

YU ISSN 0002-1954

UDC 631.52.523.11.528 = 861

**POTENCIJALNE MOGUĆNOSTI UPOTREBE GENETSKOG
INŽENJERINGA U BILJNOJ PROIZVODNJI***

**POSSIBILITY OF APPLYING OF GENETIC ENGINEERING
IN CROP PRODUCTION**

Katarina Borojević

UVOD

Genetski inženjering je direktna manipulacija genetskim materijalom. On uključuje unošenje poželjnih gena, iz jednog organizma u drugi, kao i unošenje novih gena sintetisanih hemijskim putem. Npr. unošenje humanih, životinjskih i biljnih gena u bakterije i obratno, ili unošenje poželjnih sintetisanih gena u razne organizme. Prema sadašnjim naučnim dostignućima, gotovo svaki gen mogao bi biti sintetisan u laboratoriji, kloniran (tj. genetski identično umnožen) i prenešen u prokariotske i eukariotske ćelije. Do sada je izdvojeno i nalazi se u kolekcijama već hiljade gena čoveka, vinske mušice i hiljade gena raznih virusa, kvasca, gljiva, bakterija i biljaka. Danas se genetski inženjering koristi u proizvodnji lekova, oplemenjivanju bilja, organskim sintezama kontroli zagađene sredine i razrađuje se metode za primenu u oplemenjivanju bilja.

Procenjuje se, da će rezultati genetskog inženjeringa u navedenim granama u 2.000 godini donositi prihode od nekoliko milijardi dolara u SAD. Francuska i Britanska vlada osnovale su kompanije u koje ulažu društvena sredstva za razvoj genetskog inženjeringa i njihovu primenu u biotehnologiji. Japanska vlada odredila je biotehnologiju kao primarni nacionalni i komercijalni zadatak. Velike američke kompanije potpisale su već ugovore sa najčuvenijim univerzitetima za primenu genetskog inženjeringa, a poslednjih godina osniva se veliki broj malih kompanija oko čuvenih univerziteta, kako bi dobile prve informacije o istraživanjima na genetskom inženjeringu.

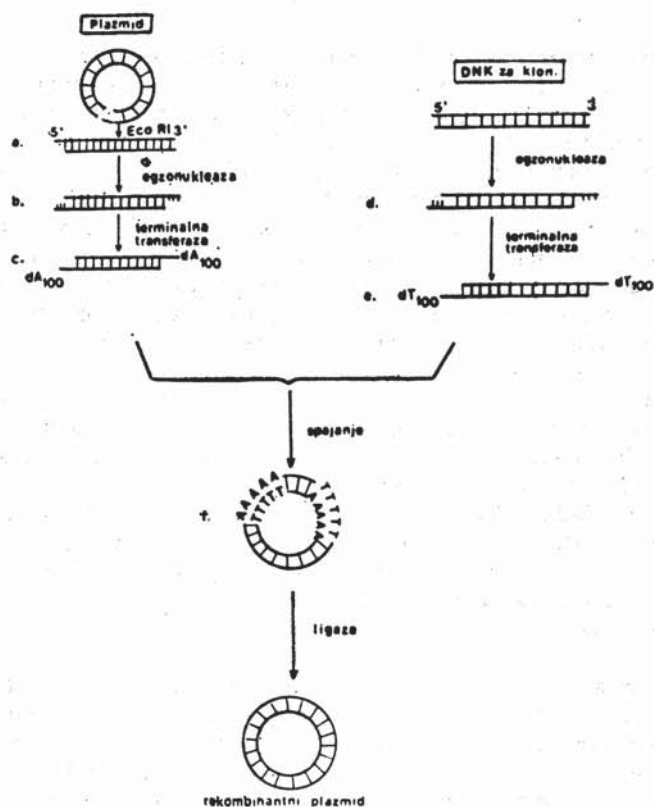
Organizacija Ujedinjenih nacija za industriju i razvoj (UNIDO) organizovala je međunarodni centar za genetski inženjering u biotehnologiji, kako za razvoj tehnika tako i transfer znanja u zemljama u razvoju. Jedan od njih nalazi se u Bombaju (Indija), a drugi u Trstu, i vlada SFRJ je jedan od osnivača. U Beogradu je osnovan Institut i Konzorcijum za genetski inženjering i biotehnologiju.

* Predavanje održano na Znanstveno-stručnom savetovanju agronoma od 2. do 7. 2. 1987. god. u Dubrovniku.

PRIMENA GENETSKOG INŽENJERINGA

Otkrića koja su prethodila primeni genetskog inženjeringa

Pedesetih godina ovog veka otkrivena je struktura *desoksidribonukleinske kiseline* — DNK (Watson i Crick, 1953) i dokazano da je ona nosilac naslednih informacija odnosno gena. Otkrivena je struktura gena i genetski mehanizmi (Jacob i Mond, 1961). Sedamdesetih godina izoluju se restrikcioni enzimi koji deluju kao hemijske makaze, razdvajajući molekulu DNK na određenim mestima (Smith i Wilcox 1970). Ova otkrića omogućila su da se DNK iseče na delove, veličine pojedinih gena, a zatim da se ti delovi ponovo rekombinuju i sastave u novi lanac — rekombinantne DNK. Ove metode omogućile su i rekombinaciju delova DNK iz genetskih nesrodnih organizama, (na primer DNK iz bakterija sa DNK iz biljaka). Međutim, da bi se lanac DNK mogao replicirati, bilo ga je potrebno ubaciti u živu ćeliju. To je učinjeno preko *plazmida* (Cohen et al. 1973).



Sl. 1. STVARANJE REKOMBINANTNOG PLAZMIDA
Construction of recombinant plasmide
(U Goodenough, 1978 iz knjige *Geni i populacija* Katarine Borojević 1978)

Stvaranje rekombinantne DNK pomoću plazmida

Plazmidi su cirkularne molekule DNK sposobne da se repliciraju. Nalaze se skoro u svim mikroorganizmima odvojeni od glavnog hromozoma i ponašaju se kao *mini hromozomi*. Radi ovakvih svojih karakteristika *plazmidi* se upotrebljavaju kao nosioci novo ugrađenih gena ali i kao prenosiooci gena — vektori — iz jednog organizma u drugi (Cohen et al. 1973).

Slika 1. prikazuje jedan od načina stvaranja rekombinantne DNK, (po N. Godenough 1978, iz knjige K. Borojević Geni i populacija 1986).

Delovanjem restrikcionog enzima, npr. Eco RI (dobivenog iz bakterije *E. coli* *plazmid* se seče na specifičnom mestu i to 5'G AATTC 3'. Nakon presecanja, *plazmid* dobiva linearnu formu. Linearizovani *plazmid* tretira se sa egzonukleazom (dobivenom iz delta faga) koja napada i razgrađuje 5'krajeve duplog DNK lanca i stvara jednostruke krajeve DNK lanca na 3'kraju (sl. 1 b).

Ovim krajevima dodaju se nosači poly-A uz posredstvo enzima terminalne transferaze (sl. 1 c).

Istovremeno se DNK u kojoj se nalazi gen koji se želi ugraditi u *plazmid*, tretira sa egzonukleazom, a zatim sa terminalnom transferazom (sl. 1d). U ovom slučaju terminalna transferaza snabdevena je samo sa TTP i zato dodaje odsečke poly-T na 3'kraju DNK.

Kada su oba procesa završena, pomešaju se fragmenti obe DNK. Poly-A odsečki koji su bili na kraju *plazmida* se spoje sa poly-T odsečcima DNK, stvarajući cirkularnu strukturu, koja se u krajnjoj stepenici kovalentno povezuje pomoću enzima ligaze. Na taj način stvoren je *rekombinantni plazmid* — odnosno *himerni plazmid* ili *transek plazmid*.

U *plazmid* se može ubaciti izolirana DNK iz nekog organizma ili sintetisana DNK, jer svaki gen čija je poznata struktura može se sintetizirati u laboratoriji (Itakura, 1977).

Himerni *plazmid* ubacuje se natrag u bakteriju (na pr. *E. coli*) i dobiva se transformisana bakterija sa novim genom. Razmnažanjem transformisane bakterije sa linernim *plazmidom* klonira se i gen unesen u *plazmid*. Za industrijsku proizvodnju potrebno je stvoriti dobre uslove za razmnožavanje transformisanih bakterija, pa da ubačeni gen dođe do izražaja i proizvede određeni protein. Rekombinantnom DNK tehnikom danas se proizvode hormoni rasta, humani inzulin, razne vakcine, interferon, antigeni virusa, sredstva za biološku zaštitu, i dr.

Pomoću metodike rekombinantne DNK, ali komplikovanijom tehnikom stvoren je gigantski miš sa genom za rast pacova (Pallmiter et al. 1982). Ove metode primenjuju se već i kod goveda. Ideja je, da se ubacuju i drugi geni kao na primer, gen za interferon, pa da krave daju mleko koje će sadržavati interferon.

Genetski inženjering u oplemenjivanju bilja

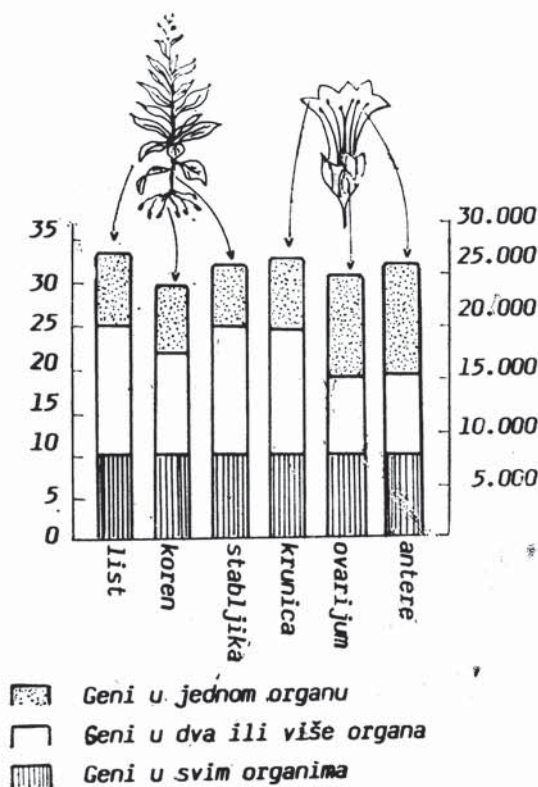
Za primenu genetskog inženjerstva kod biljaka potrebni su *donori gena*, *vektori gena* ili razrađene metode za prenošenje gena, i *recipijenti gena*.

Donori gena

Donori gena su organizmi, koji nose određene poželjne gene. Kod biljaka to mogu biti geni za otpornost prema bolestima, herbicidima, zatim kvalitet i drugi geni koji se ne mogu preneti klasičnim metodama (kao što je hibridizacija). Veliki je uspeh prenošenja bakterijskih gena u biljne sisteme.

Organizacija gena kod biljaka

Organizacija gena kod biljaka je vrlo kompleksna. Biljke, kao npr. duvan sadrže oko 100.000 gena koji se aktiviraju u određenoj fazi razvića biljke, tako da je samo 5% DNK koji sadrži nukleus aktiviran u isto vreme. Oko 25.000 gena aproksimativno je aktivirano u svakom organu biljke duvana, listu, stabljici, cvetovima (sl. 2). Zato nije dovoljno samo izolirati gene, nego se moraju naći sekvence DNK, koje će dati instrukcije određenom genu, da dođe do ekspresije u listu ili korenu u određeno vreme, odnosno u određenoj fazi razvoja biljke.



Sl. 2. EKSPRESIJA GENA KOD BILJAKA
Expresion of gene at plants
(Coldberger, 1985)

Svaki gen ima najmanje tri regiona, početni deo ili *promotor*, tj. seriju nukleotida potrebnih za transkripciju DNA u RNA. *Srednji deo gena* sadrži *kod*, koji daje informaciju za proizvodnju specifičnog proteina. Krajnje sekvencije nukleotida predstavljaju *gen terminator* koji daju signal za završetak transkripcije.

Da bi se geni mogli izolirati, DNK donora iseca se restrikcijom enzimima, da bi se proučila varijabilnost u strukturi DNK na nivou parova baza. (Ove analize nazivaju se RFLP, a dolazi od engleske reči Restriction fragment length polymorphisms). Zatim se vrši izolacija pojedinih fragmenata koji nose određene gene.

Geni se nalaze i izvan nukleusa. Npr. DNK hloroplasta i mitohondrija kodira peptide koji su uključeni u razne procese kao što je respiracija, fotosinteza, sinteza ATP i dr. Takođe mnoga svojstva, kao što su muška sterilnost, rezistentnost na pojedine herbicide, locirani su na organelama DNK u citoplazmi. Zato su istraživanja usmerena i na prenos organela sa somatskom hibridizacijom, tzv. citohibridizacijom, što je kod biljaka jednostavnija metoda nego rekombinantna DNK.

Vektori

Ti plazmid

Do sada najčešće upotrebljavan vektor kod biljaka je *Ti plazmid* koji se nalazi u *Agrobacterium tumefaciens*. *Ti plazmid*, je cirkularna molekula DNK, molekulske težine 1.2×10^6 što iznosi 3 do 5% agrobakterijskog hromozoma. Prilikom infekcije biljaka sa *Agrobacterijumom*, plazmid koji integrira deo svoje DNK u hromozom ćelije domaćina, izaziva tumor, ali ćelije domaćina ostaju transformisane i kad se iz njih uklone bakterije antibioticima. Inficirane ćelije sa *A. tumefaciensom* proizvode aminokiseline *opine* — oktopinine ili nopaline. (*Opini* su derivati arginina, nikad se ne nalaze u zdravim ćelijama).

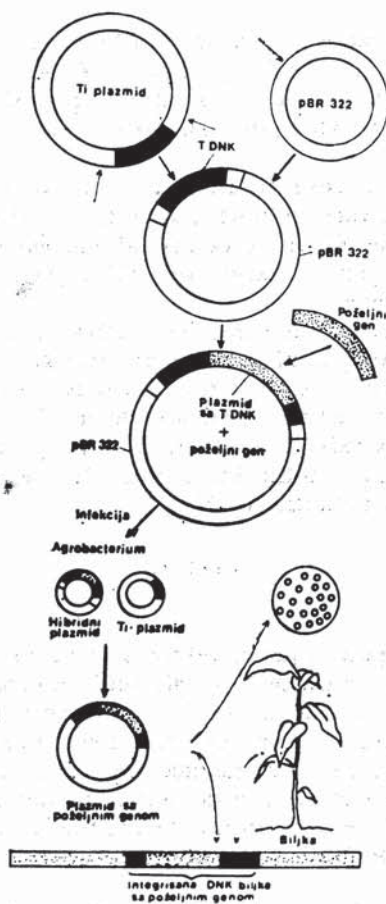
Ti plazmid ima nekoliko osobina po kojima je postao vektor za prenošenje gena u biljke:

— *Agrobacterijum tumefaciens* živi na velikom broju biljaka i u mogućnosti je da transformiše dikotiledone, i može da transformiše i monokotiledone, ali ne stvara tumore na njima (**Hooykaas-Van Slogtenen et al. 1984, Graves, 1986**).

Integrirana DNK *Ti plazmida* (*T-DNK*) nasleđuje se na mendelovski način. Njegovi geni takođe imaju svoje vlastite promotore za koje se strani geni mogu vezati i doći do ekspresije.

Najjednostavniji način da se *T-DNK* unese u biljku je infekcija sa *A. tumefaciensom*, koji sadrži odgovarajući *Ti plazmid* i dozvoljava mu, da se smesti u ćeliju biljke (sl. 3). Međutim, *Ti plazmid* je jako velika molekula koja se obično ne upotrebljava u rekombinantnoj DNK tehnici, pa se zato *Ti* region iseče iz *Ti plazmida* sa restrikcijom enzimom. Isečeni *Ti* region se unese u vektor-plazmid pBR 322.

Sledeći korak je insercija poželjnog gena u plazmid pBR322, upotrebom restriktivnih enzima i rekombinantne DNK tehnike. Tako se dobiva hibridni plazmid pBR322 sa *T-DNK* i poželjnim genom (koji se može klonirati u *E. coli*).



Sl. 3. PRIMENA GENETSKOG INŽINJERINGA KOD BILJAKA

Applying of genetic engineering in plants

(J. D. Watson i sar. 1983 iz knjige *Geni i populacija*, Katarina Borojević, 1986)

Hibridni plazmid se zatim pomeša sa kolonijama *Agrobacteriuma*, koji sadrži normalne-native *Ti* plazmide. Homolognom rekombinacijom segmenta T-DNK iz normalnog *Ti* plazmida i T-DNK sa poželjnim genom iz hibridnog plazmida dobivaju se i *Ti* plazmidi sa poželjnim genom u *Agrobacteriumu*.

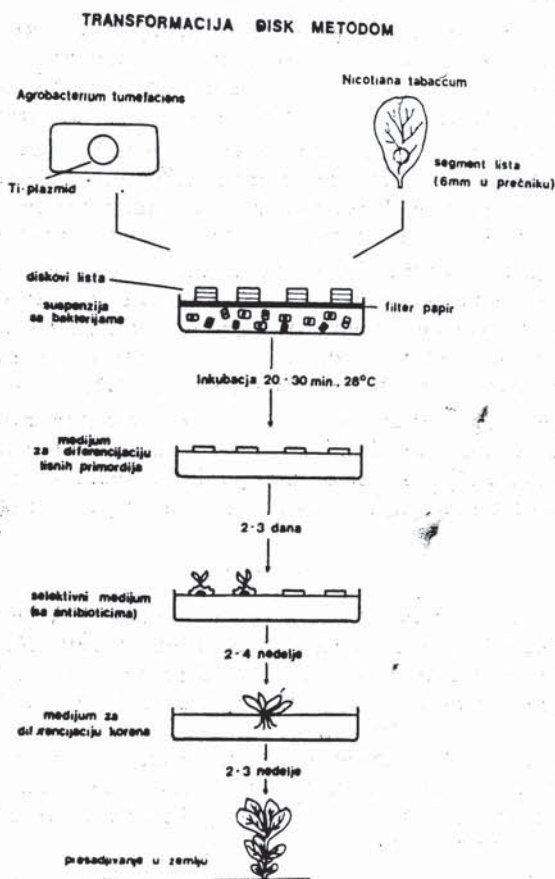
Agrobacterium koji nosi hibridni plazmid sa poželjnim genom koristi se za inficiranje celih biljaka ili protoplasta iz kojih se kasnije mogu razviti cele biljke.

Najjednostavniji metod za transformaciju biljaka pomoću *Ti* plazmida je tzv. *disk metod* (Horsh, 1985 i sar.) i primenjuje se i u našoj laboratoriji. *Disk metod* sastoji se u sledećem: iz listova na primer duvana izrežu se diskovi 6 mm u prečniku. Diskovi se inficiraju sa *Agrobacteriumom* koji nosi hibridni plazmid sa himernim poželjnim genom za otpornost na anti-

biotike. U ovom slučaju na antibiotike **kanamicin i karbamicin**. Pomoću selektivnog medijuma, kojem se dodaju ovi antibiotici, preživljavaju samo one biljke koje nose rezistenciju na navedene antibiotike, jer je samo kod njih došlo do transformacije genskog materijala (slika 4). Ovde su antibiotici upotrebljeni kao selekcionni agensi jer se pomoću njih otkrivaju transformisane biljne ćelije. Regeneracija biljaka na pr. kod **Nicotiana plumbaginifolia** iz diskova lista traje 28—30 dana, a ceo eksperiment oko 3 meseca. (Borojević Katarina, Soltes-Rak Erika 1986). Želja je da se u himerni plasmid ubaci i poželjni gen, a geni za antibiotike da služe samo kao geni markeri.

Do sada su ovim načinom dobivene transformisane biljke petunije, paradajza, krompira, deteline, soje šećerne repe (Schell, 1986).

Pored *Agrobacteriuma*, kod biljaka kao vektor mogu da se upotrebe i virusi i viroidi. Tako je za transformaciju kod žitarica pokušana upotreba virusa »wheat dwarf virus« koja izaziva sniženje stabljike.



Sl. 4. TRANSFORMACIJA BILJKE DISK METODOM
Transformation of tabacum plant by disc method
Horsh et al, 1985 (Borojević Katarina i Soltes Rak, Erika, 1987.)

Direktna mikroinjekcija DNK u biljne protoplaste može se danas primeniti kod biljnih vrsta koje se regenerišu iz protoplasta ili se mikroinjekcija vrši u mikrosporu u polenovom zrnu ili u mlad nediferenciran embrion.

Radi se takođe na upotrebi *transponsona* tj. mobilnih DNK sekvenci, koji se kreću po hromosomima biljaka, kao npr. Ac-Ds elemenata kod kukuruza (Barbara Mc Clintock, 1958, Bur & Bur 1981, Flavell 1984).

Genetski inženjering u ratarskoj proizvodnji

Nif geni

Na korenju leguminoza kao što su grašak, detelina, pasulj, nalaze se kvržice koje mogu fiksirati azot. Te kvržice su izazvane različitim sojevima bakterija **Rhizobiuma**. Biljke inficirane dobrim sojem **Rhizobiuma** rastu dobro, koristeći azot iz vazduha za ishranu.

Želja je da se metodama genetskog inženjerstva prenesu geni za azotofiksaciju tj. *nif geni* iz bakterija koje imaju sposobnost fiksiranja azota iz vazduha u biljke koje nemaju tu sposobnost, npr. pšenicu ili kukuruz, ili u bakterije oko njihovih korena, da bi se smanjila upotreba azotnih hraniva.

Simbioza bakterija i domaćina je vrlo specifična. Svako biljci odgovara određeni soj **Rhizobiuma**. Tu specifičnost simbioze određuje gen koji se nalazi u plazmidu bakterije. Neki plazmidi se mogu preneti iz jednog specijesa **Rhizobiuma** u drugi i time promeniti specifičnost simbioze.

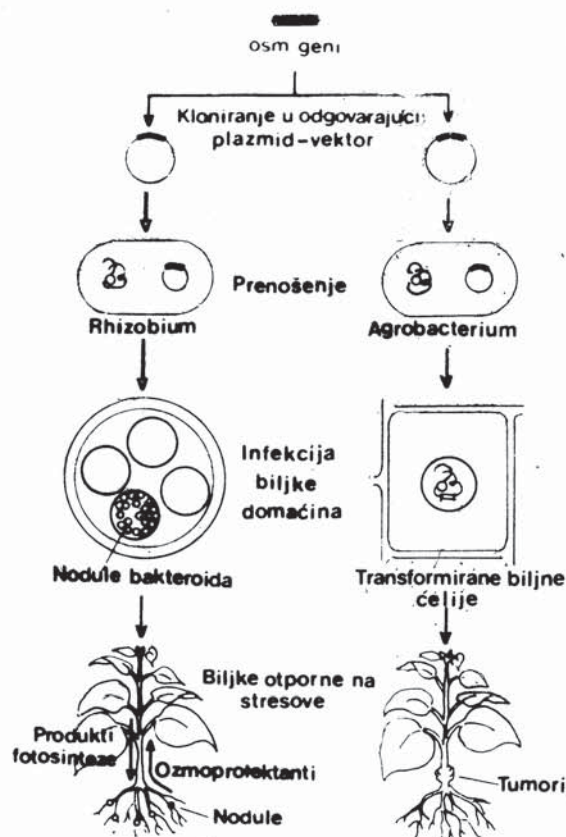
Analiza rekombinantne DNK pokazala je da ceo region za simbiozu zahvata oko 50.000 baznih parova DNK. Geni za stvaranje kvržica i specifičnost domaćina nalaze se između dve grupe gena za fiksaciju azota. Takođe nekoliko gena ovih bakterija odgovorni su za stvaranje kvržica i za specifičnost domaćina (Johnston 1983; Verma i Long, 1983).

Poznavanje ovog mehanizma omogućuje stvaranje **Rhizobiuma** sa boljim karakteristikama, kako za simbiozu, tako i za fiksiranje azota, samo zahteva dug proces istraživanja. Za sada mnogo bolji rezultati postignuti su prenosom gena za azotofiksaciju iz jednog soja bakterija u drugi.

Osm geni

Biljke su u sposobnosti da razviju mehanizme u kojem se brane od stresova sredine, kao što je to suša ili zaslanjenost zemljišta. U tako stresnim situacijama ćelije biljaka razvijaju osmoproteinske molekule kao što su *glicin betain*, *prolin betain* i dr. Ove molekule nakupljaju se u biljnim ćelijama da bi sprečile dehidraciju ćelija i balansirale osmotski pritisak citoplazme sa sredinom. Nakupljanje glicin betaina i prolin betaina je i u korelaciji sa osmotskim pritiskom sredine u kojoj se nalazi sodijum hlorid koji izaziva zaslanjenost zemljišta. Geni koji kodiraju ove proteine označeni su *osm genima* (Valentine 1984).

Osm geni mogu se ugraditi u plazmide gde se mogu kombinovati sa *nif genima*, pa čak i sa genima za otpornost prema patogenima. Slika 5 prikazuje dva sistema — *Risobiuma* i *Agrobacteriuma* koji se mogu upotrebiti za prenošenje gena za otpornost prema stresovima. Međutim, ostaje



Sl. 5. PRENOŠENJE GENA POMOĆU SISTEMA RISOBIUM-AGROBACTERIUM
 Transfer of genes by system *Risobium-Agrobacterium*
 (Valentine, 1984 — prerađeno)

još da se reši, dovoljna ekspresija *osm gena*, gena za otpornost, kao i dovoljna energija za fiksaciju azota u biljkama u koje se prenose.

Genetski inženjering u zaštiti bilja

Otpornost na herbicide

Otpornost biljaka prema herbicidima postaje potreba moderne proizvodnje, naročito za pojedine biljne kulture. Na pr. herbicidi na bazi atrazina upotrebljavaju se za uništavanje korova u kukuruzu, ali rezidue takvih herbicida mogu ostati u zemlji i izazvati problem na sledećem usevu, na pr. soje koja je neotporna prema ovim herbicidima.

Otpornost na herbicide kod biljaka je posledica stvaranja specifičnih proteina koji inhibiraju delovanje herbicida ili koji vrše detoksifikaciju

herbicida. Geni koji daju informacije o sintezi takvih proteina mogu se izolovati iz različitih donora i preneti u biljke. Evo nekoliko primera:

Herbicidi na bazi glifosfata deluju na taj način što inhibiraju aktivnost enzima EPSP sintetaze (5-enolpiruvil-3-fosfat kimat-sinteza) koja je potrebna za stvaranje esencijalnih aminokiselina za razvoj biljaka (fenilalanina, tirozina i triptofana), pa kod većih doza ovi herbicidi dovode do uginuća biljke koje sačinjavaju usev, a da korove ne unište. Već je izoliran mutantni gen **aro A** za EPSP sintetazu iz bakterija Salmonelle (**Comai et al 1985**) koje su bile otporne na herbicide. Mutantna EPSP sintetaza razlikovala se od normalne EPSP sintetaze u jednoj aminokiselini (prolin je bio zamenjen serinom), a to je bilo dovoljno da učini i biljke manje osetljivom na herbicide. Mutantni gen iz Salmonella prenesen u Ti plazmid, koji je sa Agrobacteriumom tumefaciensom prenesen u duvan. Duvan je nakon transformacije pokazivao veću otpornost prema herbicidima.

Ili drugi primer, iz Petunije hibride, otporne na ove herbicide izolovan je gen za EPSP (**Shah et al. 1986**) koji se amplicira tj. ponavlja 20 puta. Tako amplificiran gen unet je u neotporne petunije. Otpornost transformisanih biljaka povećala se 4 puta.

Očekuje se, da će geni za otpornost na herbicide biti preneseni u soju, pamuk, paradajz i druge osetljive biljke.

Otpornost na insekte i gljive

Na izolaciji gena za otpornost protiv bolesti i insekata mnogo se radi kako u naučnim institutima tako i u laboratorijama velikih proizvođača sredstava za zaštitu bilja. Međutim, obzirom na poligeni karakter otpornosti, kao i interakcije biljaka sa sredinom u kojoj se uzgajaju, i pojavom novih fiizoloških rasa i patogena, ovaj rad je otežan. Zato pokraj izolacije gena za otpornost na pojedine patogene prilazi se i posredno, unošenjem gena koji su toksični za insekte u biljkama. Tako je pokušano da se jedan kristalni protein — toksin iz Bacillus thurgensis prenese u biljke. Ovaj toksin deluje protiv mnogih fitofagnih lepidoptera (**Mansfield 1982**).

Ukoliko se radi o virusnim bolestima primenjuje se tzv. unakrsna infekcija blagim virusom, koji sprečava ponovnu infekciju jače virulencije (**Mathews, 1981**). Ovaj način zaštite već se primenjuje kod paradajza da bi se zaštitio od infekcije virulentnih sojeva virusa duvana.

Metoda rekombinantne DNK takođe omogućuje brzu dijagnozu biljnih bolesti izazvanih virusom, tako neophodne kod biljaka koje se razmnožavaju vegetativno.

Led bakterije

Bakterije pseudomonasa žive normalno u prirodi na biljkama, i u proleće one pospešuju smrzavanje biljaka, jer služe kao jezgro, oko koga se stvaraju kristali leda. Krajem sedamdesetih godina (**Lindaw et al. 1978**) metodama genetskog inženjerstva uklonjen je gen za stvaranje leda i na taj način stvorene su *led bakterije* koje su stvarale kristale leda tek na -4°C , što je bilo dovoljno da se izbegne oštećenje od prolećnih mrazeva. Na bazi ovih bakterija stvoreno je biološko sredstvo za zaštitu protiv mraza

i poprskane su biljke u Kaliforniji u SAD. Nakon prskanja, led bakterije potisnule su prirodnu populaciju i zaštitile biljke od smrzavanja na 0°C. Međutim, postavilo se pitanje njihovog uticaja na prirodne populacije i promenu mikroklimu u sredini u koju su puštene.

Gen za luciferazu

Gen za luciferazu koji izaziva svetlucanje insekata svitaca u mraku izolovan je iz insekata *Photinus pyralis* (OW, et al. 1986.). Ovaj gen je ugrađen u *Ti plazmid* i prenesen u duvan. Transformisane biljke duvana su svetlucale u mraku slično kao svici. Svakako je interesantna proizvodnja biljaka koje svetlucaju u mraku, naročito za hortikulturu, ali želje istraživača su bile sasvim druge. Gen za luciferazu ugrađen je u *Ti plazmid* da bi služio kao marker za druge gene, koji se prenose u biljke, jer transformisane biljke koje svetlucaju u mraku, mnogo je lakše selekcionirati.

TRANSFORMISANE BILJKE, SELEKCIJA I SEMENARSTVO

Transformisane biljke koje nose nove gene ugrađene genetskim inženjeringom predstavljaju nove genotipove. One se mogu umnožavati vegetativno i generativno i nemaju nikakve opasnosti za sredinu u kojoj se uzgajaju. Ako se razmnažaju vegetativno, mogu se zaštititi posebnim omotačem i tako dobiti tzv. sintetsko seme.

Ako se transformisana biljka želi razmnožiti generativno preko semena, proces proizvodnje transformisanog semena zavisiće o tome, da li je gen ugrađen u hromozome ili u citoplazmu. Ako je ugrađen u hromozom nasleđuje se mendelovski tj. u sledećoj generaciji dolazi do genetskog razdvajanja na primer 3:1. Zato je nakon prenosa gena potrebna selekcija kao i nakon hibridizacije. Ako se geni prenose samo u citoplazmu, iz njih uzgojene biljke mogu se razmnožavati vegetativnim putem, ili generativnim putem, ali metodama koje se upotrebljavaju kod citoplazmatskog nasleđivanja.

U semenarstvu metode rekombinantne DNK omogućuju otkrivanje promena na lancu DNK na nivou para baza. Ove metode su korisne za identifikaciju kako homozigotnih tako i heterozigotnih genotipova.

TRANSFORMISANI ORGANIZMI I ZAŠTITA SREDINE

Kako je napred rečeno transformisane biljke ne predstavljaju nikakvu opasnost za sredinu u kojoj se uzgajaju, nasuprot transformisanim mikroorganizmima.

Transformisani mikroorganizmi kada se puštaju u prirodne uslove izmešaju se sa divljim populacijama mikroorganizama s kojima mogu da izmenjuju svoj genetski materijal i na taj način i transformisane gene, koje nekontrolisano šire u prirodnim populacijama. Budući da nisu poznate posledice širenja transformisanih individua u prirodi, ekolozi u mnogim zemljama su jako zabrinuti za njihovo širenje. (Npr. prskanje sa led-bakterijama bilo je zabranjeno u Kaliforniji).

KULTURA TKIVA I GENETSKI INŽENJERING

Genetski inženjering je usko povezan sa uzgojem biljaka iz kulture tkiva, jer transformiranje biljnih ćelija često zahteva rad u kulturi, bilo za uzgajanje biljaka pre ili posle transformacije. Isto tako i sama kultura tkiva može biti izvor nove genetske varijabilnosti. Naime, u kulturi često dolazi do reorganizacije genetskog materijala, koji se pojavljuje spontano za vreme regeneracije biljaka.

Reorganizacija genetskog materijala izazvana je hromozomskim ili genskim promenama. Najčešće hromozomske mutacije u kulturi in vitro su poliploidi i aneuploidi. Poliploidi su obično posledica endoreduplikacije, jer deobeno vreteno ne sledi deobu nukleusa. Aneuploidi su posledica nepravilnih deoba ćelija u mitozu.

Većina genskih mutacija su male definicije i duplikacije. Ove mutacije mogu biti izazvane komponentama medijuma ili uslovima uzgajanja, ali često su posledica mutacija koje su se već nalazile u genomu, za čiju je ekspresiju bila potrebna određena sredina. Varijabilnost koju izazivaju ove promene zove se somaklonalna varijabilnost. Ova varijabilnost ponekad je toliko velika, da se može koristiti direktno za selekciju. Obzirom da u jednoj petri-šolji na hranivom medijumu može rasti 1.000 i više ćelija, dodavanjem hranljivom medijumu određenih biohemijskih agenasa ili toksina gljiva može se izvršiti selekcija, jer samo rezistentne ćelije ili kalusi mogu preživeti tretman. Ukoliko bi se ovi metodi selekcije usavršili, 5—6 petri-šolja mogle bi zameniti 1 hektar zemljišta.

ZAKLJUČAK

Metode rekombinantne DNK koje se popularno nazivaju genetski inženjering, omogućile su rekombinaciju gena iz nesrodnih organizama koje se klasičnim metodama nije moglo postići, a najveće dostignuće je prenošenje prokariotskih gena u eukarite i obrnuto.

U biljnoj proizvodnji genetsko inženjerstvo moglo bi se koristiti u oplemenjivanju bilja u procesu stvaranja novih sorti, u semenarstvu, za karakterizaciju genotipova, homozigotnih i heterozigotnih pomoću restrikcionih mapa, kao i za dijagnostiku virusnih oboljenja. Ove metode mogu se koristiti i u stvaranju sredstava za zaštitu bilja i bioloških hraniva.

Pored ogromnih teoretskih i primenjenih rezultata koje mogu dati ove metodike, ne treba zaboraviti i na opasnosti koje se kriju, jer novi organizmi mogu predstavljati i opasnost za okolinu i čoveka, pa bi takva istraživanja trebalo vršiti u određenim institutima po određenim programima, ali pod društvenom kontrolom.

Zahvaljujem se asistentima mr Eriki Rak-Šoltes, mr Evici Rajčan-Šeparević, na pomoći prilikom spremanja ovog predavanja.

SUMMARY

In this paper possibility of applying of genetic engineering in crop production is discussed. According results obtained genetic engineering may be used for creating new varieties for transferring genes which cannot be transferred by hybridization, for characterization homozygots and heterozygots in seed production, in diagnosis of virus infection and plant protection as for creating new organisms in plant and environmental protection.

LITERATURA

1. **Borojević Karatina:** Mogućnost primene genetskog inženjeringa kod biljaka. *Savremena poljoprivreda*, Vol. 31, br. 9—10, Novi Sad, 496—480, 1983.
2. **Borojević, K., Šesek, S. i Radojević, Lj.:** Responses of different genotypes on development of callus from another cultures of wheat. *International Atomic Energy Agency — SM-282/62P: 233—237*, Vienna 1986.
3. **Borojević, K., Šoltes-Rak, E.:** Priprema biljnog materijala za manipulaciju genima. VII. Kongres Biologa, Budva, str. 290, 1986.
4. **Borojević Katarina:** Geni i populacija, NIP »Forum«, Novi Sad, str. 1—545, 1986.
5. **Burr, B. and Burr, F.:** Transposable elements and genetic instabilities in crop plants. *Stadler Symp.* Vol. 13, University of Missouri Columbia 115, 1981.
6. **Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W. and Helling, R. B.:** Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70, 3240-4, 1973.
7. **Comai, L. and Stalker, D. M.:** Impact of genetic engineering on crop protection 3(4), 399—408, 1984.
8. **Comai, L., Faciatti, D., Hiatt, W. R., Thomson, G., Rose, R. E. & Stalker, D.M.:** Expression in plants of a mutant *aro A* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosphate. *Nature* 317, 741—744, 1985.
9. **Flavell, R. B.:** Transposable elements. *Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology*, Vol. 1, 207—210, 1984.
10. **Goldberg, R.:** Gene Structure. Function and Genetic Transmission. *Genetic Engineering of Plants Agricultural Research Opportunities and Policy Concerns*, National Academy Press, 27—32, Washington, D. C. 1984.
11. **Graves, A. C. F., Goldman, S. L.:** The transformation of *Zea mays* seedlings with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant. Mol. Biol.*, 7, 43—50, 1986.
12. **Hoojkaas-Van Slohtenen, G. M. S., Hooykaas, P. J. J. & Shilperoot, A.:** Expression of Ti plasmid genes in monocotyledonous plants infected with *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 311, 763—764, 1984.
13. **Horsh, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eicholtz, D., Rogers, S. G., Fraley, R. T.:** A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants. *Science*, 227, 1229—1231, 1985.
14. **Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Bolivar, F. and Boyer, H. W.:** Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science*, 198, 1056—63, 1977.
15. **Jacob, F. and Monod, J.:** Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3, 318—356, 1961.
16. **Johnston, A. W. B.:** Cloning the Nodulation genes of *Rhizobium*. *Genetic Manipulation of Crop Plants*. Agricultural & Food Research Council, London, 1983.
17. **Lindow, S. E., Arny, D. C., and Upner, C. D.:** *Erwinia herbicola*: A Bacterial Ice Nucleus Active in Increasing Frost Injury to Corn. *Phytopathology* 68, 523—527, 1978.
18. **Mansfield, J.W.:** The role of phytoalexins in disease resistance. In: *Phytoalexins*, pp. 253—288 ed by Bailey and J. W. Mansfield. New York, Halsted Press, 1982.
19. **Matthews, R. E. F.:** *Plant Virology*. Academic Press, pp 897, New York, 1981.
20. **McClintock, B.:** Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 21, 197—216, 1956.
21. **Ow, D. W., Wood, K. V., DeLuca, M., Wet, J. R., Helinski, D. R., Wowell S. H.:** Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant Cells and Transgenic Plants. *Science* 234, 856—859, 1986.
22. **Pallmiter, R. D., Brinster, R. L., Hammer, R. E., Trumbauer, M. E., Rosenfeld, M. G., Birnbers, N. C., Evans, R. M.:** Dramatic growth of mice that developed from eggs micro injected with metallothio-nein-growth tussion genes. *Nature*, 300, 5893, 611—616, 1982.
23. **Schell, J.:** Contribution of Plant Molecular Biology to Plant Breeding. *Genetika i iplemenjivanje kukuruza*. Institut za kukuruz, Beograd, 1986. (rukopis).

24. **Ssmith, H. O. and Wilcox, K. W.:** A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. Purification and general properties. *Journal of Molecular Biology*, 51, 379—91, 1970.
25. **Shah, D. M., Horsch, R. B., Klee, H. J., Kishore, G. M., Winter, J. A. Tumer N.F., Hirionaka, C. M., Sanders, P. R., Gasser, S. C., Aykent, S., Siegel, N. R. Rogers, S. G., Fraley, R. I.:** Engineering Herbicide Tolerance in Transgenic Plants. *Science*, Vol. 233, 478, 1986.
26. **Valentine, R. C.:** Genetic engineering of salinity-tolerant plants. *California Agriculture*, 36—37, 1984.
27. **Verma, D. P. S. and Long, J.:** Molecular Biology of *Rhizobium* legume symbiosis. In *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 14 (K. Jeon, ed.). Acad. Press, 211—245, 1983.
28. **Watson, I. D. & Crick, F. H. C.:** A structure for desoxyribose-nucleic acid. *Nature*, 171, 737—738, 1953.

Adresa autora — Author's Address

Prof. dr Katarina Borojević
Institut za biologiju
Prirodno-matematički fakultet, 21000 Novi Sad