да влијае врз стабилноста на mRNA. Така на пр., токсичните гени кај *Bacillus thuringiensis* се богати со A/T, каде што A или T се наоѓаат на третата позиција на кодонот, што претставува ретка појава кај растенијата. Модификацијата на нуклеотидната секвенца во кодирачкиот регион на овие гени може да предизвика зголемена експресија и продукција на висока концентрација на Bt токсин за да се убијат целните инсекти кои се хранат со растението. Исто така, селектираниот растителен вид за трансформација може да влијае врз дизајнот на трансгениот конструкт. Така на пр., фреквенцијата на користење на кодоните кај гените од монокотиледоните подлежи на строга контрола во споредба со дикотиледоните растенија.

Agrobacterium-посредуваната трансформација има ограничен таксономски ранг на растителни видови кои можат ефикасно да се трансформираат. Најголем успех при *Agrobacterium*-посредуваната трансформација е постигнат кај дикотиледоните растенија. Сепак, модификацијата на протоколите за трансформација овозможиле успешен трансфер на гени и кај голем број монокотиледони растенија. И покрај огромниот напредок во протоколите за генетска трансформација, монокотиледоните растенија најчесто се трансформираат со примена на методот на бомбардирање со партикули. При овој метод не се користат растителни бинарни вектори кои содржат T-DNA, бидејќи DNA молекулите на физички начин се пренесуваат во клетките со помош на силата од проектилните партикули. Во раните експерименти за трансформација на растенијата со методот на бомбардирање со партикули се користеле цели плазмиди, а денес се користи само трансгена касета (промоторни, генски и терминаторни секвенци). Овој пристап го редуцира бројот на инсертирани копии на трансгенот и се елиминира можноста за инсерција на непосакувани секвенци од векторот во геномот на растителната клетка.

2.3 Клонирање со примена на рекомбинација на DNA специфична за позиција

Рекомбинантната DNA технологија опфаќа комплексни манипулации со DNA со цел да се овозможи инсерција на одреден ген од интерес во соодветен вектор. Овие манипулации се олеснуваат со користење на вектори кои поседуваат серии на препознавачки места на рестрикциските ендонуклеази (рестрикциски места) во една секвенца која се нарекува **полилинкер** или **повеќекратно клонирачко место**. На таков начин се обезбедува соодветно место во векторот за инсерција на туѓа DNA. Ако векторите не поседуваат стандардизирано полилинкер место, тогаш DNA молекулите не можат лесно да се разменуваат помеѓу различни типови на вектори. Исто така, помеѓу различните типови на вектори постојат значајни разлики во гените и нивните промотори. Гените ретко се ограничени од двете страни со соодветни рестрикциски места за клонирање и често пати содржат внатрешни (интерни) рестрикциски места, што претставува причина за некомпатибилноста помеѓу некои вектори. Развитиот на методот на полимеразно-верижна реакција (Сл. 2.13) во 1985 година има големо значење при манипулацијата на DNA, воведувањето на рестрикциски места во позиции кои го ограничуваат генот или неговиот промотор, како и при отстранувањето на внатрешните рестрикциски места, а притоа се одржува интегритетот на генот. Методот на PCR се користи за амплификација на специфични DNA секвенци, како и за изменување на секвенци. Сепак, продукцијата на генски конструкти е сè уште макотрпен процес, бидејќи несоодветно позиционираните рестрикциски места претставуваат главен фактор кој ја ограничува постапката за конструкција на вектори.



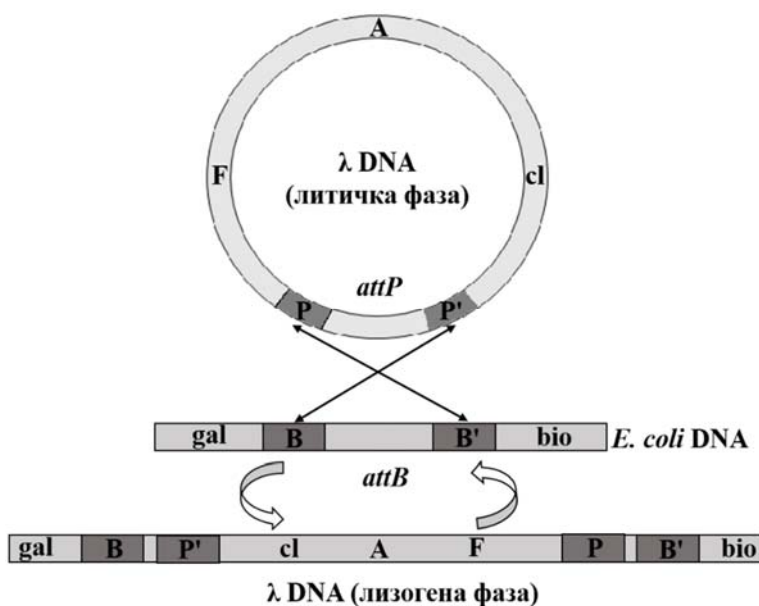
Слика 2.13 Полимеразно-верижна реакција е техника која овозможува *in vitro* амплификација на селектиран регион на DNA преку раздвојување на двојноверижен DNA примерок на два синцира преку денатурација и инкубација со олигонуклеотидни прајмери и DNA полимераза со цел да се синтетизираат комплементарни синцири. Повторувачките циклуси на денатурација, анилирање на прајмерите и елонгација (синтеза на DNA со DNA полимераза) овозможува амплификација на целниот регион на DNA (неколку илјада пати). Оваа техника има широка примена во биотехнологијата, форензиката, медицината и генетиката.

Денес се развиваат различни стратегии за да се надминат недостатоците поврзани со конвенционалното клонирање. Новите клонирачки стратегии се базираат на техники на рекомбинација на DNA специфична за позиција кои значајно го редуцираат времето за добивање на рекомбинантни DNA вектори за анализа на гени и конструкција на cDNA библиотека (cDNA е DNA секвенца која е комплементарна на кодирачката секвенца на RNA-транскриптот). Еден од најчесто користените методи е Gateway™ системот кој ефикасно се користи кај големите проекти за клонирање.

Gateway клонирање. Предноста на Gateway системот на клонирање се елементите кои природно еволуирале во животниот циклус на бактериофагот (λ). За време на овој циклус (Сл. 2.14), бактериофагот преминува од лизогена фаза (вирусниот геном е стабилно инкорпориран во геномот на домаќинот) во литичка фаза (клеточна лиза на домаќинот и ослободување на инфективни партикули на бактериофагот).

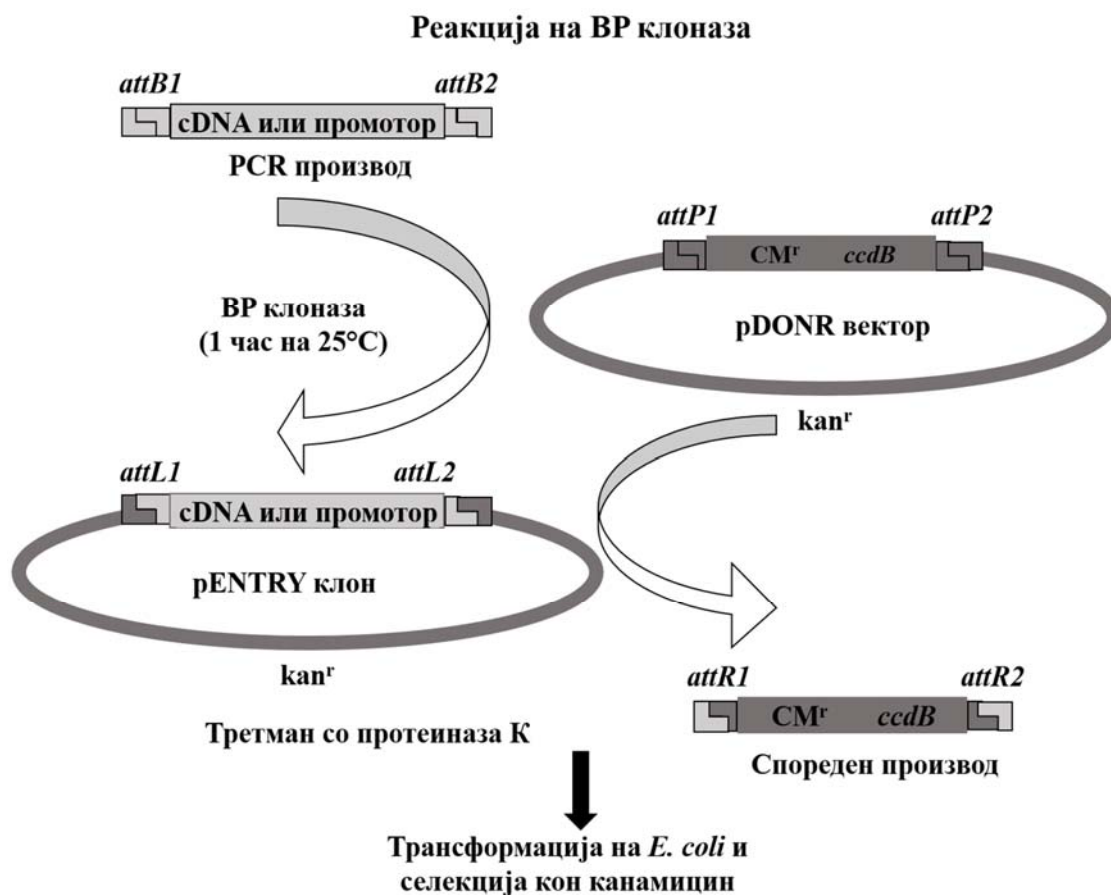
Gateway системот на клонирање користи модифицирани *att* рекомбинациски места во комбинација со ензимска мешавина за интеграција позната како BP клоназа која ги содржи протеините интеграза (Int) и фактор на интеграција во домаќинот (IHF), како и ензимска мешавина за ексцизија/интеграција позната како LR клоназа која ги содржи протеините Int, IHF и ексцизионаза (Xis) со потекло од елементите кои се користат за време на животниот циклус на бактериофагот λ . Фрагментите на DNA кои се ограничени со рекомбинациски места се мешаат *in vitro* со вектори кои исто така содржат рекомбинациски места, при што се овозможува размена на DNA фрагменти и формирање на рекомбинантна DNA. Примената на оваа стратегија ги елиминира недостатоците кои се поврзани со конвенционалното клонирање (несоодветни рестрикциски места, долготрајни реакции). При Gateway клонирањето, *att* местата се модифицираат на таков начин што ориентацијата на DNA фрагментите може да се

одржува за време на процесот на ексцизија и интеграција. Реакцијата катализирана од страна на ВР клоназа овозможува специфична рекомбинација на *attB1* место со *attP1* местото, при што се формира *attL1* место, додека пак, *attB2* местото специфично се рекомбинира со *attP2* местото за да се добие *attL2* место (Сл. 2.15). Овој процес овозможува интеграција на ограничените PCR фрагменти со *attB1* и *attB2* места во рDONR вектори кои содржат реципрочни *attP* места. На таков начин се добиваат „влезни клонови“ (рENTRY) во кои селектираните DNA фрагменти се ограничени со *attL1* и *attL2* места.



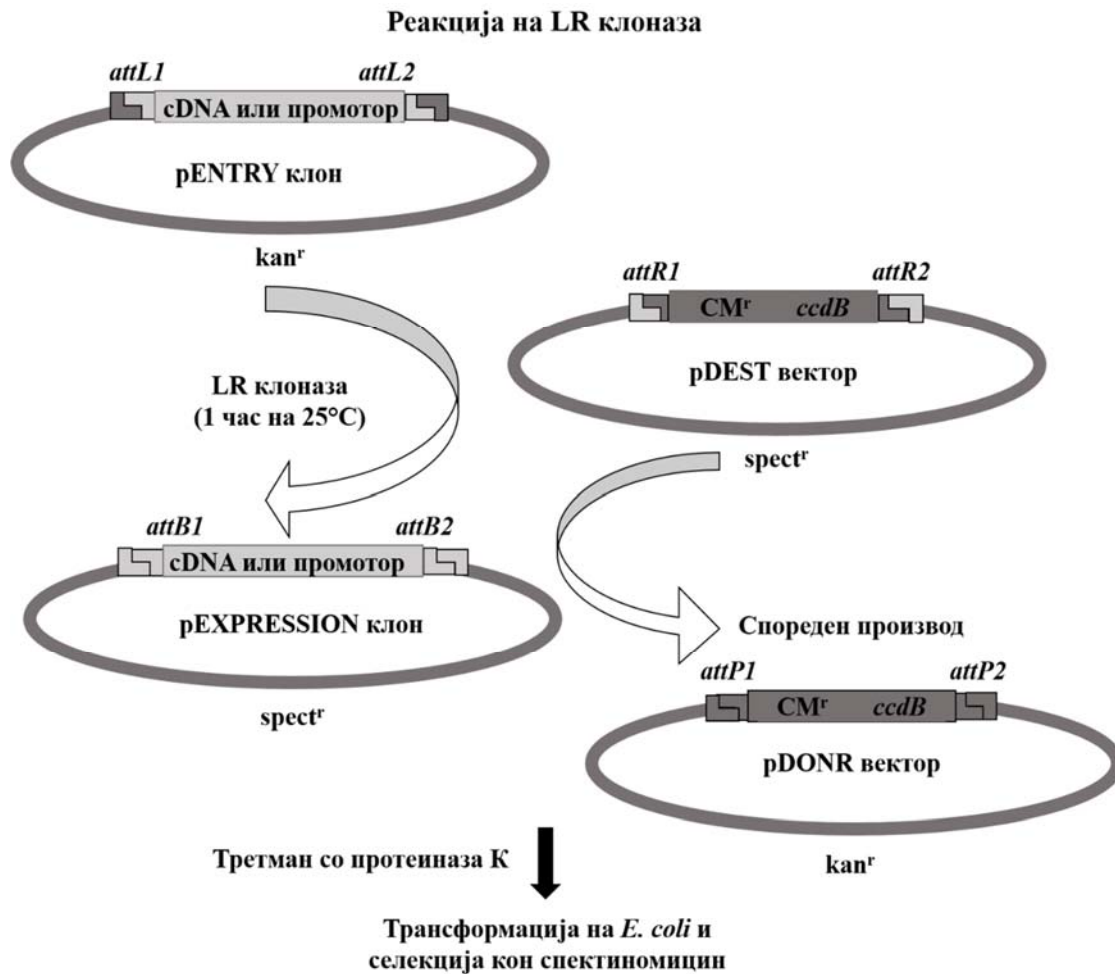
Слика 2.14 За време на лизогената фаза, вирусната DNA се инкорпорира во геномот на клетката домаќин преку процесот на рекомбинација помеѓу заедничките секвенци, односно *att* местата од двата генома. Бактериофагот λ содржи *attP* место (P-фаг), додека пак, домаќинската DNA на *E. coli* содржи *attB* место (B-бактерија). Процесот на рекомбинација се одвива со посредство на бројни протеини: Интеграза (Int) со потекло од λ -фагот и фактор на интеграција на домаќинот (IHF) со потекло од *E. coli*. Овие протеини се одговорни за навлегување на бактериофагот во лизогена фаза од својот животен циклус. Протеините IHF, Int и Ексцизионаза (Xis) со потекло од λ -фагот се одговорни за ексцизија на фагот од геномот на *E. coli* и навлегување во литичка фаза од неговиот животен циклус.

Овие „влезни клонови“ со дефинирани DNA фрагменти понатаму се користат за инсерција во т.н. “destination vectors” (pDEST). Реакцијата катализирана од страна на LR клоназа овозможува трансфер на DNA фрагментите ограничени со *attL1* и *attL2* места преку втора реакција на рекомбинација во pDEST вектори кои содржат *attR1* и *attR2* места. Добиените рекомбинантни DNA конструкти се познати како „експресирачки клонови“ (рEXPRESSION). Според тоа, рекомбинацискиот производ на *attL1* и *attR1* местата е *attB1* местото, а рекомбинацискиот производ на *attL2* и *attR2* местата е *attB2* местото (Сл. 2.16).



Слика 2.15 PCR амплификација на ген или промотор со користење на DNA целно-специфични прајмери кои содржат *attB* места (*attB1* и *attB2*) на 5' и 3'-краеви, соодветно. Пурифицираниот PCR производ кој е ограничен со *attB* места се комбинира со pDONR вектор кој содржи соодветни *attP* места. На оваа DNA мешавина се додава ензимот ВР клоназа (содржи Int и IHF протеини). По инкубација од 1 час на 25°C се додава протеиназа К и повторно се врши инкубација од 20 минути на 37°C. Оваа мешавина се користи за трансформација на бактериски клетки од *E. coli* кои се инокулираат на медиум во присуство на соодветен антибиотик (канамицин) за селекција на трансформираниите клетки кои содржат соодветен pENTRY клон.

Селекцијата на соодветен рекомбинациски производ од реакциите од ВР- и LR-клоназа се врши со помош на позитивни и негативни селективни маркери. Позитивната селекција се овозможува преку алтернативна селекција кон антибиотици, додека пак, негативната селекција се обезбедува преку *ccdB* генот, чијшто производ ја инхибира активноста на DNA гираза и настанува клеточна смрт. Бактериите на *E. coli* трансформирани со векторите кои содржат *ccdB* ген (pDONR или pDEST вектори) немаат способност за раст. Бактериите можат да преживеат само ако го содржат рекомбинантниот конструкт од интерес без *ccdB* генот, а воедно содржат соодветен маркер ген за резистентност кон антибиотик (Сл. 2.14 и 2.15).



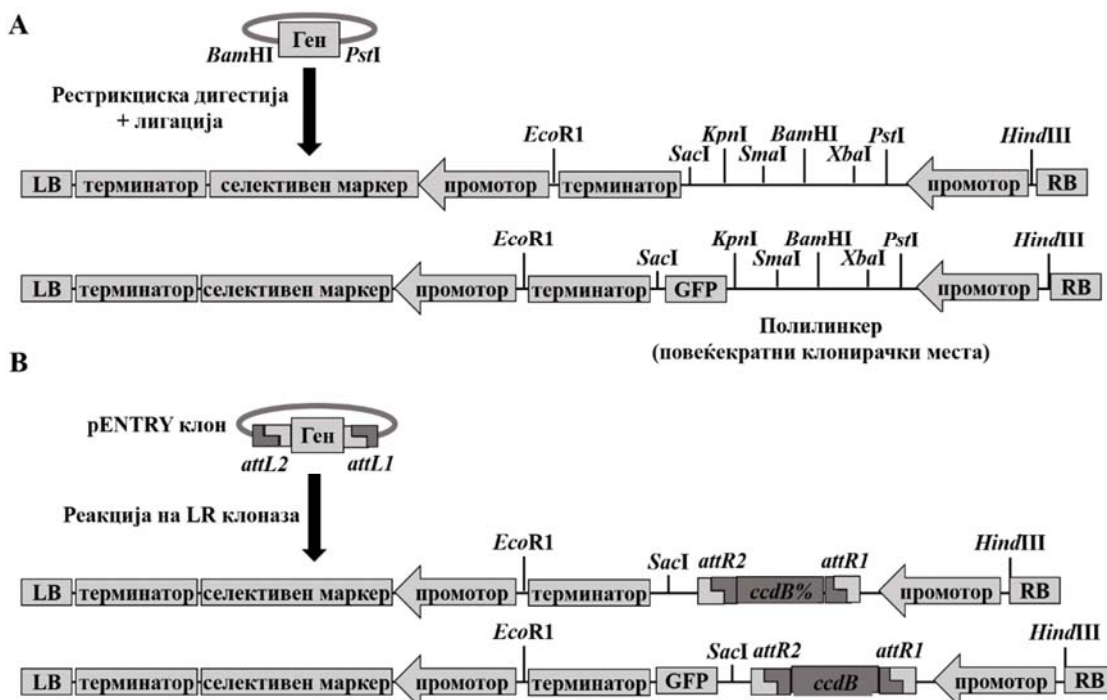
Слика 2.16 Ген или промотор којшто се содржи во pENTRY клон ограничен со *attL* места (*attL1* и *attL2*) се комбинира со pDESTINATION вектор кој содржи соодветни *attR* места. На оваа DNA мешавина се додава ензимот LR клоназа (содржи Int, IHF и Xis протеини). По инкубација од 1 час на 25°C се додава протеиназа K и повторно се врши инкубација од 20 минути на 37°C. Оваа мешавина се користи за трансформација на бактериски клетки од *E. coli* кои се инокуираат на медиум во присуство на соодветен антибиотик (спектиномицин) за селекција на трансформирани клетки кои содржат соодветен pEXPRESSION клон.

2.4 Дизајн на вектори

2.4.1 Вектори за функционална анализа

Секвенционирањето на целиот геном на модел организмите *Oryza sativa* од моноцитиледоните растенија и *Arabidopsis thaliana* од дикотиледоните растенија претставува вистински предизвик за анализа на рекомбинантните DNA молекули. Иако се откриени голем број промотори и протеин-кодирачки гени од овие геноми, сè уште постојат бројни некарактеризирани генски секвенци. Тоа претставува огромен мотив за дизајн и конструкција на вектори за ефикасна функционална анализа на гените. Традиционалните методи на клонирање со користење на лигази не претставува

практичен пристап за олеснување на анализата на сите гени и промотори кај овие модел растенија. Денес се користат растителни вектори кои се компатибилни со Gateway-рекомбинациското клонирање за да се овозможи ефикасна функционална анализа на гените (Сл. 2.17).



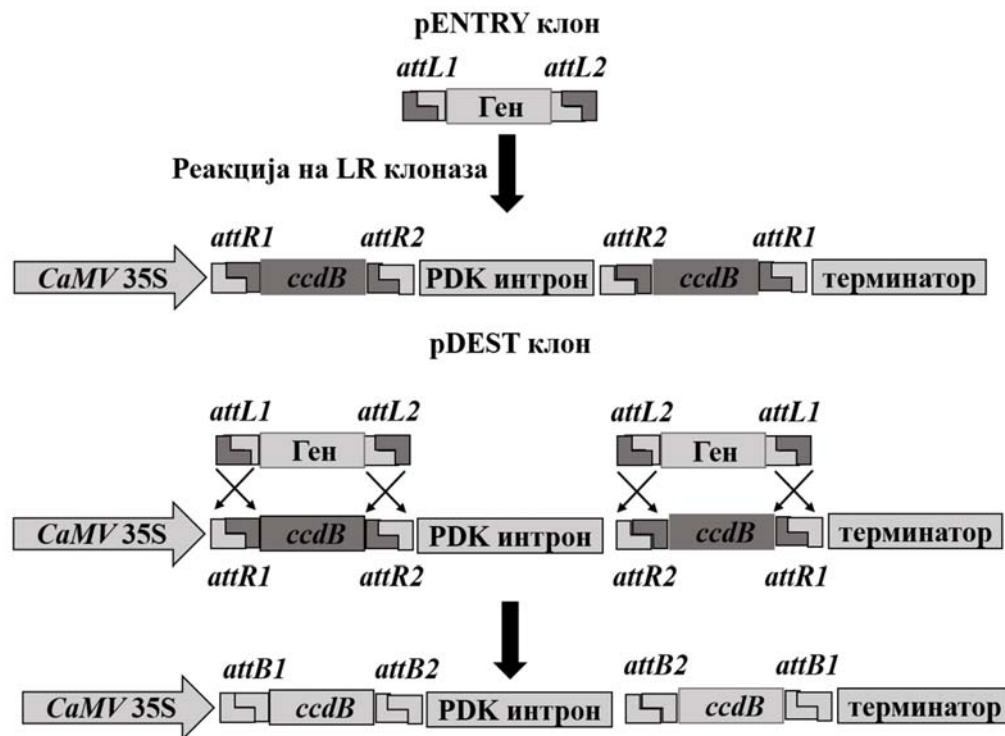
Слика 2.17 Растителни вектори за генска експресија за конвенционално клонирање со користење на рестрикциска дигестија и лигација (A) и Gateway™ рекомбинациско клонирање (B). Првите вектори прикажани на (A) и (B) се дизајнирани за да овозможат ектопична експресија на гени во растителната клетка. Вторите вектори од двата типа на клонирање содржат ген означен како GFP (зелен флуоресцентен протеин). Овие вектори се дизајнирани за да се овозможи фузија на протеини со GFP со цел да се идентификува некој субцелуларен протеин од интерес. При конструкцијата на векторите неопходно е да се изврши идеална фузија помеѓу генот од интерес и маркер генот. Инсертираната DNA треба да биде во „отворена“ ORF конфигурација, односно без присуство на стоп кодон помеѓу генот од интерес и маркер генот.

Денес се добиени голем број рекомбинациски компатибилни колекции од растителни отворени рамки на читање (ORF). Модифицираните ORF на кои им се отстранети 5' или 3' UTR (содржат само протеин-кодирачки секвенци) можат брзо и ефикасно да се пренесуваат преку вектори кои поседуваат компатибилни рекомбинациски места. Овие колекции на ORF-оми (комплетен сет на отворени рамки на читање во еден геном) се добиени на таков начин што позициите на оригиналните кодони за иницијација и терминација на транслацијата се непроменети и остануваат интактни („затворена“ ORF конфигурација). Исто така постојат колекции на ORF-оми во кои се елиминира стоп кодонот („отворена“ ORF конфигурација). Овие „отворени“ ORF конфигурации се користат при испитување на функцијата на гените кога е неопходно да се изврши фузија на С-терминалниот пептид. Често пати, функционалните податоци од некоја ORF или

ген се однесуваат на фенотипот што го индуцираат при нивна ектопична експресија (пр. во ткива каде што генот не се експресира во нормални услови) која е под контрола на конститутивен или убиквитарен промотор. Gateway-векторите кои се дизајнирани за овој тип на анализа се добиени со користење на силно активен 35S промотор од мозаичниот вирус на карфиолот (CaMV). Сепак, сите ORF не можат конститутивно да се експресираат и некои од нив можат да предизвикаат летални ефекти. При овие случаи, ORF се пренесуваат во вектори кои се дизајнирани за кондиционална или индуцибилна ектопична експресија (Joubes и сор., 2004) или во вектор системи кои овозможуваат индуцирана експресија кај одредени типови клетки (Brand и сор., 2006).

2.4.2 Вектори за RNA интерференција (RNAi)

Ефикасна стратегија за проучување на функцијата на гените е да се редуцира или „нокаутира“ природната генска експресија во организмот со примена на RNA интерференција (RNAi). При овој процес се формира двојноверижна RNA преку транскрипција на инвертирана репетитивна секвенца на одреден ген. Добиениот транскрипт формира структура во форма на шнола која го иницира процесот на RNAi и настанува деградација на хомологна mRNA (Brodersen и Voinnet, 2006). Со конструкција на специјализирани Gateway™ вектори (pDEST) се овозможува брза и ефикасна продукција на двојноверижни RNA молекули (Сл. 2.18).



Слика 2.18 Генско стивнување кај растенијата може да се постигне со користење на инвертирани репетитивни трансгени конструкти кои кодираат RNA молекул во форма на шнола. Со примена на технологијата на Gateway™ клонирање може да се добијат инвертирани репетитивни трансгени конструкти, бидејќи се одржува ориентацијата на DNA фрагментот за време на процесите на интеграција и ексцизија. Притоа, Gateway™ рекомбинациските касети се меѓусебно распоредени во спротивни ориентации.

Кај стандардните GatewayTM вектори, *att* местата на модификација се дизајнирани за одржување на ориентацијата на DNA фрагментот за време на процесите на ексцизија и интеграција (Hartley и сор., 2000). Распоредот на *att* местата во RNAi конструктите овозможува лесна инсерција на два идентични генски сегменти во спротивна ориентација кои се локализирани во низводна позиција од конститутивен активен промотор (Сл. 2.18). Конститутивно експресираната интерферирачка RNA може да се користи за стивнување на гени во текот на развитокот на растенијата.

2.4.3 Вектори кои потекнуваат од растителни секвенци

Развитокот на рекомбинантната DNA технологија овозможува генетски инженеринг на нови особини кај растителните култури кои не можат да се добијат со конвенционалната селекција. Рекомбинантната DNA технологија ги надминува интерспециските бариери кај растенијата и се проширува достапноста на генетски особини за модификација. Сепак, примената на оваа технологија е предмет на многу дискусии за конзумирање на генетски модифицирани сорти на растенија. Истражувањата на консументите покажале дека јавното прифаќање на генетски модифицираните организми се поврзува со интересот за потеклото на генетскиот материјал кој се користи за подобрување на особините на растенијата. Овие истражувања покажале дека најмалку привлечна растителна храна за консументите е онаа која содржи туѓ генетски материјал кој потекнува од несродни организми на растенијата. Сепак, важно е да се напомене дека нормалните растителни клетки содржат 3 геноми: јадрен геном и два генома кои потекнуваат од бактериите, односно хлоропластен и митохондријален геном од цијанобактериите и α -протеобактериите, соодветно. Оваа недоверба на консументите за присуството на туѓ генетски материјал во растителната храна може да се редуцира преку внимателно дизајнирање на рекомбинантни DNA вектори за подобрување на особините кај растенијата.

При дизајнот на векторите неопходно е т.н. „нерастителни секвенци“ да се одржуваат на минимално ниво. Фрагментите на T-DNA од *Agrobacterium* се најчест извор на туѓ генетски материјал кај растенијата кој може да се елиминира преку користење на растителни или “P-DNA” секвенци (Rommens и сор., 2004). Овие растителни секвенци се функционални аналози на T-DNA од *Agrobacterium* кои го поддржуваат трансферот на DNA од *Agrobacterium* во растителните клетки. Трансферот на DNA во растителните клетки е релативно редок настан и трансформираните клетки најчесто се идентификуваат и регенерираат со помош на селективни маркери, како на пр., гени за резистентност кон антибиотици кои имаат бактериско потекло. Откако туѓите селективни маркер гени ќе послужат за селекција на трансформираните клетки, овие генски секвенци можат да се отстранат бидејќи немаат повеќе никаква улога при експресија на трансгените особини кај растенијата.

Маркер гените (резистентност кон хербициди) се користат за селекција на трансформираните растителни клетки, а истовремено овозможуваат подобрување на особините кај некои растителни култури. Околу 75% од генетски модифицираните растенија поседуваат резистентност кон хербициди (Castle и сор., 2004). Најчесто користените гени за резистентност кон хербициди потекнуваат од бактериите *Streptomyces hygroscopicus* и *Bacillus licheniformis*. Бактериските гени за резистентност кон хербициди можат да се заменат со секвенци од растително потекло. Досега се идентификувани неколку растителни гени кои обезбедуваат резистентност кон хербициди.

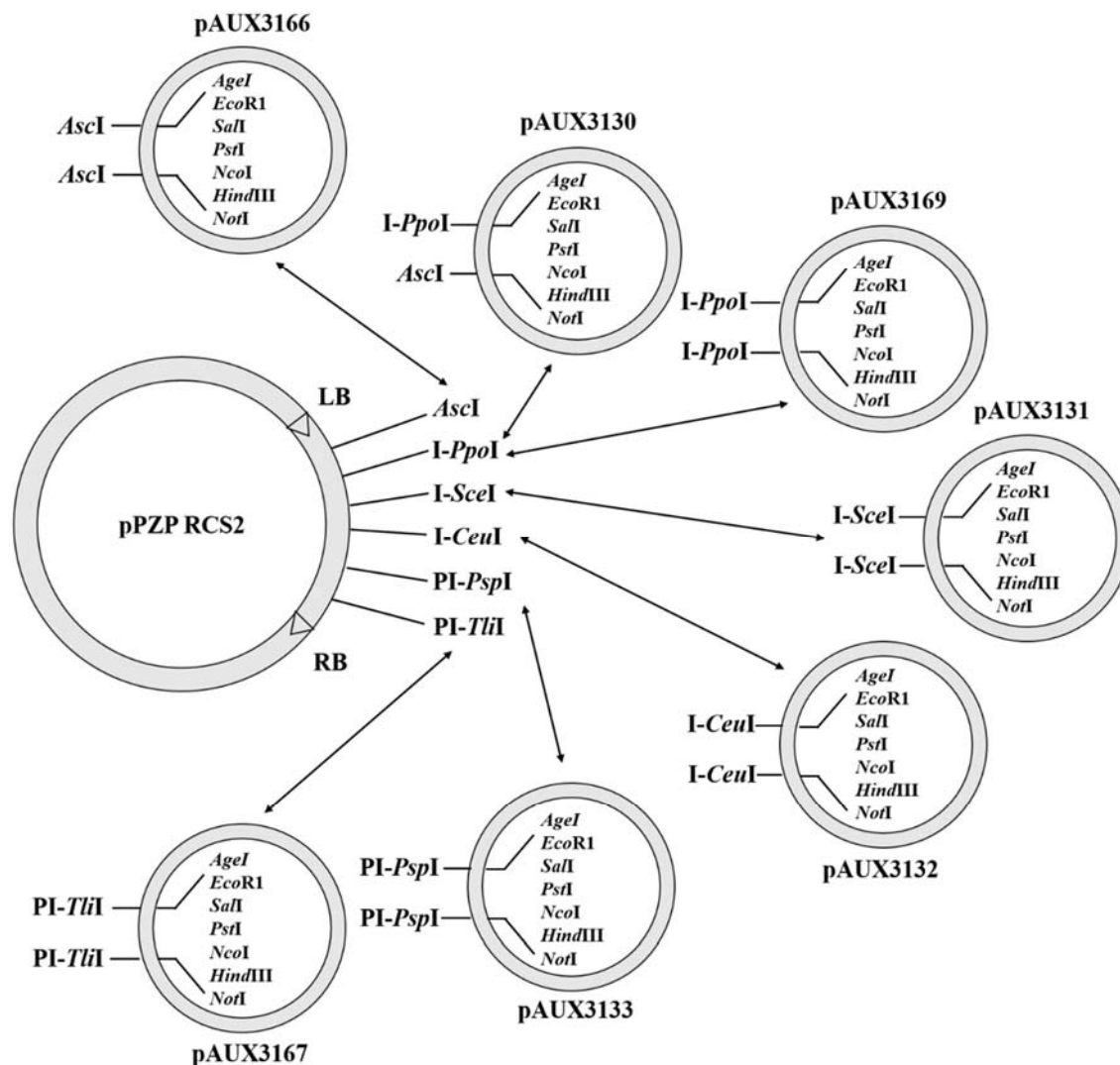
Податоците од секвенционирањето на растителниот геном и развитокот на методите во молекуларната биологија на растенијата имаат големо значење во идентификацијата и изолацијата на растителни секвенци кои можат да се користат за подобрување на растителните култури. Често пати, вирусните промотори (CaMV 35S) се користат за конститутивна и убиквитарна експресија на гени кај трансгените растенија. Овие промотори можат да се заменат со растителни промотори кои покажуваат сличен модел на експресија, како што се промоторите на актин и убиквитин. Примената на овие промотори за конститутивна и убиквитарна експресија на трансгени можат да предизвикаат некои несакани секундарни ефекти. Овие несакани ефекти можат да се елиминираат преку дизајн и конструкција на вектори за трансфер на ткивно-специфична или кондиционална генска експресија. Така на пр., дварфизмот (цучест раст) е важна особина во земјоделството за преживување на растенијата во услови на силни дождови и ветрови. Овие цучести растенија имаат низок раст бидејќи абнормално реагираат на фитохормонот гибберелин. Обидите за добивање на трансген цучест ориз преку нарушена експресија на генот *Arabidopsis gibberellin-insensitive* (GAI) резултирале со добивање на цучести растенија кои имале ниска продукција на семе (Tomsett и сор., 2004). Натамошните експерименти покажале дека овој недостаток може да се надмине преку конструкција на вектор, каде што трансгенот GAI се наоѓа под контрола на индуцибилен промотор (Ait-ali и сор., 2003).

Иако се идентификувани голем број ендегени растителни промотори кои брзо реагираат на апликација на индуктори, овие промотори можат да реагираат и на различни фактори од животната средина (вода, салинитет, температура, светлина, повредување или инфекција со патогени организми). Притоа, ендегените промотори можат несоодветно да се индуцираат од страна на факторите од животната средина и индукторите можат да ја модифицираат природната генска експресија (промени во физиологијата и развитокот на растението). Затоа се користи алтернативен пристап кој ја ограничува активноста на трансгенот во специфични типови на ткива со цел да се добие особината од интерес. При експресија на GAI генот, примената на конструкт со промотор кој е активен само во вегетативни ткива (а не во репродуктивни ткива) може да обезбеди добивање на цучести растенија кои немаат редуцирана продукција на семе.

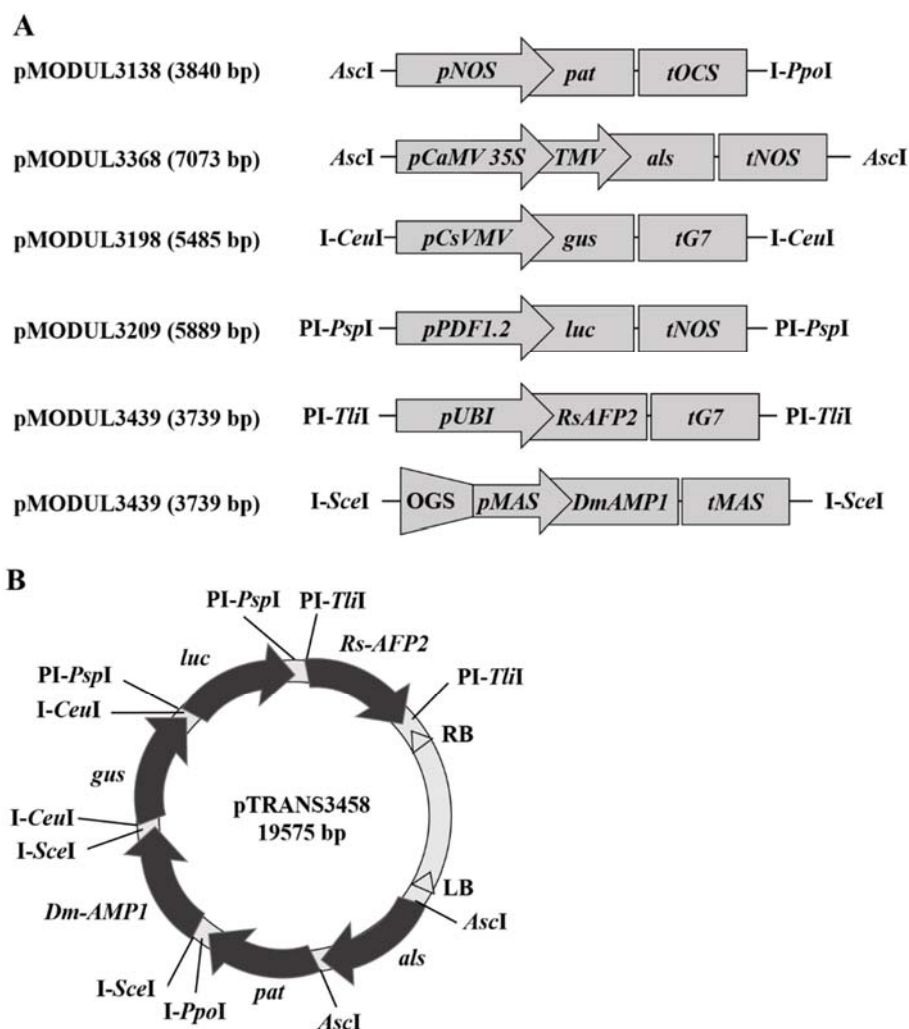
2.4.4 Вектори за мултигенски особини

Конструкцијата на вектори за подобрување на растенија може да се базира на инсерција на единечен ген, како што е продукција на Bt токсинот за заштита на растенијата од инсекти или инсерција на неколку гени при генетски инженеринг кај голем број важни особини во земјоделството. Денес, мултигенските особини се добиваат преку последователно полово вкрстосување на трансгени растителни линии кои овозможуваат акумулација на 3 или 4 независни трансгени во едно растение или со примена на различни трансгени од посебни T-DNA фрагменти кои се користат за котрансформација на растенијата. Првиот пристап претставува макотрпен и долготраен процес, додека пак, вториот пристап се смета како технички предизвик. Прецизното дизајнирање и конструирање на растителните вектори за трансформација може да има големо значење во елиминирање на голем број технички недостатоци и да се овозможи експресија на полигенски особини од единечен T-DNA фрагмент. Еден ваков дизајн се базира на колекција на дополнителни или помошни вектори (Сл. 2.19). Со примена на овие пристапи е добиен конструкт (Сл. 2.20) кој има способност за експресија на најмногу шест трансгени од единечна локација во јадрениот геном (Goderis и сор., 2002).

Постојат голем број алтернативни пристапи за поврзување на повеќе гени во акцепторни вектори. Овие вектори ги користат системите на рекомбинација специфични за позиција и т.н. “homing” ендонуклеази кои дозволуваат последователен и неограничен трансфер на експресиранки касети во акцепторен вектор, при што се овозможува експресија на голем број трансгени од единечен локус во геномот.



Слика 2.19 Помошните вектори обезбедуваат рестрикциски места на препознавање за конвенционалното клонирање на експресиранка касета со секвенци од интерес на промотор, ORF и терминатор. Експресиранките касети се ограничени со 8-bp рестрикциски места на препознавање или места на т.н. “homing” ендонуклеаза. Овие места на “homing” ендонуклеаза се екстремно ретки кај природните секвенци и можат да го олеснат асемблирањето на неколку експресиранки касети во единечниот растителен вектор за трансформација pPZP RCS2.



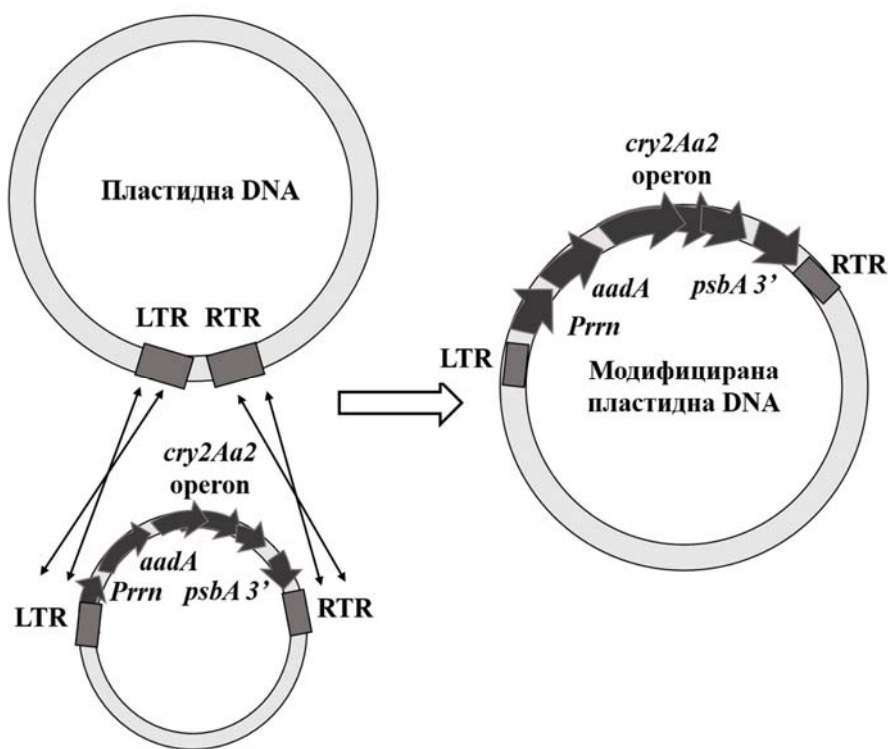
Слика 2.20 Шематски приказ на шест експресирански касети инсертирани во помошен вектор. (A) Различни промотори се користени за добивање на секоја експресиранска касета: промотор за нопалин синтаза ген (*pNOS*), RNA промотор за мозаичен вирус на карфиол (*pCaMV 35S*) со нетранслатирачки регион на мозаичен вирус на тутун (*TMV*), промотор на мозаичен вирус на касава (*pCsVMV*), растителен одбранбен 1.2 промотор на *A. thaliana* (*pPDF1.2*), промотор на *GubB1* ген од *Helianthus annuus* (*pUBI*) и промотор на манопин синтаза ген (*pMAS*) со спротиводна активирачка секвенца на промотор за октопин синтаза (*uasOCS*). Овие промотори ја контролираат експресијата на различни гени, како генот за фосфинотрицин ацетил трансфераза (*pat*) од *S. hygroscopicus*, кодирачка секвенца на DmAMP1 дефензин (*DmAMP1*), кодирачка секвенца за ацетолатат синтаза (*als*), *uidA* генот за β -глицуронидаза (*gus*) од *E. coli*, ген за луцифераза (*luc*) и дефензин кодирачка секвенца на RsAFP2 (*RsAFP2*). Секоја касета содржи терминатор: терминатор од *Agrobacterium tumefaciens* за нопалин синтаза ген (*tNOS*), терминатор на генот 7 од плазмидот *Ti15955* на *A. tumefaciens* (*tG7*), терминатор на манопин синтаза ген од *A. tumefaciens* (*tMAS*) и терминатор од октопин синтаза ген (*tOCS*) на *A. tumefaciens*. (B) Овие шест генски касети се распоредени помеѓу LB и RB од T-DNA на векторот pTRANS3458.

2.5 Таргетирани инсерции на трансген

Рекомбинантниот T-DNA вектор со дизајнирани особини за стабилна интеграција и генска експресија овозможува навлегување на DNA од интерес во растителната клетка и случјана интеграција во геномот. Позицијата на интеграцијата не може да се контролира и често пати резултира со варијабилан степен на експресија на трансгенот. Бројни фактори влијаат врз експресијата на трансгенот кај растенијата, како на пр., број на инсертирани генски копии во геномот, локални *cis*-дејствувачки елементи и RNA стивнување. Нетранскрибирачките региони богати со A/T во еукариотските геноми, познати како матрикс-прикрепувачки региони (matrix attachment regions-MAR) се користат за ограничување на гените во T-DNA векторите (Butaye и соp., 2004). Овие секевенци имаат големо значење за стабилна експресија на трансгенот и на таков начин трансгените се заштитуваат од RNA стивнување (Mlynárová и соp., 2003). Сепак, таргетирањето на трансгени во претходно одредени хромозомски места преку хомологна рекомбинација можеби ќе обезбеди подобра контрола и редукција на потенцијалните позициони ефекти. Сепак, овие пристапи се покажале како неефикасни. Продукцијата на синтетски транскрипциски фактори како цинков прст протеини (zinc-finger proteins-ZFP) кои се дизајнирани за препознавање на специфични целни DNA секевенци имаат потенцијал за зголемување на ефикасноста на таргетирана хомологна рекомбинација кај растенијата. На таков начин може да се постигне генетски инженеринг на прецизни делеции, инсерции или мутации во рамки на специфични хромозомски региони. Продукцијата на прилагодени или модифицирани ZFP во иднина може да обезбеди различни прецизни алатки за изменување на геномите и промени во експресијата на ендегените гени и трансгени кај идните генерации на генетски модифицираните растенија.

2.6 Безбедност при дизајн на вектори

Примената на растенијата како биореактори за производство на полимери, антитела, вакцини, хормони и други терапевтски агенси претставува нов предизвик при дизајн и конструкција на вектори. Ефикасната примена на растенијата како биореактори вклучува внимателна селекција на растението домаќин и иновативен дизајн на вектори за да се обезбеди висок степен на генска експресија. При овие биотехнолошки експерименти неопходно е да се превземат соодветни безбедносни мерки со цел да се спречи генетски модифицираните производи да навлезат во синџирот на исхрана. Растенијата имаат голем број предности во фармацевтската индустрија. Особено значајна примена на растенијата е еукариотскиот модел на синтеза на протеини, кој се карактеризира со посттранслациска модификација и чекори на асемблирање кои се неопходни за да се добијат активни еукариотски протеини (пр. антитела). Сепак, гликозилацијата на протеините кај растенијата се одвива на поинаков начин во споредба со цицачите. Неодамнешните истражувања во насока на „хуманизација“ на растителните патишта на гликозилација (Joshi и Lopez, 2005) ќе овозможи продукција на т.н. „хуманизирани“ протеини. Во тој контекст, предноста кај растенијата е способноста за висок степен на мултипликација, која може да обезбеди висока продукција на протеини. Исто така, растителните протеини се ослободени од патогени кои се присутни кај цицачите и голем број сорти на растенијата се јадливи, што претставува едноставен начин за администрација на различни терапевтски соединенија.



Слика 2.21 Интеграција специфична за позиција се постигнува преку два настани на хомологна рекомбинација, односно по еден од двете страни на DNA фрагментот што треба да се инсертира. За време на инсерцијата, целниот регион од векторот го заменува целниот регион од пластидниот геном, а притоа се губи основата на векторот. Инсертираниот DNA фрагмент содржи селективен маркер (*aadA* ген кој кодира аминокликозид 3'-аденилилтрансфераза која овозможува резистентност кон спектиномицин) и може да содржи единечен ген ограничен со независни 5' и 3' регулаторни региони вклучувајќи промотор, 5'-UTR и 3'-UTR или како во овој случај повеќе гени со единечен промотор кој ја регулира експресијата на оперон со индивидуални рибозомски врзувачки места (RBS) на спротиводна позиција од ORF. Во овој случај, *cry2Aa2* оперонот од *Bacillus thuringiensis* (Bt) се инсертира во пластидниот геном и се формираат инсектицидни протеини во растителните клетки. Промоторот на 16S рибозомална RNA (*Prn*) ја регулира експресијата на *aadA* генот и трите гени од *cry2Aa2* оперонот. Терминатор е *psbA* 3' регионот од генот кој ги кодира компонентите од реакциониот центар на фотосистем II од хлоропластниот геном кај тутунот.

За да се редуцира ризикот од нејадливи производи кои влегуваат во синџирот на исхрана неопходно е да се применат строги безбедносни мерки при генетскиот инженеринг на растителните вектори за експресија на овие производи. Еден таков механизам на безбедност е инкорпорацијата на **интеински секвенци** кои дозволуваат транс-сплајсинг на протеини. Интеините се внатрешни протеински елементи кои имаат способност за само-ексцизија од оригиналниот протеин и катализираат лигација на надворешните секвенци (екстеини) со пептидна врска. Гените кои кодираат транс-сплајсинг протеински фрагменти не мора да бидат лоцирани во истиот геном. Така на пр., едниот ген може да се содржи во јадрениот геном, а другиот ген во хлоропластниот геном. Во овој случај, протеинскиот фрагмент кодиран во јадрото подлежи на генетски

инженеринг за таргетирање во хлоропластот, каде што се транс-сплајсира со вториот протеински фрагмент кодиран од хлоропластот. Оваа технологија на раздвојување на гени се одвива со помош на два типа на конструкција на вектори: T-DNA вектор за интеграција во јадрениот геном со елементи за еукариотска генска експресија и пластиден вектор со елементи за прокариотска генска експресија. Примената на овој тип на дизајнирање на вектори го редуцира ризикот од проток на гени и контаминација на производот, бидејќи хлоропластите се наследуваат од женскиот родител кај растителните култури, а поленот кај овие растенија содржи само половина од протеин-кодирачкиот фрагмент.

Иновациите при конструкција на вектори и трансформација на растенијата можат да влијаат врз особините на добиеното трансгено растение. Генското стивнување и регулацијата на експресија на трансгенот се главните проблеми во растителната биотехнологија кои можат да се редуцираат преку генетски инженеринг на пластидниот геном отколку на јадрениот геном. Ова може да се објасни преку фактот што генското стивнување не се јавува кај пластидниот геном за разлика од јадрениот геном и кај повеќето растителни култури пластидите се наследуваат од женскиот родител, при што се спречува полен-посредуваното вкрстосување помеѓу несродните растенија. Векторите за трансформација на хлоропластите се дизајнирани и конструирани на таков начин што содржат леви и десни пластид-таргетирани региони (LTR и RTR), кои имаат големина од 1-2 kb и хомологија со селектираното целно место (Сл. 2.21).

Дизајнот и конструкцијата на пластидни вектори кои овозможуваат истовремена експресија на неколку гени во оперон може да има големо значење при генетскиот инженеринг на важни особини. Досега е постигната интеграција на трансген кај 16 независни места кои се дистрибуирани по должината на пластидниот геном, при што се елиминирани позиционите ефекти, кои често пати се јавуваат при интеграција на DNA во јадрениот геном. Ако се земе предвид дека во еден пластид постојат 10-100 пластидни геноми, а една клетка содржи приближно 10-100 пластиди, најверојатно околу 10,000 копии на трансгенот можат да се формираат во единечна клетка. Ова резултира со масовна транскрипција на трансгенот, што може да опфати околу 46% од вкупните растворливи протеини во клетката. Технологијата за трансформација на пластидите сè уште не е развиена кај голем број важни растителни култури, меѓутоа, оваа техника успешно е потврдена кај соја, морков и памук преку хлоропластни вектори специфични за позиција и регенерација на растенија преку соматска ембриогенеза.

3. ГЕНИ ОД ИНТЕРЕС КАЈ ТРАНСГЕНИ РАСТЕНИЈА

Специфичниот редослед на нуклеотидните бази во DNA ја одредува функцијата на одредена генетска секвенца. Сепак, јагледхидрат-фосфатна структура на DNA која ги содржи четирите азотни бази е идентична кај различни организми. Оваа сличност во структурата на DNA кај сите организми претставува основа за одвивање на трансфер на DNA помеѓу различни организми. На таков начин можат да се добијат трансгени растенија кои содржат гени од различни организми (пр. микроорганизми, инсекти, животни и луѓе).

Голем број особини кај растенијата (квалитет или принос) се контролираат од страна на повеќе гени, додека пак, други корисни особини можат да се контролираат само од единечен ген. Сепак, повеќето трансгени растенија потекнуваат од трансфер на само еден или неколку туѓи гени, бидејќи е поедноставно да се добијат трансгени растенија со ограничен број на интродуцирани гени.

3.1 Идентификација на гени од интерес преку геномски студии

Развитокот на технологиите за секвенционирање на DNA и акумулација на mRNA овозможуваат испитување на огромно количество на информации кои се содржат во геномот на еден организам. **Геномиката** претставува научна дисциплина која опфаќа голем број молекуларни техники за анализа на DNA-секвенци и експресија на гени.

Декодиранието и интерпретацијата на геномските секвенци имаат големо значење за развиток на нови техники за подобрување на некои особини кај растителните култури. Подобрувањето на особините кај повеќето растителни култури е макотрпна и сложена процедура. Така на пр., геномот кај сојата се состои од 1,1 билион базни пари (bp) на DNA, додека пак, геномот кај пченката е значајно поголем и содржи 2,4 билион bp. Од компаративен аспект, големината на хуманиот геном е околу 3 билиони bp. Овие билиони базни парови опфаќаат голем број високо репетитивни региони и некодирачки нуклеотидни секвенци кои не кодираат протеински производи. Според тоа, идентификацијата на кодирачките региони од растителната DNA кои се одговорни за некои корисни особини во земјоделството може да се постигне со комбинирање на традиционалните техники на вкрстосување, современите молекуларни анализи, генетските анализи и новите комјутерски стратегии.

Познато е дека сите растителни видови поседуваат сопствени специфични и уникатни особини, меѓутоа, постојат и голем број гени кои се конзервирани помеѓу видовите. Исто така, постојат голем број гени со конзервирани функции помеѓу растенијата и животните. Според тоа, одредувањето на функцијата на некој ген кај еден вид може да се користи за предвидување на функцијата на хомологниот ген кај друг вид. Затоа, некои растенија се сметаат како модел-растенија и привлекуваат огромен интерес во научните истражувања. Така на пр., видот *Arabidopsis thaliana* е мало и брзо-растечко растение од фамилијата Brassicaceae со мал геном составен од 5 хромозоми. Овој вид се користи како модел за проучување на развитокот на растенијата и одговорот на растенијата кон факторите од животната средина. Првото секвенционирање на растителниот геном е извршено во 2000 година кај видот *A. thaliana* и неговиот геном се состои од 120 милиони bp. Секвенционирањето на комплетниот геном кај растенијата има големо значење во одредувањето на функцијата на поединечните гени. На таков начин, голем број информации за DNA-секвенците кај растенијата стануваат достапни и се откриваат сличностите и разликите помеѓу генските структури кај различни растителни видови.

Идентификацијата на геномските секвенци на одреден растителен вид имаат големо значење во одредување на функцијата на гените. Во одредени случаи, податоците од геномското секвенционирање не придонесуваат во откривањето на функцијата на гените или нивниот ефект врз фенотипот на растенијата. Особено комплицирана задача е да се направи корелација помеѓу специфичните гени и важните особини кај растенијата, особено ако генот има минорен ефект врз особината. Затоа, геномскиот пристап за одредување на функциите на гените или генската експресија започнува широко да се применува. Главната цел на студиите за генска експресија е утврдувањето на присуството на одреден mRNA транскрипт. Функцијата на повеќето гени зависи од присуството на mRNA транскрипт со нуклеотидна секвенца која може да се преведе во аминокиселинска секвенца.

Експресијата на голем број гени се регулира на ниво на mRNA акумулација и може да се поврзе со нивната функција кај растенијата. Така на пр., голем број гени кои се вклучени во одбранбениот одговор на растенијата кодираат зголемено количеството на mRNA-молекули за време на инфекција со патогени организми. Овој феномен бил проучуван преку следење на содржината на mRNA транскрипти кај растенија инокуирани со некој патоген организам. Ако одреден ген покажува висок степен на експресија на ниво на mRNA акумулација, тогаш постои голема веројатност дека овој ген е вклучен во одбранбените одговори. Анализата на голем број транскрипти во одредени услови на животната средина овозможува идентификација на цел генски комплет кој е вклучен во одбранбените одговори на растенијата.

DNA микроереј е техника која се користи за мерење на акумулацијата на mRNA транскрипти на голем број гени (Alba и сор., 2004). Принципот на оваа техника се базира на способноста за хибридизација на два нуклеотидни сегмента со комплементарни секвенци. Ако една од секвенците е обележана со маркер кој може да се измери, тогаш може да се квантифицира количеството на хибридизација. При DNA микроереј, одредени секвенци специфично се врзуваат за супстрат (мала стаклена површина). При оваа техника се овозможува врзување на стотици илјади индивидуални секвенци на специфични локации на мала површина од 1 cm². Всушност, DNA-секвенците од одреден растителен вид се аплицираат на микроереј и потоа хибридизираат со обележани копии на mRNA во форма на cDNA од специфично ткиво по одреден третман (пр. инокулација на патоген). Ако одреден mRNA-молекул е присутен во високо количество кај третираното ткиво, тогаш со примена на микроереј се детектира висок степен на хибридизација со неговата соодветна DNA секвенца. Степенот на хибридизација на испитуваниот mRNA-транскрипт се споредува со нетретираните или контролни ткива. Овој пристап е познат како **компаративна генска експресија** и овозможува испитување на профилот на транскрипти од илјадници гени.

Протеинските производи на повеќето гени се функционални единици кои се одговори за одредена особина кај растенијата. Според тоа, неопходно е да се анализираат крајните производи на генската експресија. Важно е да се напомене дека акумулацијата на одреден RNA-транскрипт не е секогаш во корелација со содржината или активноста на протеинот којшто го кодира овој транскрипт. Оваа корелација зависи од неколку фактори, како на пр. регулација на стабилноста на RNA, степенот на транслација на протеинот или пост-транслациска регулација на протеинската стабилност или ензимската активност. **Протеомиката** опфаќа различни техники за анализа на големи мешавини на протеини кои се присутни во одредено ткиво или по одреден третман. Овој пристап вклучува сепарација на индивидуални протеини врз база на одредени физички карактеристики (пр. големина или полнеж на протеини). По сепарација на поединечните протеини, нивните аминокиселински секевенци можат да се идентификуваат со примена на масена спектрометрија. Добиените податоци од

протеомика во комбинација со анализата на DNA секвенци или генска експресија имаат големо значење во одредување на корелацијата помеѓу аминокиселинските секвенци и специфичните генски секвенци кај растенијата. На сличен начин, **метаболомиката** претставува комплексна анализа на акумулацијата на хемиски соединенија кои имаат значаен придонес во особините на растенијата. Растителните метаболити учествуваат во развитокот, физиологијата и одбранбениот одговор на растенијата, а воедно може да се користат во исхраната и продукцијата на храна. Споед тоа, растителните метаболити имаат голема примена во земјоделството поради нивниот придонес во бројни особини кај растителните култури.

Комбинацијата на геномика, протеомиката и метабономика (**омика**) во **системската биологија** овозможува проучување на голем број процеси кои се одвиваат на клеточно ниво кај организмите. Добиените податоци од овие истражувања претставуваат основа за развиток на **биоинформатиката** која опфаќа компјутерски и математички методи за целосна интерпретација на биолошките податоци (Rhee и сор., 2006).

3.2 Особини од интерес за зголемување на приносот кај растенијата

Растот на здрави растенија кои даваат принос на квалитетни производи зависи од нивната способноста за справување со променливите услови во животната средина и голем број хербивори и патогени организми. Денес се користат голем број трансгени пристапи за да се надминат овие предизвици за добивање на здрави растенија. Со примена на генетскиот инженеринг во иднина можат да се добијат растенија со зголемена толерантност кон абиотички стрес фактори, како висока температура, салинитет и суша. Во земјоделството се користат голем број трансгени растенија кои се добиени со примена на генетски инженеринг за резистентност кон хербициди, инсекти и патогени организми.

3.2.1 Резистентност кон хербициди

Првата примена на трансгени растенија која е широко прифатена во земјоделството е резистентноста кон хербициди. Плевелот се смета како сериозен проблем во земјоделството кој предизвикува значајно намалување на приносот кај растителните култури, бидејќи овие плевелни растенија се во конкуренција за вода, светлина и хранливи материи со земјоделските култури. Хемиските хербициди имаат широка примена во земјоделството поради нивната лесна достапност на пазарот и ефикасноста во уништување на плевелот. Ефикасноста на хербицидите во земјоделството зависи од нивната селективност, односно целното уништување на плевелни растенија без да имаат негативен ефект врз растителните култури. Примената на единечен ген кој е одговорен за една особина кај трансгените растенија може на специфичен начин да ги заштити растителните култури од ефектите на одреден хербицид.

Хербицидите функционираат преку таргетирање на метаболички реакции кои се есенцијални за преживувањето на растенијата. Така на пр., **глифосатот** ги убива растенијата преку инхибирање на продукцијата на одредени аминокиселини кои се неопходни за преживување на растенијата. Глифосатот е активна компонента на хербицидот “RoundUp™”. Според тоа, културите од соја и пченка кои се добиени со генетски инженеринг за резистентност кон глифосат се означени како “RoundUp Ready”. Глифосатот функционира преку врзување и инхибирање на ензимот **5-енолпирувилшикимат 3-фосфат синтаза (EPSPS)**, кој е активен во патот на шикими киселината за синтеза на ароматични аминокиселини (тирозин, фенилаланин и триптофан) од хоризматот (Сл. 3.1).



Слика 3.1 Резистентноста кон глифосат кај растенијата означени како RoundUp Ready™ се постигнува преку експресија на трансгена форма на ензимот 5-енолпирувилшикимат 3-фосфат (EPSP) синтаза (EPSPS) која е резистентна кон хербицидот. Во отсуство на овој трансген ензим, глифосатот ја инхибира растителната форма на EPSPS и се спречува синтезата на хоризмат како главен прекурсор за есенцијалните ароматични аминокиселини триптофан, фенилаланин и тирозин. Трансгената форма на EPSPS не е сензитивна кон дејството на глифосатот и се овозможува синтеза на EPSP која води кон продукција на хоризмат.

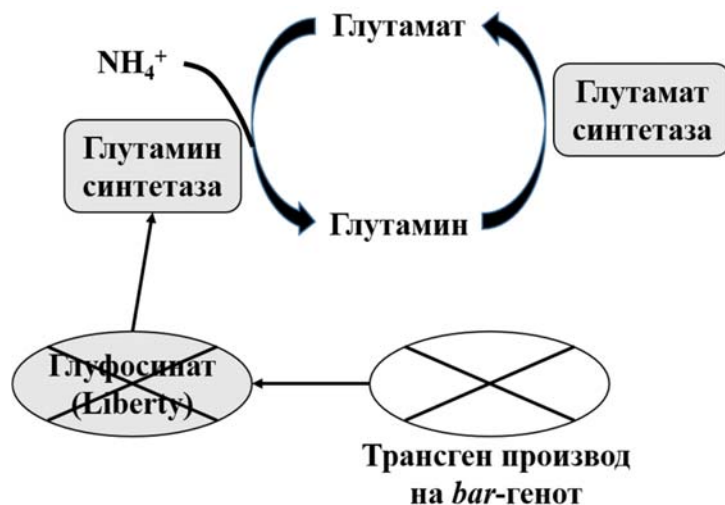
Трансгени растенија резистентни кон глифосат се добиваат со користење на посебна форма на EPSPS ензимот која е функционална кај растенијата, а воопшто не покажува сензитивност кон дејството на хербицидот. Ензимот EPSPS е присутен кај растенија, меѓутоа, овој протеин е идентификуван и кај бактериите. Научниците од компанијата Monsanto кои се иноватори на хербицидот RoundUp идентификувале алтернативна форма на EPSPS ензимот од почвена бактерија која не е сензитивна кон третманот со глифосат. Иницијалните чекори во овој процес се изведуваат со инокулација на почвени бактерии на хранлив медиум кој содржи глифосат со цел да се идентификуваат бактериските соеви резистентни кон хербицидот. Потоа се изолира генот за EPSPS од бактеријата и се интродуцира во растенијата, а експресијата на трансгенот се регулира со додавање на силен промотор (35S промотор од мозаичниот вирус на карфиол) кој е одговорен за експресијата на трансгенот во растенијата (Shah и сор., 1986). Со оглед на тоа што *Agrobacterium*-посредуваната трансформација не бил ефикасен метод кај сојата, физичкиот метод на бомбардирање со партикули бил користен за да се добие иницијалниот настан на трансформација. Во подоцнежните експерименти, овој настан на генетска трансформација се користел за трансфер на глифосат-резистентен бактериски EPSPS ген кај голем број комерцијални сорти на соја со примена на традиционалните техники на вкрстосување и селекција на растенија.

Нормалната верзија на растителниот EPSPS ген се кодира во DNA од јадрениот геном. Транслацијата на mRNA секвенцата од овој ген се одвива во цитоплазмата, а формираниот EPSPS протеин се транспортира во хлоропластите каде што е активен патот на шикими киселината. Транспортот на бактериската форма на EPSPS протеинот од цитоплазмата во хлоропластите се овозможува преку фузионирање на кратка DNA секвенца за 5'-крајот на кодирачкиот регион од бактерискиот EPSPS ген. Оваа DNA секвенца кодира хлоропластна транзитна пептидна секвенца која се поврзува за аминокиселинскиот крај на бактерискиот EPSPS протеин и служи како интрацелуларен сигнал за соодветна локализација на протеинот. Транзитната пептидна секвенца потекнува од генот за кодирање на протеинот рибULOза-1,5-бисфосфат карбоксилаза/оксигеназа (Rubisco) кој е присутен во хлоропластите и учествува во фиксацијата на јаглерод. Транспортираниот бактериски EPSPS протеин во хлоропластите ја превзема функцијата на растителниот ензим за биосинтеза на ароматичните аминокиселини.

Сојата означена како “RoundUp Ready” е првата трансгена растителна култура која е одобрена за комерцијално производство. Комерцијализацијата на оваа трансгена култура била веднаш прифатена од страна на земјоделците и претставува најпопуларно трансгено растение во светот. Глифосатот има неколку предности и се смета како атраткивен хербицид во земјоделството. Ефикасноста на овој хербицид се базира на неговата лесна апсорпција и транспорт низ целото третирано растение. Глифосатот не се задржува долг временски период во животната средина, бидејќи за кратко време се деградира од страна на почвените микроорганизми. Оваа карактеристика на глифосатот има огромно значење во агрономската пракса и заштитата на животната средина, бидејќи земјоделците можат за кратко време да садат нови растенија на третираното подрачје со хербицидот. Селективноста на глифосатот во уништување на плевелот има големо значење за одгледување на растенија на необработливи површини, што резултира со понизок степен на ерозија на почвата и големи финансиски заштеди. Исто така, животните немаат способност за синтеза на ароматични аминокиселини преку метаболичкиот пат на шикими киселината кој претставува главна цел на дејството на глифосатот. Според тоа, хербицидот глифосат има низок степен на токсичност кај животните. Во првата година од комерцијализација на глифосатот (1996 година), трансгените растенија од соја означени како RoundUp Ready опфаќале околу 2% од вкупното производство на соја во САД. До 2000 година, производството на трансгена соја се зголемило до 54%, а во 2005 година изнесувало околу 87% од вкупното производство на соја во САД. Денес, генетскиот инженеринг особено се користи во Јужна Америка и Азија за добивање на голем број глифосат-резистентни култури. Широката примена на глифосат-резистентни култури предизвикала зголемена употреба на овој хербицид во светски рамки, а значајно намалување на употребата на другите хербициди. Зголемената употреба на глифосатот била дополнително стимулирана со одобрувањето на патентот за овој хербицид во 2001 година. Денес, глифосатот се продава како генерички хербицид или во RoundUp формулациите на Monsanto. Големото количество на глифосат кое денес се користи за третман на растителните култури може да претставува голема закана за земјоделството поради можноста за прекумерно размножување на глифосат-резистентни биотипови. Исто така, земјоделците се должни да плаќаат финансиски надоместок на Monsanto за добивање на права за култивирање на RoundUp Ready растенија.

Резистентноста кон глифосат се базира на експресија на активен бактериски ензим EPSPS, кој не реагира на дејството на хербицидот. Алтернативна стратегија на генетскиот инженеринг за стекнување на резистентност кон хербициди е експресија на протеин кој врши инактивирање на аплицираниот хербицид кај растенијата. Овој пристап се користи за добивање на трансгени култури резистентни кон хербицидот

глуфосинат, кој претставува активна компонента на производот Liberty™. Добиените трансгени култури резистентни кон глуфосинат се нарекуваат “LibertyLink”. Глуфосинатот ги убива растенијата преку инхибирање на растителниот ензим глутамин синтетаза (GS), кој е одговорен за синтеза на аминокиселината глутамин. Всушност, ензимот GS го користи вишокот на азот во растенијата во форма на амониумови јони кои се инкорпорираат во аминокиселината глутамин. Кај третираните растенија со глуфосинат се инхибира активноста на GS ензимот и настанува зголемување на концентрацијата на амониумови јони во растенијата до токсично ниво (Сл. 3.2).



Слика 3.2 Резистентноста кон глуфосинат кај растенијата означени како LibertyLink™ се постигнува преку експресија на ензим кој директно го инактивира хербицидот. Глуфосинатот ги убива растенијата преку инхибиција на ензимот глутамин синтетаза. Овој ензим е одговорен за продукција на аминокиселината глутамин преку реакција на искористување на вишокот азот во форма на амониумови јони (NH_4^+). При инаktivација на овој ензим под дејство на глуфосинат настанува прекумерна акумулација на амонијак и убивање на растенијата. Кодираниот ензим од бактерискиот *bar* ген кај трансгените растенија има способност за инаktivација на глуфосинатот.

Во природни услови глуфосинатот се продуцира кај некои бактерии од родот *Streptomyces*. Покрај фитотоксичното дејство на глуфосинатот, овој хербицид покажува и антибиотско дејство поради неговата токсичност кај други бактерии. Бактериските соеви кои се резистентни кон глуфосинат продуцираат ензим **фосфоинотрицин ацетилтрансфераза (ПАТ)** кој се кодира од страна на *bar* генот (Thompson и сор., 1987). Всушност, *bar* генот изолиран од бактеријата *Streptomyces hygroscopicus* го кодира ензимот ПАТ кој врши деградација на глуфосинатот. Со примена на генетскиот инженеринг, *bar* генот бил интродуциран кај голем број растителни култури (пченка, канола и памук) за да се добијат глуфосинат-резистентни растенија.

Слична стратегија се користи за добивање на резистентност кон хербицидот бромоксинил (Buctril™) преку експресија на протеин кодиран од бактериски ген кој врши инаktivирање на хербицидот. Бромоксинилот ги убива растенијата преку инхибирање на функцијата на фотосистем II кој има есенцијално значење кај растенијата за одвивање на процесот на фотосинтеза. Денес во САД широко е прифатено култивирањето на Buctril-резистентен памук, додека пак, другите култури резистентни кон овој хербицид (тутун и компир) се во завршна фаза од нивната комерцијализација.

3.2.2 Резистентност кон инсекти

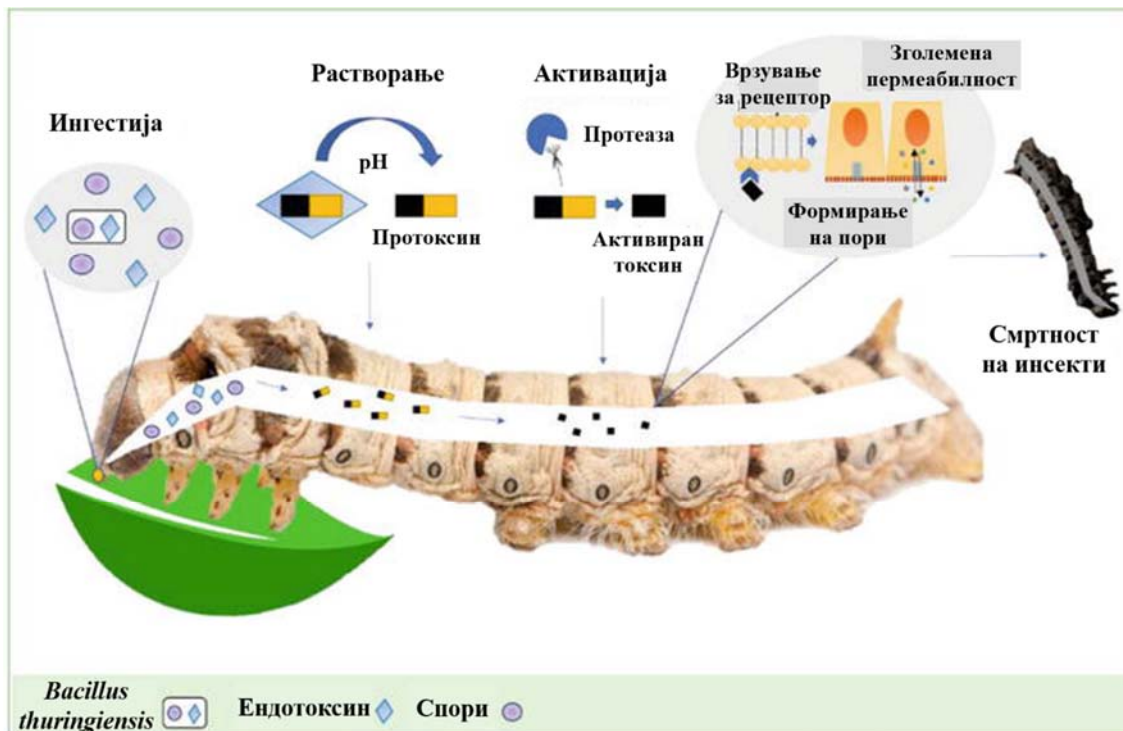
Повредите и оштетувањата кај растенијата предизвикани од инсектите претставуваат глобален проблем во земјоделството. Контролата на инсектите како штетници во земјоделството се врши со примена на синтетски инсектициди од хемиска природа. Сепак, инсектите сè уште претставуваат значајни фактори за намалување на приносот и квалитетот кај растителните култури.

Голем број протеини со негативни ефекти врз инсектите биле испитувани како потенцијални средства за добивање на трансгени растенија резистентни кон инсекти. Експериментите од генетскиот инженеринг покажале дека трансгените растенија кои експресираат неколку гени за кодирање на протеини имаат способност за инхибирање на растот на инсектите или предизвикуваат висок степен на смртност кај инсектите. Тука се вбројуваат гени за **протеазни инхибитори** кои интерферираат во дигестијата на инсектите, **лектини** кои имаат инсектицидно дејство преку врзување за специфични гликозилирани протеини и **хитинази** кои претставуваат ензими за деградација на хитинот како составен дел од кутикулата на некои инсекти. Консумацијата на производите на овие гени покажува негативно влијание врз инсектите и затоа можат да се користат при контрола на инсектите во земјоделството. Сепак, гените кои кодираат ендотоксини од бактеријата *Bacillus thuringiensis* (Bt) имаат широка примена во земјоделството поради нивната висока ефикасност за убивање на инсектите. Природната инсектицидна активност на Bt ендотоксините претставува ефикасна алтернатива во споредба со хемиските пестициди кои покажуваат неселективни токсични ефекти кај некои корисни инсекти, птици, риби и цицачи. Главна предност на трансгените растенија резистентни кон инсекти е способноста за продукција на сопствен инсектициден протеин кој се консумира од страна на инсектите при нивно хранење со овие растенија.

Првиот бактериски вид кој продуцира Bt токсини бил изолиран пред повеќе од 100 години и бил именуван како *Bacillus thuringiensis*. Откривањето на овој бактериски вид започнало со проучувањето на бактериското заболување кај свилените буби во Јапонија. Подоцна било откриено дека Bt ендотоксинот од *B. thuringiensis* покажува токсични ефекти врз ларвите кај повеќето видови од Lepidoptera (молци и пеперутки). Овие истражувања јасно потврдиле дека организмите кои поседуваат Bt токсини имаат огромен потенцијал за заштита на растителните култури од инсекти. Во подоцнежните години биле идентификувани дополнителни соеви на Bt кои покажуваат токсични ефекти кај Coleoptera (тврдокрилци), Diptera (муви и комарци), па дури и кај нематоди. Специфичната инсектицидна активност на Bt кај одредени видови инсекти се одредува според формите на *cry* гени кај бактеријата. Според тоа, контролата на одредени видови на инсекти можат да се изврши со примена на специфични ендотоксини.

Гените *cry* кои кодираат токсични протеини кај Bt се именуваат според кристалните инклузии што се формираат во внатрешноста на бактеријата кога се наоѓа во спорогена фаза. Често пати, овие кристали содржат повеќе од еден специфичен тип на *cry*-генски производи. *Cry*-кодираните Bt протеини егзистираат како протоксини во бактеријата, а нивното активирање во токсични протеини се одвива во внатрешноста на дигестивниот тракт на инсектите. При ингестија на Bt протеините од страна на инсектите, кристалите се деградираат и раствораат во алкална средина ($pH \geq 8$) од средното црево на инсектите. Специфичните протеази во внатрешноста на дигестивниот систем на инсектите катализираат отстранување на краевите на Bt протоксинот, при што се добива токсичен протеин. Активниот протеин се врзува за специфични протеински рецептори кои се наоѓаат на мембраната на цревните ресички во средното црево на инсектите (Сл. 3.3).

Во повеќето случаи на трансформација за добивање на трансгени растенија кои експресираат Bt протеини не настанува трансфер на целиот кодирачки регион на протоксинот. Всушност, кај трансгените растенија се експресира скратена верзија на генот, бидејќи со примена на ваква стратегија се овозможува повисок степен на акумулација на Bt протеинот (Fischhoff и сор., 1987).



Слика 3.3 Bt токсинот се врзува за специфични рецептори на епителната мембрана од дигестивниот систем на инсектите. Токсинот формира пори или канали во мембраната и настанува истекување на јоните, што резултира со смртност кај инсектите.

По врзувањето за рецепторот, активниот Bt токсин навлегува во клеточната мембрана на инсектот каде што голем број на копии од протеинот олигомеризираат и формираат пори. Овие пори на клеточните мембрани предизвикуваат истекување на јоните од дигестивниот систем и настанува осмотско лизирање и целосно оштетување на мембраната. Откако ќе се наруши епителната мембрана на клетките од дигестивниот систем, инсектите почнуваат да гладуваат и умираат. При вистинска инфекција со *B. thuringiensis*, бактериските клетки формираат спори во подоцнежните стадиуми од инфекцијата на инсектите и на таков начин се овозможува натамошна инфекција на други инсекти. Инсектите кои се хранат со трансгените растенија престануваат со консумацијата за неколку часа и потоа за кратко време умираат.

Главен фактор за одредување на сензитивноста на одреден вид на инсект кон даден Bt протеин е присуството или отсуството на специфични форми на рецептори во средното црево на инсектите (Hofmann и сор., 1988). Така на пр., претставниците од *cryIA* генската фамилија се најчесто користени *cry* гени во генетскиот инженеринг за добивање на трансгени растенија поради токсичноста на нивните генски производи кај широк спектар на штетници од Lepidoptera. Сепак, оваа форма на Bt покажува слаб ефект кај видовите од Coleoptera, бидејќи овие инсекти не поседуваат специфични рецептори

кои ги препознаваат Cry1A протеините. На сличен начин, некои видови на тврдокрилци како што е компировата златица (*Leptinotarsa decemlineata*) е сензитивна на Cry3A Bt токсинот, додека пак, повеќето пеперутки се резистентни на овој ендотоксин. Според тоа, кај растителните култури се интродуцираат и експресираат специфични *cry* гени со цел да се адаптираат сортите за контрола на специфични штетници, а притоа да не се влијае врз другите инсекти. Така на пр., неколку варијации на *cry1A* гените биле интродуцирани кај пченката за контрола на пченкиниот молец (*Ostrinia nubilalis*), кој претставува штетник од пеперутките и се храни со внатрешноста на стеблото кај пченка. Од друга страна пак, експресијата на *cry3Bb1* гените се користи кај различни сорти на пченка за контрола на ларвите на пченкината златица (*Diabrotica virgifera*), кој претставува тврдокрилец и примарно се храни со корените од пченката. Со примена на оваа стратегија, трансгените сорти резистентни кон одреден инсект можат да бидат ефикасни во некои региони каде што преовладуваат овие штетни инсекти.

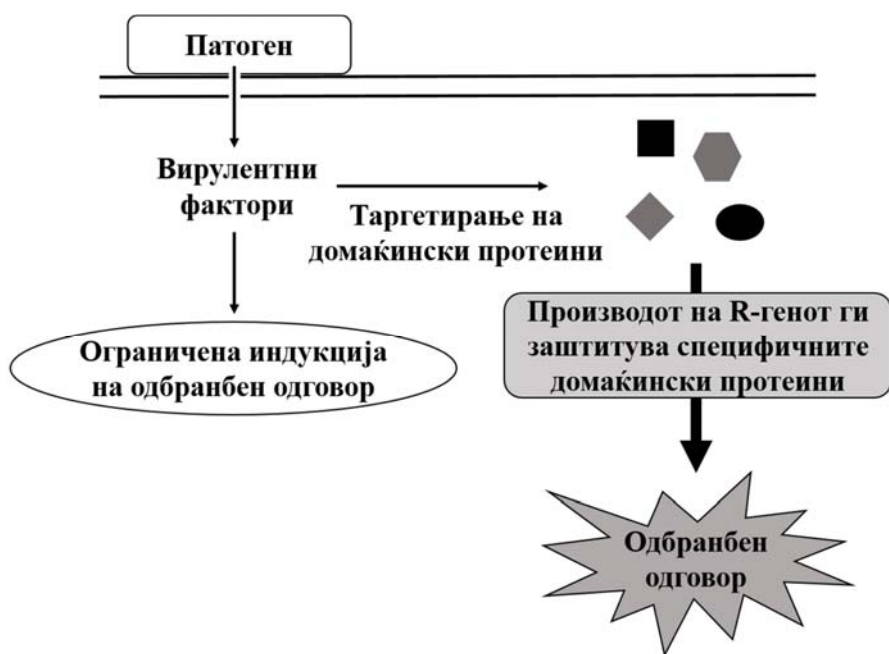
Важно е да се напомене дека Cry-токсините не се ефикасни како контактни инсектициди, бидејќи е неопходно да се изврши активирање на овие ендотоксини во дигестивниот систем на инсектите. Всушност, смртноста кај инсектите настанува само при ингестија на токсините. Повеќето корисни инсекти не се засегнати во полињата со Bt култури, бидејќи овие инсекти и други организми не поседуваат специфични мембрански рецептори за Bt и често пати имаат способност за деградација на конзумираниот Bt токсин во дигестивниот систем. Според тоа, Bt токсинот е нетоксичен за повеќето артроподи, животни и птици, вклучувајќи ја и хуманата популација. Исто така, постои алтернативен пристап на директно прскање на растенијата со Bt кристалински спори (интактни микроорганизми). Оваа стратегија се користи како безбеден пристап според сертифицираната продукција на органска на храна во САД со цел да се обезбеди ефикасна контрола на инсектите. Главни недостатоци на овој пристап во споредба со Bt-трансгените растенија е тоа што аплицираниот Bt токсин на површината на растенијата не пенетрира во растителните ткива и овој токсин не е стабилен долг временски период поради брзото разградување при експозиција на UV-светлина. Исто така, постои голема веројатност за развој на Bt-резистентна популација на инсекти поради широката примена на Bt-трансгени култури во земјоделството.

На сличен начин како и хербицид-резистентните култури, Bt-трансгените растенија се широко прифатени за култивирање во САД. Инсектите предизвикуваат огромни штети кај памукот и продукцијата на оваа индустриска култура зависи од постојаниот третман со синтетски хемиски пестициди. Во 2005 година, култивирањето на трансгени растенија од памук опфаќа речиси 80% од вкупното производство на памук во САД и продолжува да се одгледува во други делови од светот, како Кина. Денес, трансгените растенија од пченка се култивираат на повеќе од 50% од вкупната обработлива површина во САД. Важно е да се напомене дека особините за резистентност кон хербициди и инсекти често пати се комбинираат во една иста сорта на растенија од памук и пченка и се означуваат како „поврзани особини“.

3.2.3 Резистентност кон патогени организми

Патогените организми кај растенијата, како вируси, фунги и бактерии се постојана закана за продукцијата на растителни култури во земјоделството. Голем број методи на генетскиот инженеринг се користат за воспоставување на контрола на заболувањата кај растенијата, меѓутоа, само мал дел од овие техники имаат комерцијална примена во земјоделството. Еден од најефикасните методи за контрола на заболувањата е користење на растенија кои се резистентни кон патогени организми. Резистентноста на растенијата

кон одреден патоген може да се постигне со помош на единечен резистентен ген (*R*-ген), а неговиот производ има функција во препознавањето на вирулентен фактор од патогенот кој е кодиран од авирулентен ген (*Avr*-ген). Оваа поврзаност кај системите растение-патоген се нарекува интеракција помеѓу гени (Сл. 3.4). Со примена на традиционалните методи на вкрстување потребни се многу години за да се идентификува една растителна линија која поседува резистентност од интерес и да се пренесе оваа особина кај некои корисни сорти на растенија. Друг недостаток при вкрстувањето е можноста некои непосакувани гени да се поврзат со *R*-генот. Овие непосакувани гени тешко можат да се одвојат од *R*-генот со примена на традиционалните методи на вкрстување. Во некои случаи, корисните *R*-гени не можат да се пренесат кај други растенија поради интерспециските бариери што постојат при вкрстување на различни растителни видови. Според тоа, способноста за клонирање и трансфер на единечен *R*-ген од една на друга сорта или вид претставува алтернативна стратегија за добивање на трансгени растенија резистентни кон одредени заболувања.



Слика 3.4 Резистентноста кон специфични соеви на растителни патогени може да се постигне преку кодирање на протеинскиот производ на единечен ген за резистенција (*R*). Повеќето растителни *R*-гени функционираат преку препознавање на активноста или присуството на специфични вирулентни фактори од патогениот организам. Овие вирулентни фактори или ефектори индуцираат основни одбранбени одговори, а можат да извршат и напад на различни протеини на клетката-домаќин. Протеинските производи на *R*-гените имаат одбранбена улога против патогените преку заштита на таргетираните домаќински протеини. Активацијата на одбранбените одговори под дејство на *R*-генот индуцираат хиперсензитивен одговор и брза експресија на одбранбени гени кај растителните клетки.

Карактеристичен пример за успешно добивање на трансгени резистентни растенија е примената на специфичен резистентен ген за да се спречи појавата на бактериско заболување кај оризот (Ronald, 1997). Бактериската пламеница кај оризот е деструктивно

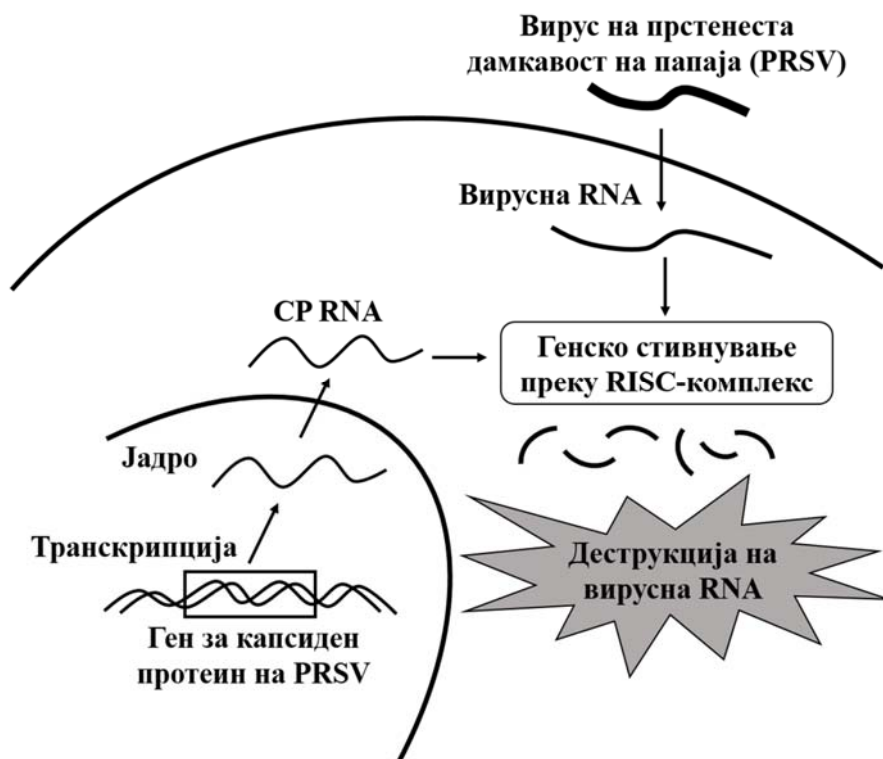
заболување кај култивираниот ориз (*Oryza sativa*) во Африка и Азија кое е предизвикано од патогената бактерија *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Потрагата по алтернативни извори на резистентност кон бактериската пламеница на оризот овозможила идентификување на див вид сроден на оризот (*O. longistaminata*) кој природно расте во Мали. Дивиот ориз покажал резистентност кон овој патоген, меѓутоа, овој вид се карактеризирал со низок квалитет и принос на зрно. Примената на генетски и молекуларни истражувања кај дивиот ориз овозможиле изолација на *R*-генот означен како *Ha21*. Овој ген бил интродуциран во култивираниот ориз со користење на методот на бомбардирање со партикули. На таков начин се постигнала силна резистентност кај оризот кон соевите на бактеријата *X. oryzae* кои поседуваат *Avr*-ген кој се препознава од страна на *Ha21*-генот. Подоцна, *Ha21*-генот бил интродуциран кај неколку сорти на ориз кои имаат големо значење во земјоделството. Трансгените линии на ориз резистентни на бактериско заболување се одобрени за комерцијална продукција, меѓутоа, овие трансгени култури немаат широка примена во земјоделството за продукција на храна. Важно е да се напомене дека $\frac{1}{3}$ од светската популација зависи од оризот како главен извор на хранливи материи. Затоа, развитокот на резистентен ориз кон бактериски заболувања може да има големо значење за намалување на гладот во светски рамки.

Познато е дека инокулацијата со вирусни честички може да ги заштити растенијата од натамошни инфекции со слични вируси. Оваа форма на имунизација на растенијата е позната како **вкрстена заштита** и била применувана кај неколку растителни видови со активни вируси. Според овој пристап, растителните култури можат да се инокулираат со средно инфективни соеви на вирус со цел да се заштитат растенијата од натамошни вирусни инфекции. На сличен начин како и при вакцинација на луѓето со живи вируси, оваа стратегија се карактеризира со одредени ризици и недостатоци. Постои веројатност дека инокулацијата на средно инфективен растителен вирус може да го намали приносот на културите или овој вирус да добие повирulentни карактеристики и да предизвика тешки форми на заболувања кај растенијата. Развитокот на генетскиот инженеринг кај растенијата овозможува експресија на само мал дел од растителните вируси во рамки на растението-домаќин. На таков начин, овој пристап може да индуцира стекнување на резистентност кон слични растителни вируси.

Повеќето растителни вируси се карактеризираат со едноставен генетски систем составен од неколку гени кои се содржат во RNA- или DNA-геномот кој е ограничен со протеинска обвивка (капсид). Конститутивната експресија на одреден дел од вирусниот геном во растенијата може да предизвика активирање на специфични RNA-молекули во растението-домаќин кои учествуваат во дегарација на вирусните RNA-секвенци. Овој RNA стивнувачки систем (RNA интерференција) е активен кај растенијата и голем број други организми и најверојатно еволуирал како систем за заштита и преживување на организмите од напад на вируси.

Огромен напредок е постигнат во продукција на папаја во Хаваи со примена на RNA-посредувана вирусна резистентност (Gonsalves, 1998). Во средината на 1990-тите години, речиси целите популации на папаја во Хаваи биле загрозуени поради ширење на вирусот на прстенеста дамкавост на папајата (papaya ringspot virus-PRSV). Ширењето на вирусната инфекција во доцните 1990-ти години предизвикало големи загуби во приносот на папаја и напуштање на големи обработливи површини. Трансгени растенија резистентни кон патогени вируси биле добиени со експресија на генот за капсиден протеин кај средно инфективниот сој на PRSV кај папаја (Сл. 3.5). Трансгените сорти на папаја биле за прв пат комерцијализирани во Хаваи во 1998 година и добиените трансгени линии покажале вирусна резистентност во текот на наредните години. Ефикасната генетска трансформација кај една сорта за добивање на вирусна резистентност подоцна била искористена за трансфер на генот од интерес кај други

комерцијални сорти со примена на стандардните техники на вкрстување. Сличен пристап бил користен за контрола на мозаичниот вирус на краставица (*Cucumber mosaic virus*-CMV) кај трансгени растенија од тиква. Исто така, RNA-посредуваната резистентност може ефикасно да се користи за контрола на вирусот на пеперугаста шареница (*feathery mottle virus*) кај слаткиот компир во Африка. Развитокот на трансгени сорти резистентни кон овој вирус може да претставува ефикасна стратегија за зголемување на приносот кај голем број индустриски култури.



Слика 3.5 Резистентност кај растенијата кон вирусот на прстенеста дамкавост на папајата (парауа ringspot virus-PRSV) се постигнува поради активирање на RNA-посредуваното генско стивнување. Резистентни растенија кон вируси се добиваат со трансфер и експресија на дел од генот за капсиден протеин (CP) на PRSV кај трансгени растенија од папаја. При транскрипција на овој ген, формиранiot RNA-молекул активира специфична деградација на комплементарни RNA секвенци, како што е секвенцата кај вирусната RNA на PRSV. Иницијалната деградација на вирусната RNA се одвива под дејство на ензимскиот комплекс наречен RNA-индуциран стивнувачки комплекс (RISC). Активноста на овој ензимски комплекс води кон деградација на RNA, како и блокирање на транскрипцијата и транслацијата на целиот ген.

3.3 Особини за подобрување на растителни производи и квалитет на храна

Почетоците на комерцијализација на биотехнолошките истражувања биле фокусирани кон особините на растителните култури за резистентност кон хербициди и пестициди. Овие особини кај растенијата се нарекуваат **влезни особини**. Натамошните апликативни истражувања во растителната биотехнологија биле насочени кон

излезните особини, односно подобрување на квалитетот на трансгените растителни производи за консументите ширум светот.

3.3.1 Подобрување на нутритивниот квалитет

Хуманата популација зависи од растенијата како важен извор на хранливи материи, витамини и есенцијални амнокиселини. За разлика од животните како значаен дел од прехранбената индустрија, растенијата продуцираат широк спектар на хемиски соединенија. Примената на методите од растителната биотехнологија овозможуваат добивање на растенија со зголемен капацитет за продукција на хемиски соединенија или променети нутритивни карактеристики.

Еден од најпознатите примери за подобрување на нутритивниот квалитет кај индустриските култури е развојот на златен ориз (Golden Rice), односно трансгено растение кое синтетизира висока содржина на β -каротен или провитамин А во зрното на оризот (Ye и sor., 2000). Повеќе од $\frac{1}{3}$ од светската популација зависи од оризот како главна компонента во исхраната. Оризот претставува добар извор на калории, меѓутоа, оваа култура не содржи висока концентрација на протеини и витамини. Дефицитот на витамини во исхраната не претставува честа појава во индустријализираните земји. Сепак, оваа појава сè уште претставува сериозен проблем кај земјите во развој од некои делови на јужна Азија и Супсахарска Африка, каде што оризот е основна храна и не постои достапност до различна храна (месо, овошје и зеленчук). Дефицитот на витамин А во хуманата популација претставува сериозен проблем и според Светската Здравствена Организација (СЗО) околу 4 милиони деца страдаат од дефицит на витаминот А. Дефицитот на витамин А е главна причина за појава на слепило кај децата и зголемена стапка на смртност поради различни заболувања како морбили и маларија. Една од стратегиите за решавање на овие проблеми е снабдувањето со суплементи на витамин А во форма на капсули за децата. Сепак, ефикасноста на оваа стратегија зависи од повеќекратна администрација на суплементите во текот на една година, што претставува логистички предизвик за многу региони во светот. Алтернативна стратегија е да се обезбеди провитамин А во форма на β -каротен во оризот.

Каротеноидите се голема и хетерогена подкласа на соединенија од растителните метаболити кои се нарекуваат терпеноиди или изопреноиди. Оваа класа на соединенија се составени од основни структурни единици со 5 јаглеродни атоми, кои можат меѓусебно да се асемблираат и да формираат комплексни молекули. Голем број познати мириси и ароми (нане и борова смола) се составени од терпеноиди. Прекурсорот на каротеноидите со 5 јаглеродни атоми може да се синтетизира преку независни патишта во цитоплазмата и пластидите. Каротеноидите се соединенија составени од 40 јаглеродни атоми кои се добиваат од прекурсорот преку биохемиски патишта во пластидите. Основната структура на β -каротенот е фитоеенот кој се добива со комбинирање на две молекули на геранилгеранил пирофосфат (GGPP) со 20 јаглеродни атоми под дејство на ензимот фитоеен синтаза (Сл. 3.6). Потоа се одвиваат серија реакции на десатурација и додавање на двојни врски на фитоеенот за да се добие ликопен, кој претставува антиоксидантно соединение со црвена боја кај повеќето растенија. Во последната реакција, ликопенот може да се конвертира во β -каротен под дејство на ензимот на ликопен циклаза. Научните сознанија за функционирањето и механизмите на регулација на овој биохемиски пат имаат големо значење за трансформација на оризот со неопходните гени за продукција на каротеноиди во зрната на оризот.

Зрната од ориз имаат способност за продукција на GGPP и затоа интродукцијата на активен ген за фитоеен синтаза кој се експресира во зрното под контрола на ендосперм-специфичен промотор овозможува продукција на фитоеен. Подоцна, трансгените

Геранилгеранил пирофосфат
 Фитонен синтаза
 Фитонен
 Десатураза (кодирана од бактериски ген кај златен ориз)
 Ликопен
 Ликопен циклаза
 β-каротен (провитамин А)

Зрното од Golden Rice продуцира доволна концентрација на β -каротен за да добие жолта боја. Сепак, акумулираната содржина на β -каротен во зрната од ориз не е доволна за да се обезбеди висока нутритивна вредност. Затоа била развиена подобрена верзија на трансгените растенија од ориз означена како Golden Rice 2 преку користење на ген за фитоен синтаза од пченка наместо од нарцис. Оваа подобрена верзија на трансгениот ориз акумулирала 20 пати повисока концентрација на каротеноиди во споредба со

оригиналната верзија на Golden Rice (Paine и сор., 2005). Податоците покажуваат дека умерената консумација на Golden Rice 2 обезбедува доволно количество на β -каротен за надминување на дефицитот на витамин А.

Постојат одредени контроверзии во однос на продукцијата на Golden Rice. Застапниците на трансгени производи ја подржуваат идејата дека трансгениот ориз може да обезбеди провитамин А за милиони потхранети деца во светот. Од друга страна пак, противниците на оваа технологија сметаат дека развитокот на овој трансген производ е стратешка цел на биотехнолошката индустрија за да се стимулира прифаќањето на трансгената храна ширум светот. Голем број противници тврдат дека суплементите со витамини и збогатувањето на храната со есенцијални елементи и витамини можат да се користат како супериорни методи за справување со дефицитот на витамин А. Затоа е неопходно да се решат овие спорни прашања пред да се прифати оваа трансгена култура во светски рамки. Развитокот на Golden Rice претставува јасен доказ за модификација на природната способност на растенијата за синтеза на комплексни соединенија и подобрување на нивната нутритивна вредност.

3.3.2 Модифицирани растителни масла

Масните киселини кај растенијата претставуваат извор на масла кои се користат во исхраната, а можат да имаат примена и во подготовката на козметички препарати, детергенти и пластични материјали. Маслодајната репка (*Brassica napus*) се користи како извор на растително масло уште пред многу години. Канола е вообичаено име за култивираната форма на овој растителен вид и била добиена со традиционалните методи на вкрстување за да се намали содржината на токсичните глукозинолати и ерукова киселина. Со примена на генетскиот инженеринг, во растенијата од канола бил интродуциран ген за тиестераза од калифорниски лавор (*Umbellularia californica*) со цел да се добие масло со висока концентрација на корисни масни киселини. Експресијата на интродуцираниот ген за тиестераза предизвикува предвремено прекинување на синцирите на масни киселини, што резултира со акумулација на лауринска киселина со 12 јаглеродни атоми и миристинска киселина со 14 јаглеродни атоми. Кај овие трансгени растенија не се зголемува вкупната содржина на липиди, бидејќи акумулацијата на масни киселини со кратки синцири кореспондира со намалувањето на содржината на масни киселини со долги синцири, како што се олеинската и линолната киселина со 18 јаглеродни атоми. Овие масни киселини со кратки синцири имаат големо значење за користење на маслото од канола како соодветна замена на палминото и кокосовото масло во подготовката на различни производи (маргарин, путер и други кондиторски производи).

Исто така, маслото од соја се користи за подготовка на различни прехранбени и индустриски производи. Намалување на активноста на ензимот Δ_{12} -десатураза кај трансгените растенија од соја предизвикува зголемена акумулација на олеинска киселина. Намалената активност на Δ_{12} -десатураза кај трансгените растенија настанува поради супресија на нормалниот *fad2* ген за кодирање на ензимот и интродукција на втора копија на генот (трансген) во растението. Прекумерната експресија на втората копија на трансгенот предизвикува истовремено исклучување на експресијата на ендегениот (нормален) ген и трансгенот кај растението. Притоа, стивнувањето на *fad2* генот резултира со зголемена акумулација на олеинска киселина и соодветно намалување на содржината линолна киселина и линолеинска киселина со 18 јаглеродни атоми. Единствени разлики помеѓу овие 3 масни киселини е бројот на двојни врски во нивните синцири. Во тој контекст, сојата со висока содржина на олеинска киселина има ниска содржина на заситени масти и trans-масти. На таков начин се редуцира потребата

за хидрогенација на маслото од соја за подготовка на хранливи производи (маргарин). Ова модифицирано масло од соја се одржува во течна форма и како термостабилен производ може да се користи во готвењето.

3.3.3 Фармацевтски производи

Фармацевтските производи од растително потекло кои се добиени со примена на генетскиот инженеринг се предмет на широка дискусија. Познато е дека растенијата синтетизираат широк спектар на соединенија кои имаат значајни ефекти врз здравјето на хуманата популација (салицилна киселина, кокаин, морфин, таксол и др.). Интродукцијата на нов трансген кај растенијата може да се користи за биосинтезата на комплексни метаболити или специфични протеини.

Продукцијата на орални вакцини кај растенијата претставува атрактивен пристап во одделни региони во светот, каде што инфраструктурните и финансиските недостатоци можат да го ограничат складирањето, трансферот и администрацијата на традиционалните вакцини. Интродукцијата на имуноген протеин во растителната храна која може лесно да се култивира, складира и потоа да се консумира претставува ефикасна стратегија за вакцинација. Така на пр., продукцијата на површински антиген на хепатитис В вирусот кај трансгени растенија од компир индуцира имун одговор кај луѓето. Исто така, продукцијата на протеини кај трансгени растенија од банана може да претставува потенцијален извор на орални вакцини. Постојат неколку дискутабилни теми при овој пристап, како што се времето на администрација на вакцината, дозирањето, како и ефикасноста на протеинот за индуцирање на имунитетот преку орална администрација.

Антителата се големи и комплексни протеини со изразена способност за препознавање и врзување на специфични целни молекули. Во физиолошки услови растенијата не продуцираат антитела, меѓутоа, постојат голем број литературни податоци дека растенијата можат да синтетизираат функционални антитела при експресија на соодветни трансгени. Карактеристичен пример е продукцијата на специфично моноклонско антитело кое препознава површински клеточен протеин од бактеријата *Streptococcus mutans* како главен причинител за појава на кариес на забите. Антителото се врзува за бактерискиот површински протеин и на таков начин интерферира во врзувањето на бактеријата за забниот глеѓ. Способноста на трансгени растенија од тутун за синтеза на антитела и добивање на производ означен како *CaroRX* може да има потенцијална примена за производство на пасти или други средства за заби.

Денес, повеќето биофармацевтски производи се продуцираат со користење на култури на бактерии (*E. coli*), квасци и мамалиски клетки. Стратегијата за продукција на фармацевтски протеини од растенијата може да има неколку предности (Giddings и сор., 2000). Култивирањето на трансгените растенија овозможува добивање на голема количина на биомаса која експресира некој производ од интерес. Некои терапевтски протеини како серумски фактори, хормони или антитела се добиваат на традиционален начин од хуманата популација или животните. Примената на растенијата може значајно да го намали пренесувањето на непознати инфеткивни агенси од донорниот организам, бидејќи растенијата не се носители на аминални патогени. Сепак, продукција на терапевтски протеини кај индустриските растенија не е широко прифатена идеја. Противниците на оваа идеја нагласуваат дека прехранбените производи можат да се контаминираат со растителни ткива кои се наменети за продукција на лекови. Карактеристичен пример е спротивставувањето на една голема компанија за пијалоци на фармацевтска компанија која планирала да култивира трансгени растенија од ориз во близина на постоечките полиња со ориз кои се користат за производство на пијалоци.

Втор потенцијален недостаток на фитофармацевтските протеини се разликите во гликозилација на протеините што се одвиваат кај растенијата и животните. Всушност, јаглехидратните компоненти кои се врзуваат за протеините можат значјано да влијаат врз нивната функција и имуногеноста. Во тој контекст, некои модели на гликозилација на протеините кај растенијата можат да предизвикаат несакани алергиски реакции кај хуманата популација. Затоа, продукцијата на растителните протеини треба да се одвива на таков начин што овие терапевтски производи ќе бидат безбедни за употреба и нема да елицитираат имун одговор кај луѓето.

3.3.4 Биогорива

Зголемената потрошувачка на енергија и трошењето на фосилните горива во светот претставуваат вистински предизвик за растителната биотехнологија во откривањето на алтернативни и обновливи извори на енергија. Продукцијата на етанол и биогорива од растителен материјал може да ја замени примената на постоечките горива. Во тој контекст, трансгените растенија имаат голем потенцијал да ја зголемат ефикасноста на биогоривата во многу стопански области.

Етанолот се карактеризира со неколку предности како енергетски извор. Овој алкохол е биодградибилно и обновливо гориво кое може да гори без загадување на атмосферата во споредба со повеќето фосилни горива. Етанолот се добива со ферментација на јаглехидратите под дејство на квасци. Во САД пченката е доминантен извор на ферментирачки јаглехидрати. При овој процес, сложените јаглехидрати од скроб во зрната од пченка се разградуваат до прости моносахариди, кои потоа се користат од страна на квасците за продукција на етанол. Ефикасен пристап за зголемување на продукцијата на етанол е да се добијат трансгени растенија кои имаат висока содржина на ензими одговорни за иницијалните фази на разградување на скробот (Himmel и сор., 2007). Зголемената експресијата на гените за разградување на скробот во прости јаглехидрати (амилаза) во зрната од пченка или други растенија може да резултира со добивање на висок процент на достапни јаглехидрати за ферментација. Подобрувањето на условите за култивирање на пченката (азотни ѓубрива и пестициди) не претставува долгорочна стратегија за продукција на етанол. Во Бразил, идеален растителен вид за производство на етанол е шеќерната трска поради високата содржина на прости ферментирачки јаглехидрати. Исто така, шеќерната трска е повеќегодишна култура која може лесно да се култивира со минимални вложувања за нејзино производство. Успехот на Бразил за прифаќање на етанолот како извор на гориво е најдобар пример за искористување на постоечките ресурси и инфраструктура за користење на биогорива.

Постојат голем број истражувања за користење на растителен материјал богат со целулоза како потенцијален извор за продукција на етанол. Конверзијата на растенијата богати со целулоза во ферментирачки јаглехидрати претставува неефикасен процес и не се смета како практичен метод за продукција на биогориво. Сепак, различни растителни материјали, како пченкарна слама (стебла и листови), дрвесина или биомаса од повеќегодишни култури имаат енергетска вредност која може да се конвертира во етанол. Во тој контекст, некои растителни култури (просо) или брзо-растечки дрвја (врба или топола) имаат голема предност поради повеќекратното колектирање на голема количина на биомаса од исти растенија кои имаат висок капацитет за растење без големи потреби од наводнување и ѓубрење. Според тоа, развитокот на нови методи за целулитичко конвертирање на растителниот материјал во етанол може да биде основа за одржливо производство на горива од растенијата. Техниката на генетски инженеринг била испитувана за продукција на целулоза која може лесно да се конвертира во прости

ферментирачки јаглехидрати за добивање на етанол од страна на микроорганизми. Исто така, испитувани се можностите за добивање на треви и дрвенести растенија со ниска содржина на лигнин кој може да интерферира при деградација на целулозата. Постојат истражувања во генетскиот инженеринг на микроорганизмите за деградација на лигнинот или конвертирање на целулозата и други сложени јаглехидрати до етанол (Stephanopoulos, 2007). Денес се истражуваат различни можности за воспоставување на едноставна процедура за продукција на етанол од целулоза со примена на трансгени растенија кои експресираат целулази или некои други ензими за разградување на клеточните сидови.

Биогоивата од растителен материјал можат да се користат како ефикасна алтернатива во споредба со фосилните горива. Употребата на дизел горивата за транспортни цели опфаќа околу 20% од вкупната потрошувачка на горива во САД. Според тоа, иновацијата на обновлив извор на горива може да има значајно влијание врз светските побарувања за нафта. Биодизелот се продуцира од маслодајни култури (соја или канола) преку процесот трансестерификација. Иако растенијата од соја и канола се култивираат на огромни површини во светски рамки, генетскиот инженеринг кај овие маслодајни култури сè уште нема практична примена за продукција на биодизел. Економските, еколошките и политичките притисоци поврзани со прекумерната употреба на фосилните горива ќе овозможи во иднина развој на нови стратегии за примена на трансгените растенија како извор на биогорива.

4. МАРКЕР ГЕНИ И ПРОМОТОРИ

Познато е дека генетската трансформација на растителната клетка се одвива во природни услови. Технологијата за добивање на трансгени растенија во лабораториски услови започнува да се развива пред околу 3 децении. Постојат голем број прашања за фундаменталната природа на трансгените растенија, како и генетските механизми на функционирање на растителниот геном. Растенијата се карактеризираат со стабилни модели на транскрипција и механизми на програмирање, поради што растителните геноми се недостапни за инсерција на маркер гени (El Ouakfaoui и Miki, 2005). Овие податоци имаат големо значење во геномските студии кај трансгените растенија кои се користат како модел-системи за проучување на функцијата на непознати гени. Исто така, биобезбедноста на трансгената храна се испитува преку компарација со други растенија кои се потврдени како безбедни за употреба и консумација од страна на хуманата популација. Затоа е неопходно да се одреди дали за време на процесот на трансформација можат да се индуцираат несакани или непредвидени генетски промени. Маркер гените овозможуваат проучување на овие фундаментални процеси и претставуваат есенцијална компонента за добивање на трансгени растенија.

Денес се развиени неколку типови на маркер гени кои имаат различна примена во биотехнологијата, како регенерација на трансгени растенија, експериментална манипулација со растителни ткива, интрацелуларен транспорт на протеините, испитување на регулаторните механизми на растителните гени и биобезбедноста на трансгените растенија. Маркер гените се групираат во различни категории во зависност од нивната селективност, стимулирање или супресирање на растот и диференцијацијата на ткивата, како и зависноста од надворешни супстрати. Поради потребата за натамошни истражувања, неопходно е да се развијат методи за селективно отстранување на маркер гените со цел да се добијат трансгени растенија ослободени од маркер гени.

4.1 Дефиниција на маркер гени

Маркер гените имаат есенцијално значење за идентификација на трансгените растенија и модификација на протоколите со цел да се зголеми фреквенцијата на трансформација. **Маркер гените** се поделени во две категории: **селективни** маркер гени и **неселективни** или **репортер** гени (Табела 4.1).

4.1.1 Селективни маркер гени

Селективните маркер гени овозможуваат продукција на трансгени растенија преку користење на соединенија во хранливиот медиум кои обезбедуваат селективен раст на трансгените ткива во однос на нетрансгените ткива кои не покажуваат способност за раст. Имајќи предвид дека само неколку клетки од целата клеточна популација на растителниот експлантат успешно се трансформираат, постои мала веројатност за регенерација на трансгени клетки без примена на селективни маркер гени. Селективните маркер гени се поделени во две основни групи во зависност од тоа дали обезбедуваат позитивна или негативна селекција (Табела 4.1). **Позитивните селективни маркер гени** обезбедуваат селективна предност за раст на трансформираниите растителните клетки во однос на нетрансформираниите клетки. Механизмот на дејство на позитивните селективни маркер гени може да биде поизразен ако се користат токсични соединенија во хранливиот медиум. Соединенијата се дизајнираат на таков начин што предизвикуваат селективно убивање на нетрансформираниите клетки, додека пак, трансформираниите клетки остануваат вијабилни преку механизмите на детоксификација

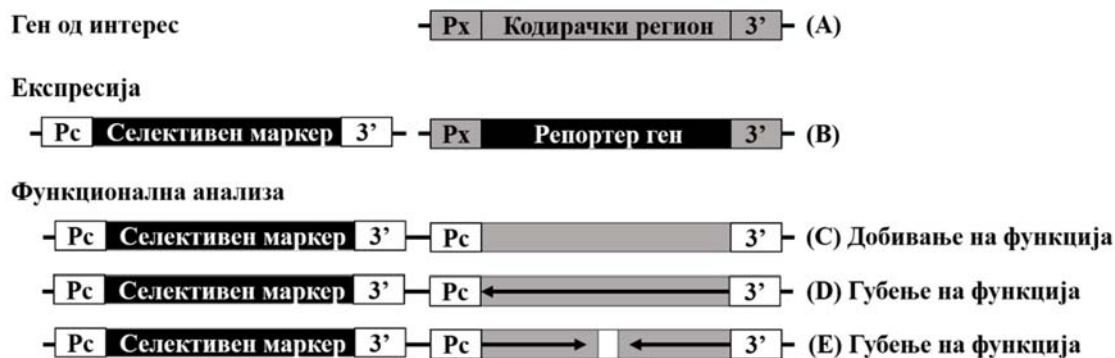
или резистентност кои се кодирани од селективните маркер гени. **Негативните селективни маркер гени** кодираат системи кои се токсични за трансгените растителни клетки и вршат нивно селективно убивање.

Кондиционалните позитивни селективни маркер гени се важна група на компоненти од повеќето системи на трансформација за добивање на трансгени растенија. Овие маркер гени се инкорпорираат во векторите за трансформација и ги придружуваат другите гени од интерес кои се фузионирани за репортер гените кај трансгените растенија (Сл. 4.1). Кондиционалните позитивни селективни маркер гени можат да потекнуваат од растенијата или некои други организми. Повеќето маркер гени имаат бактериско потекло и се одговорни за нови особини на резистентност кај растенијата (Табела 4.1). За ефикасна примена во процесите на трансформација, селективните маркер гени не треба да стапуваат во интеракција со некои специфични целни молекули или да интерферираат во сигналните патишта на трансдукција во растителната клетка. Ако овие маркер гени предизвикаат некои промени кај растенијата, тогаш се комплицира идентификацијата на влијанието на генот од интерес врз фенотипот на растенијата.

Табела 4.1 Категории на маркер гени кои се користат кај растенијата.

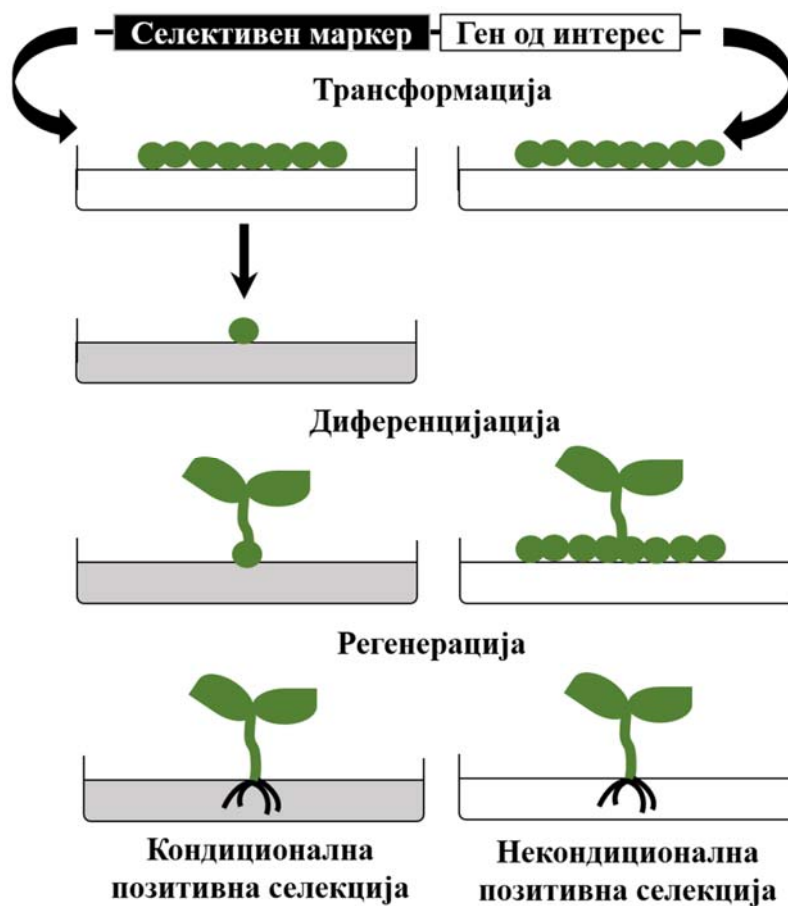
Класа на маркер гени	Примери	Извор на гени	Селективен агенс
Селективни маркер гени			
Позитивни			
Кондиционални	<i>nptII, neo, aphII</i>	<i>Escherichia coli</i>	Канамицин
	<i>hpt, hph, aphIV</i>	<i>E. coli</i>	Хигромицин
	<i>bar</i>	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Фосфинотрицин
	<i>manA</i>	<i>E. coli</i>	Маноза
Некондиционални	<i>ipt</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	/
Негативни			
Кондиционални	<i>codA</i>	<i>E. coli</i>	5-Флуороцитозин
Некондиционални	<i>barnase</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	/
Неселективни (репортер) гени			
Кондиционални	<i>uidA, gusA</i>	<i>E. coli</i>	MUG, X-gluc
Некондиционални	<i>gfp</i>	<i>Aequorea victoria</i> (медуза)	/

Селективните маркер гени од бактериско потекло треба да се модифицираат со цел да се обезбеди нивна експресија во растителната клетка. На таков начин се овозможува препознавање на бактериските гени од страна на системот за генска експресија кај растенијата. Овие модификации на селективните маркер гени опфаќаат промени во секвенците за да се добијат кодони слични кај растенијата и елиминација на криптичните места на сплајсинг кои можат да индуцираат неправилно процесирање на транскриптите. Промените опфаќаат замена на спротиводните и низводните регулаторни елементи со растителни секвенци за да се добијат „химерни гени“ кои ќе бидат препознаени од системите на транскрипција и транслација кај растенијата. Дизајнирањето на химерните гени овозможува ефикасна експресија на маркер гените во растителната клетка (Сл. 4.1). Првите добиени химерни гени се селективните маркер гени кои се користеле за развој на техники за генетска трансформација на растенија. Тука се вбројуваат маркер гените за резистентност кон антибиотици и хербициди.



Слика 4.1 Функционална организација на селективни маркер гени и репортер гени кај вектори кои се користат за трансфер на DNA во растителни клетки. Селективните маркер гени се основна компонента на векторите за трансформација бидејќи се неопходни за идентификација на трансгениот материјал. Векторите се користат за проучување на растителните гени и нивните регулаторни елементи. Од геномските студии често пати не може да се добијат податоци за функцијата на гените и затоа се користат трансгените растенија како експериментални системи за проучување на функционалноста на гените. (A) Генот од интерес може да се испитува на различни начини. Регулаторните елементи често пати се наоѓаат во некодирачките региони на генот. Така на пр., промоторот (Px) е локализиран на 5' спротиводниот регион и вклучува бројни елементи кои се неопходни за транскрипција, како што се основниот промотор и елементи на засилувачи или репресори. Некои од овие регулаторни елементи се локализирани на 3' низводниот регион. (B) Фузијата на 5' и 3' некодирачките региони за репортер ген и инсерцијата на химерниот ген во векторот овозможува испитување на моделот на генска регулација кај трансгени растенија. (C) Експериментите за добивање на функција можат да се спроведат со прекумерна експресија на кодирачкиот регион со користење на силни конститутивни промотори (Pc), како што е 35S промоторот и 3' краевите кои се неопходни за терминација и полиаденилација (3'), како оние од *nos* генот или 35S транскриптот. Добиеениот фенотип кај трансгеното растение може да има големо значење за одредување на функцијата на гените. (D) Од друга страна, елиминацијата или редукцијата на експресијата на генот од интерес преку формирање на antisense транскрипт кај трансгеното растение се користи за добивање на мутантен фенотип. (E) Овој феномен може да се постигне и преку конструкција на вектор со инвертни репетитивни секвенци на генот од интерес, при што настанува генско стивнување.

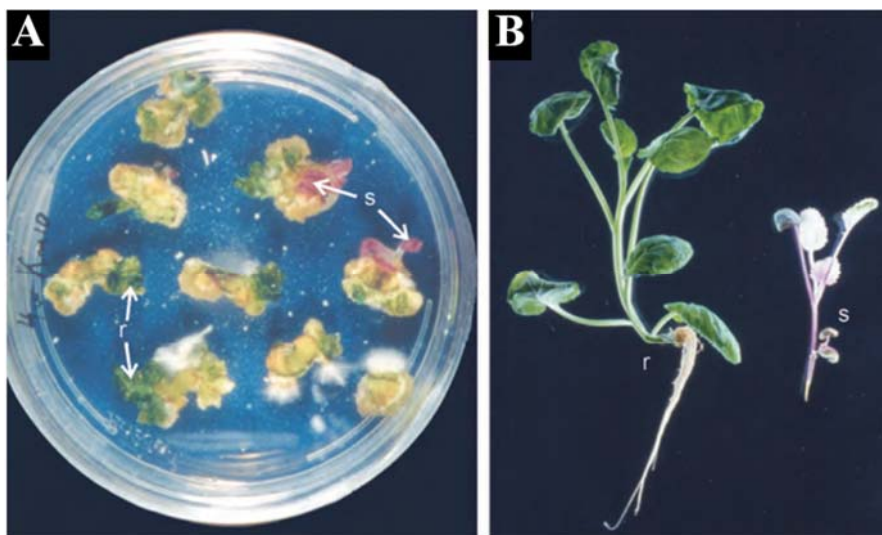
Примената на кондиционален и некондиционален позитивен селективен маркер ген за селекција на трансгени растенија е прикажана на Сл. 4.2. Клетките кои експресираат кондиционален позитивен селективен маркер ген поседуваат нова особина за резистентност која овозможува детосификација на токсичен супстрат во хранливиот медиум за култивирање и регенерација на растенија. На таков начин, само трансформираниите ткива можат нормално да растат и да се регенерираат во трансгени растенија, бидејќи нетрансформираниите клетки ја губат вијабилноста и изумираат поради токсичноста на супстратот. Некондиционалните системи овозможуваат идентификација на трансформираниите клетки преку промени во растот без да се применуваат надворешни супстрати. Сепак, двата система овозможуваат добивање на трансгени клетки кои се присутни во мал број од целата клеточна популација.



Слика 4.2 Компарација на кондиционален позитивен систем на селекција со некондиционален позитивен систем на селекција. Кондиционалните системи имаат широка примена во генетската трансформација на растенијата, додека пак, некондиционалните системи сè уште се во фаза на истражување и развој. Кондиционалните системи овозможуваат интродукција на нова особина на резистентност која често пати има потекло од бактериите. Надворешниот супстрат (сива боја на медиум) кој се додава во хранливиот медиум за раст и регенерација на трансформираниите клетки се користи за супресија на растот на нетрансформираниите ткива. Кај некондиционалниот систем, интродуцираните гени го изменуваат растот и диференцијацијата на трансгените клетки на таков начин што овозможуваат нивна сепарација од нетрансформираниите клетки во отсуство на надворешни супстрати. Примената на некондиционални системи овозможува изменување на основните клеточни процеси кај растителните клетки. На овој шематски приказ е претставен селективен маркер ген поврзан со ген од интерес кај рекомбинантен DNA молекул. Процесот на регенерација на растенијата опфаќа последователна органогенеза на изданоци и корени.

Првиот селективен маркер ген кој сè уште се користи во растителната биотехнологија е генот за неомицин фосфотрансферза II (*nptII*). Овој маркер ген овозможува преживување и раст на трансформираниите клетки на хранлив медиум во присуство на антибиотикот канамицин (Сл. 4.3). Селективните маркер гени претставуваат важна компонента од протоколите за генетска трансформација

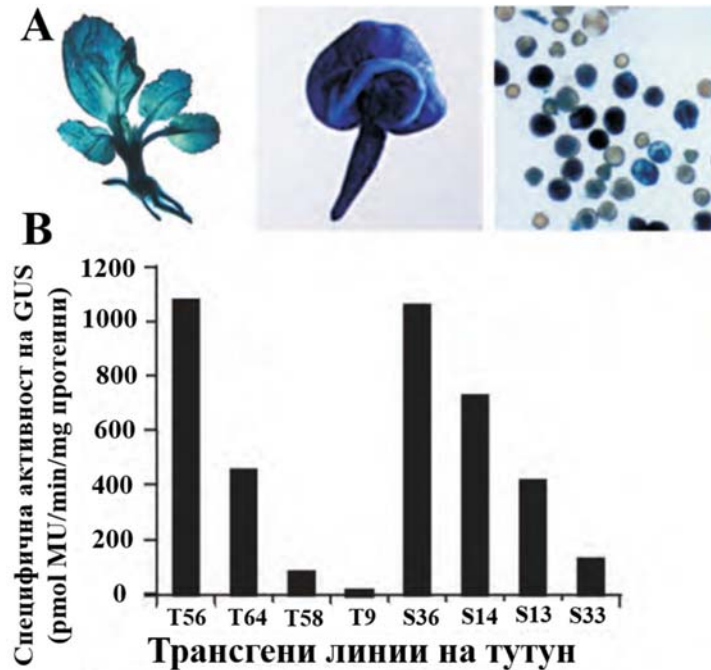
растенијата, бидејќи повеќето настани на трансформација се јавуваат во многу ниска фреквенција. Исто така, селективните маркер гени имаат голема примена кај растителните видови за кои не се развиени *in vitro* протоколи за култивирање или ефикасноста на трансформација е многу ниска. Селективните маркер гени кај добиените трансгени растенија можат да се користат како генетски маркери во натамошните студии бидејќи се поврзани со генот од интерес.



Слика 4.3 Селекција на трансгени растенија од канола (*Brassica napus* cv Westar) на хранлив медиум во присуство на канамицин во хранливиот медиум. Експлантати од стебло се инфицираат со *Agrobacterium tumefaciens* кој поседува вектор за трансформација со химерен *nptII* ген за резистентност кон канамицин кај трансформираниите ткива. (А) Растителните ткива се ко-култивираат со *Agrobacterium* за да се изврши трансформација на клетките. Потоа, растителните ткива се пренесуваат на хранлив медиум во присуство на канамицин за раст на калусно ткиво и диференцијација на изданоци. Повеќето нетрансформирани ткива (s) побелуваат и престануваат да растат бидејќи се сензитивни кон дејството на антибиотикот. Трансформираниите ткива (r) остануваат зелени и продолжуваат да растат поради резистентноста кон канамицин. (В) Трансгените изданоци кои се диференцираат во присуство на канамицин се изолираат од калусното ткиво и се субкултивираат на хранлив медиум за вкоренување и регенерација на корени (r). Изданоците кои не се резистентни кон канамицин (s) немаат способност за регенерација на корени во присуство на антибиотикот.

4.1.2 Репортер гени

За разлика од селективните маркер гени кои овозможуваат селекција на трансгените ткива, репортер гените покажуваат кои клетки имаат трансгена природа. Примената на карактеристичен кондиционален неселективен (репортер) ген е прикажан на Слика 1.4. Генот *uidA* (уште познат како *gusA*) кодира ензим β -глукуронидаза (GUS) кој може да реагира со супстратот 5-бромо-4-хлоро-3-индолил глукуронид (X-gluc), при што се добива син преципитат (Сл. 4.4А). Овој преципитат претставува хистохемиска боја која може да се користи за прикажување на локацијата на експресираниот трансген (Jefferson и сор., 1987).



Слика 4.4 Генот *uidA* кој е одговорен за кодирање на ензимот β -глукуронидаза (GUS) е карактеристичен пример за репортер ген кој има широка примена кај растенијата. (A) Хистохемиското бојење за активност на GUS со користење на супстратот 4-метил умбелиферил глукуронид (MUG) овозможува детекција на генската активност во специфични ткива на трансгените растенија. На Сл. 4.4A (лева страна) е прикажано бојење на регенерирани растенија од карфиол, каде што конститутивната експресија на GUS е предизвикана од страна на силен конститутивен промотор (tCUP). На Сл. 4.4A (средина) се прикажани изолирани ембриони од трансгени семиња на канола, каде што специфичната експресија во семињата е предизвикана од промотор за напин. На Сл. 4.4A (десна страна) е прикажан полен од трансгени растенија на канола, каде што специфичната експресија во клетките е предизвикана од страна на специфичен промотор за поленг (Bnm1 промотор). Дистинкцијата помеѓу трансформираниите и нетрансформираниите клетки на поленот може да се изврши врз база на присуството или отсуството на боја. (B) Одредување на специфичната ензимска активност на GUS со користење на супстратот 5-бромо-4-хлоро-3-индолил глукуронид (X-gluc). Секоја поединечна трансгена линија на тутун се разликува во степенот на генска експресија поради влијанието на инсертираните гени од генетските елементи и природата на хроматинот на различни места на инсерцијата. Овие влијанија на инсерцијата на трансгенот се нарекуваат позициони ефекти (Сл. 4.5). Со цел да се изврши компарација на разликите помеѓу интродуцираните гени и генски елементи во трансгените растенијата, анализите треба да опфатат голем број трансгени линии за да се редуцира влијанието на позиционите ефекти. Репортер гените имаат големо значење за добивање на големо количество на податоци. Во овој случај, компарацијата на јачината на конститутивните промотори 35S (трансгени линии со ознака S) и tCUP (трансгени линии со ознака T) може да се одреди преку споредување на активност на репортер генот.

Интензитетот на обојување е важен параметар за одредување на степенот на фузионирање на генските регулаторни елементи за химерниот репортер ген (Сл. 4.1) и контролата на генот во различни клетки од растението. Исто така, квантитативното одредување на специфичната активност на GUS ензимот може да се користи како индикатор за степенот на генска експресија и јачината на фузионирање на промоторот за маркер генот (Сл. 4.4B). Всушност, сините “GUS” обојувања и интензитетот на обојување кај растенијата имаат главно значење во определување на ефикасноста на трансформацијата, експресијата на генот и функционирањето на промоторот.

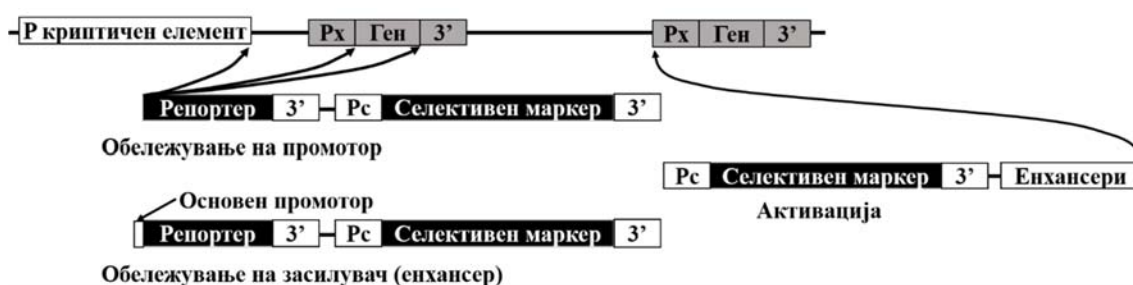
Маркер гените можат да се следат со примена на техники за детекција и мерење на специфични DNA, RNA или протеински секвенци. Широката примена на репортер гените се базира на можноста за добивање на голем број податоци и употребата на примероци со големи димензии. Во тој контекст, трансгените растенија значајно варираат во експресијата на трансгенот поради позиционите ефекти, односно различните влијанија на инсерциските места врз инсертираните гени (Сл. 4.4B). Важно е да се напомене дека со примена на кондиционалните репортер гени се добиваат индиректни податоци за генската експресија и голем број фактори можат да влијаат врз нивната интерпретација. Тука се вбројуваат стабилноста на производот во различни ткива, присуство на инхибитори во одредени ткива или различен степен на интерференција. Овие фактори можат значајно да варираат кај различни растителни видови. Затоа се препорачува потврдување на овие индиректни податоци со користење на соодветни техники кои овозможуваат директна детекција на секевенцата од интерес.

4.2 Промотори

Промоторните секевенци имаат големо значење за регулација на растителните гени. Функцијата на сите трансгени конструкти вклучувајќи ги генот од интерес и маркер гените зависи од присуството на промотори кои обезбедуваат репродукцибилна и предвидлива регулација на нивната транскрипција. Трансгените можат да се клонираат со помош на хетерологни промотори (промотори кои имаат потекло од друг организам) при конструкција на химерните гени во векторите за трансформација. Оптималното функционирање на маркер гените кај регенерираните трансгени растенија зависи од нивната експресија во сите растителни клетки. Вообичаено, селективниот притисок се применува веднаш по фазата на трансформација и се одржува во текот на растот и диференцијацијата на ткивата, како и за време на регенерацијата на цели трансгени растенија (Сл. 4.2 и 4.3). Исто така, селекцијата на трансформираниите клетки може да се изврши за време на ртењето на семето и растот на изртените растенија со цел да се следи сегрегацијата на маркер гените во потомството. Важно е да се напомене дека само **конститутивните промотори** обезбедуваат експресија на трансгените во сите ткива и за време на сите стадиуми од развитокот на растенијата (Сл. 4.1-4.4). Во растителната биотехнологија најчесто се користат конститутивни промотори кои се поврзани со гените од T-DNA во Ti плазмидите, како што е нопалин синтаза (*nos*) генот (Fraleу и сор., 1983) или промоторот на мозаичниот вирус на карфиолот (CaMV) кој е асоциран со 35S транскриптот. Овие два промотори со бактериско потекло имаат широка примена во развитокот на технологии за трансформација на растенијата. Од компаративен аспект, 35S е посилен промотор од *nos* (Sanders и сор., 1987), бидејќи се карактеризира со висока селективна ефикасност. Овие два промотори се користат за генетска трансформација кај голем број дикотиледони растенија, меѓутоа не покажуваат ефикасност кај монокотиледоните растенија. Кај житните растенија се користат промоторите на актин од ориз и убиквитин 1 од пченка (Christensen и Quail, 1996) како соодветни алтернативни промотори. Иако се изолирани голем број конститутивни промотори, 35S и *nos*

промоторите сè уште имаат широка примена во протоколите за трансформација на растенија. Предноста на овие промотори е познавањето на начинот на нивното функционирање и ефикасност, како и нивната широка достапност во лабораториите за растителна биотехнологија.

Исто така, експресијата на маркер гените зависи од голем број други фактори кои треба да се земат во предвид при конструкција на векторите за трансформација. Така на пр., големо значење има ориентацијата на промоторот во рамките на DNA секвенцата што се пренесува во целниот организам. Истражувањата покажуваат дека 35S промоторот може да стапува во интеракција со соседните промотори од векторот, како и со растителните секвенци од местото на инсерција. На таков начин можат да настанат значајни промени во специфичноста на ткивно-специфичните промотори. Во експериментите познати како активација со обележување (activation-tagging), промоторите случајно се интегрираат во геномот и можат да ја зголемат експресијата на гени (Сл. 4.5).

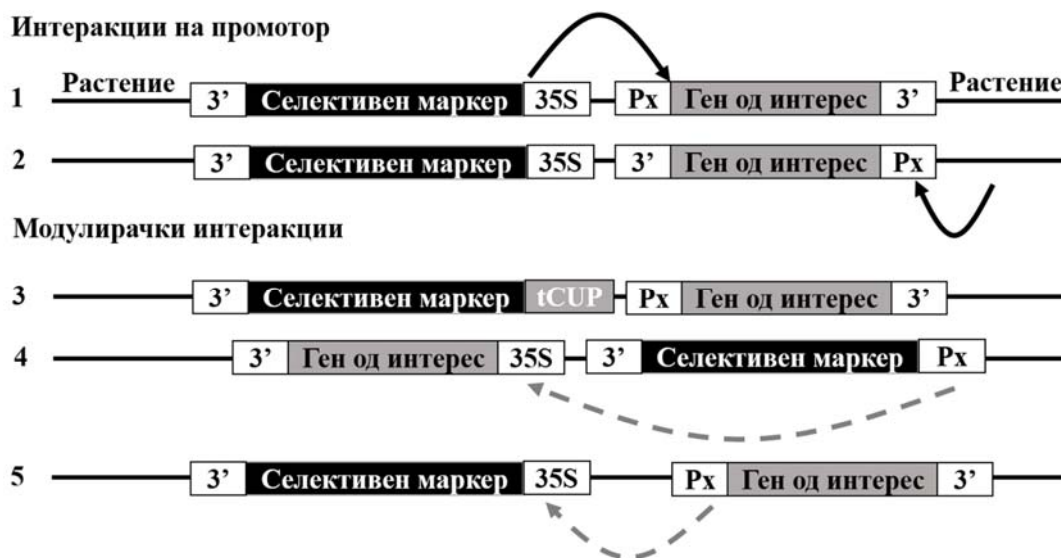


Слика 4.5 Интеракции кои се јавуваат помеѓу маркер гени и генски елементи од растителниот геном. Истражувањата на функционалните елементи и гените во растителниот геном опфаќа примена на вектори, каде што репортер гените се интродуцираат во растителниот геном без клучни регулаторни елементи, како што се промотори и засилувачи (енхансери). Активацијата на репортер генот зависи од додавањето на овие клучни елементи кои недостасуваат од геномот на инсерциското место. Овие експерименти се нарекуваат промотор или енхансер замки. Регулаторните елементи можат да се поврзани со експресираниите гени (Рх) или можат да останат дормантни во геномот како криптични елементи (Р криптичен елементи). Активација со обележување на гени е алтернативна стратегија за активирање на гените од интерес преку интродукција на силни конститутивни енхансер елементи.

Промоторите можат да стапат во интеракција со некои инфицирачки вирусни секвенци кои предизвикуваат стивнување на трансгенот и стопирање на неговата експресија во трансгените растенија. Стивнувањето на гените може да настане и поради постоењето на сличност во секвенците помеѓу интродуцираните промотори во векторите за трансформација и ендегените гени (гени на растението-домаќин). Постојат голем број информации за природата на интеракциите кои можат да ја модифицираат генската експресија, како и за влијанието на ориентацијата на генските елементи врз генското стивнување. Така на пр., познато е дека треба да се избегнува користењето на инвертни повторувања во DNA секвенците (Сл. 4.1). При конструкција на векторите за трансформација, промоторите кои се асоцирани со селективните маркер гени треба да се лоцирани на максимална оддалеченост од промоторите кои се асоцирани со генот од интерес или граничните секвенци на растителната DNA (Сл. 4.6). Растителниот геном има голем број промотори кои можат да стапат во интеракција со инсертираната DNA

секвенца. Сите овие податоци се користат во истражувањата за откривање на промотори преку користење на стратегии кои се познати како промотор или енхансер замки (Сл. 4.5). На таков начин е откриен силен конститутивен промотор означен како tCUP, кој се користи за контрола на експресијата на селективните маркер гени. Предноста на овој промотор е тоа што не стапува во интеракција со други промотори како што е 35S промоторот (Сл. 4.6).

Неселективните маркер (репортер) гени се користат за проучување на специфичноста и степенот на активноста на растителните промотори. Често пати, селективниот маркер ген и генот репортер се поврзуваат во ист DNA фрагмент кој е наменет за пренесување во растителната клетка (Сл. 4.1). Ориентацијата и типот на промоторот кој е поврзан со генот репортер треба соодветно да се дизајнираат во однос на промоторот фузиониран за селективниот маркер ген (Сл. 4.6).



Слика 4.6 Конструкција на вектори за трансформација на растенијата за да се спречат интеракции помеѓу промоторите кои ја контролираат експресијата на селективните маркер гени и гените од интерес. Често пати, конститутивните промотори (пр. 35S промотор) се користат за контрола на експресијата на селективните маркер гени. Сепак, 35S промоторот стапува во интеракција со другите промотори (полни стрелки) од векторот за трансформација, особено ако овие промотори се лоцирани во непосредна близина (конфигурација 1). Оваа појава може да предизвика нарушена или непредвидлива експресија на генот од интерес. Слични интеракции можат да се јават со елементите од растителната DNA кои се позиционирани во близина на промоторите од интродуцираната DNA (конфигурација 2). Овие интеракции можат да се минимизираат преку соодветно дизајнирање на векторот. Едноставен пристап е да се користи конститутивен промотор (пр. tCUP промотор) кој нема тенденција да стапува во интеракции со другите промотори (конфигурација 3). Исто така, гените од трансфер-DNA можат да се позиционираат на таков начин што нивните промотори се меѓусебно оддалечени на што е можно поголемо растојание (конфигурација 4) или преку инсерција на спејсер-DNA помеѓу промоторите (конфигурација 5). Ови манипулации при конструкција на вектори можат да имаат големо значење во редукција на степенот на интеракции помеѓу промоторите (испрекинати стрелки).

Кај некои растителни видови е постигнат голем напредок во технологиите за инсерција на гени во хлоропластниот геном. Постојат селективни маркер гени кои можат да се користат за трансформација на пластидите и јадрото (Miki и McHugh, 2004). Сепак, експресијата на селективните маркер гени во различни геноми се врши со примена на различни промотори. Трансформација на хлоропластите се врши со користење на промоторот на рибозомален RNA оперон (Prn). Овој промотор покажува слична фреквенција на трансформација како и при трансформација на јадрениот геном (Svab и Maliga, 1993).

4.3 Типови на селективни маркер гени

Во литературата се опишани повеќе од 50 селективни маркер генски системи за трансформација на јадрениот геном (Miki и McHugh, 2004). Сепак, само мал дел од овие селективни маркер гени се користат во рутинската пракса. Постоенето на голем број селективни маркер гени има големо значење, бидејќи нивната ефикасност може да варира кај различни растителни видови. Во Табела 4.1 е прикажан системот на класификација на различни маркер гени кои се користат кај растенијата.

4.3.1 Кондиционални позитивни селективни маркер гени

Оваа група содржи најголем број селективни маркер генски системи кои имаат широка примена кај растенијата. Кондиционалните позитивни селективни маркер гени кодираат ензим или производ кој овозможува резистентност кон одреден супстрат преку селективна инхибиција на растот и диференцијацијата на нетрансформираниите ткива (Сл. 4.2). Токсичниот супстрат може да биде антибиотик, хербицид, лек, метаболички интермедиер или прекурсор на фитохормони. Начинот на апликација на супстратот има големо значење бидејќи треба да обезбеди сигурна пролиферација на трансформираниите клетки, а воедно да изврши брза супресија на растот или убивање на нетрансформираниите клетки. Акумулацијата на токсини од мртвите ткива може да има негативно влијание врз способноста за преживување на живите ткива, особено ако овие вијабилни ткива се присутни во ограничен број од големата популација на мртви клетки. Оптималните услови за селекција се специфични за секој растителен вид или типот на растително ткиво. Ако не се обезбедат соодветни услови за селекција, процентот на добивање на трансформирани клетки може да биде многу понизок во однос на фреквенцијата на трансформација која реално се јавува кај клеточната популација. Исто така, треба да се земат во предвид пропустите (escapes) кога нетрансформираниите ткива се идентификуваат како трансформирани ткива поради преживувањето на селективниот притисок. Ако е премногу висока фреквенцијата на овие пропусти, тогаш се спроведуваат дополнителни анализи за да се изврши селекција на трансгените од нетрансгените ткива.

Во оваа категорија се вбројуваат генски системи кои овозможуваат пристап до извор на хранливи материи кои можат да се искористат само од трансформираниите ткива. Од друга страна пак, нетрансформираниите ткива ја губат својата вијабилност поради недостаток од овие нутриенти. Карактеристичен пример е *manA* генот кој обезбедува способност на растителните клетки да користат маноза како извор на јаглерод (Reed и sor., 2001).

Важно е да се напомене дека само 3 селективни системи имаат широка примена во научната дејност и рутински се користат за комерцијални цели при добивање на трансгени растенија. Тука се вбројуваат *nptII* (Bevan и sor., 1983) и *hpt* (Waldron и sor.,

1985) гените кои се одговорни за резистентност кон антибиотиците канамицин и хигромицин, соодветно. Третиот систем е *bar* или *pat* гените (De Block и сор., 1989) кои обезбедуваат резистентност кон хербицидот фосфинотрицин (Табела 4.1).

4.3.1.1 Селекција кон антибиотици

Аминогликозидните антибиотици вклучуваат голем број различни антибиотици, како канамицин, неомицин, гентамицин и паромомицин. Канамицинот се продуцира од почвената актиномицета *Streptomyces kanamyceticus*. Молекулите на канамицинот се многу токсични за растителните клетки (Сл. 4.3), бидејќи ја инхибираат синтезата на протеини. Сепак, постојат голем микроорганизми кои продуцираат голем број ензими за детоксификација на канамицинот. Во тој контекст, ензимот фосфотрансфераза обезбедува резистентност преку АТР-зависна-*O*-фосфорилација на канамицинот. Неомицин фосфотрансфераза II (NPTII) од *Escherichia coli* претставува бактериски ензим означен како аминокликозид 3'-фосфотрансфераза II [APH (3') II], кој има широка примена кај растителните клетки за стекнување на резистентност кон канамицин.

За нормално функционирање во растителните клетки, генот кој кодира NPTII (*nptII*), уште познат како *neo* или *aphII* се фузионира со регулаторните елементи од генот за нопалин синтаза (*nos*) од T-DNA на Ti-плазмидот кај *Agrobacterium tumefaciens*. Генските елементи на *nos* овозможуваат конститутивна експресија на *nptII* генот и резистентност кон канамицин во сите клетки на трансгеното растение. Силната низводна промоторна секвенца од мозаичниот вирус на карфиолот (CaMV) која е одговорна за транскрипција на 35S RNA обезбедува висока експресија на *nptII* генот и висок степен на резистентност кон канамицин. Генот *nptII* може да функционира како селективен маркер во јадрениот и пластидниот геном. Сепак, трансформацијата на хлоропластите примарно се одвива со користење на друг селективен генски маркер означен како аминокликозид-3''-аденилтрансфераза (*aadA*).

Генот *nptII* за резистентност кон канамицин има широка примена во растителната биорехнологија поради ефикасноста на овој селективен генски маркер кој функционира кај широк спектар на растителни видови. Исто така, овој селективен генски маркер ефикасно функционира кај различни микроорганизми и еукариотски клетки. Иако постојат одредени можности за потенцијален трансфер на резистентноста на други организми, досега не се потврдени негативни ефекти кај хуманата популација, животните или животната средина (Flavell и сор., 1992). Важно е да се напомене дека експресијата на *nptII* генот не влијае врз транскрипција кај трансгените растенијата и затоа растенијата кои го експресираат овој ген не се разликуваат во фитохемискиот состав во однос на нетрансгените растенија (El Ouakfaoui и Miki, 2005).

Хигромицин В е вториот најчесто користен антибиотик за селекција на трансформирани растителни клетки (Waldron и сор., 1985). Во споредба со канамицинот, хигромицинот В е многу токсичен антибиотик и затоа е неопходно оптимизирање на неговата концентрација за да не предизвика убивање на растителните клетки. Хигромицин В е аминокликтолен антибиотик кој ја инхибира синтезата на протеини и покажува широк спектар на дејство. Бактерискиот ген *aphIV* (уште познат како *hph* или *hpt*) кодира хигромицин фосфотрансфераза (HPT), кој делува преку АТР-зависна фосфорилација на хигромицин В. Овој селективен генски маркер има широка примена кај голем број растителни видови.

Исто така се користат и други антибиотици, како стрептомицин, блеомицин, стрептотрицин и хлорамфеникол. Резистентноста произлегува од гени кои кодираат ензими за детоксификација на антибиотиците преку модификација на нивните молекуларни структури.

4.3.1.2 Селекција кон хербициди

Фосфинотрицин (PPT) или глуфосинат амониумова сол е активна компонента на неколку комерцијални хербициди. Како аналог на L-глутаминска киселина, PPT е компетитивен инхибитор на глутамин синтаза (GS) кој е есенцијален ензим за асимилација на амониум кај растенијата. На таков начин, инхибицијата на GS предизвикува акумулација на токсични концентрации на амониум во растителните клетки. Ензимот фосфинотрицин N-ацетилтрансфераза (PAT) катализира детоксификација на PPT преку ацетил CoA-посредувана ацетилација и на таков начин се обезбедува резистентност кон овој хербицид. Досега се клонирани два гена кои го кодираат PAT ензимот: *bar* генот (за резистентност кон хербицидот биалафос кој се состои од L-аланин и PPT) од *Streptomyces hygroscopicus* и *pat* генот (кодира фосфинотрицин ацетилтрансфераза) од *Streptomyces viridochromogenes*. Двата гена имаат широка примена како селективни маркер гени кај житните растенија поради неефикасната селекција на канамицинот кај овие растенија. Всушност, канамицинот покажува пониска ефикасност за убивање на монокотиледоните растенија во споредба со хербицидите биалафос или PPT. Трансформираниите растенија со *bar* или *pat* гени се меѓу првите случаи кои биле комерцијално одобрени за култивирање на отворено поле и биле означени како безбедни растенија од голем број интернационални регулаторни агенции. Исто така, голем број други хербициди (глифосат, имидазолинони и бромоксинил) можат да се користат во комбинација со нивните соодветни гени за резистентност при селекција на трансгените растенија.

4.3.1.3 Селекција со примена на нетоксични метаболички супстрати

Повеќето кондиционални позитивни селективни системи користат токсични супстрати за селекција на трансформираниите ткива. Од неодамна се развиени алтернативни системи на селекција со примена на нетоксични метаболички интермедиери. Овој тип на селективни системи се разликуваат од примената на антибиотици, хербициди или лекови за селекција на трансгените ткива, бидејќи супстратите кои се користат не го инхибираат растот на клетките. Всушност, овие супстрати претставуваат извори на јаглерод кои не се достапни за користење од страна на растителните клетки, освен ако не поседуваат ензим за искористување на јаглеродот во примарниот метаболизам.

Карактеристични примери на овој тип селективни супстрати се маноза и D-ксилоза. Бактериските гени кои кодираат фосфоманоза изомераза (PMI) од *E. coli* (*manA*) или ксилоза изомераза од *Streptomyces rubiginosus* и *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* (*xylA*) овозможуваат вклучување на овие ензими во гликолизата. Предноста на овие гени е ефикасното дејство кај широк спектар на растителни видови со висока фреквенција на трансформација (Reed и сор., 2001). Овој пристап на користење на нетоксични метаболити драстично се разликува од претходните системи со токсични метаболити, бидејќи новостекнатите особини кодирани од селективните маркер гени можат значајно да го променат метаболизмот кај растенијата.

4.3.2 Некондиционални системи на позитивна селекција

Новите истражувања се насочени кон развиток на позитивни селективни системи без користење на супстрати за селекција (Zuo и сор., 2002). Овие системи се базираат на примена на гени кои обезбедуваат предности во растот, карактеристична морфологија

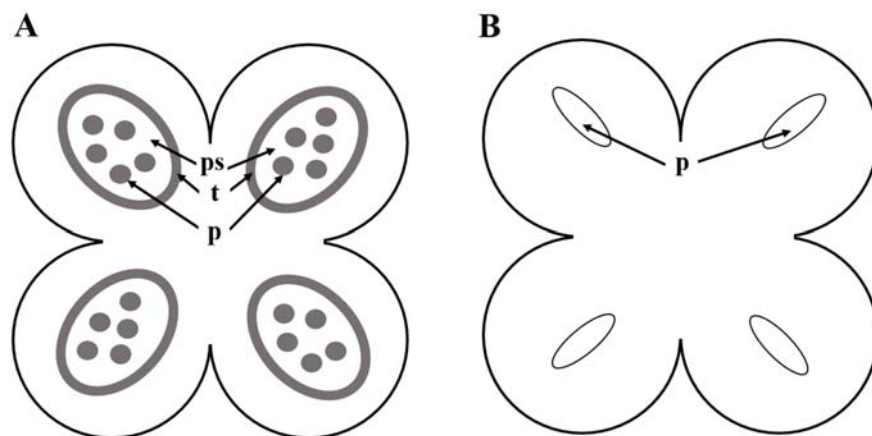
или селективна диференција на трансформираните ткива без да настане смртност кај нетрансформираните ткива (Сл. 4.2). Карактеристичен пример за некондиционален систем за позитивна селекција на трансформираните ткива е примената на органогенеза на изданоци. Всушност, формирањето на изданоци во *in vitro* услови зависи од присуството на висок однос цитокинин/ауксин во хранливата подлога за култивирање на растенијата. Познато е дека T-DNA од Ti плазмидите на *A. tumefaciens* кодира ензим изопентенил трансфераза (IPT), кој катализира синтеза на изопентенил аденозин-5'-монофосфат како почетна реакција од биосинтезата на цитокинини (Табела 4.1). Експресијата на овој ген во клетките индуцира висока степен на регенерација на изданоци и добивање на трансгени растенија. Единствен недостаток на овој процес е абнормалната морфологија на изданоците поради нарушената рамнотежа во концентрацијата на цитокинини, како и формирање на изданоци кои немаат способност за формирање на корени (Ebinuma и сор., 2001). За да се надмине овој недостаток се користи индуцибилен промотор, како што е β -естрадиол-индуцибилен промотор за да се ограничи времето на експресија на *ipt* генот (Zuo и сор., 2001). Исто така, овој пристап се разликува од повеќето системи за селекција бидејќи овие генски маркери интерферираат во основните процеси на раст и диференцијација на растителните клетки.

4.3.3 Кондиционални системи на негативна селекција

Кондиционалните системи на негативна селекција се користат во научните истражувања за елиминација на некои непосакувани настани на трансформација, како и за селективна експресија во специфични ткива или при специфични индуцибилни услови. Досега се опишани само неколку кондиционални системи на селекција. Карактеристичен пример е бактерискиот *codA* ген (Stougaard, 1993), кој кодира цитозин деаминаза (Табела 4.1). Важно е да се напомене дека овој ген покажува ефикасност при трансформација на јадрениот и пластидниот геном. Оваа класа на селективни маркер гени кодираат ензими кои вршат конверзија на нетоксичен супстрат во токсичен супстрат и на таков начин се елиминираат трансформираните клетки кои активно ги експресираат овие гени.

4.3.4 Некондиционални системи на негативна селекција

Некондиционалните системи на негативна селекција имаат широка примена како селективни маркер гени за отстранување на специфични типови на клетки кај трансгените растенија. Овие системи кодираат токсини или ензими кои ги нарушуваат основните процеси во клетката и предизвикуваат клеточна смрт. Иако повеќето системи се користат за продукција на трансгени растенија, некондиционалните системи на негативна селекција ги убиваат клетките кај зрели растенија поради безбедносни цели или вкрстување на растенијата. Карактеристичен пример е протеинот рибонуклеаза или барназа од *Bacillus amyloliquefaciens*. Експресијата на генот за овој протеин само во клетките од тапетниот слој предизвикува нивна смрт и се спречува диференцијација и созревање на поленот (Сл. 4.7). Всушност, овој процес предизвикува машка стерилност и добиените растенија немаат способност за продукција на полен (Mariani и сор., 1990). Активноста на барназа може да се контролира преку специфичен протеински инхибитор означен како барстар кој се наоѓа кај *B. amyloliquefaciens*. Оваа технологија се користи во растителната биотехнологија за добивање на машка стерилност и комерцијална продукција на хибридно семе. Исто така, овој систем може да се применува за функционална анализа на специфични типови на клетки и регулаторни елементи кои ја ограничуваат генската експресијата во овие клетки.



Слика 4.7 Шематски приказ на примената на барназа како негативен селективен маркер ген за отстранување на тапетните клетки кај канола: (А) нетрансформирани растенија и (В) трансформирани растенија. Генот за барназа кодира рибонуклеаза кај *Bacillus amyloliquefaciens*. Експресијата на овој ген под контрола на тапетум-специфичен промотор (ТА29) се ограничува само во клетките од тапетумот (t) кај трансгените растенија. Активноста на рибонуклеаза во клетките на тапетумот како прекурсори на поленот го спречува неговиот развиток и настанува распаѓање на поленовата торбичка (ps). На таков начин, поленот (p) не се диференцира и се добиваат трансгени растенија со машка стерилност. Специфичната експресија на рибонуклеазата во тапетумот не предизвикува промени во останатите ткива и клетки на трансгеното растение (Mariani и сор., 1990).

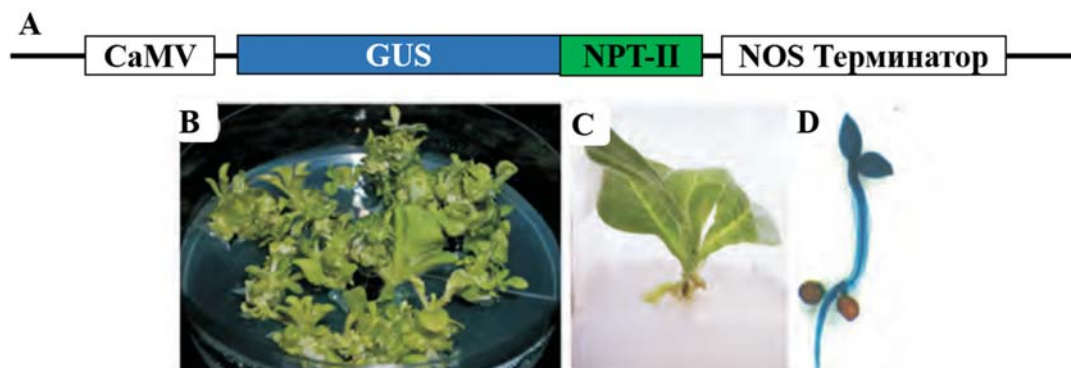
4.4 Типови на неселективни маркер гени или репортер гени

Селективните маркер гени се користат за развиток на технологии на трансформација, додека пак, неселективните (репортер) гени имаат фундаментална улога во откривањето на механизмите на генска регулација кај растенијата. Овој тип на гени во комбинација со селективните маркер гени имаат големо значење при научните истражувања за добивање на трансгени растенија. Исто така, репортер гените се нарекуваат „видливи маркер гени“ бидејќи го менуваат изгледот на растителните ткива. Најчесто се користат репортер гените кои кодираат β -глукуронидаза (GUS), луцифераза (LUC) и зелен флуоресцентен протеин (GFP). Притоа, GUS и LUC се кондиционални неселективни маркер гени кои зависат од надворешен супстрат за детекција на активноста. Од друга страна пак, GFP е некондиционален неселективен маркер ген бидејќи кодираниот протеин може директно да се детектира без користење на супстрат.

4.4.1 β -Глукуронидаза

Бактерискиот ензим β -глукуронидаза (GUS) се кодира од генот *uidA* (*gusA*) од *Escherichia coli* и претставува најчесто користен репортер систем кај растенијата (Jefferson и сор., 1987). Овој ензим има сензитивна и специфична активност во присуство на супстратот 5-бромо-4-хлоро-3-индолил глукуронид (X-gluc) при што се овозможува хистохемиска локализација на генот на клеточно ниво (Сл. 4.4). Исто така, GUS ензимот може да се локализира со примена на други супстрати во зависност од методот што се применува за негова детекција. Така на пр., супстратот *p*-нитрофенил β -D-глукуронид

се користи за спектрофотометриска детекција, додека пак, супстратот 4-метилумбелиферил глукуронид (MUG) се применива при флуориметриска детекција на ензимот. Ензимот е стабилен во клетките и може да се акумулира во висока концентрација без да предизвика токсичност кај растителните клетки. Главен недостаток на овој маркер ген е деструктивноста на клетките со цел да се изврши негова детекција. Важно е да се напомене дека GUS репортер е еден од најзначајните генски системи за проучување на механизмите на регулација на генските елементи кај растенијата. При детекција на овој маркер ген кај растенијата постои многу низок степен на интерференција во споредба со другите организми. Познато е дека во нормални услови растенијата не формираат сина боја при експозиција на супстратот X-gluc. Овој маркер ген се користи за проучување на голем број регулаторни елементи кои се клонираат во растителниот геном (Сл. 4.1), како и при експериментите познати како промотор-обележување (Сл. 4.5). Исто така, GUS репортер системот формира стабилна транслациска фузија со протеините. Така на пр, GUS генот се фузионира со *nptII* генот со цел да се добие бифункционален протеин кој може да се користи како селективен и репортер маркер (Сл. 4.8).



Слика 4.8 Фузија на репортер и селективен маркер ген за добивање на бифункционален ген. (A) Фузионираниот GUS:NPTII систем кај растенијата овозможува инкорпорација на *nptII* ген за резистентност кон канамицин и GUS репортер ген. (B) Селекција на трансгени изданоци од тутун. (C) Трансгени изданоци со регенерирани корени на хранлив медиум со канамицин. (D) Трансгени изртени семиња по две генерации кои покажуваат задржување на активноста на GUS генот при хистохемиско боене со X-Gluc.

4.4.2 Луцифераза

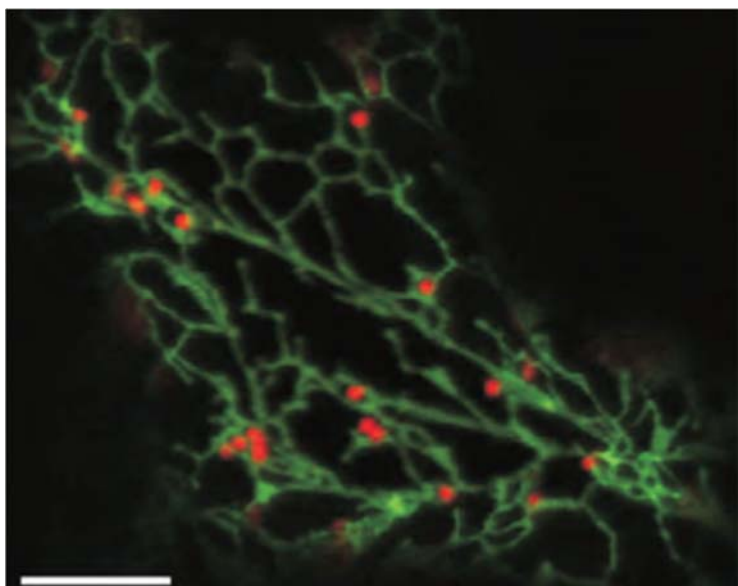
Ензимот луцифераза од инсектот светулка (*Photinus pyralis*) е еден од првите успешно користени репортер системи кај растенијата (Ow и сор., 1986). За разлика од GUS кој врши обојување на трансгените клетки со сина боја, луциферазата продуцира светлина во форма на биолуминисценција (Сл. 4.9). Ензимот луцифераза претставува кондиционален неселективен маркер систем бидејќи катализира АТР-зависна оксидативна декарбоксилација на супстратот луциферин. Предноста на овој маркер систем е сензитивноста и недеструктивната техника која овозможува следење на генската експресија во реално време. Исто така, протеинот луцифераза има пократок полуживот во растителните клетки во споредба со GUS, при што се овозможува прецизно одредување на транскрипциската активност. Често пати, луциферазата се користи како внатрешна контрола кај експериментите кои опфаќаат примена на повеќе репортер системи.



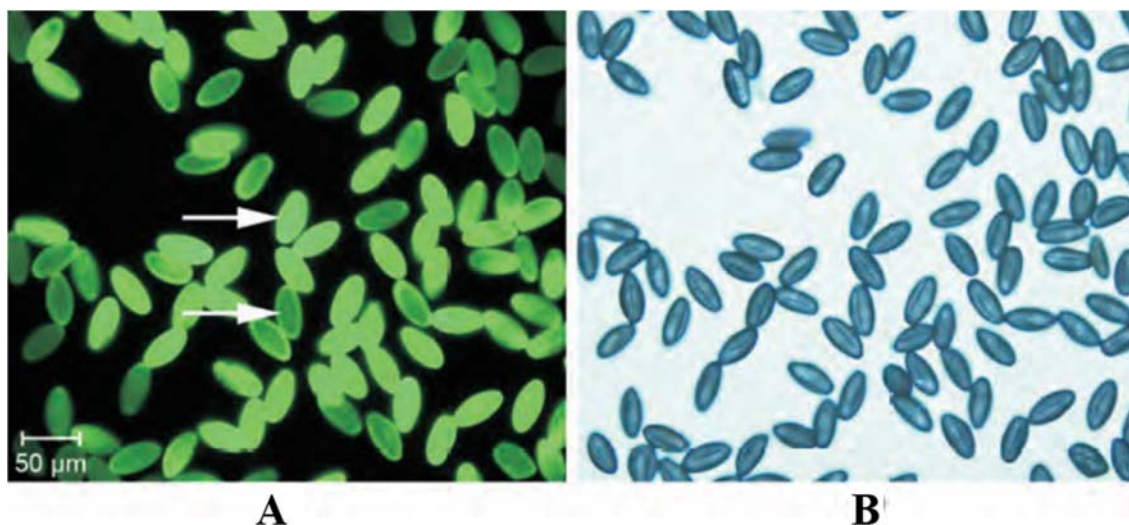
Слика 4.9 Детекција на биолуминисценција кај трансгени растенија од тутун со ген од светулка за луцифераза кој е под контрола на 35S промотор. Растенијата се наводнуваат со луциферин како супстрат за луцифераза (Ow и сор., 1986).

4.4.3 Зелен флуоресцентен протеин

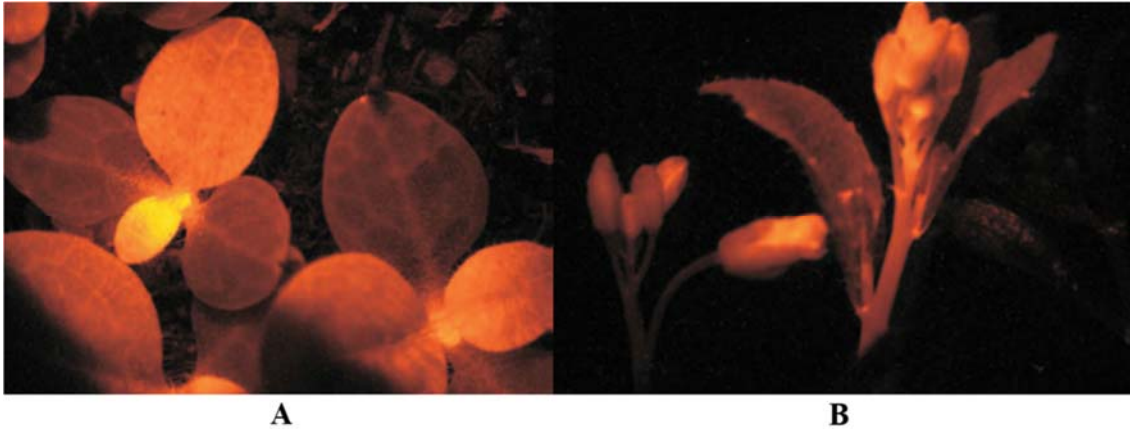
Зелениот флуоресцентен протеин (GFP) од медузата *Aequorea victoria* е особено важен репортер генски систем кај растенијата (Stewart, 2001). Овој репортер систем претставува некондиционален неселективен маркер ген, бидејќи за негова детекција не е потребно користење на надворешен супстрат. Предноста кај GFP и другите флуоресцентни протеини е високиот степен на сензитивност на субклеточно ниво со користење на конфокална ласер-скенирачка микроскопија со детекција во реално време во живите клетки (Сл. 4.10). Денес се користат различни флуоресцентни протеини кои овозможуваат истовремено следење на голем број комплексни процеси во живите клетки (Stewart, 2006). Така на пр., флуоресцентните протеини можат да се фузионираат со различни растителни протеини и функционираат како маркери за следење на нивниот интраклеточен транспорт и интеракции (Сл. 4.10). Примената на GFP овозможува брза и лесна детекција на трансгените растенија или одредени делови од растенијата како што се клетките на Polenot (Сл. 4.11). При култивирање на растителни клетки и ткива во *in vitro* услови, GFP се користи во комбинација со селективни маркер гени со цел да се зголеми продукцијата на трансгени растенија кај видови каде што не се развиени ефикасни системи на трансформација и селекција. Денес се развиени и други флуоресцентни протеини со различна боја (Stewart, 2006). Особено значење имаат флуоресцентните протеини кои емитураат светлина во портокаловиот и црвениот спектар (Сл. 4.12), бидејќи кај повеќето растенија не е застапена природната автофлуоресценција во овој дел од спектарот.



Слика 4.10 Конфокална ласер-скенирачка микроскопија на мезофилни клетки кај растенија од тутун која прикажува експресија на пептиди фузионирани за зелен флуоресцентен протеин (зелна боја) и жолт флуоресцентен протеин (црвена боја). Зелениот флуоресцентен протеин е фузиониран за HDEL тетрапептид за да се прикаже кортикалната мрежа на ендоплазматскиот ретикулум во клетките на листот. Локализацијата на Golgi-евиот систем во близина на мрежата од ендоплазматскиот ретикулум е потврдена со примена на жолт флуоресцентен протеин кој е фузиониран за гликолизацискиот ензим ST-YFP од Golgi-евиот систем (Brandizzi и соп., 2004).



Слика 4.11 Зелениот флуоресцентен протеин (GFP) се користи за детекција на трансгени делови од растенијата, како што се поленовите клетки со користење на GFP ген под контрола на полен-специфичен промотор (LAT59) од домот: (A) Микроскопијата под сина светлина прикажува флуоресценција на GFP кај поленови клетки (стрелки). (B) Микроскопија под бела светлина.



Слика 4.12 Гените за нови флуоресцентни протеини се кодирани од корални организми, а потоа се експресирани кај растенија од тутун (A) и *Arabidopsis* (B).

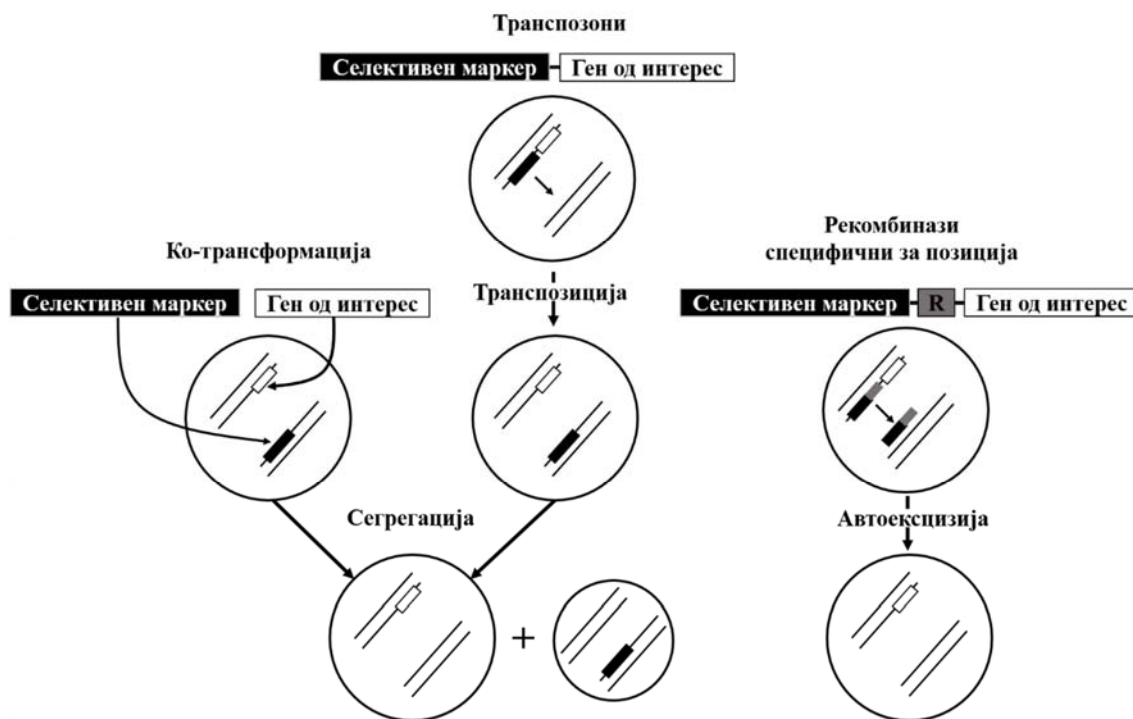
4.5 Стратегии за ослободување од маркер гени

Селективните маркер гени не треба да се одржуваат во трансгените растенија бидејќи нивната улога е значајна само во текот на процедурата за добивање на трансформиран растителен материјал. Елиминацијата или отстранувањето на селективните маркер гени има големо значење при воспоставување на нови експерименти на трансформација кај трансгените растенија. Ако селективниот маркер влијае врз безбедноста по здравјето или животната средина, тогаш е неопходно да се развие метод за негово отстранување од растението пред комерцијализација на трансгените растенија. Особено е важно да се отстранат селективните маркер гени кои интерферираат врз процесите на раст и диференцијација на растителните клетки.

Наједноставен метод за добивање на растенија ослободени од маркер гени е ко-трансформација на генот од интерес со маркер генот (Ebinuma и сор., 2001) преку сегрегација на неповрзаните гени во одвоени линии кај потомството (Сл. 4.13). Оваа технологија може да се применува само кај трансгени растенија кои се размножуваат преку семе (полово размножување). Методот на ко-трансформација не се користи за елиминација на селективните маркер гени кај растенијата кои се размножуваат на вегетативен начин. Ко-трансформацијата може да се постигне на неколку начини. Така на пр., два гена можат да се интродуцираат во два различни плазмиди. Ако се користи *Agrobacterium*-посредуваната трансформација, ко-трансформацијата може да се постигне преку инфекција на ткивата со одвоени плазмиди од различни соеви на *Agrobacterium* или преку одвоени плазмиди од еден бактериски сој. Исто така, ко-трансформацијата може да се постигне со користење на еден сој на *Agrobacterium* кој носи единечен плазмид со два одвоени T-DNA региони. Фреквенцијата на ко-трансформација може да биде многу висока (>50%), при што се овозможува селекција на трансгениот материјал кој го носи селективниот маркер и генот од интерес. Високата фреквенција на сегрегација на трансгените линии кои го носат генот од интерес од линиите кои го поседуваат селективниот маркер ген може да има практична примена кај растителните видови кои ефикасно се трансформираат со *Agrobacterium*.

Исто така, транспозоните можат да се користат за транслокација на гените во рамки на растителниот геном со цел да се прекине поврзаноста помеѓу селективниот маркер ген и генот од интерес (Сл. 4.13). Постои стратегија со користење на некондиционален позитивен селективен маркер ген (*ipt*) во комбинација со Ас елемент кој кодира транспозаза за отстранување *ipt* генот. При овој процес на мултиавтотрансформација

(MAT), *ipt* генот има позитивно дејство врз индукцијата и пролиферацијата на абнормални изданоци. Овие изданоци не можат да се развијат во регенерирани изданоци со формирани корени поради прекумерната продукција на цитокинини. Сепак, по неколку недели можат да се развијат нормални изданоци во ниска фреквенција како резултат на транспозиција на *ipt* генот во оддалечен локус кој може да се одвои во соматските клетки (Ebinuma и сор., 2001).



Слика 4.13 Методи за добивање на трансгени растенија ослободени од селективни маркери. Ко-трансформацијата зависи од интеграцијата на селективен маркер ген и ген од интерес на одвоени хромозомски места кои можат да сегрегират во следната половина генерација. Овој процес може да се постигне и преку интродукција на селективен маркер и ген од интерес на ист вектор и нивна инсерција во исто хромозомско место, а со натамошна транспозиција на маркер генот на одвоен генски локус се врши негова сегрегација од генот од интерес. Денес се користат рекомбинази за ексцизија (R) под контрола на индуцибилни промотори кои вршат сопствена автоексцизија во комбинација со селективниот маркер ген. Овој процес може да има широка примена бидејќи не се користи фазата на сегрегација на гените.

Од неодамна се истражуваат рекомбиназите специфични за позиција како ефикасна стратегија за отстранување на маркер гените од инсерциското место. Рекомбиназите и нивните целни места вклучуваат Cre/lox од бактериофагот P1, FLP/FRT од квасецот *Saccharomyces cerevisiae* и R/RS од квасецот *Zygosaccharomyces rouxii* (Ebinuma и сор., 2001). Овие целни секвенци се поставуваат околу целните гени за ексцизија, што е проследено со интродукција на рекомбиназа во втор циклус на трансформација (Dale и Ow, 1991). Сепак, овој пристап подлежи на голем број критики поради неговата слаба ефикасност во одвојување на генот за рекомбиназа од генот од интерес, како и ограничената примена само кај растенијата кои се размножуваат преку семе. Овие

недостатоци можат парцијално да се надминат со интродукција на генот за рекомбиназа преку нестабилна експресија. Притоа, генот за рекомбиназа не се интегрира во геномот и ексцизијата се јавува со ниска фреквенција. Според друг пристап, генот од интерес се инкорпорира во еден вектор заедно со селективните маркер гени и генот за рекомбиназа (Сл. 4.13). Оваа стратегија ги надминува сите претходни ограничувања преку користење на индуцибилен промотор кој експресира рекомбиназа, при што настанува истовремена автоексцизија на генот за рекомбиназа и селективните маркер гени (Ebinuma и сор., 2001). Овој пристап има големо значење во минимизирање на периодот на експозиција на растенијата кон дејството на рекомбинази. Во тој контекст, пролонгираното експонирање на рекомбинази може да предизвика непредвидливи делеции во растителниот геномот поради дејството на рекомбиназите врз криптичните целни места. Сепак, овие рекомбиназа-посредувани делеции се потврдени само кај пластидниот геном, а воопшто не постојат податоци за одвивање на овие процеси во јадрениот геном. Во наредниот период се очекува значаен напредок на системите на ексцизија и генските регулаторни елементи и широка примена на оваа технологија во рутинската пракса за добивање на трансгени растенија ослободени од селективни маркер гени.

5. АНАЛИЗА НА ТРАНСГЕНИ РАСТЕНИЈА

При експериментите за добивање на трансгени растенија со примена на *Agrobacterium*-посредувана трансформација или бомбардирање со партикули неопходно е да се спроведат неколку тестови или анализи за да се потврди генетската трансформација. Генетската трансформација на растенијата може да се карактеризира со голем број **трансгени настани**. Од овие трансгени настани треба да се селектира најмалку еден настан со единечна инсерција на трансген и висок степен на генска експресија. Уникатната интродукција на трансгениот конструкт во растителниот геном се дефинира како трансген настан. Според тоа, секој трансген настан е независен од останатите трансгени настани. Затоа е неопходно да се изврши идентификација на независните трансгени настани од нетрансформирани растенија, како и да се валидира секој воспоставен трансген настан. Валидацијата на трансгените настани може да се постигне со примена на различни физички, фенотипски и генетски анализи (Birch, 1997; Potrykus, 1991).

5.1 Директни методи

Голем број критериуми треба да се исполнат пред да се потврди генетската трансформација кај растенијата. Најдобар начин за потврдување на генетската трансформација е примената на молекуларни анализи. Молекуларните анализи опфаќаат карактеризација на сегменти од DNA, RNA и протеини во организмите. Во 1975 година, Edwin Southern од Универзитетот во Оксфорд опишал начин за трансфер на DNA на мембрана, а потоа нејзина хибридизација со хомологна DNA од интерес (проба). Според тоа, DNA гел блотинг техниката е позната како **Southern блотинг анализа** (Southern, 1975). Southern блотинг анализата се применува за потврдување на физичката интеграција на трансгенот во јадрениот геном, како и за одредување на бројот на инсерции (број на копии) на трансгенот. Исто така, примената на овој метод покажува дали целиот ген е интегриран во растителниот геном, бидејќи скратената или реаранжираната копија на трансгенот не покажува функционални карактеристики. По извршената потврда за стабилна интеграција на трансгенот во геномот, следниот чекор е потврдување на транскрипција на трансгенот и продукција на специфичен mRNA молекул. Постојат неколку методи за детекција на mRNA транскрипти кај трансгените растенија. Анализата со RNA гел блотинг позната како **Northern блотинг** претставува конвенционален метод. Друг метод за детекција и квантификација на mRNA транскрипти е **real-time реверзна транскриптаза RT-PCR**. **Имуноблотинг анализата** позната како **протеински блотинг** или **Western блотинг** се користи за идентификација на трансгени протеини со антитела кои се прикажуваат како електрофоретски ленти (бандови) со различни големини кои можат семиквантитативно да се одредат според нивните интензитети. Алтернативен начин за потврдување на продукцијата на трансген протеин е примената на **ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)** методот, кој опфаќа анализа на протеинска мешавина преку користење на специфично антитело.

Фенотипските податоци се само парцијални докази за потенцијалниот трансфер на трансгенот и не се користат како валиден доказ за успешно добивање на трансген настан. Исто така, генската експресија може да настане поради стабилна интеграција, како и нестабилна експресија на трансгенот (Wenck и сор., 2003). За едногодишни растителни видови кои се карактеризираат со полово размножување, сегрегацијата на трансгенот во T₂ генерацијата може да претставува дополнителен доказ за Менделовото наследување (Birch, 1997). Оригиналото добиено трансгено растение се нарекува T₀ генерација.

5.2 Иницијален скрининг на потенцијални трансгени растенија

Иницијалниот скрининг за идентификација на потенцијални трансгени растенија треба да биде едноставен, брз, ефикасен и економичен метод. Скринингот овозможува минимизирање на лажно позитивните резултати со цел да се намали бројот на примероци кои се анализираат со долготрајни и сложени молекуларни методи. При иницијалниот скрининг, потенцијалните трансформанти се идентификуваат со примена на селективни агенси, како и со PCR или ELISA методи. Селективните и репортер маркер гените имаат голема примена во иницијалниот скрининг на трансгените растенија. Сепак, овие скрининг тестови не се објавуваат во научната литература без да се применат детални молекуларни анализи и фенотипски податоци.

5.2.1 Скрининг на селективен медиум

Регенерираните трансформирани растенија се познати како T_0 растенија и секогаш се означуваат како хемизиготни растенија. Тоа значи дека постои копија на трансгенот во нов локус од растителниот геном, бидејќи трансгенот се интегрира само во едниот хромозом, а не во истиот локус од хомологниот хромозом. Овие T_0 растенија продуцираат T_1 семиња кои се развиваат во T_1 растенија. Добиените T_1 растенија го носат трансгенот во хемизиготна, хомозиготна позитивна или хомозиготна негативна состојба според очекуваниот Менделов однос од 2:1:1 ако постои инсерција на единечна копија на трансгенот.

Скринингот на трансгени семиња може да се изврши со асептично инокулирање на семињата на цврст медиум со селективни агенси, како што се канамицин, хигромицин или фосфотрицин со цел да се идентификуваат растенијата кои го преживуваат селективниот агенс (Weigel и Glazebrook, 2002). Преживеаните растенија се пренесуваат во садови со почва за натамошен развојот и потоа се користат за колектирање на примероци и семиња. Иницијално, неопходно е да се одреди минималната летална доза на селективниот агенс кој убива 100% (LD_{100}) од нетрансформирани растенија, а воедно овозможува преживување на трансформирани растенија. Нетрансформирани растенија се карактеризираат со хлоротични или побелени листови или немаат способност за развојот на корени (Сл. 5.1). За компаративни цели, нетрансформирани примероци треба да се инокулираат на медиум без селективен агенс. Кај некои растителни видови, оптималните концентрации на селективниот агенс се разликуваат кај одредени сорти.



Слика 5.1 Компарација на трансформирани (лево) и нетрансформирани (десно) изртени растенија од *Arabidopsis* култивирани на MS хранлив медиум во присуство на $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ канамицин како селективен антибиотик. Изртените трансформирани растенија покажуваат хлороза и немаат способност за развојот на корени (Harrison и сор., 2006).

Ако едно индивидуално T₀ трансгено растение е само-опрашувачко и се добијат T₁ семиња, тогаш T₀ растението има присутен трансген во хемизиготна состојба. Овие T₁ семиња и растенија ќе сегрегираат според 3:1 фенотипски однос за трансгенот ако постои единечна инсерција на трансгенот. Трансгените настани со единечна инсерција имаат големо значење, бидејќи Менделовото наследување се одвива на едноставен начин и моделите на експресија се предвидливи во споредба со повеќекратните инсерции на трансгенот. Според тоа, ако 100 T₁ семиња кои сегрегираат за единечна инсерција на трансгенот се инокулираат на хранлив медиум кој содржи селективен агенс, тогаш се добива 3:1 фенотипска сегрегација. Тоа значи дека околу 75 од изртените растенија ќе изгледаат како на левата страна од Сл. 5.1, додека пак, околу 25 од нетрансгените сегреганти ќе изгледаат како од десната страна на Сл. 5.1. При овие пресметки се користи зборот „околу“, бидејќи веројатноста за реалниот број може да варира. Поради оваа варијација треба да се користат голем број на репликати и статистички тестови.

5.2.2 Полимеразна верижна реакција (PCR)

Полимеразна верижна реакција (PCR) е високо сензитивен метод кој се користи за скрининг на генот од интерес или селективните маркери со користење на DNA екстракти. Овој метод опфаќа амплификација на DNA секвенца во присуство на два прајмери (преден и реверзен) кои се комплементарни на 5' и 3' краевите на DNA секвенцата, како и Taq DNA полимеразата од термофилната бактерија *Thermus aquaticus*. Со примена на повторувачки циклуси на зголемување и намалување на температурата настанува амплификација на DNA секвенцата од интерес помеѓу двата прајмера (Reese, 2004). Добиените резултати од PCR не се сметаат за веродостојни ако не се користат соодветни позитивни и негативни контроли.

Скринингот со PCR на потенцијалните трансформанти добиени со *Agrobacterium*-посредувана трансформација треба внимателно да се спроведе, бидејќи агробактериите кои го носат плазмидот можат да претставуваат извор на неинтегрирана DNA во растителниот геном и да се добијат лажно позитивни резултати. Во тој контекст, PCR анализата не треба да се изведува кај млади растенија кои се регенерирани директно по инфекцијата со *Agrobacterium* без претходно да се примени третман со соодветен антибиотик, бидејќи агробактериите можат да останат живи во растителното ткиво. Регенерираните растенија или изртените семиња можат да се третираат со специфични антиобиотици, како на пр. карбеницилин (Cheng и сор., 1997) или цефотаксим (Broothaerts и сор., 2005) за да се елиминира контаминацијата со *Agrobacterium*. Овие антиобиотици ефикасно ги убиваат клетките на *Agrobacterium*, а воедно не покажуваат токсичност кај растителните ткива. Формираните семиња кај T₀ растенијата кои се трансформирани со потопување на цветови во суспензија од *Agrobacterium* треба да се исплакнат со разреден раствор од натриум хипохлорит (NaOCl) пред да се инокулираат на хранлив медиум за натамошен развиток (Weigel и Glazebrook, 2002). Важно е да се напомене дека T₁ растенијата имаат пониска веројатност за контаминација со *Agrobacterium* во споредба со оригиналните трансформирани родителски растенија. Затоа, добиените PCR податоци од DNA екстрактите на растенијата од потомството се поверодостојни во споредба со родителските трансформирани растенија. Исто така, PCR реакциите можат лесно да се контаминираат со помош на аеросол DNA (Scherzinger и сор., 1999) и затоа се препорачува PCR скринингот да се одвива во асептичен простор или кабинет кој е изолиран од просторијата каде што се врши екстракција на DNA од растителниот материјал.

5.2.3 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) методи

За некои селективни маркери се користат квалитативни или семиквантитативни ELISA методи како едноставни, сензитивни и ефикасни скрининг тестови (пр. *NPTII* тест). Техниката опфаќа екстракција на растителните протеини и нивна инкубација во микроплејт плочи кои претходно се обложени со специфични антитела. Антителата имаат способност да го врзуваат трансгениот протеин (антиген) преку водородни врски (Sambrook и Russell, 2001). Овие микроплејт плочи се плакнат и инкубираат со ензимски-врзан конјугат кој предизвикува примена на боја при додавање на соодветен супстрат. Степенот на промена на бојата може да се одреди визуелно или да се квантификува со примена на спектрофотометар (Сл. 5.2). Исто така може да се користи семиквантитативен ELISA метод за пресметување на продукцијата на трансген протеин.

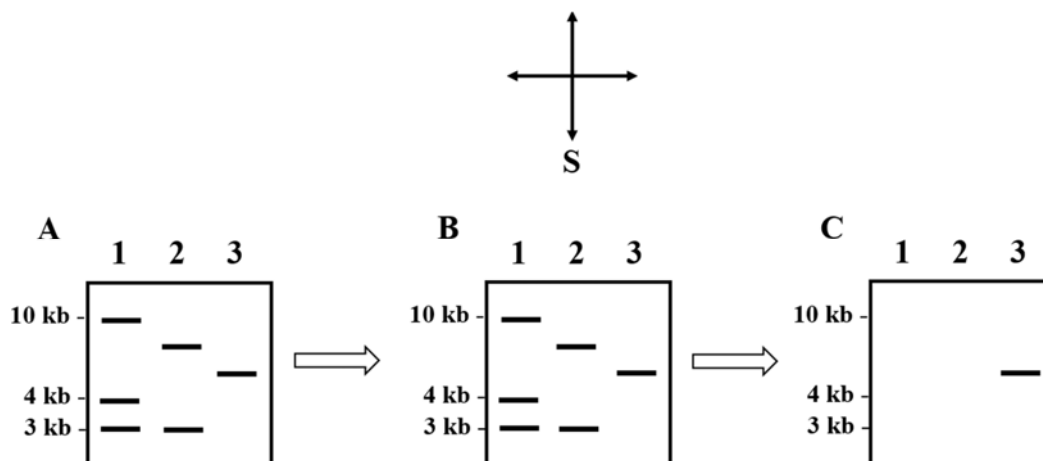


Слика 5.2 Анализа на NPTII протеин со примена на ELISA метод. Разредувањата на стандардот со NPTII протеин се прикажани во првата редица од лева страна, а примероците од растителниот материјал се прикажани во останатите редици од микроплејт плочата. Растителните примероци кои покажуваат позитивни резултати за присуство на NPTII се прикажани со жолта боја.

5.3 Крајна молекуларна карактеризација

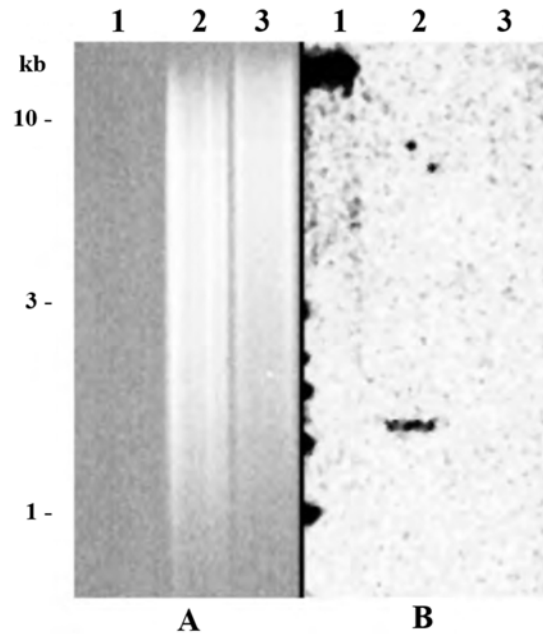
5.3.1 Интеграција на интактен трансген

Бројот на копии или бројот на инсерција на трансгенот во растителниот геном се анализира со примена на Southern блотинг анализа. Southern blot анализата е повеќекратен процес кој се одвива во неколку дена. Овој метод опфаќа изолација на одредено количество на геномска DNA од растението, дигестија на DNA со користење на соодветно избрани рестриксиски ензими и електрофоретска гел сепарација на фрагментите според нивната големина. Потоа, фрагментираната DNA се пренесува на мембрана (blotting-впивање) и добиената имобилизирана геномска DNA се хибридизира со радиообележана или неизотопски обележана проба (Langer и сор., 1981), (Сл. 5.3).

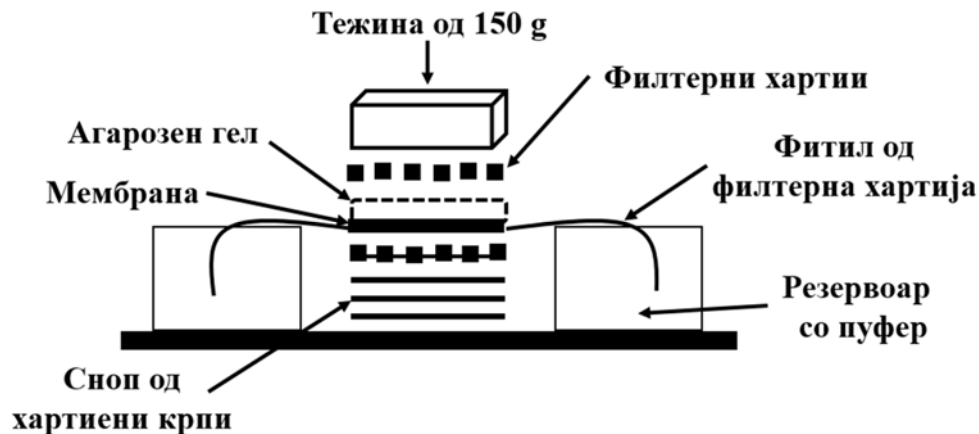


Слика 5.3 Процес на DNA блотинг анализа (Southern блотинг и хибридизација): (A) дигестираните DNA фрагменти се сепарираат според нивната големина на агарозен гел. (B) Пренесување на DNA фрагментите на мембрана (блотинг). (C) Авторадиографија на мембраната по хибридизација со радиообележана едноверижна комплементарна DNA проба.

При изведување на Southern блотинг анализата се користи високо квалитетна геномска DNA со висока молекуларна тежина (≥ 20 kb). Екстракцијата на високо молекуларна DNA е важен процес за успешно изведување на Southern блотинг анализата. Ако настане деградација или сечење на изолираната геномска DNA, добиените ленти на Southern блотинг нема да се разликуваат и ќе се забележи развлекување на хибридизираната DNA со пробата. Ако геномската DNA е непресечена, тогаш се добива високо молекуларен артефакт по хибридизацијата (Birch, 1997). По извршената дигестија на геномската DNA, добиените DNA фрагменти се сепарираат на агарозен гел (Сл. 5.4A). Негативниот полнеж на DNA поради фосфатните групи овозможува движење на DNA фрагментите кон анодата со позитивен полнеж. Агарозниот гел со сепарираните фрагменти се поставува на најлонска мембрана, а потоа се поставува одредена тежина и апсорбирачки крпи врз гелот за да се овозможи мигрирање на DNA фрагментите кон мембраната преку капиларно дејство (Sambrook и Russell, 2001). При изведување на традиционалниот Southern блотинг, мембраната се поставува на агарозниот гел и DNA фрагментите асцедентно мигрираат кон мембраната со капиларно дејство. Новиот протокол е познат како десцедентен Southern блотинг (Chomczynski, 1993) и опфаќа поставување на гелот врз мембраната, при што DNA молекулите брзо мигрираат кон мембраната како резултат на капиларните и гравитационите сили (Сл. 5.5). Притоа, DNA фрагментите од мембраната хибридизираат со пробата која е комплементарна на генот од интерес или селективниот маркер ген. При овој процес, пробата воспоставува водородни врски со хомологните секвенци на гените од интерес. Пробите вообичаено се добиваат преку рестрикциска дигестија на плазмидна DNA или PCR амплификација на генот од интерес. По извршената хибридизација, неспецифично врзаните проби се измиваат од мембраната со примена на висока температура или ниска концентрација на соли. На крај, мембраната се експонира на рендгенски филм со авторадиографија или фосфорен екран и се скенира за да се добие дигитална слика (Reese, 2004).



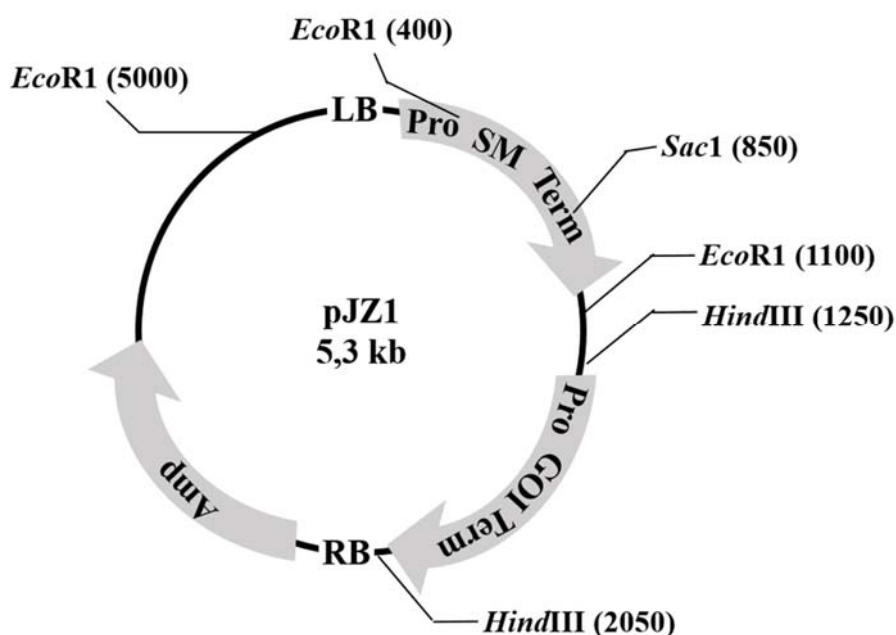
Слика 5.4 Дигестија на растителна геномска DNA која е електрофоретски сепарирана за Southern блотинг анализа (A) и слика од фосфорен екран на мембрана по хибридизација со радиообележана проба (B). Примероците се аплицирани според следниот редослед: линија 1-позитивна контрола од плазмид, линија 2-потенцијално трансгено растение, линија 3-негативна контрола од нетрансформирано растение. Геномската DNA се екстрахира и целосно дигестира, а потоа се аплицира на 0,8% агарозен гел (A). Дигестираната DNA се пренесува на мембрана, хибридизира со радиообележана проба и се експонира на фосфорен екран (B). На сликата е прикажана една лента од плазмидот (>10 kb) на линија 1 и една лента на линија 2 со големина од 1,8 kb која има комплементарна секвенца со пробата.



Слика 5.5 Десцендентен Southern блотинг апарат. Сноповите од хартиени крпи се покриваат со филтерна хартија, мембрана, агарозен гел, фитили од филтерна хартија и предмет со одредена тежина. Фрагментите на DNA мигрираат кон мембраната под дејство на капиларни и гравитациони сили.

Вообичаено се користат два различни типа на геномска дигестија за да се покаже интеграцијата на трансгенот во геномот:

1. Бројот на копии на трансгенот може да се одреди во однос на граничните секвенци на интродуцираната DNA. Така на пр., овој тип на анализа се користи кај *Agrobacterium*-посредувана трансформација на *Arabidopsis*, при која настанува трансфер на неколку T-DNA инсерции (Katavic и сор., 1994). Особено е важно да се знае колку инсерциски места се присутни. Единечните копии се од голем интерес во истражувањата поради едноставниот модел на сегрегација. Слика 5.6 прикажува плазмид кој се користи при *Agrobacterium*-посредувана трансформација. Слика 5.7 прикажува T-DNA од десната до левата гранична секвенца (RB и LB, соодветно) која се пренесува во растителниот геном преку *Agrobacterium*-посредувана трансформација. Ако геномската DNA од трансгеното растение се дигестира со рестрикцискиот ензим *EcoR*I кој сече во близина на левата T-DNA гранична секвенца каде што се наоѓа селективниот маркер ген, како и во растителниот геном, тогаш DNA-фрагментите од мембраната ќе хибридизираат со пробата за селективниот маркер ген (Сл. 5.7). Бројот на копии на трансгенот може да се одреди во однос на било која T-DNA гранична секвенца. Сепак, анализата на десната гранична секвенца има порелевантно значење за T-DNA трансферот во растителниот геном, бидејќи оваа секвенца има тенденција за поефикасен трансфер во споредба со левата гранична секвенца (Carlan и сор., 1985).



Слика 5.6 Мапа на pJZ1 плазмид на која се прикажани локациите на Pro:SM:Term (Промотор:Селективен маркер:Терминатор), Pro:GOI:Term (Промотор:Ген од интерес:Терминатор) и генот за резистентност кон ампицилин (*Amp*). Локацијата на рестрикциските места на *EcoR*I и *Sac*I се прикажани со цел да се изврши дигестија со рестрикциски ензими за Southern блотинг анализа. Регионот на T-DNA помеѓу левата гранична секвенца (LB) и десната гранична секвенца (RB) се пренесува во растителниот геном преку *Agrobacterium*-посредувана трансформација. Векторот за бомбардирање со партикули не поседува LB и RB секвенци

2. Бројот на копии на трансгенот може да се одреди со користење на ензим кој сече еднаш во интродуцираната DNA, а потоа геномскиот блотинг се анализира со секвенци од било која страна на рестрикциското место. Така на пр., *SacI* сече еднаш во интродуцираната DNA и блотингот може да се анализира со селективниот маркер ген или генот од интерес (Сл. 5.7). Овој метод се користи при методот на бомбардирање со партикули, каде што голем број на копии се интегрираат во една хромозомска локација (Taylor и Fauquet, 2002).



Слика 5.7 Интеграција на T-DNA во растителен геном. Регионот на T-DNA помеѓу левата и десната гранична секвенца се интегрира во растителниот геном. Анализата на LB опфаќа дигестија со ензимот *EcoRI* кој сече во регионот на селективниот маркер (SM) и во растителниот геном. При оваа анализа се користи проба со cDNA од селективниот маркер или PCR фрагмент. Дигестијата со ензимот *HindIII* може да се користи како дијагностички Southern блотинг за да се потврди дали регионот од промотор:кодирачки регион:терминатор на генот од интерес (GOI) е пренесен во целост и со точна големина во растителниот геном. LB-лева гранична секвенца, RB-десна гранична секвенца, Pro:SM:Term-Промотор:Селективен маркер:Терминатор, Pro:GOI:Term-Промотор:Ген од интерес:Терминатор.

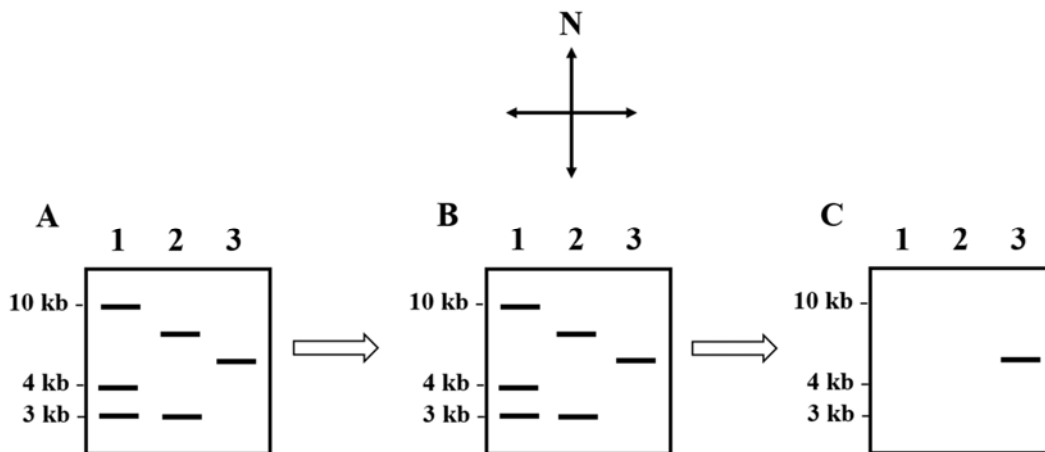
Двата начина за одредување на бројот на копии на трансгенот даваат иста информација. Ако интродуцираната DNA е интегрирана во геномот, тогаш големината на електрофоретските ленти ќе биде различна од плазмидната позитивна контрола. При овие методи се одредува само бројот на ленти кој покажува колку пати DNA е интегрирана во растителниот геном. Независните трансформанти кои се добиени со трансформација од ист плазмид треба да се прикажат на единечен блотинг заедно со DNA примероци од негативна контрола на нетрансформирани растенија и плазмидна позитивна контрола. На таков начин се намалува веројатноста за погрешно толкување на добиените податоци од единечна линија (Birch, 1997).

Real-time PCR е релативно нов и ефикасен метод за одредување на бројот на копии на трансгенот кај растенијата и најчесто се користи како дополнителен метод на Southern блотинг анализата (Bubner and Baldwin 2004). Всушност, овој метод претставува автоматизирана PCR техника која следи амплификација на DNA секвенца во реално време преку повторувачки PCR циклуси. При одвивање на Real-time PCR се користи флуоресцентна боја која се врзува за прајмерот или PCR производот и добиениот сигнал се зголемува пропорционално со добиениот PCR производ (Reese, 2004).

5.3.2 Експресија на трансген преку транскрипција

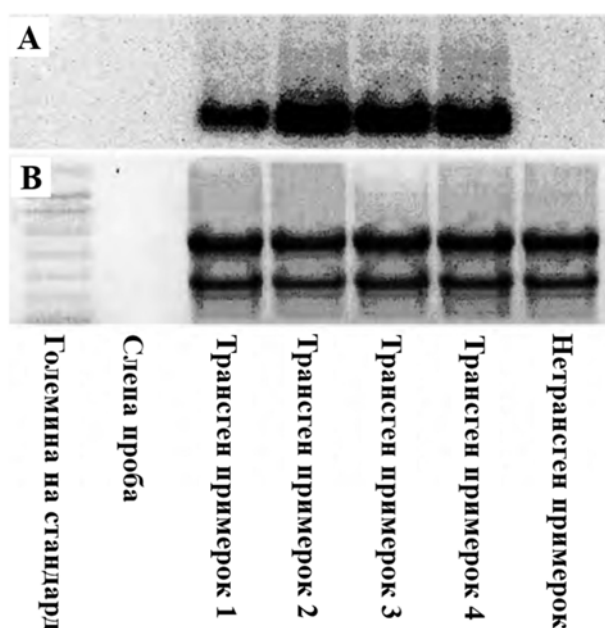
Northern блотинг анализа. RNA блотинг или Northern блотинг анализите (Thomas, 1980) се користат за хибридизација со комплементарни проби за детекција,

квантификација и одредување на големината на транскриптите, како и следење на ткивно-специфичната експресија на трансгенот на ниво на mRNA (Сл. 5.8 и 5.9). На сличен начин како и кај Southern блотингот, Northern блотинг анализата опфаќа користење на големо количество интактни нуклеински киселини. За разлика од Southern блотингот, при изведување на Northern блотинг анализата не се користи рестрикциска дигестија бидејќи индивидуалните транскрипти се фракционират по големина на природен начин. Важно е да се напомене дека RNA е значајно понестабилен молекул од DNA и може да се деградира под дејство на различни ензими, како што се RNазите. Постои голема веројатност за контаминација на примерокот со RNази, бидејќи овие убиквитарни ензими се присутни на рацете, пластичните и стаклените садови, како и во дестилираната вода. Затоа, сите раствори, стаклени садови, епрувети и типови треба да бидат ослободени од RNази за да се спречи деградација на RNA молекулите (Sambrook и Russell, 2001). При изведување на RNA блотингот, вкупната изолирана RNA или mRNA се сепарира според големината со користење на агарозна гел електрофореза. Познато е дека RNA има негативен полнеж и се однесува на ист начин како и DNA при гел електрофорезата. Кај молекулите на RNA постои тенденција за формирање на секундарни структури (формирање на структури како резултат на воспоставување на водородни врски помеѓу комплементарните бази). Затоа, во гелот или пуферот за примерокот се додаваат денатуранти (формалдехид или глиоксал) со цел да се спречи формирањето на интермолекуларните интеракции кај RNA молекулите (Sambrook и Russell, 2001). Ако се користи формалдехид, овој денатурант мора да се измие од гелот пред RNA да се пренесе на мембраната. Потоа, RNA гел блотингот опфаќа миграција на сепарираниите RNA молекули кон најлонска мембрана преку капиларно дејство. Транскриптот се детектира преку хибридизација на мембраната со комплементарна радиообележана проба (Feinberg и Vogelstein, 1984) или неизотопски обележана проба (Sambrook и Russell, 2001). Пробата може да биде едноверижна DNA или RNA (Memelink и соp., 1994; Sambrook и Russell, 2001). Пробите кои се неспецифично поврзани се измиваат од мембраната (Sambrook и Russell, 2001), а потоа, мембраната се експонира на рендгенски филм со ауторадиографија (Reese, 2004) или фосфорен екран (Johnston и соp., 1990) за да се развие дигитална слика (Сл. 5.9).



Слика 5.8 Процесот на RNA блотинг анализа (Northern блотинг и хибридизација. (A) едноверижни RNA фрагменти се сепарираат на агарозен гел според нивната големина. (B) RNA фрагментите се пренесуваат на мембрана. (C) Ауторадиографија на мембраната по хибридизација со радиообележана комплементарна едноверижна DNA или RNA проба.

Добиениот сигнал од RNA гел блотингот може да се зголеми на неколку начини. Сигналот од RNA може да биде слаб ако настане деградација на RNA за време на екстракцијата. Затоа е неопходно да се одржуваат ниски температури ($<4^{\circ}\text{C}$) при сите чекори од екстракцијата на RNA. Сензитивноста на RNA гел блотингот може да се зголеми преку збогатување на mRNA (Sambrook и Russell, 2001), при што се намалува неспецифичното врзување на пробата. Постојат *in vitro* транскрипциски китови за продукција на едноверижни RNA проби кои можат да бидат радиообележани и се карактеризираат со високо специфична активност и зголемена сензитивност. Исто така, аплицирањето на повеќе RNA молекули може да ја зголеми сензитивноста на RNA блотингот. Во повеќето случаи, проби од „домаќински ген“ (housekeeping gene) како што е генот за актин или убиквитин се користат во комбинација со генот од интерес за да се контролира диференцијалното движење на RNA молекулите.

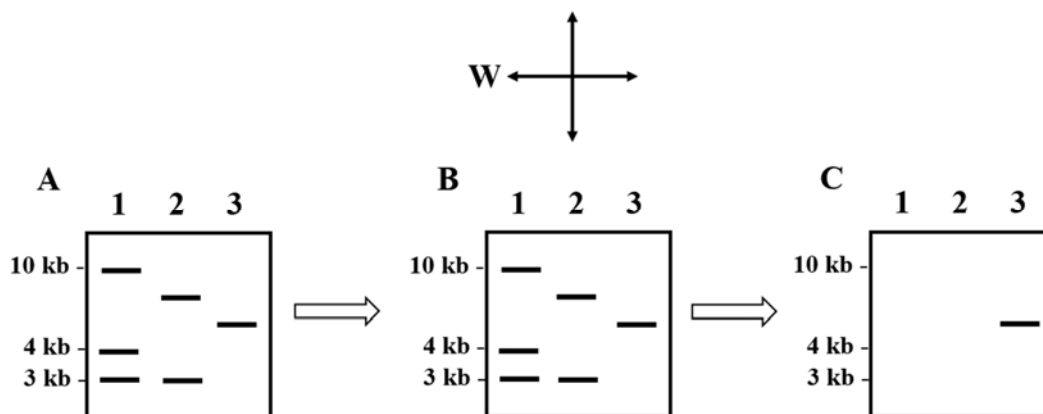


Слика 5.9 Northern блотинг. (A) Специфична cDNA од репресорен елемент за арсен се хибридира со mRNA од трансгени растенија, при што одредени настани на трансформација покажуваат висока експресија на трансгенот. (B) RNA ленти со приближно еднаква големина.

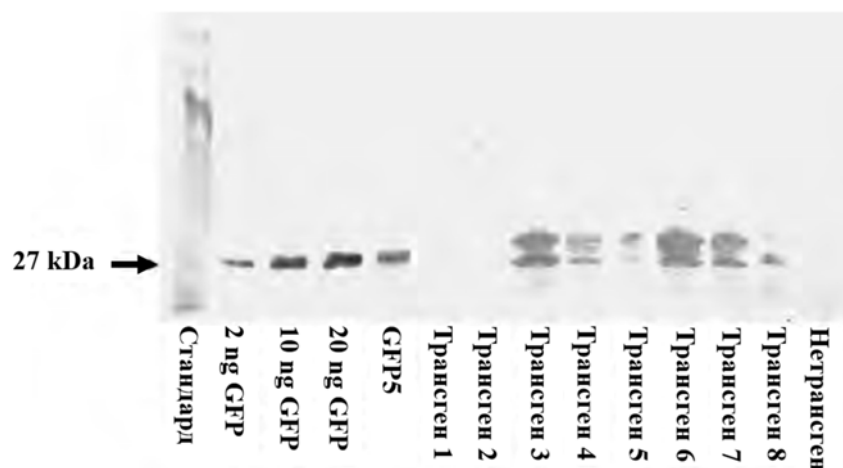
Квантитативна Real-Time реверзна транскриптаза (RT)-PCR. Генската експресија може да се следи со комбинирање на методите на квантитативен real-time PCR и реверзна транскриптаза (RT). За изведување на оваа техника се користи екстрахирана RNA или mRNA со комплементарен прајмер, 2'-деоксинуклеозид 5'-трифосфати (dNTP) и реверзна транскриптаза за да се добие едноверижна комплементарна DNA означена како cDNA (Reese, 2004). Оваа cDNA се реплицира со примена на нормален PCR и користење на Taq DNA полимераза. Повторувачките циклуси на квантитативниот real-time PCR овозможува амплификација на секевенцата од интерес, додека пак, флуоресцентната боја ја следи акумулацијата на PCR производот (Reese, 2004). Овој метод се карактеризира со висока сензитивност и ефикасност без да се применува гел електрофореза и фракционирање.

5.3.3 Експресија на трансген преку транслација: Western блотинг анализи

Протеинскиот гел блотинг или Western блотинг анализите се користат за семиквантитативно одредување на продукција на специфичен рекомбинантен протеин во трансгеното растение. Всушност, овие анализи покажуваат дека интродуцираниот и транскрибируваниот трансген успешно се транслатира во интактен протеин. Протоколот за Western блотинг (Burnette, 1981) опфаќа екстракција и фракционирација на вкупните протеини на полиакриламиден гел, кој потоа се пренесува на мембрана и се детектира со користење на примарни и секундарни антитела (Сл. 5.10 и 5.11).



Слика 5.10 Процес на Western блотинг анализа. (А) Полипептидите се сепарираат на полиакриламид-SDS гел според нивната големина. (В) Полипептидите се пренесуваат на мембрана од поливинилиден флуорид. (С) Мембраната се инкубира со антитело специфично за трансгениот протеин. Ова антитело се детектира со секундарно антитело врзано за ензимски конјугат, при што се предизвикуваат промени во бојата или хемилуминисценцијата.



Слика 5.11 Примена на Western блотинг за детекција на GFP кај трансгени растенија со користење на специфично поликлонално антитело. Семиквантитативната анализа опфаќа апликација на пурифициран GFP во различни концентрации (2-20 ng). На протеинскиот блотинг е прикажана варијанта на GFP протеинот означена како GFP5. На следните линии се прикажани индивидуални примероци од трансгени растенија со претходно присутна GFP4 варијанта.

За сепарација на протеините врз база на нивната големина најчесто се користат натриум додецил сулфат полиакриламидни (SDS-PAGE) гелови (Laemmli, 1970). Кај овие гелови се додаваат дисулфидни редуцирачки агенси (β -меркаптоетанол или дитиотреитол) за да се изврши денатурација на протеините до полипептиди. Притоа, SDS ги снабдува полипептидите со негативен полнеж со цел да се овозможи нивно движење кон анодата (Memelink и сор., 1994). Протеините се пренесуваат на мембрана од поливинилиден флуорид (PVDF) преку техника на електроблотинг. Потоа, мембраната се инкубира со антитело специфично за трансгениот протеин, при што се воспоставуваат водородни врски помеѓу трансгениот протеин и антителот (Sambrook и Russell, 2001). Антителото се детектира со помош на секундарно антитело врзано за ензимски конјугат, при што настануваат промени во бојата или хемилуминисценција која може да се детектира на филм (Сл. 5.11). Семиквантитативното одредување на трансгениот протеин може да се изврши од протеинските ленти или со користење на стандард од соодветен протеин.

5.4 Дигитално фотографирање

Пред 1990-тите години, во молекуларната биологија се користеле едноставни недигитални фотографии за документирање на податоците од геловите и блотинг анализите. Денес се применува дигиталното фотографирање. Повеќето научни списанија имаат одредени правила во однос на софтверските прилагодувања кои се прифатливи за дигиталните слики на нуклеински киселини и протеински блотови со цел да се елиминираат погрешни интерпретации во научните истражувања. Прилагодувањата на светлината или контрастот не треба да се прават на одредени делови од гелот, туку само на целиот гел за да не се променат оригиналните податоци добиени од молекуларните техники.

5.5 Фенотипски анализи

По извршениот скрининг и молекуларната карактеризација, трансгените растенија се одгледуваат за натамошна анализа на нивниот фенотип која опфаќа компарација со нетрансформираните растенија. Познато е дека фенотипот на растенијата кој е одреден од нивниот генетски состав се наоѓа под влијание на животната средина. Исто така, неопходно е да се систематизираат сите изменети особини кај трансгените растенија во однос на селективните маркери (пр. резистентност кон хербициди или антибиотици). Трансгените растенија кои експресираат нов ген од интерес можат да имаат значајни промени во фенотипот (ртење на семе, начин на раст, време потребно за цветање или матурација, боја на семиња, резистентност кон заболувања) во однос на нетрансформираните растенија.

6. РЕГУЛАТИВИ И БИОБЕЗБЕДНОСТ НА ТРАНСГЕНИ РАСТЕНИЈА

Хуманата популација започнала со земјоделско производство на храна пред околу 10 000 години. Главен предизвик во тоа време било да се произведе доволно количество на храна. Денес, земјоделството сè уште се соочува со различни проблеми за снабдување на храна, како и одржување на безбедноста на храната. Познато е дека хуманата популација на планетата Земја изнесува околу 7 билиони, а земјоделството може да обезбеди храна за популација од 3-4 билиони. Постојаниот развиток на земјоделското производство во насока на задоволување на потребите за храна значајно влијае врз уништување на природните ресурси. Исто така, јавната свест за безбедноста на храната започнува да се зголемува како резултат на интензивното преминување од традиционалното земјоделство кон технолошките производствени процеси.

Во минатото постоело изобилство од здрава храна за консумација и луѓето покажувале многу мал интерес за безбедното производство на храна. Сепак, заедниците секогаш страдале од локални, регионални или светски гладувања за храна и овие недостатоци постојат и денес. Развивокот на нови технологии во земјоделството за производство на храна започнале да се разгледуваат како небезбедни и потенцијално опасни практики.

Транзицијата на традиционалните практики за продукција на храна кон модерните технологии во земјоделството во минатиот век била придружена со масовен егзодус на фармерите во урбаните центри. Денес, многу мал број луѓе од урбаните и богатите заедници се запознаени со начинот на производство на храна од страна на фармерите во руралните средини. Оваа игнорантност на богатите и развиени заедници е главна причина за напуштање на традиционалното култивирање на растенијата и примена на современи технологии за производството на храна.

Во последните 100 години, голем број современи технологии биле интродуцирани во земјоделството и системите за продукција на храна. Технологиите кои опфаќаат механизација, агрономија и генетска модификација преку селекција на растенијата имале значајно влијание врз зголемување на квалитетот и квантитетот на продуцираната храна. Исто така, технолошките развојни процеси во насока на чување, обработка и транспорт на храната овозможиле лесен пристап на хуманата заедница до здрава храна. Сепак, сите нови технологии кои се имплементирани во земјоделството претставуваат потенцијален ризик за здравјето на луѓето и животната средина и неопходно е нивно систематско идентификување, анализирање и соодветно менаџирање.

Во текот на XX-иот век започнале да се развиваат владини регулативи за да се овозможи безбедна имплементација на речиси сите технологии и иновации во земјоделството. Во 1970-тите и 1980-тите години започнува да се зголемува јавната свест за безбедноста на системите за продукција на храна и ефикасноста на регулативите кои ги опфаќаат овие системи. Јавната свест за производство на здрава храна уште повеќе започнала да се зголемува поради прекумерната употреба на хемиски ѓубрива и пестициди, како и интензивирање на модернизираниот земјоделство за сметка на традиционалните земјоделски практики. Потребата за законско регулирање на методите на растително производство произлегува од иновациите во рекомбинатна DNA технологија која уште се нарекува генетски инженеринг или генетска модификација за да се добијат генетски модифицирани растенија. Како резултат на развитокот на рекомбинатната DNA технологија, владите ширум светот воспоставиле регулаторни механизми за контрола на генетскиот инженеринг во земјоделското производство на храна со цел да се заштити јавноста и животната средина од потенцијалните ризици на генетскиот инженеринг.

6.1 Историски преглед на регулацијата на генетскиот инженеринг

Генетскиот инженеринг или рекомбинантната DNA технологија не е нова технологија. Првата успешна DNA рекомбинација или хибридизација помеѓу два различни DNA молекули за прв пат е објавена во 1973 година (Cohen и сор., 1973). На почетокот, научната заедница ја класифицирала оваа нова технологија како извор на потенцијални ризици (Berg и сор., 1974). По тој повод, група на водечки научници во 1975 година организирале конференција во Калифорнија на која биле воспоставени серија на директиви и упатства за испитување на ризиците и опасностите од рекомбинантната DNA технологија. Следната година, Националните институти за здравство (National Institutes of Health-NIH) во САД ги официјализирале и воспоставиле строгите правила за регулација на истражувачките активности на рекомбинантната DNA технологија. Исто така, овие регулативи биле официјално прифатени од страна на голем број агенции, како Агенција за заштита на животна средина (Environmental Protection Agency-EPA), Агенција за контрола на храна и лекови (Food and Drug Administration-FDA) и Министерство за земјоделство на САД (US Department of Agriculture-USDA). Подоцна, сите овие прелиминирани регулативи станале задолжителна пракса кај речиси сите истражувања за рекомбинантната DNA технологија во САД и на меѓународно ниво.

Рекомбинантната DNA технологија била препознаена од владините системи како автентичен биотехнолошки метод кој ќе започне да се користи не само во научно-истражувачката заедница, туку и во приватните компании кои ќе нудат производи на пазарот и нивно ослободување во животната средина. Како резултат на тоа, владините организации започнале да се подготвуваат за потенцијалните ризици од примената на рекомбинантната DNA технологија. Организацијата за економска соработка и развој (Organization for Economic Cooperation and Development-OECD) го објавила првиот официјален документ каде што е наведена стандардизираната дефиниција на биотехнологијата. Според оваа организација, биотехнологијата опфаќа примена на научни и инженерски принципи за обработка на материјали со помош на биолошки агенсии за да се обезбедат производи и услуги (OECD, 1982). Иако биотехнологијата опфаќа широки рамки за користење на сите биолошки системи вклучувајќи ги производите од конвенционалните системи за продукција на храна, оваа дефиниција сè уште се користи и претставува основа за воспоставување на регулативите во многу земји. Исто така, во извештајот на OECD била потенцирана потребата за регулација на биотехнолошките производи, кои можат да предизвикаат одредени ризици.

Во средината на 1980-тите години биле добиени првите живи организми со рекомбинантната DNA технологија кои биле означени како трансгени организми или генетски модифицирани организми. Овие трансгени организми привлекувале огромен интерес во јавноста поради потенцијалниот ризик за безбедноста на храната и заканата и опасностите за животната средина. Во 1986 година, Американскиот завод за политика на наука и технологија (US Office of Science and Technology Policy-OSTP) составиле Координативна рамка за регулација на биотехнологијата. Овој документ ги координирал постоечките регулаторни организации со релевантните студии кои произлегуваат од научната заедница. Исто така, овој документ препорачува да се прифатат постоечките легислативи за производите од биотехнологијата, како и да се користат постоечките регулаторни експертизи од релевантни организации и агенции (USDA, FDA и EPA). Според тоа, генетски модифицираните растенија се регулираат во однос на безбедноста на храната преку соодветна експертиза од FDA, испитувањето на пестицидните својства се под надлежност на EPA, додека пак, потенцијалот за ризик во животната средина е

под контрола на USDA. Оваа координирана распределба на одговорностите за регулација на генетски модифицираните растенија продолжува и денес во САД.

Во тој период, OECD објавила студија за биобезбедноста на биотехнологијата која била наречена „Сина книга“ (OECD, 1986). Сината книга сè уште претставува широко цитирана студија поради фундаменталниот пристап во испитувањето на ризиците. Всушност, оваа студија е првата научна анализа која ги зема во предвид опасностите за животната средина кои можат да произлезат од трансгените организми. Затоа, сината книга служи како стандард кој се користи од многу влади и регулаторни агенции за воспоставување на процедурите за испитување на ризиците од биотехнолошките производи. Од друга страна пак, повеќето организации од Европската Унија потенцираат дека новата рекомбинатната DNA методологија е потенцијално опасна технологија. Според овие организации, постоечките легислативи и регулаторната експертиза немаат капацитет да се справат со опасностите и ризиците, при што се формираат нови организации за регулација на генетски модифицираните организми.

При крајот на 1980-тите години, Американската академија за науки ја објавила т.н. „Бела книга“ во која се наведува дека рекомбинатната DNA технологија не продуцира нови категории на ризици. Во оваа студија се потенцира дека испитувањето на ризиците треба да опфати анализа на физичките особини на производот, а не процесот кој се користи за добивање на крајниот производ (NRC, 1987). На таков начин се доаѓа до општиот заклучок дека сите методи на генетска манипулација можат да произведат опасни производи, додека пак, рекомбинатната DNA технологија не предизвикува добивање на производи со повисок ризик во споредба со останатите методи. Според тоа, испитувањето на ризиците треба да се фокусира на крајниот производ независно од методот што се применува за негово производство (NRC, 2004).

Техниките на рекомбинатна DNA технологија се користат за добивање на различни производи кои имаат широка примена во медицината, индустријата, земјоделството и продукцијата на храна. Во доцните 1970-ти години, првите успешни експерименти опфаќале добивање на генетски модифицирани микроорганизми преку трансфер на соодветни гени за продукција на протеини. Овој технолошки напредок за кратко време бил широко прифатен за комерцијална продукција на терапевтски лекови за хуманата популација. Така на пр., во 1978 година е објавена студија за продукција на инсулин преку рекомбинатна DNA технологија која опфаќа трансфер на хуман ген во бактерија. Во 1982 година е одобрена првата комерцијална примена на рекомбинатната DNA технологија за производство на лекот инсулин за третман на дијабетес (трговска марка: хумулин од Genentech). Подоцна, голем број други фармацевтски компании развиле различни производи со примена на рекомбинатната DNA технологија. Во Белгија се добиени трансгени растенија од тутун резистентни кон канамицин и метотрексат (Schell и сор., 1983, Herrera-Estrella и сор., 1983). Во компанијата Монсанто во САД биле добиени трансгени растенија од петунија резистентни кон канамици (Fraley и сор., 1983). Исто така, во САД биле добиени трансгени растенија од сончоглед со инсертиран ген од грав (Murai и сор., 1983). Првите експерименти со засадување на трансгени растенија на отворено поле биле изведени во 1985 година. Сепак, во доцните 1980-ти и раните 1990-ти години значајно се намалил бројот на спроведени експерименти за генетска модификација на растителни видови.

Првите комерцијализирани генетски модифицирани растенија се тутун резистентен на вируси во 1993 година и домот со долг полуживот означен како Flavr Savr во 1994 година (Macilwain, 2003). Сепак, ниту едно од овие генетски модифицирани растенија не се задржале на пазарот. Комерцијалното производство на домотот Flavr Savr била прекината поради непостојаниот капацитет за продукција и испорака на пазарот (компанијата Calgene која го развила Flavr Savr домотот тврдела дека не може да ги

одржува големите потреби на пазарот). Кинеските трансгени растенија од тутун биле повлечени од пазарот поради притисокот од пушачите кои се плашеле дека пушењето на генетски модифициран тутун може да предизвика одредени ризици по здравјето.

Првиот генетски модифициран хранлив производ е коагуирачкиот агенс за млеко химозин, кој е развиен во 1981 година и по неколку спроведени теститања и испитувања за безбедност бил комерцијално одобрен на пазарот во 1988 година во Велика Британија и во 1990 година (САД). Повеќето тврди сирења кои денес се произведуваат користат генетски модифициран протеин наместо сириште од желудникот на кравите. Овие сирења имаат голема популарност иако не се обележуваат дури и наместа каде што е задолжително обележување на производите кои се добиени со рекомбинантната DNA технологија. Сепак, неприфатливо е за потрошувачите да се тврди дека сирењето е “не-GMO”, иако само траги од ензимот остануваат во крајниот производ од сирењето.

Во последните две децении е забележано импресивно прифаќање на генетски модифицираните растенија. Според организацијата ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications), речиси 500 милион хектари биле засадени со комерцијални генетски модифицирани култури до 2005 година. Само во 2005 година, генетски модифицираните култури опфаќале површина околу 90 милиони хектари во целиот свет. Главни земји кои континуирано учествуваат во култивирање на генетски модифицирани култури се САД, Аргентина, Канада и Кина. Исто така, помалите земји како Јужна Африка, Филипини, Иран и Романија имаат значаен придонес во зголемување на површината со генетски модифицирани растенија (James, 2005).

Доминантни генетски модифицирани култури во САД се соја, пченка и памук кои опфаќаат 89%, 61% и 83% соодветно, од вкупните засадени површини на овие култури (USDA/NASS, 2006). Исто така, во групата на комерцијализирани генетски модифицирани култури се компирот, домотот и ленот, како и вирус-резистентните растенија од папаја и тиква. Од неодамна е одобрено производството на генетски модифицирани растенија од луцерка, додека пак, шеќерната репка и вирус-резистентните растенија од сливи се во фаза на евалуација.

Денес, голем број генетски модифицирани растенија се наоѓаат во фаза на развиток, како на пр., модар патлиџан и компир збогатен со протеини во Индија, пченка во Јужна Африка, брокула, домат, сладок компир, папаја, банана и лубеница во Тајван, ориз, компир и локални видови на зеленчук во Кореја, како и касава во Кенија.

Повеќето комерцијализирани генетски модифицирани растенија поседуваат т.н. „влезни“ особини, како резистентност кон заболувања или хербициди. Од друга страна пак, рекомбинантната DNA технологија никогаш не била фокусирана кон добивање на генетски модифицирани растенија со „излезни“ особини, како подобрени нутритивни својства, отстранување на алергени соединенија или други антинутритивни протеини. Главната причина поради која модифицираните растенија со „излезни“ особини не се комерцијализирани е долгиот и скап регулаторен процес.

6.2 Регулација на генетскиот инженеринг

6.2.1 Соединети Американски Држави

Регулаторната политика за биотехнолошките производи во САД започнува релативно рано. Американската организација OSTP имала главна улога во воспоставувањето на координативната рамка за распределување на одговорностите поврзани со биотехнолошките производи до соодветни агенции. Според оваа координативна рамка, FDA добила примарна одговорност за регулација на ризиците за безбедноста на храна, EPA била вклучена во регулација на производите со пестицидни

својства, додека пак, одговорноста на USDA била поврзана со потенцијалните ризици во животната средина кои произлегуваат од генетски модифицираните растенија. Во многу случаи, сите три агенции се вклучени во испитување на добиените генетски модифицирани растенија. Така на пр., растителна храна со нова особина за резистентност кон хербициди која е добиена со рекомбинантна DNA технологија подлежи на рецензија од страна на USDA за потенцијалот на растението како штетник, EPA ги разгледува новите хербицидни аспекти, додека пак, FDA ги анализира сите промени во квалитетот на новодобиената храна.

Постојат голем број генетски модифицирани производи кои не подлежат на регулација од страна на сите три агенции. Така на пр., хортикултурните растенија со промени во бојата на цветовите не се регулираат од страна на EPA и FDA, меѓутоа, овие модифицирани растенија подлежат на регулаторна рецензија од USDA. Вусшност, сите добиени растенија со рекомбинантна DNA технологија кои не подлежат на целосна регулација се испитуваат од страна на USDA. Сите модифицирани растителни производи што се користат како храна подлежат на рецензија од страна на FDA, дури и ако храната не поседува изменети својства. Важно е да се напомене дека САД спроведува редовни испитувања на своите регулаторни процедури за да се осигура дека регулаторните тела се информирани за најновите развојот во технологијата.

Министерство за земјоделство на САД (USDA). Регулаторниот надзор на земјоделските производи добиени со рекомбинантна DNA технологија се врши од страна на Инспекциската служба за здравје на животните и растенијата (Animal and Plant Health Inspection Service-APHIS) како составен дел од Регулаторната служба за биотехнологија (Biotechnology Regulatory Service-BRS) во USDA. Според BRS, „регулираниот објект“ (пр. растение добиено со генетски инженеринг) може да премине во растителен штетник и негативно да влијае врз животната средина. Всушност, USDA испитува дали „регулираниот објект“ може директно или индиректно да предизвика болест или друго оштетување на растението. Регулираните објекти можат да вклучуваат растенија, микроорганизми и животни добиени со рекомбинантна DNA технологија. Денес, примарни регулирани објекти се генетски модифицирани растенија резистентни кон хербициди и инсекти, како и други трансгени растенија (домати со доцно зреење и компири резистентни кон болести). Исто така, BRS ги контролира ослободувањата на генетски модифицирани растенија на отворено поле, како и меѓународните увози и транспорти на трансгените растенија и организми.

Регулаторната служба за биотехнологија (BRS) дозволува ослободување на трансгени растенија во животната средина преку два начини: известување и дозвола. Известувањата се користат за специфични растенија кои поседуваат особини со низок ризик. Дозволата е неопходна за трансгени растенија кои можат да предизвикаат значаен ризик, како што се некои видови кои се помалку познати за BRS или растенија кои продуцираат фармаколошки соединенија. По спроведувањето на испитувањата и комплетирањето на податоците за овие растенија, иноваторите можат да побараат дозвола за нерегулиран статус. Исто така, BRS спроведува испитување на животната средина со цел да се обезбедат сигурни докази дека производот не претставува растителен штетник и вообичаено го следи јавното мислење пред донесувањето на одлука. Откако регулираниот објект ќе стекне нерегулиран статус, производот може да се култивира, продава и дистрибуира како и останатите немодифицирани растенија.

Агенција за контрола на храна и лекови (FDA). Агенцијата за контрола на храна и лекови (FDA) во рамки на Министерството за здравство и социјална заштита (Department of Health and Human Services) е одговорна институција за безбедноста на храната. За разлика од USDA, FDA не го испитува процесот на рекомбинантна DNA технологија, туку физичкиот состав на храната.

Рецензијата на FDA се фокусира на три главни прашања:

1. Дали новата храна содржи нови алергени?
2. Дали новата храна содржи нови токсични соединенија?
3. Дали новата храна има променет нутритивен состав во однос на содржина на хранливи соединенија, антинутритивни компоненти или други соединенија?

При ингестија на храна можат да настанат различни проблеми кои произлегуваат од присуството на штетни соединенија, како што се алергените или токсичните соединенија. На долг рок, овие проблеми можат да потекнуваат од отсуството или ниска концентрација на вообичаените хранливи соединенија кои се присутни во некоја храна. Така на пр., голем број луѓе консумираат сок од портокал поради огромниот бенефит од високата концентрација на витамин С (аскорбинска киселина). Ако од некои причини поврзани со генетскиот инженеринг портокалите престанат да продуцираат аскорбинска киселина, тогаш некои консументи можат случајно да развијат симптоми на дефицит на витамин С (скорбут). Со оглед на тоа што ова се смета како несакан ефект, FDA врши испитувања на новите портокали за содржината на аскорбинска киселина со цел да се потврди дека овој витамин се наоѓа во соодветна концентрација. Според досегашните податоци, биотехнолошката храна не покажала неочекувано губење на вообичаените хранливи соединенија и сите комерцијализирани биотехнолошки производи имаат иста нутритивна содржина како и конвенционалната храна. Важно е да се напомене дека новата трансгена храна може специфично да се модифицира во насока да поседува повисока содржина на хранливи соединенија.

Главен проблем при генетската модификација е веројатноста за неочекувано присуство на алергенски соединенија во новата храна. Постојат податоци за ваков случај, иако производот не бил комерцијализиран и немало никакви последици по здравјето кај консументите. Во овој случај, генетската модификација кај сојата (која природно има дефицит за аминокиселините метионин и цистеин) била извршена со трансфер на ген од бразилски орев за зголемување на нутритивниот статус. Испитувањата покажале дека генетската модификација го подобрила нутритивниот состав кај трансгената соја преку експресија на генот од бразилскиот орев и протеинот богат со овие аминокиселини. Натамошните тестови пред комерцијализација на трансгената соја покажале дека новата соја предизвикува алергени реакции кај консументите кои се алергични на бразилскиот орев. Овие податоци покажуваат дека резервниот протеин во бразилскиот орев кој е извор на аминокиселините од интерес претставува главен алерген дури и при негова експресија во сојата (Nordlee и соп., 1996). Испитувањата за детекција на алергени кај трансгената соја биле објавени во јавноста со цел да се потврди ефикасноста на регулативите за безбедноста на храната.

И покрај тоа што биотехнолошките производи не подлежат на задолжителни испитувања за безбедноста на храната, секоја комерцијализирана трансгена култура волонтерски (доброволно) се тестира од страна на FDA. Всушност, иноваторите на новата храна инсистираат на тестирање на производот од FDA од безбедносни причини. Главната причина за доброволното тестирање е тоа што иноваторите сакаат потврда од FDA дека новите производи се безбедни за консумација пред да се појават на пазарот. Оваа безбедносна проверка на новата храна има големо значење за иноваторите кои настојуваат да понудат здрави производи за консументите. Ако подоцна се потврди присуство на некои токсични соединенија или контаминанти во новата храна, тогаш иноваторите можат да се соочат со:

1. регулаторни мерки од FDA поради ослободување на контаминирана или токсична храна на пазарот или
2. судски спор од неинформирани консументи кои се оштетни поради консумација на контаминирана храна.

Агенција за заштита на животна средина (ЕРА). Американската агенција за заштита на животната средина (ЕРА) е одговорна за потенцијалните ризици кои можат да бидат предизвикани од пестицидите или хербицидите. Според ЕРА, пестицид претставува било кое соединение или комбинација на соединенија кои се наменети за да се спречи оштетувањето од било кој штетник или може да се користи како регулатор на растот на растенијата. Според овој критериум, трансгените растенија резистентни кон хербициди или инсекти поседуваат пестицидни својства. Особено е важно да се напомене дека ЕРА не ги регулира трансгените растенија, туку пестицидните својства на трансгените растенија. Сите трансгени растенија не подлежат на тестирање и регулација од страна на ЕРА. Оваа организација издава дозволи за култивирање на трансгените растенија со пестицидни својства на огромни површини (> 4 хектари). Исто така, ЕРА ги регулира комерцијалните регистрации за растителните сорти кои се продаваат со пестицидни својства, како што се Vt пченката или трансгената соја резистентна кон хербициди.

6.2.2 Европска Унија

Ситуацијата во Европската Унија (ЕУ) е многу конфузна во однос на регулативите за биотехнолошките производи. Иако голем број научни достигнувања во биотехнологијата се објавиле во рамките на ЕУ, комерцијализацијата на медицински, прехранбени и индустриски производи претставува сложена процедура. Исто така, ЕУ значајно заостанува во однос на одобрувањата и комерцијализацијата на генетски модифицираните растенија. Постојат голем број контрадикторни регулативи во однос на контролата на производите во ЕУ кои се добиени со рекомбинантна DNA технологија. Така на пр., тврдото сирење кое се добива од генетски модифицирани организми (производот не содржи детектибилна модифицирана DNA или протеин) не подлежи на регулација или специјалното означување за ГМО храна. На сличен начин, генетски модифицираните растенија од пченка, канола и соја не поседуваат детектибилна генетски модифицирана DNA или протеин, меѓутоа подлежат на строг регулаторен надзор и означување на производот. Исто така, ЕУ не е обединета во однос на ставовите за регулација на генетски модифицираните организми. Во тој контекст, само неколку земји членки имаат мала поддршка за примената на биотехнологијата, други земји немаат донесено одлука за оваа технологија, додека пак, некои земји имаат остануваат строги противници за примената на биотехнологијата.

Регулативите за генетски модифицираните организми се поделени во неколку дела од легислативата. Во раниот период од развитокот на биотехнологијата, регулативите на ЕУ биле поделени помеѓу две регулаторни директиви. Првата Директива означена како 90/119/ЕС опфаќа примена на генетски модифицирани организми, а втората Директива означена како 90/220/ЕС опфаќа промислено ослободување на генетски модифицирани организми во животната средина. Подоцна, двете директиви биле изменети: Директивата 90/119/ЕС била заменета со 98/81/ЕС во 1998 година, додека пак, Директивата 90/220/ЕС била заменета со 2001/18/ЕС во 2001 година. Регулативата бр. 1830/2003 ја заменила Директивата 2001/18/ЕС која ги поставила одредбите за следливост и означување на генетски модифицирани организми и прехранбените производи што се добиваат од овие организми. Покрај овие примарни регулаторни документи постојат и други регулативи. Така на пр., Регулативата ЕС 1829/2003 ги опфаќа одобрувањата за храна која се состои од, содржи или се добива од генетски модифицирани организми. Регулативата ЕС 1946/2003 ги опфаќа меѓународниот пазар и транспорт на генетски модифицирани организми, при што ефикасно се имплементира Картагенскиот Протокол за биобезбедност и случајните меѓугранични движења.

Комплицирањето на оваа веќе комплицирана бирократија претставува „заштитна клаузула“, преку која земјите членки на ЕУ отстапуваат од прифаќањето на генетски модифицираните организми кои се сметаат за безбедни според различни регулаторни директиви. Оваа клаузулата слободно се користи од земјите членки кои се противници на одобрувањето на генетски модифицираните организми. Оваа конфликтна ситуација во ЕУ во однос на огромните бирократски процедури претставува главна причина поради која генетски модифицираните организми се многу малку застапени на земјоделските полиња. Во тој поглед, само 5 земји членки на ЕУ (Чешка, Франција, Германија, Португалија и Шпанија) култивират генетски модифицирани растенија на строго ограничени површини. Храната која потекнува од генетски модифицирани организми е многу ретка во ЕУ, со исклучок на примерот со тврдото сирење кое е добиено со ензими од генетски модифицирани организми. Всушност, овој прехранбен производ ги има избегнато строгите регулативи и означувања поради комфорната семантичка дистинкција помеѓу **храната произведена од** генетски модифицирани организми (која подлежи на регулаторен надзор) и **храната произведена со** генетски модифицирани организми (не подлежи на регулација).

Во сите документи на ЕУ се потенцира дека спроведувањето на регулативите овозможува заштита на здравјето на луѓето и животната средина од потенцијални ризици поврзани со генетски модифицираните организми. Досега воопшто не е документиран или опишан некој ризик кој произлегува од генетски модифицираните организми. Сепак, ЕУ врши строга регулација на речиси сите аспекти на биотехнолошкото земјоделство и добиените производи, при што одобрените производи во ЕУ имаат највисок степен на регулација и се сметаат за најбезбедни производи.

Интересно е да се напомене дека САД, Канада и Аргентина поднеле тужба против ЕУ во Светската Трговска Организација (WTO) поради примената т.н. илегални регулаторни мерки кои ги дискриминираат странските биотехнолошки производи. Организацијата WTO ја прифатила оваа тужба, меѓутоа крајната резолуција најверојатно ќе трае неколку години. Во текот на изминатиот период, научните истражувања не потврдиле било каков ризик по здравјето и животната средина кои можат да се поврзат со генетски модифицираните организми. Според тоа, ЕУ е под голем притисок да ја оправда нивната позиција во однос на воспоставувањето на строги регулативи за заштита на здравјето и животната средина од ризиците кои можат да произлезат од генетски модифицираните организми. Веќе подолг временски период, научниците од Европските земји активно се фокусирани кон пронаоѓање или потврдување на ризици предизвикани од генетски модифицираните организми. Во тој контекст, Европската Комисија потрошила 70 милиони евра за финансирање на 81 истражувачки проекти преку ангажирање на 400 тима на научници помеѓу 1984 и 2000 година за да се карактеризираат ризиците поврзани со генетски модифицираните организми (Kessler и Economidis, 2001). До ден денс, сè уште не е документиран ниту еден ризик кој произлегува од генетски модифицираните организми.

6.2.3 Канада

Канада е единствената земја која во регулативите за генетски модифицирани организми тврди дека ризикот е последица од потенцијален опасен производ, а не од процесот кој се применува за добивање на производот. Според тоа, во оваа земја се прави регулаторна рецензија на сите нови производи, дури и некои производи кои не се добиени со рекомбинантна DNA технологија или други форми на технологија. Сите други регулативи во светот се базираат на процесот на производство (рекомбинантна DNA технологија) со цел да ги опфатат производите под соодветни регулаторни

процеси. До денес, Канада е единствената земја во светот каде што заклучоците од научната заедница (процесот на размножување не е поврзан со ризик) се целосно прифатени во регулаторната пракса.

Регулаторните одговорности за генетски модифицираните организми во Канада се спроведуваат од страна на 3 федерални организации: Канадска организација за инспекција на храна (Canadian Food Inspection Agency-CFIA), Здравје Канада (Health Canada) и Канадска агенција за заштита на животната средина (Canadian Environmental Protection Agency-CEPA). Здравје Канада има ексклузивна одговорност за безбедноста на храната, додека пак, канцелариите на CFIA се одговорни за ризиците во животната средина и заканите за храната на животните. Од друга страна пак, CEPA обезбедува специфично осигурување кое ги опфаќа сите производи кои се пропуштени од страна на останатите организации, како и производи кои двосмислено се толкуваат од законските акти за да ја избегнат регулаторната контрола.

6.3 Меѓународни перспективи

Сите регулаторни агенции ширум светот веруваат дека биотехнолошките производи можат да предизвикаат одредени ризици на сличен начин како и производите кои се добиени со традиционалното размножување. Сепак, регулаторните агенции сметаат дека производите што се добиваат со рекомбинантната DNA технологија можат да предизвикаат опасности по безбедноста на храната или загрозување на екосистемите.

Регулаторните агенции за безбедноста на храната ги разгледуваат можностите за намерно или случајно контаминирање на нормалната храна со токсични или алергени соединенија за време на процесот на производство или значајно да се намали содржината на хранливи материи. Овие регулаторни агенции го испитуваат изворот на интродуцираниот ген со цел да се одреди неговата потенцијална токсичност или алергеност. Во тој контекст, истражувања покажале дека алергениот резервен протеин од бразилскиот орев покажува алергени својства и при негов трансфер и експресија во соја (Nordlee и сор., 1996). Според тоа, алергените протеини немаат потреба од својот генетски или физиолошки домаќин за да елицитираат алерген одговор. На сличен начин, агенциите за безбедноста на храната ја испитуваат веројатноста за трансфер на потенцијално токсични и други антинутритивни соединенија од донорните видови кај реципиентните видови. Исто така, регулаторните агенции сугерираат дека постои веројатност за трансфер на „бенигни“ гени и протеини кои можат да ја стимулираат продукцијата на ендогени токсини, алергени и антинутритивни соединенија во реципиентните видови и прехранбените производи.

Иноваторите на биотехнолошките растителни култури не ги потценуваат реалните ризици и затоа спроведуваат тестирања пред фазата на комерцијализација со цел да се обезбедат сигурни докази дека новите сорти не поседуваат токсични, алергени или антинутритивни соединенија. Секоја нова сорта која покажува присуство на токсини или алергени се елиминира од натамошниот процес на комерцијализација пред да се спроведат тестирања од регулаторните агенции. Неопходно е да се потенцира дека не постои компанија која посакува да се соочи со одговорноста за комерцијализација на нови производи кои претставуваат вистинска закана по здравјето на консументите.

Физиологијата на човекот е уникатна физиолошка целина, односно токсините алергените или други антинутритивни соединенија предизвикуваат речиси подеднаков ризик кај сите луѓе ширум светот. Иако постојат одредени разлики кај хуманата популација во експозицијата поради културолошките разлики, кулинарските преференци или методите на подготовка, токсините во храната претставуваат опасност за луѓето од различни континенти. Тоа значи дека сите регулаторни агенции треба да

спроведуваат тестирања за безбедноста на храна кои се базираат на исти критериуми. Во тој контекст, американските и европските регулаторни агенции треба да бидат единствени во заштитата и интересот на сите потрошувачи ширум светот и не треба да се дуплираат бирократските процедури за безбедноста на храната. Од особено значење е регулаторните агенции да се фокусираат на локалните варијации во кулинарството, вклучувајќи го методот на подготовка (готвена храна во однос на свежа храна) или целокупната експозиција (одредена храна е главна хранлива компонента кај една култура, а минорна компонента кај друга култура).

Исто така, регулаторните агенции ги контролираат потенцијалните ризици кои произлегуваат од биотехнолошките производи врз животната средина. Консензусот во научната заедница јасно потврдува дека методот на размножување на растенијата не претставува ризик фактор за загрозување на животната средина. Според научната заедница, главните ризици за нарушување на екосистемите потекнуваат од растителниот вид од интерес, особината која се модифицира, како и регионот на ослободување на генетски модифицираните растенија.

За разлика од униформната физиологија на човекот, екосистемите во светот покажуваат широка варијација. Тоа значи дека растенијата кои што се сметаат безбедни за ослободување и комерцијализација во САД можат да предизвикаат еколошка катастрофа во Амазонските прашуми. Широката варијација на животните средини ширум светот е главна причина за постоењето на хетерогеност во стратегиите за контрола на ризиците врз животната средина кај регулаторните агенции од различни региони во светот. Сите држави не поседуваат регулаторни ресурси како САД, Канада или ЕУ и затоа меѓународните коалиции се обидуваат да ја рационализираат регулацијата на биобезбедноста за потенцијалните ризици во екосистемите.

Главна научно друштво за испитување на ризиците од биотехнолошки производи врз животната средина е Интернационалното друштво за истражување на биобезбедноста (International Society for Biosafety Research-ISBR). Ова научно друштво одржува двегодишни симпозиуми за научни дискусии кои се однесуваат на биобезбедноста на екосистемите и влијанието на биотехнологијата врз биосферата.

Особено значење за консолидирање на информациите за ефектите на биотехнолошките производи врз биодиверзитетот има Картагенскиот Протокол, кој потекнува од Конвенцијата на биолошкиот диверзитет (Convention on Biological Diversity-CBD). Целта на овој Протокол е „да се заштити биолошката разновидност од потенцијалните ризици предизвикани од живите модифицирани организми кои се добиени од модерната биотехнологија“. Протоколот го имаат потпишано повеќе од 130 земји кои се обврзуваат да воспостават организации за идентификација, мониторинг, документирање и следење на живите модифицирани организми. Договорот опфаќа меѓународна трговија на живи модифицирани организми, односно вијабилни и необработени биотехнолошки производи. Во овој Протокол е опфатена една законска определба означена како Biotechnology Clearing House, која претставува банка на информации за живите модифицирани организми.

Картагенскиот Протокол го имаат ратификувано 134 земји со цел да се овозможи изготвување на регулаторни одлуки за степенот на ризик за локалните екосистеми. Сепак, основата на Картагенскиот Протокол се базира на претпоставките дека биотехнолошките производи претставуваат закана за биодиверзитетот, иако не постојат податоци кои ги потврдуваат овие информации. Парадоксално е тоа што биодиверзитетот е загрозен само од биотехнолошките производи, додека пак, сите вијабилни организми и производи за меѓународна трговија се ослободени од оваа регулатива. Голем број научни студии за ризиците во животната средина јасно потврдуваат дека биотехнолошките производи не претставуваат поголема закана за

екосистемите и биодиверзитетот во споредба со конвенционалните производи. На таков начин се смета дека главната претпоставка на Картагенскиот Протокол нема релевантна и важечка основа. Сè уште нема евидентиран податок или случај дека генетски модифицираните организми предизвикуваат штети врз биодиверзитетот (McHuguen, 2006). Тоа значи дека вистинските закани за биодиверзитетот и причините кои можат да предизвикаат еколошка катастрофа во нашиот планетарен екосистем ќе продолжат да се дискутираат во иднина. Исто така, треба да се земе во предвид дека Картагенскиот Протокол управува со сите регулаторни ресурси за заштита од хипотетските ризици од живите модифицирани организми, а воопшто не се спроведуваат активни стратегии за елиминирање на факторите кои предизвикуваат реална штета во животната средина.

6.4 Недостатоци на регулаторните системи за генетски модифицирани организми

Денешните регулаторни системи за генетски модифицираните организми не се базираат на научни сознанија и покрај тврдењата од политичарите и регулаторните агенции дека нивните системи имаат научна позадина. Постојат голем број недостатоци од научен аспект кои ги демантираат регулаторните структури.

1. Повеќето регулаторни организации претпоставуваат дека традиционалните методи на генетска модификација не се сметаат како ризик фактор, додека пак, процесот на биотехнологија претставува извор на ризици (Сл. 6.1). Оваа претпоставка сè уште не е потврдена од научен аспект, бидејќи сите студии сугерираат дека процесот на биотехнологија не е поопасен во споредба со другите методи на размножување на растенијата (Kessler и Economidis, 2001; NRC, 2004). До денес, сè уште не постои јавно барање за да се иницира испитувањето на ризикот кој произлегува од конвенционалното земјоделство. Според тоа, сите производи добиени со размножување на растенијата, вклучувајќи ги растенијата добиени со рекомбинантна DNA технологија треба да подлежат на регулација. Исто така, неопходно е да се намали строгата регулација кај некои „бенигни“ генетски модифицирани растенија и да се третираат како конвенционалните земјоделски производи со сличен ризик.
2. Ексклузивната регулација на генетски модифицираните организми од страна на некои регулаторни агенции се базира на претпоставката дека интерспецискиот трансфер на гени е неприроден и потенцијално опасен процес. Сепак, треба да се напомене дека не постои ригидна бариера помеѓу видовите во однос на трансферот на гени, бидејќи постојат неколку примери во природата за движење на гени од еден на друг организам без да настане некоја опасност. Така на пр., *A. tumefaciens* е природен „генетски инженер“ кој врши трансфер на кратки сегменти од бактериска DNA во еукариотско јадро на клетката домаќин. Исто така, голем број сорти на пченица (*Triticum*) за производство на леб носат DNA фрагменти од хромозомите на рж (*Secale*).
3. Не постои организација која има доволно ресурси за испитување на сите генетски модифицирани организми во однос на сите потенцијални ризици. Во тој контекст, регулаторните организации развиле рационален систем на приоритетност, според кој производите кои претставуваат најголем ризик подлежат на највисок степен на регулаторна инспекција. Сепак, постојат голем број несогласности во однос на примената на овој систем на приоритетност. Така на пр., две различни сорти на канола можат да се модифицираат за стекнување на резистентност кон хербициди со примена на рекомбинантна DNA технологија или индуцирана мутагенеза. Иако двете сорти на канола предизвикуваат слични ризици, сортата добиена со биотехнолошкиот метод подлежи на повисока регулаторна контрола. Според тоа, сличните сорти кои предизвикуваат подеднакви ризици треба да подлежат на сличен степен на регулаторна контрола.



Слика 6.1 Релативна веројатност за несакани генетски ефекти кои се поврзани со различни методи на генетска трансформација на растенијата. Сивите зони го прикажуваат рангот на несакани промени, додека пак, црните зони го прикажуваат степенот на генетско нарушување при секој метод. Постои ниска веројатност за појава на еднаков степен на несакани генетски ефекти кај различни методи на гентскиот инженеринг, генетската модификација или конвенционалното размножување. Поверојатно е да настанат несакани генетски ефекти кај крајниот производ отколку кај методот што се применува за генетска трансформација. Така на пр., селекцијата од хомогена популација покажува најниска веројатност за појава на несакани генетски ефекти. Од друга страна пак, индуцираната мутагенеза покажува највисок степен на генетско нарушување и висока веројатност за појава на несакани генетски ефекти (NRC, 2004).

4. Постои неоснована претпоставка дека ризиците од биотехнологијата се уникатни и треба да се тестираат како апсолутни објекти. Сепак, ризикот кој произлегува од биотехношките производи треба да се смета како релативен или компаративен во однос на конвенционалните производи. Во тој контекст, вообичаеното прашање: кои се ризиците поврзани со оваа генетски модифицирана сорта?, треба да се замени со научно издржано прашање: кои се ризиците поврзани со оваа генетски модифицирана сорта во однос на ризиците од конвенционалната сорта која ќе ја замени?. Ова ексклузивно регулирање на новите сорти и игнорирање на статусот на постоечките сорти овозможува секој идентификуван ризик од генетски модифицираните сорти да се искористи како аргумент за да се забрани комерцијализацијата на биотехнолошките производи.
5. Тврдењата на организациите дека регулативите имаат научна основа се потврдени со техничката документација која ја покажува валидноста на различни методи, тестови, мерења и други критериуми. Сепак, достапноста на ресурси и експертизата за спроведување на тестовите не се доволни критериуми за да се задоволи научната

валидност и оправданост. Така на пр., тестирањето на екстрахиран и пурифициран протеин од генетско модифицирано растение за потенцијална алергеност навидум изгледа како оправдана потреба за регулација. Сепак, спроведувањето на тестови за алергеност не е научно оправдана стратегија ако не постои хипотеза дека протеинот може да има алергени својства. Ако генот е клониран од познат извор на алергени или испитуваниот протеин има хомологна аминокиселинска секвенца со познат алерген, тогаш тестовите за спроведување на алергеност имаат научна валидност и оправданост. Овие неосновани потреби за регулација за да се покаже на јавноста дека се спроведени научни тестови за потенцијална алергеност или да се вежба контрола над иноваторите не успеваат да ја зголемат јавната доверба за безбедноста на производите.

Пред да се спроведат било какви тестирања кај генетски модифицираните организми, регулаторните агенции треба да одговорат на следното прашање: „Како информацијата од овој тест/анализа ќе помогне во зголемување на јавната доверба за безбедноста на овој производ?“. Ако одговорот е „речиси исто“ или „нема промени“, тогаш, потребата за спроведување на регулативи не е научно оправдана и се потценуваат правата на јавноста за ефикасна регулација.

Познато е дека здравјето може да се загрози од различни токсични фактори од хемиско или биолошко потекло кои можат да се најдат во храната (диоксини, *Salmonella*, *Escherichia coli*). Исто така, екосистемите и биодиверзитетот се загрозени од активностите во земјоделството и размножувањето на растенијата, како што е интродукцијата на инвазивни видови. До денес, не постојат потврдени случаи на нарушувања на здравјето кај луѓето или животните, како и загрозување на животната средина од страна на генетски модифицираните организми. Сепак, речиси сите регулативи ги опфаќаат само биотехнолошките производи, а конвенционалните производи кои претставуваат извори на сите познати оштетувања експлицитно се ослободуваат од регулација. Несогласените ставови помеѓу регулаторната пракса и научните препораки претставуваат континуирана закана по здравјето и животната средина која ќе продолжи во иднина се додека не започне регулаторна контрола на производите кои претставуваат најголем ризик без разлика на методот што се применува за нивно производство. Ефикасноста на регулаторната контрола треба да е во корелација со степенот на ризик. Во таква ситуација, регулаторните агенции ќе се фокусираат на контрола на вистинските закани по здравјето и животната средина, а помалку внимание ќе се посвети на производите кои претставуваат мала закана.

Прифаќањето на оваа политика ќе овозможи опфаќање на некои производи кои сега не се под регулаторна контрола, како што е традиционалниот начин на генетска модификација (пр. индуцирана мутагенеза со јонизирачко зрачење). Од друга страна пак, овој пристап ќе овозможи исклучување на некои биотехнолошки производи кои покажуваат низок ризик, а подлежат на регулаторна контрола. Овој пристап не значи преоптоварување на регулаторните агенции, бидејќи новите опфатени поопасни производи ќе се во рамнотежа со исклучените и помалку опасни производи кои подлежат на контрола. Исто така, елиминацијата на бројните непотребни тестови за научна валидација на безбедноста на биотехнолошките производи може да го редуцира преоптоварувањето во регулаторните агенции. Ако политичката и регулаторната заедница ги прифатат препораките од научната јавност, тогаш човештвото ќе ја препознае вистинската заштита од реалните ризици кои сега го нарушуваат нашето здравје и планетарните екосистеми.

7. КОНТРОВЕРЗНОСТ НА ТРАНСГЕНИ РАСТЕНИЈА

Примената на хемиски агенси во земјоделското производство на храна има долга историја. Уште пред 1000 години, Кинезите користеле сулфур како фумигант, во XVI-иот век соединенија на арсен биле користени како инсектициди, а во 1930-тите години започнало користењето на новите синтетски соединенија. Со почетокот на Втората Светска Воја започнала интензивна продукција на хемиски соединенија, како што е DDT (дихлородифенилтрихлороетан) за контрола на маларијата која се пренесува преку инсекти. Поствоената ера го означила почетокот на современата агрохемиска индустрија. Во тој период, огромниот напредок во хемиската продукција претставува основа за користење на различни инсектициди, фунгициди и фумиганти во земјоделството за продукција на храна (Powell и Leiss, 1997).

Денес, фолијарната апликација на различни хемиски соединенија за стимулирање на продукцијата на растителни култури се почесто се заменува со генетскиот инженеринг и интродукција на гени од голем број организми со пестицидни или хербицидни-толерантни својства во растителниот геном. На сличен начин како и во раниот период на користењето на хемиски пестициди, јавната дискусија за биотехнолошкото земјоделство била фокусирана кон проучување на потенцијалните ризици отколку кон бенефитите од примената на генетски модифицирана храна. Од крајот на XX-иот век, јавната дискусија за генетски модифицираната храна опфаќа едноставни прашања за кои многумина не успеале адекватно да одговорат на следните прашања:

1. Зошто човештвото се плетка со природата?
2. Зошто не се обележуваат сите производи?
3. Постои ли гаранција дека нема да се појават долгорочни ризици?
4. Зошто човекот се игра Бог?

Во 1994 година започнува да се врши комерцијално производство на биотехнолошки производи преку трансфер на гени за стимулирање на продуктивноста на културите. Примената на техниките на генетскиот инженеринг овозможиле продолжување на рокот на траење на свежите овошја и зеленчукот, како и редукција на стресот во животната средина за продукција на храна. Од 1995 година, земјоделците од Северна Америка и ширум светот се одлучиле да инвестираат во генетски подобрени семиња од пченка, соја, канола и компир поради зголемениот принос на иста површина на земја, редуцираната употреба на хемиски соединенија и поефикасните системи за продукција. Затоа се поставува прашањето: зошто оваа технологија предизвикува одбивност во јавноста?

7.1 Перцепција на ризици

Ризиците кои произлегуваат од генетски модифицирана храна се предмет на голем број истражувања. Sandman, (1987) забележал дека јавноста посветува многу малку внимание на опасната природа на ризиците и експертите обично комплетно ги игнорираат овие фактори кои можат да предизвикаат вознемиреност кај консументите. Научниците ги дефинираат ризиците од аспект на самата наука, односно тие ја земаат во предвид природата на оштетувањата која може да се случи, веројатноста за појва на оштетувањата, како и потенцијалниот број на загрозени луѓе (Groth, 1991). Повеќето граѓани се помалку свесни за квантитативната природа на ризикот, а многу повеќе се загрижени за квалитативни својства на ризиците, како на пр., дали доброволно е прифатен ризикот, дали ризиците и бенефитите се рамномерно дистрибуирани, дали ризикот може да се контролира од една индивидуа, дали ризикот е неизбежен или постојат побезбедни алтернативи, дали ризикот е познат или непознат, дали ризикот има природно или технолошко потекло (Sandman, 1987). Истражувањата во психолошките

науки идентификувале 47 познати фактори кои влијаат врз перцепцијата на ризикот, како на пр., контрола, беневит, доброволно прифаќање на ризик и најважниот фактор, вистината (Covello, 1992). Овие фактори можат да помогнат во објаснувањето на загриженоста на консументите за потенцијалните ризици кои произлегуваат од генетски модифицираната храна. Денешната состојба покажува дека агенциите кои се одговорни за менаџирање на ризикот при безбедноста на храната треба да докажат дека ефикасно го редуцираат или минимизираат степенот на ризик од генетски модифицираната храна. Предрасудата или стигматизацијата е моќна стратегија која ја користат консументите за испитување на ризиците поврзани со храната. Појавата на стигматизацијата е резултат на зголемената загриженост на јавноста за ризиците по здравјето на луѓето и животната средина кои произлегуваат од примената на новите технологии.

Gregory и сор., (1995) ја карактеризирале стигматизацијата на следните начини:

- Изворот на стигматизација е опасен и покажува голем број карактеристики кои придонесуваат за висока перцепција на ризици (пр. инсерција на гени од бактериско потекло во растителен геном).
- Прекршување на стандардите за правилно или природно дејствување поради дискредитација на последиците од некој настан (пр. повреда на невини луѓе).
- Нееднаква дистрибуција на влијанијата помеѓу групите (пр. децата и бремените жени се непропорционално засегнати).
- Потенцијалните исходи се неограничени (научна неизвесност во однос на потенцијалните последици по здравјето и животната средина).
- Сомневање во менаџирање на опасностите во однос на компетенцијата, конфликтот на интереси, како и неспособноста за примена на соодветна вредност и мерки на претпазливост.

Овие фактори на стигматизација се применуваат и за биотехнолошките производи во земјоделството. Стигматизацијата станува стандард за храната и водата кои се поврзуваат со заболувањата или смртта кај хуманата популација. Според тоа, вистински предизвик е редуцирање на стигматизацијата. Менаџирањето на стигматизацијата која е поврзана со безбедноста на храната треба да ги опфати следните фактори:

- Ефикасни и брзи системи на надзор,
- Ефикасна комуникација за природата на ризикот,
- Кредибилан, отворен и одговорен регулаторен систем,
- Докажани напори за редуцирање на степенот на неизвесност и ризик,
- Докажани дејства кои кореспондираат со регулативите.

Според тоа, неопходно е да се спроведе менаџирање на ризикот од научен аспект и комуникација со јавноста за природата на ризикот со цел да се овозможи искористување на бенефитите од биотехнолошкото земјоделство.

Биотехнолошките производи достигнале нормален статус во општеството кога јавноста од Северна Америка била експонирана на огромен број информации за микробиолошката безбедност на конвенционалната храна. Во 1993 година, еден случај на зараза со *Escherichia coli* во еден ресторан предизвикал огромен интерес во јавноста за начинот на производство на храната (Powell и Leiss, 1997). Загриженоста на консументите за безбедноста на храната во тој период претставува основа за воспоставување на строга контрола и надзор од супермаркетите до фармите. Денес, овој тренд може да се забележи преку зголемена продажба на органска храна и книги за здрава храна, бидејќи јавноста настојува да врши контрола на храната која поволно влијае врз нивното здравје.

Во средината на 1990-тите години, индустриските практики и владите промовирале сомневање и сè уште креираат атмосфера на недоверба во однос на примената на

генетски модифицирани култури. Оваа недоверба произлегува од обидите за карактеризација на биотехнологијата како тривијално продолжување на познатите техники на печење леб, лозарство и вкрстување на растенијата. Научната заедница е категорична во однос на биотехнолошките производи добиени со генетски инженеринг: „Технологиите на генетскиот инженеринг се комплетно различни од традиционалните методи бидејќи се работи за моќни и прецизни техники од молекуларната биологија кои водат кон индустриски раст, а воедно и загриженост во јавноста“ (Durant, 1992).

Поединците кои ги подржуваат генетски модифицираните култури тврдат дека терминот „генетски инженеринг“ е алармирачки за јавноста и треба да се користат алтернативните термини „подобрување на културите“ или „биотехнологија“. Денес, активистите кои се противници на генетски модифицираните организми доминираат во јавните дебати.

7.2 Одговори кон страв

Голем број политичари, компании и академски заедници ги натерале граѓаните да се едуцираат од научен аспект со цел да се надмине јавниот страв за ризикот од земјоделската биотехнологија. Оваа едукативна стратегија била спроведена од страна на промоторите на технологијата и опфаќала јавни дискусии за технолошките ризици. Од неодамна, промоторите на хемиските соединенија во земјоделството во 1960-тите години и нукларната енергија во 1970-тите години го прифатиле јавниот модел на едукација. Сепак, јавната едукација се покажала како неуспешен модел, бидејќи поединците донесуваат рутински одлуки за политиките за кои немаат детално академско познавање. Според тоа, консументите ќе продолжат самостојно да донесуваат одлуки за генетски модифицираната храна без разлика на нивниот степен на едукација (Kelley, 1995).

Генетскиот инженеринг претставува моќна технологија која подлежи на регулација бидејќи претставува извор на потенцијален бенефит и неконтролиран страв. Во тој контекст, сите револуционерни технологии предизвикуваат три одговори во јавноста: нереални очекувања (сите нови технологии се распродадени), конфузија и евентуално наоѓање на начин за справување (Ball, 1992). Со текот на времето, јавната дискусија за биотехнологијата се променува кон пореален пристап на рационализација на бенефитите и минимизирање на ризиците. Сепак, во многу земји во светот (особено во Европа) постои иницијалниот страв од ризици за генетски модифицираната храна и биотехнолошките производи сè уште се стигматизирани. Така на пр., во Франција се прифатени ризиците од нуклеарната енергија, иако истражувањата за перцепција на ризикот сугерираат дека треба да се одбие прифаќањето на оваа технологија.

Овие податоци сугерираат дека јавната контроверзност за генетски модифицираната храна во различни земји или социјалните групи се регулира преку континуирани конверзации за ризиците и бенефитите. Во последната деценија, примената на блогови, Wikipedia, YouTube, Facebook и други социјални мрежи овозможуваат демократизација на информацијата, како и пролиферација на неосновани инфомации.

7.3 Студија на случаи

7.3.1 Компири на Pusztai

Во 1998 година, д-р Arpad Pusztai од Rowett Институтот за истражување во Абердин, Шкотска објавил дека хранењето на 5 стаорци со генетски модифицирани компири кои содржеле лектини (токсични протеини за инсектите) по период од 110 дена предизвикува намален раст и нарушен имун систем. Д-р Pusztai не ги објавил овие

истражувања во рецензирано научно списание, туку на телевизиската програма UK World in Action. Прегледот на овие податоци покажал дека Pusztai ги игнорирал конвенционалните критериуми на научна рецензија, како и експерименталниот дизајн кој не опфатил користење на соодветни контроли. Познато е дека компирите содржат токсични соединенија и нивната содржина може значајно да варира во зависност од начинот на култивирање (феномен познат како соматонска варијабилност). При овие експерименти, задолжително е култивирање на компирите во стандардизирани и контролирани услови со цел експерименталните животни да конзумираат униформна храна. Исто така, старците не можат да преживеат долг временски период само на сурова храна од компири, бидејќи нивната храна треба да содржи дополнителни суплемементи. За 2 дена по објавата на овие резултати, д-р Pusztai бил суспендиран и присилен да се пензионира.

Оваа т.н. Pusztai афера предизвикала значајна медиумска покриеност со бројни обвинувања. Во 1999 година, група на 20 меѓународни научници јавно ја подржиле работата на д-р Pusztai и обвиниле дека процесот на генетски инженеринг, особено примената на 35S промоторот од мозаичниот вирус на карфиол има негативно влијание кај животните. Познато е дека 35S промоторот има широка примена во генетскиот инженеринг на растенијата за активирање и стивнување на специфични гени. Поради оваа широка примена, регулаторните агенции од Западните земји побарале евидентни докази дека 35S промоторот стабилно се интегрира во растителниот геном. Експериментите на д-р Pusztai биле повторени со користење на 35S промотор кај трансгени компири и воопшто не биле констатирани промени кај лабораториските животни. Важно е да се напомене дека трансгените компири култивирани од страна на д-р Pusztai никогаш не биле одобрени во Канада, САД или Велика Британија. Кралското Друштво на Велика Британија заклучило дека „Истражувањето на д-р Arpad Pusztai за ефектите на хранење старци со генетски модифицирани компири е несоодветно и неоправдано и не може да се извлече заклучок дека генетски модифицираната храна е опасна за хуманата популација“. Сепак, аферата Pusztai постојано се цитира како доказ за опасноста од генетски модифицираната храна.

7.3.2 Монарх пеперутки

Во 1999 година, John Losey и колегите од Cornell Универзитетот во САД објавиле кратко соопштение во научното списание Nature кое привлечело огромна национална и меѓународна медиумска покриеност (Losey и соп., 1999). Во нивното истражување кое било спроведено во стакленик, листови од *Asclepias* биле вештачки опрашени со полен од конвенционални и генетски модифицирани Bt растенија од пченка. Овие автори сметале дека степенот на вештачкото опрашување не се разликувал природното опрашување. Растенијата од Bt пченка биле генетски модифицирани со гените кои кодираат ендотоксини од почвената бактерија *Bacillus thuringiensis*. Во оваа студија, Monarch гасеници стари 3 дена биле поставени на листовите со цел да се хранат 4 дена. Добиените резултати покажале смртност од 44% кај Monarch ларвите кои се хранеле со опрашените листови со полен од Bt пченка. Од друга страна пак, смртноста не била констатирана кај гасениците кои се хранеле со опрашените листови со конвенционален полен од пченка (контролни листови). Исто така, ларвите кои се хранеле со Bt-опрашени листови конзумирале помало количество листови и имале двојно намалена големина во споредба со ларвите кои се хранеле со контролните листови. Сепак, во оваа студија не била извршена компарација на покриеноста на листовите со полен во лабораториски услови и природната покриеност која егзистира во близина на полиња од пченка.

Според овие автори, студијата има ограничена примена и неопходно е спроведување на тестови на отворено поле за да се одреди значајноста на овие податоци во лабораториски услови. Во својата публикација, д-р Losey изјавил „Ние не можеме да заборавиме дека Bt-пченката и другите трансгени растенија имаат огромен потенцијал за редуцирана употреба на пестициди и зголемување на приносите кај растенијата. Оваа студија е само прв чекор и неопходни се поголем број истражувања со цел објективно да се измерат ризиците во однос на бенефитите од примената на оваа нова технологија“. Подоцна, д-р Losey открил дека неговите научни резултати биле трансформирани во мутантни приказни за пченката убиец и светите пеперутки. Така на пр., весникот The New York Times објавил сторија на насловната страница насловена како „Истражувачите велат дека модифицираната пченка може да ги загрози пеперутките“. Денес, активистите на Greenpeace продолжуваат да се облекуваат во костими од Monarch пеперутките и истовремено паѓаат мртви пред телевизиските камери. Одличен уличен театар и лажна политика за јавноста!

7.4 Колку бенефити се неопходни за едногласно одобрување на генетски модифицираната храна?

Во 2000 година, американската агенција за заштита на животната средина (ЕРА) објавила извештај дека генетски модифицираните растенија од пченка, памук и компир за одбивање на штетници нудат значајни бенефити за фармерите со мал број ризици. Затоа, ЕРА едногласно ја одобрува технологијата на генетски инженеринг како ефикасна стратегија за зголемување на приносот на културите, редуцирање на токсичните хемиски соединенија, како и намалување на контаминацијата на подземните води. Овој извештај на ЕРА овозможил намалување на трошоците за пестициди кај американските земјоделци за повеќе од 100 милиони долари.

Прашањето „Дали сакате гени од риба во вашите домати?“ постојано се користи од страна на активистите на Greenpeace во нивните кампањи и медиумите (Greenpeace, 2001). Сепак, експериментот за трансфер на антифризен протеин од риба која живее во студени води за да се зголеми толерантноста на ниски температури кај домати бил спроведен само еднаш и овие истражувања биле неуспешни. Ова е само дел од бројни примери на информација која е наменета да алармира отколку да информира во јавноста. До 1999 година, оваа комбинација од научна наивност, медиумска пропаганда и теории на заговор има голема улога во сите јавни дискусии за улогата на генетски модифицираната храна. На таков начин, двете активистички групи Greenpeace и Советот на Канаѓани се надеваат дека ќе постигнат успех во стигматизацијата на генетски модифицираната храна во Европа преку јавни демонстрации (Сл. 7.1).

Во средината на 1990-тите години, научните заедници и политичките лидери воопшто не се огласиле во однос на јавната загриженост од консумација на генетски модифицирана храна во Велика Британија и Европа. Оваа т.н. игнорантност на политичките и научните групи во тој период била оправдана поради кризата од кравјо лудило во Велика Британија. Во 1996 година, Британската влада објавила дека консумацијата на производи од заболена крава со кравјо лудило (кравја спонгиформна енцефалопатија) може да предизвика нова варијантна форма на Creutzfeld-Jacob-ова болест која ги напаѓа младите индивидуи и предизвикува неизбежна смрт. Оваа криза предизвикала убивање на неколку милиони животни и финансиска штета од милијарда долари поради загубениот пазар, а воедно починале околу 150 луѓе од оваа болест. Болеста на кравјо лудило јасно ја прикажува современата земјоделска пракса како „науча надвор од контрола“.



Слика 7.1 Активисти на Greenpeace протестираат против генетски модифицирани култури.

За разлика од европските земјоделци, северноамериканските земјоделци веднаш ги прифатиле новите генетски модифицирани семиња и биле подготвени да учествуваат во јавните дебати за да го задржат и обезбедат пристапот до овие современи технологии. Овој пристап води кон активна кампања на информираност која им овозможува на консументите самостојно да донесуваат одлуки за производите. Важно е да се напомене дека земјоделците немаат интерес да ги снабдуваат пазарите со производи кои нема да ги конзумираат потрошувачите. Тоа може да биде скап неуспех за земјоделците.

7.5 Континуирани дебати

7.5.1 Процес или производ?

Генетската варијабилност е неопходен процес за подобрување на некои особини кои се од интерес за хуманата популација. Генетските истражувања се фокусираат кон идентификација на растенија, животни или микроорганизми кои поседуваат некоја особина од интерес (пр. зголемена продуктивност или резистентност кон болести). Варијабилноста од интерес може да се селектира преку генерации со помош на вкрстување. Генетскиот инженеринг и техниките од молекуларната биологија овозможуваат интродукција на дополнителен извор на генетска варијабилност во одреден организам.

Постојат и други техники за добивање на генетска варијабилност покрај традиционалното вкрстување и современиот генетски инженеринг. Од 1940-тите години започнува да се користи процесот на мутагенеза за индуцирање на генетска варијабилност кај растенијата преку експонирање на семињата на мутагени фактори

(соединенија кои индуцираат DNA мутации, јонизирачко зрачење или иперит). Процесот на индуцирана мутација се користи и денес за добивање на генетска варијабилност. Од тука произлегуваат две прашања:

1. Дали производите добиени со индуцирана мутација треба да се регулираат како и биотехнолошките производи?
2. Дали процесот на индуцирана мутагенеза е ризичен како и генетскиот инженеринг?

Со појавата на генетскиот инженеринг, подржувачите и критичарите на оваа тема постојано се соочуваат на јавни дебати. Сепак, научната заедница и регулаторните агенции од Северна Америка доследно посочуваат дека е неопходна регулација на крајниот производ, а не процесот кој се користи за добивање на производот. Така на пр., истражувањата кај некои сорти од компир и целер кои биле добиени преку традиционалното вкрстување покажале неприфатливо висока содржина на природни соединенија. Овој пристап за регулација на безбедноста на крајниот производ независно од методот за продукција официјално е афирмиран од страна на канадските и американските научни организации.

7.5.2 Загриженост за здравјето

Во 1994 година, Flavr Savr доматот била првата генетски модифицирана храна која е одобрена од американската агенција за храна и лекови на (FDA) и Здравје Канада (Health Canada). Резултатите од експериментите на хранење на глодари не покажале значајни разлики помеѓу користењето на конвенционалните и генетски модифицираните домати. Важно е да се напомене дека овие истражувања биле рецензирани од страна на регулаторните агенции.

Генетски модифицираните растенија од пченка содржат ген од почвената бакетрија *Bacillus thuringiensis* и се означуваат како Bt пченка. Регулаторните агенции и неколку меѓународни научни организации потврдиле дека Bt пченката е еквивалентна на традиционалната пченка и се смета како безбедна за консумирање. Овие податоци произлегуваат од експериментите кои покажуваат дека ингестијата на Bt ендотоксините немаат никакви ефекти врз здравјето, поради тоа што овие токсични протеини за кратко време се дигестираат во цревниот тракт на луѓето. Комерцијалните производи добиени со генетскиот инженеринг треба да поседуваат значајна еквивалентност во молекуларните, нутритивните и токсиколошките податоци со традиционалните производи. Доколку не може да се воспостави значајна еквивалентност со конвенционалната храна, тогаш се вршат натамошни испитувања за безбедноста на идентификуваните разлики или новите карактеристики. Новата храна која значајно се разликува од соодветните традиционални производи подлежи на детални испитувања за безбедноста. Исто така, детални испитувања на безбедноста се спроведуваат кај биотехнолошките производи кои се добиваат со модификација на комплексните метаболички патишта кај растенијата за да се добие повисок нутритивен статус.

Сепак, обидите за подобрување на било која храна може да доведе до неочекувани последици. Така на пр., во еден случај е пренесен хуман алерген од една во друга растителна култура. Сепак, компанијата го прекинала експериментот уште при прелиминарниот процес на испитување. Овој случај различно се толкува и презентира од страна на критичарите и подржувачите на генетски модифицираната храна. Според подржувачите, овој инцидент јасно го рефлектира функционирањето на регулаторните системи, додека пак, критичарите посочуваат дека ризиците не се прикажуваат поради манипулација со структурата на храната.

7.5.3 Загриженост за животната средина

Уште од дамнешно време е познато дека прекумерното користење на одредена технологија во земјоделството предизвикува еволутивен притисок на селекција кој во многу случаи води кон резистентност, како и неефикасност на технологијата. Оваа појава е карактеристична и кај технологијата на генетскиот инженеринг. Плевелот во земјоделството може значајно да го редуцира приносот на растителните култури. Затоа, земјоделците користат различни стратегии за контрола на плевелот, вклучувајќи примена на одобрени и регистрирани хербициди, плодоредење, како и генетски инженеринг. Денес се користат генетски модифицирани сорти од соја и канола кои содржат бактериски гени за резистентност кон хербициди, при што се овозможува зголемено растително производство со намалена примена на хемиски средства.

Главна загриженост за хербицид-резистентните растенија е веројатноста за пренесување на генот одговорен за толерантноста кај соседните плевели. На таков начин се стимулира размножување на плевелот поради стекнувањето на резистентност кон соодветниот хербицид. Сепак, плевелот може сè уште да се контролира со примена на други практики, како што се обработката на почвата или користењето на алтернативни хербициди. Развојот на резистентноста е чест феномен во земјоделството. Познато е дека трансферот на гените од едно на друго растение се случува преку поленот, како и преку вируси кои можат во природни услови да инфицираат едно растение, а потоа да се пренесат на друго растение. Исто така, постои загриженост за растенијата резистентни кон инсекти, бидејќи продуцентите на генетски модифицирана Bt пченка имаат обврска да посветат 20% од нивната земјоделска површина на нетрансформирани сорти на пченка.

7.5.4 Избор на консументи

Означувањето на храната во Канада и САД главно се базира на податоците за здравјето и нутритивниот состав. Сепак, постојат алтернативни системи на означување врз база на религиски преференци (пр. halal месо), начин на култивирање (пр. органска храна) или нутритивен состав (пр. ниска-масленост, ниска концентрација на сол). Со цел да се задоволат потребите на консументите, неопходно е да се врши означување на сите хранливи производи независно од методот што се применува за производство. Сепак, повеќето консументи ја избираат храната врз база на вкусот, цената и нутритивната содржина независно од научните препораки. Според тоа, правилата за обележување на храната треба да се прилагодат на сите овие вредности.

7.6 Бизнис и контрола

Во последните неколку децении, јавноста постојано предупредува за концентрирање на научната и технолошката компетентност од областа на земјоделската биотехнологија во приватниот сектор, особено во мултинационалните компании како Monsanto, Syngenta, DuPont и Bayer. Ова концентрирање на стручната експертиза во големите претпријатија има значајно влијание врз развојот на истражувачките приоритети во индустријализираните земји за сметка на загрозување на јавните добра.

Во 1912 година била објавена брошура за иновативна дејност на една нова компанија The Synthetic Products Company Ltd. во Велика Британија. Глобалниот недостаток на гума од 1907 до 1910 година бил вистински предизвик за европските научници за откривање на синтетски извор на гума и овој процес бил речиси пред откривање. Една научна група од Pasteur Институтот во Франција открила бактерија која има способност

за конверзија на скробот во мазут богат со амил алкохол и бутанол. Овие научни сознанија биле искористени од британската компанија и дизајнирале процес на конверзија на скробот до индустриски размери. Сепак, британските научници извршиле модификација на процесот на ферментација кон продукција на бутанол за производство на синтетска гума, како и ацетон како главна компонента на експлозивите кои во тоа време биле масовно увезувани во земјата.

Во капиталистичките друштва, бизнис секторот често пати се инволвира во иновациската дејност на научните установи. Денес, главен предизвик е да се пронајде рамнотежа помеѓу приватниот профит и јавното добро, како и да се споделуваат заклучоците од истражувањата на отворен и демократски начин. Земјоделците, преработувачите, дистрибутерите, како и другите учесници во растителното производство континуирано се стремат за подобрување на безбедноста, квалитетот и ефикасноста на снабдувањето со храна. Генетскиот инженеринг претставува ефикасна стратегија која може значајно да придонесе во оставрувањето на овие цели.

8. ЛІТЕРАТУРА

- Agrawal PK, Kohli A, Twyman RM, Christou P (2005): Transformation of plants with multiple cassettes generates simple transgene integration patterns and high expression levels. *Mol Breed* 16:247–260.
- Ait-ali T, Rands C, Harberd N (2003): Flexible control of plant architecture and yield via switchable expression of *Arabidopsis gai*. *Plant Biotechnol J* 1:337–343.
- Alba R et al (2004): ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: Tools for dissecting plant physiology and development. *Plant J* 39:697–714.
- Altpeter F, Baisakh N, Beachy R, Bock R, Capell T, Christou P, Daniell H, Datta K, Datta S, Dix PJ, Fauquet C, Huang N, Kohli A, Mooibroek H, Nicholson L, Nguyen TT, Nugent G, Raemakers K, Romano A, Somers DA, Stoger E, Taylor N, Visser R (2005): Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Mol Biol* 5:305–327.
- Badr YA, Kereim MA, Yehia MA, Fouad OO, Bahieldin A (2005): Production of fertile transgenic wheat plants by laser micropuncture. *Photochem Photobiol Sci* 4:803–807.
- Berg P, Baltimore D, Boyer HW, Cohen SN, Davis RW, Hogness DS, Nathans D, Roblin R, Watson JD, Weissman S, Zinder ND (1974): Letter: Potential biohazards of recombinant DNA molecules. *Science* 185:303.
- Bevan MW, Flavell RB, Chilton M-D (1983): A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304:184–187.
- Birch RG (1997): Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:297–326.
- Bock R, Khan MS (2004): Taming plasmids for a green future. *Trends Biotech* 22:311–318.
- Brand L, Hörler M, Nüesch E, Vassalli S, Barrell P, Yang W, Jefferson RA, Grossniklaus U, Curtis MD (2006): A versatile and reliable two-component system for tissue-specific gene induction in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141:1194–1204.
- Brandizzi F, Irons SL, Johansen J, Kotzer A, Neumann U (2004): GFP is the way to glow: bioimaging of the plant endomembrane system. *J Microsc* 214:138–158.
- Brodersen P, Voinnet O (2006): The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet* 22:268–280.
- Broothaerts W, Mitchell HJ, Weir B, Kaines S, Smith LM, Yang W, Mayer JE, Roa-Rodriguez C, Jefferson RA (2005): Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* 433:629–633.
- Bubner B, Baldwin IT (2004): Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant Cell Rep* 23:263–271.
- Burnette WN (1981): “Western blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195–203.
- Butaye KMJ, Cammune BPA, Delaure SL, De Bolle MFC (2005): Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. *Mol Breed* 16:79–91.
- Butaye KMJ, Goderis IJWM, Wouters PFJ, Pues JM-TG, Delaure SL, Broekaert WF, Depickers A, Cammue BPA, De Bolle MFC (2004): Stable high-level transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions. *The Plant J* 39:440–449.
- Castle LA, Siehl DL, Gorton R, Patten PA, Chen YH, Bertain S, Cho HJ, Duck N, Wong J, Liu D, Lassner MW (2004): Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene. *Science* 304:1151–1154.

- Chen L, Marmey P, Taylor NJ, Brizard JP, Espinoza C, D'Cruz, Huet H, Zhang S, de Kochko A, Beachy RN, Fauquet CM (1998): Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. *Nat Biotechnol* 16:1060–1064.
- Cheng M, Fry JE, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan Y (1997): Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 115:971–980.
- Chomczynski P (1993): One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal Biochem* 201:134–139.
- Christensen AH, Quail PH (1996): Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res* 5:213–218.
- Clark AJ, Warren GJ (1979): Conjugal transmission of plasmids. *Annu Rev Genet* 13:99–125.
- Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB (1973): Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3240–3234.
- Covello VT (1983): The perception of technological risks: A literature review. *Tech Forecasting Social Change* 23:285–297.
- D'Halluin K, Bonne E, Bossut M, De Beuckeleer M, Leemans J (1992): Transgenic maize plants by tissue electroporation. *Plant Cell* 12:1495–1505.
- Dale E, Ow D (1991): Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10558–10562.
- DeBlock M, De Brower D, Tenning P (1989): Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants. *Plant Physiol* 91:694–701.
- Durant J (1992): *Biotechnology in Public: A Review of Recent Research*. Science Museum London.
- Ball N (1992): *Essential connections: Past and future, technology and society in Beyond the Printed Page: Online documentation*. Proc 2nd Conf Quality in Documentation, Univ Waterloo, Waterloo, Ontario, pp 11–28.
- Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Endo S, Yamada K, Komamine A (2001): Systems for the removal of a selectable marker and their combination with a positive marker. *Plant Cell Rep* 20:383–392.
- El Ouakfaoui S, Miki B (2005): The stability of the *Arabidopsis* transcriptome in transgenic plants expressing the marker genes *nptII* and *uidA*. *Plant J* 41:791–800.
- Feinberg AP, Vogelstein B (1984): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum. *Anal Biochem* 137:266–267.
- Finer JJ, Finer KR, Ponappa T (1999): Particle bombardment mediated transformation. In *Plant Biotechnology: New Products and Applications*, Hammond J, Mc Garvey PB, Yusibov V (eds). Springer-Verlag, Heidelberg, pp 59–80.
- Fischhoff DA et al. (1987): Insect tolerant transgenic tomato plants. *Bio/Technol* 5:807–813.
- Flavell RB, Dart E, Fuchs RL, Fraley RT (1992): Selectable marker genes: Safe for plants. *Bio/Technol* 10:141–144.
- Fraley RT, Rogers SB, Horsch RB (1983): Use of a chimeric gene to confer antibiotic resistance to plant cells. *Advances in Gene Technology: Molecular Genetics of Plants and Animals*. Miami Winter Symposia, Vol 20, pp 211–221.
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Gallupi GR, Goldberg SB, Hoffman NL, Woo SC (1983): Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:4803–4807.
- Giddings G, Allison G, Brooks D, Carter A (2000): Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol* 18:1151–1155.

- Goderis IJ, De Bolle MF, Francois IE, Wouters PF, Broekaert WF, Cammue BP (2002): A set of modular plant transformation vectors allowing flexible insertion of up to six expression units. *Plant Mol Biol* 50:17–27.
- Gonsalves D (1998): Control of papaya ringspot virus in papaya: A case study. *Annu Rev Phytopathol* 36:415–437.
- Greenpeace (Oct 4, 2001): Fishtomato.com. Retrieved Oct 4, 2001.
- Gregory R, Slovic P, Flynn J (1995): Risk perceptions, stigma, and health policy. *Health Place* 2:213–220.
- Groth E (1991): Communicating with consumers about food safety and risk issues. *Food Technol* 45:248–253.
- Hadi MZ, MD McMullen, JJ Finer (1996): Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Rep* 15:500–505.
- Harrison, S. J., Mott, E. K., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J. C., & Cottage, A. (2006). A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant methods*, 2(1), 1-7.
- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA (2000): DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res* 10:1788–1795.
- Hashmi S, Ling P, Hashmi G, Reed M, Gaugler R, Trimmer W (1995): Genetic transformation of nematodes using arrays of micromechanical piercing structures. *BioTechniques* 19:766–770.
- Herrera-Estrella L, Depicker A, van Montagu M, Schell J (1983): Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303:209–213.
- Himmel ME, Ding SH, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, Foust TD (2007): Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315:804–807.
- Hofmann C, Vanderbruggen H, Höfte H, Van Rie J, Jansens S, Van Mellaert H (1988): Specificity of *Bacillus thuringiensis* endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7844–7848.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985): A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229–1231.
- James C (2005): Global Status of Biotech/GM Crops in 2005. ISAAA Briefs No. 34-2005: Executive Summary.
- Jefferson RA, Kavanaugh TA, Bevan MW (1987): GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901–3907.
- Johnston RF, Pickett SC, Barker DL (1990): Autoradiography using storage phosphor technology. *Electrophoresis* 11:355–360.
- Joshi L, Lopez LC (2005): Bioprospecting in plants for engineered proteins. *Curr Opin Plant Biol* 8:223–226.
- Kaeppler HF, Gu W, Somers DA, Rines HW, Cockburn AF (1990): Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells. *Plant Cell Rep* 9:415–418.
- Katavic V, Haughn GW, Reed D, Martin M, Kunst L (1994): In planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 245:363–370.
- Kelley J (1995): Public Perceptions of Genetic Engineering: Australia 1994. Australian Department of Industry, Science and Technology, Canberra.
- Kessler C, Economidis I (2001): EC Sponsored Research on Safety of Genetically Modified Organisms. A Review of Results. European Communities, Luxembourg.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.

- Langer PR, Waldrop AA, Ward DC (1981): Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6633–6637.
- Losey JE, Raynor LS, Carter ME (1999): Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* 399:214.
- Macilwain C (2003): Chinese agribiotech: Against the grain. *Nature* 422:111–112.
- Mariani C, De Beuckeleer M, Truettner J, Leemans J, Goldberg RB (1990): Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347:737–741.
- McHughen A (2006): Problems with the Cartagena Protocol. *Asia Pacific Biotech* 10:684–687.
- McKnight TE, Melechko AV, Griffin GD, Guillorn MA, Merkulov VI, Serna F, Hensley DK, Doktycz MJ, Lowndes DH, Simpson ML (2003): Intracellular integration of synthetic nanostructures with viable cells for controlled biochemical manipulation. *Nanotechnology* 14:551–556.
- Melechko AV, Merkulov VI, McKnight TE, Guillorn MA, Klein KL, Lowndes DH, Simpson ML (2005): Vertically aligned carbon nanofibers and related structures: Controlled synthesis and directed assembly. *J Appl Phys* 97:41301.
- Memelink J, Swords KMM, Staehelin LA, Hoge JHC (eds) (1994): *Southern, Northern and Western Blot Analysis*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 1-F1:1–23.
- Miki B, McHugh S (2004): Selectable marker genes in transgenic plants: Applications, alternatives and biosafety. *J Biotechnol* 107:193–232.
- Mlynárová L, Hricová A, Loonen A, Nap J-P (2003): The presence of a chromatin boundary appears to shield a transgene in tobacco from RNA silencing. *Plant Cell* 15:2203–2217.
- Murai N, Sutton DW, Murray MG, Slightom JL, Merlo DJ, Reichert NA, Sengupta-Gopalan C, Stock CA, Barker RF, Kemp JD, Hall TC (1983): Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. *Science* 222:476–482.
- National Research Council (NRC) (1987): *Introduction of Recombinant DNA-engineered Organisms into the Environment, Key Issues*. White paper, National Academies Press, Washington, DC.
- National Research Council (NRC) (2004): *Safety of Genetically Engineered Foods*. National Academies Press, Washington, DC.
- Nordlee JA, Taylor SL, Townsend JA, Thomas LA, Bush RK (1996): Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *New Engl J Med* 334:688–692.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (1982): *Biotechnology, International Trends and Perspectives*.
- Ow D, Wood KV, DeLuca M, DeWey JR, Helinski DR, Howell SH (1986): Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234:856–859.
- Paine JA et al (2005): Improving the nutritional value of Golden Rice through increased provitamin A content. *Nat Biotechnol* 4:482–487.
- Pawlowski WP, Somers DA (1998): Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:12106–12110.
- Potrykus I (1991): Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42:205–225.
- Powell DA, Leiss W (1997): *Mad Cows and Mother's Milk*. McGill-Queen's Univ Press, pp 123–152.
- Reece RJ (2004): *Analysis of Genes and Genomes*. Wiley, Chichester, UK.
- Reed J, Privalle L, Powell ML, Meghji M, Dawson J, Dunder E, Suttie J, Wenck A, Launis K, Kramer C, Chang Y-F, Hansen G, Wright M (2001): Phosphomannose isomerase: An efficient selectable marker for plant transformation. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 37:127–132.

- Rhee SY, Dickerson J, Xu D (2006): Bioinformatics and its applications in plant biology. *Annu Rev Plant Biol* 57:335–360.
- Rommens CM, Humara JM, Ye J, Yan H, Richael C, Zhang L, Perry R, Swords K (2004): Crop improvement through modification of the plant's own genome. *Plant Physiol* 135:421–431.
- Ronald PC (1997): Making rice disease-resistant. *Sci Am* 277:100–105.
- Sambrook J, Russell DW (2001): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanders PR, Winter JA, Zarnson AR, Rogers SG, Schaffner W (1987): Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic Acids Res* 15:1543–1558.
- Sandman PM (1987): Risk communication: Facing public outrage. *EPA J* 13:21.
- Schell J, van Montagu M, Holsters M, Zambryski P, Joos H, Inze D, Herrera-Estrella L, Depicker A, de Block M, Caplan A, Dhaese P, Van Haute E, Hernalsteens J-P, de Greve H, Leemans J, Deblaere R, Willmitzer L, Schroder J, Otten L (1983): Ti plasmids as experimental gene vectors for plants. *Advances in Gene Technology: Molecular Genetics of Plants and Animals. Miami Winter Symposia*, Vol 20, pp 191–209.
- Scherzinger CA, Ladd C, Bourke MT, Adamowicz MS, Johannes PM, Scherzinger R, Beesley T, Lee HC (1999): A systematic analysis of PCR contamination. *J Forens Sci* 44:1042–1045.
- Shah D et al (1986): Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233:478–481.
- Sheen J (2001): Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Physiol* 127:1466–1475.
- Sheng Y, Mancino V, Birren B (1995): Transformation of *Escherichia coli* with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic Acids Res* 23:1990–1996.
- Southern EM (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503–517.
- Stephanopoulos G (2007): Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Science* 315:801–804.
- Stewart CN Jr (2001): The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Rep* 20:376–382.
- Stewart CN Jr (2006): Go with the glow: Fluorescent proteins to light transgenic organisms. *Trends Biotechnol* 24:155–162.
- Stougaard J (1993): Substrate-dependent negative selection in plants using a bacterial cytosine deaminase gene. *Plant J* 3:755–761.
- Svab Z, Maliga P (1993): High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:913–917.
- Taylor NJ, Fauquet CM (2002). Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA Cell Biol* 21:963–977.
- Thomas PS (1980): Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:5201–5205.
- USDA/NASS (2006): <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/nass/Acre//2000s/2006/Acre-06-30-2006.pdf>.
- Vain P, McMullen MD, Finer JJ (1993): Osmotic treatment enhances particle bombardment mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Rep* 12:84–88.
- Vaucheret H (1994): Promoter-dependent trans-inactivation in transgenic tobacco plants; kinetic aspects of gene silencing and gene reactivation. *CR Acad Sci* 317:310–323.
- Waldron C, Murphy EB, Roberts JL, Gustafson GD, Armour SL, Malcolm SK (1985): Resistance to hygromycin B. *Plant Mol Biol* 5:103–108.

- Weigel D, Glazebrook J (eds) (2002): *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 1–354.
- Wenck A, Pugieux C, Turner M, Dunn M, Stacy C, Tiozzo A, Dunder E, van Grinsven E, Khan R, Sigareva M, Wang WC, Reed J, Drayton P, Oliver D, Trafford H, Legris G, Rushton H, Tayab S, Launis K, Chang YF, Chen DF, Melchers L (2003): Reef-coral proteins as visual, non-destructive reporters for plant transformation. *Plant Cell Rep* 22:244–251.
- Ye X, Al-Babili S, Klotz A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I (2000): Engineering provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287:303–305.
- Zuo J, Niu Q-W, Ikeda Y, Chua N-H (2002): Marker-free transformation: Increasing transformation frequency by the use of regeneration-promoting genes. *Curr Opin Biotechnol* 13:173–180.
- Zuo J, Niu Q-W, Moller SG, Chua N-H (2001): Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nature Biotechnol* 19:157–161.