

Review

## GENETIČKI PREINAČENI ORGANIZMI U HRANI – PROIZVODNJA, DETEKCIJA I MOGUĆE OPASNOSTI

Davor ŽELJEŽIĆ

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb*

Primljeno u lipnju 2004.

Prva genetički preinačena (engl. *genetically modified* - GM) biljka bio je duhan otporan na antibiotike. Dobiven je 1983. godine. No, tek 1996. godine genetički preinačena biljka prvi put se našla u slobodnoj prodaji. Riječ je o rajčici s produljenim trajanjem. Godine 2003. više od 67 milijuna hektara obradivih površina bilo je zasijano GM usjevima. Da bi se proizvela takva biljka, potrebno je iz organizma donora izolirati gen za željeno svojstvo. Tom genu potrebno je dodati promotorsku sekvencu, terminator i gen marker te dobiveni konstrukt ubaciti u biljnu stanicu. U specifičnim uvjetima uzgoja dobivene transformirane stanice potiču se na diobu i izrastaju u čitavu biljku koja u sebi nosi gen za željeno svojstvo. U svrhu utvrđivanja prisutnosti GM organizama u hrani danas se najčešće rabi tehnika lančane reakcije polimerazom (engl. *polimerase chain reaction* - PCR). No, da bi se ona mogla uspješno primijeniti, potrebno je točno poznavati barem dio sekvence DNA koja je transformacijom ubačena u novonastalu biljku, što katkada može biti ozbiljan problem. Posljednjih dana svjedoci smo žestokih sukobljavanja u vezi sa sigurnosti konzumacije proizvoda koji sadržavaju genetički preinačene sastojke. Kao neki od razloga protiv navode se alergijske reakcije na GM sastojke, njihova toksičnost i opasnost GM organizama za biološku raznolikost i ravnotežu unutar ekosustava. Nedvojbeno je da bi vodeću riječ u ocjeni opasnosti GM organizama trebala imati znanost bazirana na činjenicama, a što nažalost nije uvijek slučaj.

**KLJUČNE RIJEČI:** *alergija, ELISA, otpornost na antibiotike, otpornost na herbicide, otpornost na insekticide, PCR*

U Direktivi Vijeća EU 2001/18/EEC genetički preinačeni organizam (engl. *genetically modified organisms* - GMO) definira se kao jedinka čiji genetski materijal sadržava promjene do kojih ne dolazi spontano parenjem ili rekombinacijom (1).

Prva biljka koja je sadržavala genetičke modifikacije proizvedena je 1983. godine. Bio je to duhan otporan na antibiotike, međutim nije se rabio u komercijalne, već samo u eksperimentalne svrhe. Desetak godina kasnije proizvedena je i prva genetički modificirana biljka (engl. *genetically modified plants* - GMP) namijenjena širokoj potrošnji – rajčica s odgodom gnjiljenja. Uskoro su slijedile modifikacije genoma komercijalnih sorti žitarica i soje koje su ih učinile otpornima na kukce, viruse i herbicide (2). U svijetu,

1996. godine 1,7 milijuna ha obradivih površina bilo je zasijano genetički preinačenim (GM) biljkama. Do 1997. ta se površina povećala na 11 milijuna hektara, a do 1998. na 28 milijuna (3). Godine 2003. u 18 zemalja diljem svijeta više od 67 milijuna ha nalazilo se pod GM usjevima (4). U istoj godini najveći proizvođači bili su SAD, Argentina, Kanada, Brazil, Kina te potom Južnoafrička Republika, Indija, Španjolska, Meksiko i drugi (4, 5). Neke od GM biljaka koje se danas mogu naći na tržištu prikazane su na tablici 1. zajedno sa svojstvima koja su im pridodana genetičkim inženjerstvom. Biljke koje posjeduju ta svojstva nazvane su biljkama prve generacije i uglavnom se radi o njihovoj otpornosti na herbicide, kukce i viruse.

Tablica 1 Neke od genetički preinačenih biljaka prve generacije i njihova novoizražena svojstva

| Kultura       | Svojstvo  |
|---------------|---|
| Kukuruz       | Otpornost na herbicide<br>Otpornost na kukce          |
| Krumpir       | Otpornost na herbicide<br>Otpornost na kukce          |
| Pamuk         | Otpornost na herbicide<br>Otpornost na kukce          |
| Pšenica       | Otpornost na herbicide                                |
| Riža          | Otpornost na kukce<br>Produljeno vrijeme skladištenja |
| Soja          | Otpornost na herbicide<br>Otpornost na kukce          |
| Šećerna repa  | Otpornost na herbicide                                |
| Uljana repica | Otpornost na herbicide<br>Otpornost na kukce          |

Otpornost na herbicide moguće je postići prenošenjem gena koji kodiraju enzime odgovorne za njihovu razgradnju ili inaktivaciju iz bakterije u biljku. Najčešće se radi o otpornosti na glufosinat koja se postiže unošenjem gena za fosfonitricin acetiltransferazu (*pat*) iz bakterije *Streptomyces viridochromogenes* (6). Nadalje, postoje GM biljke otporne na glifosat. One u svojim stanicama sadržavaju gen za 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfatsintazu (EPSP) izoliran iz bakterije *Agrobacterium tumefaciens*. Isto svojstvo može se izraziti i ubacivanjem gena za glifosatoksidoreduktazu (*gox*), enzima iz bakterije roda *Achromobacter*, odgovornog za detoksikaciju glifosata (7). Također je moguće dobiti biljku otpornu na sulfonilureju. Sulfonilurea se kao aktivna tvar rabi za suzbijanje širokolisnog korova. U biljci, ona koči acetolaktatsintazu, enzim odgovoran za sintezu aminokiselina leucina, izoleucina i valina. Gen je izoliran iz duhana i genetičkim inženjerstvom promijenjen tako da daje enzim na koji sulfonilurea neće djelovati. Unošenjem promijenjenog gena u biljku dobiveni su usjevi otporni na herbicide koji sadržavaju sulfonilureu kao aktivnu tvar (8). Nadalje, prenošenje gena za bromoksinilnitrilazu (*bxn*) iz bakterije *Klebsiella pneumoniae* u biljku dovodi do sinteze enzima odgovornog za detoksikaciju bromoksinila, što rezultira otpornošću GM biljke na tu aktivnu tvar (9).

Otpornost usjeva na kukce može se postići prijenosom gena odgovornog za sintezu toksina Bt, proteina s insekticidnim djelovanjem, iz bakterije *Bacillus turengiensis* u biljku. Bakterija *Bacillus*

*turengiensis* prirodno obitava u tlu. Odavno je poznato da pojedini sojevi te bakterije proizvode proteinske smrtonosne za kukce s lužnatom sredinom u probavilu. Toksin posjeduje sposobnost vezanja za epitelne stanice stijenki probavnog trakta kukaca i dovodi do njihova razaranja. Time bakterije koje nastanjuju probavni trakt slobodno ulaze u tjelesne šupljine te kukac ugiba od opće infekcije. Bakterija *Bacillus turengiensis* je selektivna tako da pojedini sojevi bakterije ubijaju točno određeni rod kukaca. Tako protein za koji kodira gen *cry 1 Ac* djeluje na štetnike iz roda *Lepidoptera* (običan i kukuruzni moljac), *cry 3* na rod *Coleoptera* (krumpirova zlatica), a *cry 4* na muhe i komarce iz roda *Diptera*. Bitna je činjenica da toksini Bt nisu štetni za ljude, sisavce, ptice, ribe i korisne kukce (10-12). Drugi način dobivanja usjeva otpornih na kukce s pomoću genetičkog inženjerstva je prijenos gena za inhibitor  $\alpha$ -amilaze iz sjemenki boba u neku drugu biljku (13).

Iako se o genetički preinačenim organizmima počelo značajnije govoriti tek unatrag desetak godina, oni su već mnogo duže prisutni u svakodnevnom životu čovjeka. Tako se od kraja sedamdesetih godina rabe u proizvodnji antibiotika, vitamina, hormona (inzulin, somatostatin). Danas su mnogi tehnološki procesi u proizvodnji hrane i pića nezamislivi bez enzima koje proizvode genetički preinačeni mikroorganizmi. Primjerice, u proizvodnji prirodnih sokova za njihovo bistrenje rabi se pektinaza (14, 15). Amilaze GM bakterija upotrebljavaju se u proizvodnji kruha jer pospješuju dizanje tijesta (15, 16). U pekarskoj industriji koriste se i sojevima kvasca s ugrađenim genom za maltazu čime je značajno skraćeno vrijeme potrebno da se proizvod ispeče. Ujedno, ubacivanje gena za lipoksigenaciju dovodi do izbjeljivanja brašna u proizvodnji bijelog kruha (15). U proizvodnji sireva rabe se enzimi iz sirišta (dijela želuca) teladi. Danas za dobivanje tih enzima služe genetički preinačene bakterije, što uvelike pojeftinjuje proizvodnju jer omogućava njihovo dobivanje u neograničenim količinama (15, 17, 18). Mikroorganizmi koji sudjeluju u proizvodnji hrane svojom fermentacijskom aktivnošću također su genetički promijenjeni u svrhu poboljšanja njihove učinkovitosti i dobivanja kvalitetnijeg proizvoda. Tako komercijalni sojevi koji se rabe u proizvodnji piva sadržavaju ubačeni gen za glukoamilazu. Taj enzim dovodi do razgradnje preostalog nefermentiranog dekstrina i time omogućava dobivanje niskokaloričnog piva (19). Nadalje, ubacivanje gena za  $\alpha$ -acetolaktatde karboksilazu u pivski kvasac smanjuje razinu spojeva

koji nastaju kao nusprodukt vrenja, a daju neugodan okus pivu (15, 20-22). U mljekarskoj industriji rabe se GM sojevi bakterija koji daju posebnu aromu i okus različitim vrstama jogurta, sira, margarina i ostalih namaza (15, 23-29).

U novije vrijeme provode se intenzivna istraživanja sa svrhom razvoja druge generacije genetički preinačenih biljaka. Prema Kjellssonu i Strandbergu (30) te bi biljke mogle pokazivati neka od sljedećih svojstava:

- povećana otpornost na stres (suša, mraz, salinitet)
- promijenjene razvojne osobine (muška sterilnost, smanjena podložnost gnijiljenju, ubrzan rast, fiksacija dušika)
- promijenjen nutritivni sastav (više proteina, sastav masnoća, više vlakana i vitamina)
- sinteza farmaceutika (vakcine, hormoni, enzimi)
- proizvodnja industrijskih sirovina (biomasa, lignin, plastika)
- bioremedijacija (dekontaminacija tla).

## DOBIVANJE GENETIČKI PREINAČENIH BILJAKA

Ako znamo koji je gen odgovoran za ekspresiju svojstva koje želimo da posjeduje nova GM biljka, najprije je potrebno taj gen izolirati iz davatelja u čijem se genomu on prirodno nalazi. Stanice davatelja liziraju se puferom koji sadrži detergent kako bi se iz njih izolirala ukupna genomska molekula DNA. S pomoću visokospecifičnih restrikcijskih enzima koji cijepaju DNA na mjestima točno određenog slijeda nukleotida iz genoma se izolira željeni gen. Da bi taj gen mogao biti aktivan u novom domaćinu i proizvesti visoki broj kopija proteina odgovornog za izražavanje željenog svojstva, potrebno mu je dodati odgovarajuću promotorsku i terminacijsku sekvencu. Promotorska sekvenca nalazi se ispred samoga gena i nužna je za njegovo prepisivanje u glasničku RNA. Ona na sebe veže kompleks makromolekula zaduženih za transkripciju, određuje mjesto početka prepisivanja i regulira učestalost prepisivanja. Bez promotorske sekvence sam bi gen bio neaktivan (31).

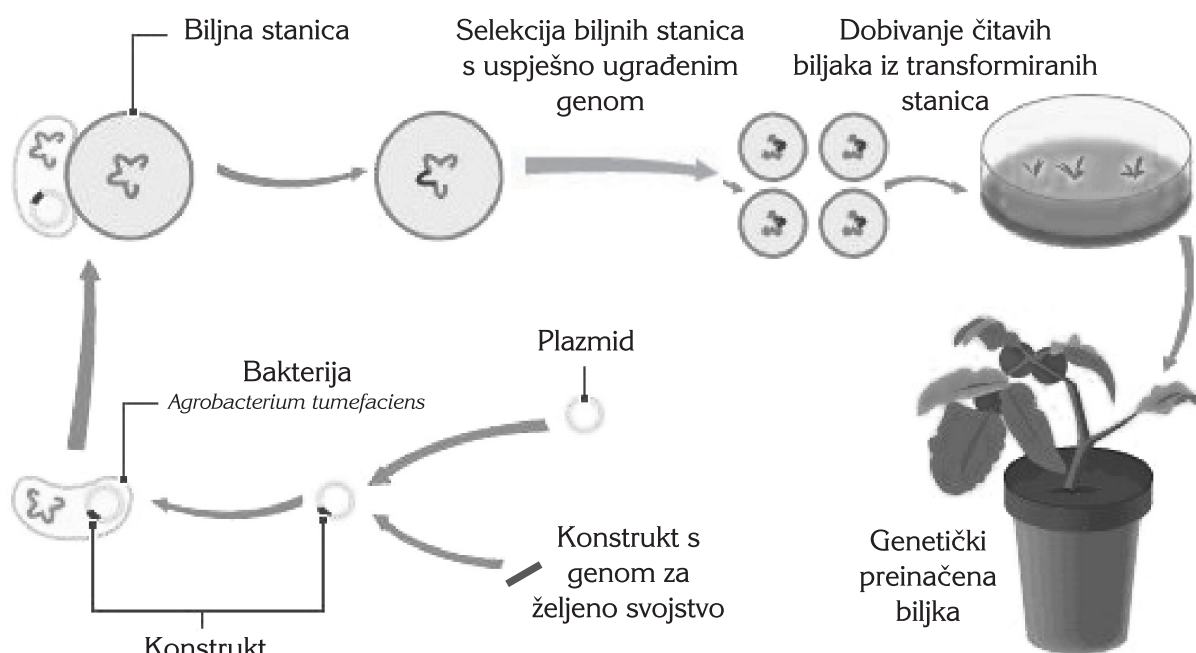
Iza željenog gena potrebno je dodati terminacijski slijed baza. On označava kraj gena i daje uputu transkripcijskom kompleksu da prestane s njegovim prepisivanjem (31, 32).

Osim dobivenog konstrukta u novu biljku potrebno je unijeti i gen marker koji omogućava selekciju stanica koje su uspješno ugradile gen za željeno svojstvo i započele s njegovom transkripcijom (transformirane stanice) od onih koje to nisu (netransformirane stanice). Sam gen marker nije nuždan za izražavanje željenog svojstva i ne utječe na njega. Najčešće se u tu svrhu rabi gen odgovoran za otpornost na neki od antibiotika. Tako gen *npt II* kodira sintezu neomicinfosfotransferaze II koja transformiranim stanicama omogućava inaktivaciju antibiotika kanamicina i neomicina. Samo one stanice koje sadržavaju taj gen i uspješno ga ekspimiraju mogu preživjeti u uvjetima selektivnog pritiska zbog izlaganja navedenim antibioticima. Kao gen marker mogu se rabiti i geni za  $\beta$ -glukuronidazu ili luciferazu (33). Konstrukt sastavljen od gena markera, promotorske sekvence, gena za željeno svojstvo i terminacijske sekvence spreman je za ubacivanje u biljnu stanicu. Najčešća dva načina na koje je to moguće učiniti jesu (34):

- tehnologijom rekombinantne DNA uz uporabu plazmida ili virusa kao vektora
- tehnikama izravnog ubacivanja genetičkog materijala pripravljenog *in vitro* u živi organizam mikroinjekcijom, makroinjekcijom ili mikroinkapsulacijom.

### *Tehnologija rekombinantne DNA uz pomoć vektora*

Danas se kao vektor rabi binarni plazmid. On sadržava dva ishodišta replikacije. Jedno je aktivno u bakteriji *Escherichia coli*, a drugo u bakteriji *Agrobacterium tumefaciens*. Ujedno, binarni plazmid sadržava takozvanu regiju DNA T (34, 35). Ta regija izvorno se nalazi na plazmidu Ti (engl. *tumor inducing*) u bakteriji *Agrobacterium tumefaciens*. U procesu infekcije biljne stanice DNA T prenosi se iz bakterijskog plazmida u biljnu stanicu. Prijenos te regije plazmida omogućavaju geni *vir* koji se također nalaze na plazmidu Ti. Sam plazmid Ti prevelik je za manipulaciju u uvjetima *in vitro* pa se stoga za prenošenje željenoga gena u biljku rabi sustav binarnog plazmida koji najčešće sadržava dvije DNA T. Binarni plazmid se restrikcijskim enzimima otvara unutar regija DNA T i na to jedno mjesto ubacuje se gen za željeno svojstvo, a na drugo gen marker. U električnom polju, u procesu nazvanom elektroporacija, plazmid s ugrađenim genima najprije se unosi u bakteriju *Escherichia coli*, u kojoj se binarni



**Slika 1** Prikaz dobivanja genetički preinačenih biljaka unošenjem gena u biljne stanice s pomoću sustava plazmida bakterijom *Agrobacterium tumefaciens*

plazmid umnožava, a potom se izolira i na jednak način unosi u bakteriju *Agrobacterium tumefaciens*. Budući da binarni plazmid ne posjeduje gene *vir* zadužene za prenošenje DNA T s ubačenim genima u biljku, u bakteriji *A. tumefaciens* nalazi se još jedan plazmid koji sadržava gene *vir* plazmida Ti, ali ne i DNA T. U njegovoj prisutnosti doći će do prijenosa regija DNA T s ugrađenim genom za željeno svojstvo i genom markerom iz binarnog plazmida u biljku. U jezgri stanice konstrukt se ugrađuje u genom biljke i počinje ekspresija ubačenih gena. Ponovno, zahvaljujući genu markeru, mogu se selektirati stanice koje su uspješno ugradile unesene gene. Budući da biljne stanice posjeduju svojstvo omnipotentnosti, u posebnim uvjetima kultiviranja one će regenerirati čitavu biljku čija će svaka stanica sadržavati konstrukt s genom za željeno svojstvo (34-36). Shematski prikaz dobivanja GM biljaka prikazan je na slici 1.

#### Tehnike izravnog ubacivanja genetičkog materijala

Najjednostavnija i najčešće rabljena izravna tehnika dobivanja GM biljaka je biolistička metoda. Metalne čestice mikroskopske veličine (tungsten, zlato), zbog razlike u naboju, vežu na sebe konstrukt s genom za željeno svojstvo. Strujom helija pod visokim pritiskom tako omotane čestice ispaljuju se u biljne stanice u kulturi. U stanici konstrukt napušta česticu metala i ugrađuje se u genom. Zahvaljujući genu markeru,

izdvajaju se transformirane stanice i potiču na regeneraciju čitave biljke (34, 37).

#### DETEKCIJA GENETIČKI PREINAČENIH ORGANIZAMA U HRANI

Sukladno regulativama Vijeća Europe No 1829/2003, No 1830/2003 i prijedlogu Preporuke o tehničkim smjernicama za uzorkovanje i detekciju GMO, samo referentni i nacionalni laboratoriji u europskoj mreži GMO laboratorija akreditiranih prema EN ISO/IEC 17025/2000 ovlaštene su za detekciju i kvantifikaciju GMO u hrani (38-41). Detekcija GMO i/ili njihovih derivata provodi se utvrđivanjem prisutnosti molekula (DNA ili proteina) koji nastaju kao rezultat genetičke modifikacije. Testovi koji se pri tome rabe zasnivaju se na lančanoj reakciji polimerazom (tehnika PCR) kojom se utvrđuje prisutnost DNA ubačene u biljku ili, prilikom utvrđivanja prisutnosti proteina za čiju je sintezu odgovoran ubačeni gen, na imunološkoj reakciji (ELISA). Za sada je tehnika PCR najprihvaćenija u svrhu detekcije GMO u sklopu provođenja legistative vezane uz tu problematiku (41).

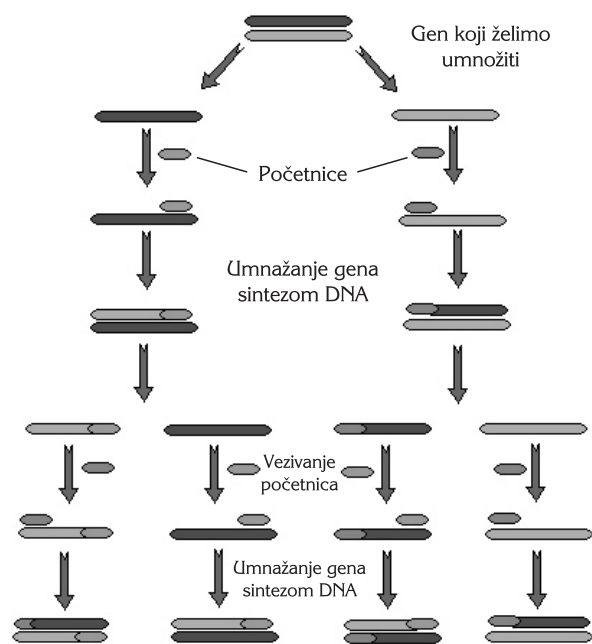
#### Tehnika lančane reakcije polimerazom

Budući da je riječ o vrlo osjetljivoj tehnici, za detekciju su dovoljne male količine uzorka. PCR



omogućava mnogostruko umnažanje specifične sekvence ako se posjeduju početnice (sintetski oligonukleotidi) komplementarne s njezinim početnim i završnim slijedom baza. Stoga, da bi se mogla iskoristiti ova tehnika, potrebno je točno znati što se traži u fragmentima DNA izoliranim iz uzorka hrane. Drugim riječima potrebno je znati koje je sljedove DNA sadržavao konstrukt ubačen u biljnu stanicu. Budući da je broj gena kojima je moguće transformirati biljku u komercijalne svrhe izrazito velik, umjesto njih u uzorku DNA pokušava se utvrditi prisutnost regulatornih sekvenci koje su nužne za njihovu aktivnost u novodobivenoj biljci. Najčešće se rabe početnice komplementarne s 35S promotorom mozaičnog virusa cvjetače i/ili terminatorom nos (*nos3'*) iz bakterije *Agrobacterium tumefaciens* (42). Prisutnost tih regija upućuje na genetičku modifikaciju organizama ili njihovih sastavnica upotrijebljenih u proizvodnji testiranog uzorka hrane (43). Sam proces umnažanja DNA tehnikom PCR sastoji se od cikličkog ponavljanja triju različitih molekularno-bioloških procesa. U svakom koraku ciklusa postizu se tri različite temperature nužne za odvijanje pojedinih koraka umnažanja:

- denaturacija DNA izolirane iz hrane (94 °C)
- vezanje klica s komplementarnim sljedovima na sekvencu u uzorku DNA (50-65 °C)
- sinteza DNA produljivanjem vezanih početnica enzimatskom aktivnošću polimeraze Taq (*Thermus aquaticus*) (72 °C).



Slika 2 Shematski prikaz umnažanja gena lančanom reakcijom polimerazom (PCR)

Ciklus sa sva tri koraka ponavlja se i do 50 puta. Shematski prikaz umnažanja gena PCR-om prikazan je na slici 2.

Ako je u DNA izoliranoj iz uzorka hrane bila prisutna neka od sekvenci koja upućuje na genetičku preinaku te ako su početnice bile pravilno odabrane, doći će do umnažanja sekvence. Kako bi se isključili mogući lažni pozitivni rezultati, umnožena sekvenca prenosi se na agarozni gel i unosi u električno polje. S istim ciljem, u električno polje unose se i negativna kontrola (uzorak DNA koji ne sadržava traženi gen) i pozitivna kontrola (umnoženi standard gena). Djelovanjem polja molekula DNA putuje kroz gel. Duljina puta koji će prijeći izravno ovisi o veličini umnožene sekvence. Stoga je na osnovi duljine prijeđenog puta moguće utvrditi da li je umnoženi fragment DNA uistinu sekvenca koju smo pokušali detektirati u uzorku hrane. Dodatno utvrđivanje identiteta umnoženog fragmenta provodi se nakon elektroforeze njezinim prenošenjem s gela na membranu i hibridizacijom sa standardnom sondom za traženu sekvencu, obilježenom fluorescentnom bojom (42, 44).

U svrhu utvrđivanja količine ostataka genetički preinačenih organizama u hrani rabi se tehnika kompetitivnog PCR-a. Zasniva se na istodobnom umnažanju nepoznate količine sekvence u uzorku DNA iz hrane i standarda poznate koncentracije u istoj reakcijskoj smjesi uz uporabu istih početnica. Standard je dobiven delecijom sekvence koja se pokušava detektirati tako da se od nje razlikuje za do 40 baznih parova. Rabi se više reakcijskih smjesa u kojima je koncentracija DNA iz uzorka hrane uvijek ista, a koncentracija standarda varira. Iz koncentracije standarda u smjesi za koju je dobiven isti intenzitet signala za DNA iz uzorka hrane i standard računa se udio GMO u uzorku hrane (45). Sama tehnika polazi od pretpostavke da su brzina i učinkovitost umnažanja DNA iz uzorka hrane i standarda iste tijekom svih ciklusa (46).

Osim kompetitivnog PCR-a, u svrhu detekcije i kvantifikacije GMO u hrani danas se najčešće rabi i tehnika PCR-a u realnom vremenu (engl. *real time PCR*) (47). Tehniku su uveli *Higuchi et al.* (48). Specifičnost tehnike je mogućnost praćenja intenziteta umnažanja gena tijekom svih ciklusa lančane reakcije polimerazom. U tu svrhu, u reakcijsku smjesu, osim početnice, dodaje se i sonda specifična za gen čiju prisutnost želimo utvrditi u uzorku hrane. Sonda na sebi sadržava vezanu fluorescentnu boju, ali i dodatan spoj (engl. *quencher*) koji, ako se nalazi u blizini fluorokroma, gasi njegovu fluorescenciju. Sonda će se

vezati za gen koji detektiramo te će, zahvaljujući 5'-3' egzonukleaznoj aktivnosti polimeraze Taq, u procesu produživanja početnica, odnosno umnažanja gena, biti pocijepana. Na taj način oslobađa se fluorokrom, a nastala fluorescencija mjeri se spektrofotometrom i izravna je mjera za količinu produkta umnažanja gena lančanom reakcijom polimerazom. Budući da su za pojavu fluorescencije nužni i vezanje početnica, ali i vezanje sonde na ciljani gen, detekcija primjenom "real time" PCR-a veće je specifičnosti od klasične metode (46-48).

#### *Imunološka tehnika*

Tehnike koje se rabe u detekciji proteina uglavnom se baziraju na imunskim reakcijama. Budući da zahtijevaju očuvanost tercijarne i kvarterne strukture proteina, mogu se rabiti samo na svježim i neobrađenim uzorcima hrane. Imunološka detekcija zasniva se na visokospecifičnom vezanju antitijela na protein kodiran od gena ubačenog u transformiranu biljnu stanicu te stoga zahtijeva točno poznavanje učinjene genetičke modifikacije (43, 49).

Prije same detekcije iz uzorka hrane izoliraju se ukupni proteini i vežu na čvrstu fazu. Proteinima se dodaju primarna antitijela specifična za protein koji se sintetizira u GM biljci kao posljedica unošenja novoga gena. Nakon ispiranja nevezanih antitijela dodaju se sekundarna antitijela na koja je vezan određeni enzim. Vezanje sekundarnog antitijela na primarno i dodatak supstrata rezultirat će pojavom obojenja koje upućuje na prisutnost traženog proteina u hrani (50).

#### MOGUĆE OPASNOSTI

Rasprava vezana uz primjenu genetičkog inženjerstva u proizvodnji hrane koje smo svjedoci u posljednje vrijeme, karakterizirana je primjenom različitih standarda za različite kategorije preinačenih organizama. Tako zagriženim protivnicima genetički preinačenih usjeva u ljudskoj prehrani istodobno ne smeta uporaba farmaceutskih proizvoda dobivenih uzgojem genetički preinačenih mikroorganizama. Istodobno osuđuju znanstvenike kada pokušavaju oplemeniti biljke tehnologijom rekombinantne DNA, a prihvaćaju činjenicu da se proizvodnja inzulina i somatostatina ostvaruje primjenom genetički izmijenjenih bakterija, da se GM mikroorganizmi rabe u pročišćavanju industrijskih otpadnih voda prije njihova ispuštanja u okoliš. Međutim, u većini

debata postavljaju se i ozbiljna pitanja vezana uz moguće opasnosti za zdravlje i okoliš, a koje bi mogle proisteći iz proizvodnje i uporabe genetički preinačenih biljaka.

#### *Alergije*

Kada je riječ o konzumaciji hrane koja potječe od GMO, postoji bojazan da bi ona u hipersenzitivnih osoba mogla dovesti do razvoja alergijskih reakcija. Uzrok tomu bili bi proteini koji su proizvod aktivnosti gena unesenog u biljku transformacijom. Tako bi se, primjerice, u osoba alergičnih na ribu mogla razviti alergijska reakcija na hranu koja u sebi sadržava ostatke GM biljke u koju je prenesen neki od gena ribe, a čiji produkt djeluje alergeno. Međutim, broj proteina s alergenim djelovanjem koji bi se mogli rabiti u svrhe genetičke modifikacije izuzetno je malen tako da je vjerojatnost pojave alergija nakon konzumacije hrane s GMO izuzetno niska. Nadalje, svaka biljka dobivena tehnologijom rekombinantne DNA prolazi testiranja tako da bi, pokaže li se da postoji opasnost od razvoja alergijskih reakcija na nju, bila zabranjena (51). Jedan od primjera je genetički preinačena soja u koju je ubačen gen iz brazilskog oraha (52). Naime, soja sadržava izuzetno malo aminokiselina s tiolnom skupinom, dok je plod brazilskog oraha njima bogat. Genetički oplemenjena soja sadržavala je protein (albumin 2S) iz endosperma oraha bogat tioninom. Međutim, serološkim ispitivanjima unesenog proteina, kao i kožnim prik testom pokazano je da on posjeduje alergena svojstva. Na temelju tih spoznaja prekinulo se s proizvodnjom na taj način preinačene soje (52).

Kada su u pitanju alergije na hranu, valja naglasiti pozitivnu stranu genetičkih modifikacija. Tako je primjenom molekularno-bioloških metoda (knock-out) moguće iz genoma biljke izbaciti gen odgovoran za sintezu alergena i time omogućiti konzumaciju te namirnice osobama alergičnim na nju u njezinu konvencionalnom obliku (51). Primjer je alergeni protein  $\alpha$ -amilaza, koji je genetičkim oplemenjivanjem izbačen iz riže (53).

#### *Povećana toksičnost*

Poznato je da neke od biljaka koje svakodnevno rabimo u prehrani sintetiziraju spojeve koji su toksični. Međutim, u biljci su ti spojevi u dovoljno niskoj koncentraciji da ne izazovu nikakve negativne učinke za zdravlje. Nedostatak tehnika koje omogućavaju unošenje novih gena u genom biljaka je nemogućnost nadziranja lokacije unutar genoma

na koju će se taj gen ugraditi. Stoga postoji teoretska mogućnost da se uneseni konstrukt koji sadržava jaki promotor ugradi u blizinu gena odgovornog za sintezu toksičnog spoja čime bi se povećala njegova ekspresija i porasla koncentracija toksikanta u biljci. Isti učinak moglo bi imati i oštećenje regija odgovornih za regulaciju gena za sintezu toksikanta prilikom insercije konstrukta. Postoji i bojazan da bi protein koji se sintetizira pod utjecajem unesenoga gena mogao interferirati s postojećim metaboličkim putovima u biljnim stanicama te na taj način povisiti razinu toksikanta. Međutim, do sada nije zabilježen ni jedan slučaj povećane toksičnosti GM biljaka u odnosu na njihov konvencionalni oblik. Da bi to i dalje ostalo tako, provode se rigorozna ispitivanja biljaka dobivenih genetičkom preinakom prije njihova puštanja na tržište, kao što je to slučaj i u farmaceutskoj industriji prije registracije novosintetiziranih lijekova (54).

#### *Otpornost na antibiotike*

Prilikom genetičke preinake biljnih stanica, uz gen za željeno svojstvo, unosi se i gen marker u svrhu selekcije transformiranih stanica. Najčešće se kao marker rabi gen *npt II*, odgovoran za rezistenciju na kanamicin, neomicin i njima srodne antibiotike. Ponekad se upotrebljava i gen *aad* odgovoran za rezistentnost na streptomycin i spektinomycin te gen *hpt* odgovoran za otpornost na higromicin. U javnosti postoji bojazan da bi ti geni, nakon konzumacije hrane proizvedene od GM biljaka mogli biti preneseni u bakterije debelog crijeva te preko njih u potencijalno patogene bakterije (55-57). U vezi s time provedeno je istraživanje kojim se pratila razgradnja DNA iz GM soje tijekom prolaska kroz gastrointestinalni (GI) trakt ileostomalnih pacijenata primjenom kompetitivne lančane reakcije polimerazom (58). Segmenti DNA unesene hranom utvrđeni su u tankom crijevu svih ispitanika. U nastavak istraživanja uključene su osobe s cjelovitim GI traktom. Nakon unošenja GM soje u fecesu ni u jednog ispitanika nije utvrđen uzorak DNA iz hrane, što upućuje na činjenicu da se ona potpuno razgradila prolaskom kroz probavni trakt (58). Međutim, Jelenić u svom preglednom članku navodi da su neka druga istraživanja pokazala da mogućnost transformacije bakterija koje obitavaju u GI traktu ipak postoji (59). Navodi se dalje da su rađeni proračuni koji su pokazali da bi konzumacija rajčice s genom *npt II* dovela do povećanja pojave bakterija mikroflore crijeva rezistentnih na kanamicin od  $2,6 \times 10^{-16} \%$  (59, 60). Međutim, bakterije transformirane

na taj način ne bi dugo opstale u probavnom traktu u kompetenciji s nerezistentnim sojevima u uvjetima odsutnosti stalnoga selekcijskog pritiska. Na osnovi navedenoga može se zaključiti da se ukupno praktično značenje prijenosa gena za otpornost na kanamicin iz GM biljaka na bakterije probavnog trakta može smatrati zanemarivim (59).

Unatoč čvrstim znanstvenim dokazima i dalje je prisutno protivljenje javnosti uporabi markera za otpornost na antibiotike prilikom transformacije biljaka koje će se rabiti u prehrani. Stoga se radi na uvođenju novih strategija u genetičkoj preinaci. Jedna od njih uključuje ubacivanje ekscizijskog vektora u konstrukt koji se unosi u biljnu stanicu. Na taj način, nakon selekcije transformiranih stanica, omogućilo bi se izrezivanje gena markera iz genoma biljke. Druga je mogućnost da se gen marker i gen za željeno svojstvo unose u stanicu posebnim tDNA vektorom. Nakon replikacije kromosoma i stanične diobe, uporabom tog vektora, dio stanica posjedovao bi samo gen za željeno svojstvo, bez gena markera i te bi se stanice selektivno potakle na regeneraciju čitave biljke (61).

#### *Pojava kukaca otpornih na toksin Bt*

Toksin Bt od 60-ih se godina rabi u suzbijanju kukaca u organsko-biološkoj proizvodnji hrane. Pojava kukaca otpornih na te spojeve dovela bi do njegove neučinkovitosti. Iako bi do razvoja otpornih jedinki moglo doći i zbog prekomjerne uporabe pripravaka s toksinom, to se smatra manje vjerojatnim jer je izlaganje kukaca toksinu u organsko-biološkom uzgoju vremenski ograničeno, dok je on prilikom uzgoja GM usjeva trajno prisutan jer se sintetizira u samoj biljci (62). Postoji nekoliko strategija koje imaju za cilj usporavanje razvoja otpornosti kukaca. Jedna od njih predviđa uspostavu tzv. "izbjeglištava" za kukce. To bi bila područja bez GM biljaka, bez selektivnog pritiska, gdje bi bio moguć opstanak nerezistentnih jedinki. Njihovim parenjem s jedinkama koje su stekle otpornost onemogućio bi se prijenos gena za rezistentnost na čitavu populaciju kukaca. Pojava rezistentnih kukaca mogla bi se spriječiti i istodobnim unošenjem dvaju ili triju gena za različite proteine iz skupine toksina Bt u biljku. Naime, pokazano je da kukci ne mogu razviti istodobnu otpornost na više spojeva (engl. *multi drug resistance*). U novije vrijeme razmatra se i mogućnost postizanja otpornosti na kukce mijenjanjem nekih morfoloških osobina GM biljaka, primjerice povećanjem dlakavosti biljke ili debljanjem kutikule (63).

*Prijenos gena, pojava "superkorova" i bioraznolikost*

GM biljke mogle bi narušiti postojeću ravnotežu u ekosustavu. Tijekom oprašivanja, pelud GM biljke mogao bi oploditi zametak divljeg srodnika i na taj način divljoj populaciji prenijeti gene unesene genetičkim inženjerstvom. Ako je uneseni gen bio odgovoran za otpornost na herbicid, došlo bi do pojave biljaka rezistentnih na standardne agrokemikalije. Raznošeno vjetrom ili životinjama, sjeme tih biljaka moglo bi dospjeti i na obradive površine i izniknuti u ulozu "superkorova". Slično, sjeme kulture rezistentne na herbicid, zaostalo na polju, moglo bi niknuti sljedeće godine, a zbug promjene kulture uslijed plodoređa, predstavljalo bi "superkorov". Za njihovo suzbijanje morali bi se rabiti snažniji pesticidi koji bi istodobno predstavljali veće opterećenje za okoliš pa i samu ljudsku populaciju. Iako postoje dokazi da je prijenos gena s kultivirane biljke na divljeg srodnika moguć, postoje određeni uvjeti koji moraju biti zadovoljeni da bi do njega došlo. Tako u Africi i Aziji ne postoji opasnost od prijenosa gena s uzgojenog GM kukuruza jer u tim krajevima ne obitavaju njegovi divlji srodnici. Ta opasnost itekako je realna na području Meksika i Srednje Amerike (64). Ipak, u područjima bez divljih srodnika ostaje prisutna opasnost od prijenosa gena s GM kultivirane biljke na konvencionalnu kulturu (65, 66).

Većina GM biljaka prve generacije, proizvedenih nakon 1983, u svom genomu sadržava kratku sekvencu koja potječe od DNA biljnih virusa. Najčešće je riječ o regulacijskim sekvencama. Može li ta DNA ili RNA kao transkripcijski produkt prilikom virusne infekcije rekombinirati s nukleinskom kiselinom virusa (67)? Teoretski je moguće da sinergistička interakcija eksprimiranih heterolognih proteina koji se sintetiziraju nakon unošenja gena prilikom modifikacije biljke i virusnih proteina pojača simptome infekcije. Potvrda za to nađena je promatranjem multiplih infekcija do kojih ponekad spontano dolazi u prirodi. Također postoji mogućnost da prilikom sastavljanja novih virusnih čestica gen unesen u biljku transformacijom, zabunom bude uklopljen u kapsidu i kao virion prenesen u drugu biljku. Međutim, u novoinficiranoj biljci gen će biti prisutan samo u stanicama obuhvaćenim infekcijom i neće se prenositi na potomstvo (68, 69). Iako je u kontroliranim laboratorijskim uvjetima takav horizontalan prijenos gena s GM biljke putem virusa

moguć, njegovo odvijanje u prirodi i dalje je samo na razini teoretske pretpostavke (69).

Kako bi se moguća opasnost GM usjeva za okoliš i zdravlje ljudi svela na najmanju moguću mjeru, sukladno Direktivi EU 2001/18/EC, uzgoju genetički preinačenih organizama u komercijalne svrhe mora prethoditi procjena rizika zasnovana na principu nazvanom "case-by-case". Drugim riječima, procjena rizika obavlja se za svaku pojedinačnu kulturu i svaki potencijalni lokalitet njezina uzgoja (1). Princip, također, obuhvaća procjenu mogućih izravnih učinaka na ljude i okoliš koji potječu od samog unesenoga gena i neizravnih učinaka koji mogu nastati kao posljedica unošenja stranoga gena u genom biljke. Prilikom procjene rizika u obzir se uzimaju i same biološke karakteristike kulture, lokalna poljoprivredna praksa, agroekološki uvjeti lokaliteta te gospodarska politika regije (1).

Kao sastavni dio procjene rizika rabi se princip sadržajne jednakovrijednosti (engl. *principle of substantial equivalence*). Sam princip obuhvaća utvrđivanje razlika između genetički promijenjene i konvencionalne kulture. Pri tom se utvrđuju moguće razlike u toksičnosti biljaka, njihovoj alergenosti, nutritivnim karakteristikama, razmatra se stabilnost unesenog gena i mogući posredni učinci genetičke preinake (70). Godine 2003. FAO i WHO predlažu da se princip sadržajne jednakovrijednosti zamijeni koncepcijom komparativnog utvrđivanja sigurnosti (engl. *comparative safety assessment – CSA*) (70, 71). CSA bi se jednako mogao primjenjivati i na GM biljke i GM životinje. Koncepcija se u prvom redu zasniva na temeljitoj usporedbi GM organizma s najbližim konvencionalnim srodnikom u svrhu uočavanja mogućih opasnosti za zdravlje čovjeka i okoliš. Usporedba obuhvaća fenotipske karakteristike, uključujući i mjerljive parametre zdravstvenog stanja GM organizama, ali i analizu sastava. Analizom sastava utvrđuju se moguće razlike u sadržaju i količini ključnih tvari između GM i konvencionalnog organizma i ona se mora kontinuirano usklađivati s najnovijim znanstvenim spoznajama vezanim uz oplemenjivanje organizama genetičkim inženjerstvom. Drugi korak principa CSA podrazumijeva toksikološku i nutritivnu procjenu utvrđenih razlika. Kao rezultat te procjene mogu se odrediti dodatna, specifična ispitivanja proizvoda u cilju prikupljanja relevantnih podataka nužnih za procjenu rizika (70, 71).



## UMJESTO ZAKLJUČKA

U današnjem svijetu eksponencijalno rastućeg stanovništva, ograničenih i nejednoliko raspoređenih resursa za uzgoj hrane, GM biljke čine nam se kao neizbježna budućnost. Nemoguće je negirati prednosti takvih biljaka pred konvencionalnim sortama. Međutim, jednako je tako činjenica da svaki napredak tehnologije pored mnogobrojnih koristi sa sobom donosi i određenu opasnost. U slučaju GM biljaka ona bi se mogla odraziti bilo na zdravlje ljudi bilo na okoliš koji nas okružuje. Kako bi sve potencijalne opasnosti bile svedene na najmanju moguću mjeru, nužno je donošenje razumljivih i dobro sročениh zakonskih propisa vezanih uz proizvodnju, uzgoj, prijevoz i stavljanje u promet genetički preinačenih organizama. Također je nužno osigurati bespogovorno provođenje tih propisa. U cilju očuvanja zdravlja ljudi prije puštanja novih GM organizama na tržište potrebno je nad njima provesti detaljna toksikološka i alergološka ispitivanja te osigurati neovisnu procjenu njihova rizika za okoliš i čovjeka, utemeljenu na znanstvenim činjenicama.

## LITERATURA

1. EU Directive 2001/18/EEC on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. Official Journal of the European Communities. No. L. 106.
2. Seetharaman K. GMO crops; Biotechnology. Food Agric 2003;48:75-9.
3. De Kathen A. The impact of transgenic crop released in developing countries. Biotech Dev Monitor 1996;28: 10-14.
4. James C. Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2003. Preview. ISAAA Briefs No. 30. Ithaca (NY): ISAAA; 2003.
5. Jelenić S. Komercijalni uzgoj biljaka oplemenjenih genetičkim inženjerstvom u 2003. godini. Priroda 2004;4:24-5.
6. Vinnemeier J, Dröge-Laser W, Pistorius EK, Broer I. Purification and partial characterization of the Streptomyces viridochromogenes TU494 phosphotricin-N-acetyltransferase mediating resistance to the herbicide phosphotricin in transgenic plants. Z Naturforsch 1995;50c:796-805.
7. Dyer WE. Resistance to glyphosate. In: Powles SB, Holtum JAM, editors. Herbicide Resistance in Plants. Boca Raton (FL): Lewis Publishers; 1994. p. 229-41.
8. Brandle JE, McHugh SG, James L, Labbe H, Miki BL. Instability of transgene expression in field grown tobacco carrying the csrl-1 gene for sulfonylurea herbicide resistance. Bio/Technol 1995;13:994-8.
9. Huppatz JL, Llewellyn DJ, Last DL, Higgins TJ, Peacock WJ. Development of herbicide-resistant crops - strategies, benefits and risks. In: McLean GD, Evans G, editors. Herbicide-resistant crops and pastures in Australian farming systems. Canberra: Bureau of Resource Sciences; 1995. p. 15-24.
10. Drummond J, Pinnock D. Host spectrum of *Bacillus thuringiensis*. In: Milner R, Chandler C, editors. The Proceedings from the Workshop on *Bacillus thuringiensis*; 24-26 September 1991; Canberra, Australia. Canberra: CSIRO; 1991. p. 78.
11. Hofte H, Whitely HR. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol Rev 1998;53:242-55.
12. Noteborn HPJM, Bienenmann-Ploum ME, van den Berg JHJ, Alink GM, Zolla L, Reynaerts A, Pensa M, Kuiper HA. Safety assessment of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein CRY1A(b) expressed in transgenic tomatoes. In: Engel K-H, Takeoka GR, Teranishi R, editors. Genetically Modified Foods: Safety Aspects. Washington DC: American Chemical Society; 1995. p. 14-56.
13. Fischhoff DA, Bowditch KS, Perlak FJ, Marrone PG, McCormick SM, Niedermeyer JG, Dean DA, Kusano-Kretzmer K, Mayer EJ, Rochester DE, Rogers SG, Fraley RT. Insect tolerant transgenic tomato plants. Bio/Technol 1987;5:807-13.
14. Kashyap DR, Chandra S, Kaul A, Tewari R. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp DT7. World J Microbiol Biotechnol 2000;16: 277-82.
15. James C. Global review of commercialized transgenic crops. ISAAA Briefs No. 8, Ithaca (NY): ISAAA, 1998.
16. Randezgi-Gil F, Prieto JA, Murcia A, Sanz P. Construction of bakers yeast strains that secrete *Aspergillus oryzae* alpha-amylase and their use in bread making. J Cereal Sci 1995;21:185-93.
17. McGarry A, Law A, Coffey J, Daly C, Fox PF, Fitzgerald GF. Effect of genetically modifying the lactococcal proteolytic system on ripening and flavor development in Cheddar cheese. Appl Environ Microbiol 1994;60: 4226-33.
18. Amigo L, Martin-Alvarez PJ, Garcia-Muro E, Zarazaga I. Effect of milk protein haplotypes on the composition and technological properties of Fleckvieh bovine milk. Milchwissenschaft-Milk Sci Int 2001;56:488-91.
19. Vakeria D, Box W, Bird L, Mellor J. Characterisation of amylolytic brewing yeast. J Inst Brew 1996;102: 27-32.
20. Hasona A, York SW, Yomano LP, Ingram LO, Shanmugam KT. Decreasing the level of ethyl acetate in ethanolic fermentation broths of *Escherichia coli* KO11 by expression of *Pseudomonas putida* estZ esterase. Appl Environ Microbiol 2002;68:2651-59.

21. Spencer JFT, de Spencer ALR, Laluce C. Non-conventional yeasts. *Appl Environ Microbiol* 2002;58: 147-56.
22. Sone H, Fujii T, Yamano S. Beer flavor. In: Teranishi R, Wick EL, Hornstein I, editors. *Flavor Chemistry: 30 Years of Progress*. New York (NY): Kluwer Academic Publisher; 1999. p. 167-73.
23. Alves-Araujo C, Hernandez-Lopez MJ, Sousa MJ, Prieto JA, Randez-Gil F. Cloning and characterization of the MAL11 gene encoding a high-affinity maltose transporter from *Torulaspora delbrueckii*. *FEMS Yeast Res* 2004;4:467-76.
24. Mercenier A, Pouwels PH, Chassy BM. Genetic engineering of lactobacilli, leuconostocs and *Streptococcus thermophilus*. In: Gasson MJ, de Vos WM, editors. *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. Oxford (UK): Chapman and Hall; 1994. p. 252-93.
25. De Vos WM. Safe and sustainable systems for food-grade fermentations by genetically modified lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 1999;9:3-10.
26. Swindell SR, Benson KH, Griffin HG, Renault P, Ehrlich SD, Gasson MJ. Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:2641-3.
27. Burgess C, Sybesma W, Hugenholtz J, van Sinderen D. Riboflavin Over-Production in *Lactococcus lactis*. In: Communication at 103rd General Meeting of the American Society of microbiology. Washington DC; 2003:18-22.
28. Sybesma W, Starrenburg M, Kleerebezem M, Mierau I, Kleerebezem M, De Vos WM, Hugenholtz J. Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 2003;69: 3069-76.
29. Boucher I, Parrot M, Gaudreau H, Champagne CP, Vadeboncoeur C, Moineau S. Novel food-grade plasmid vector based on melibiose fermentation for the genetic engineering of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:6152-61.
30. Kjellsson G, Strandberg M. Monitoring and surveillance of genetically modified higher plants. Guidelines for procedures and analysis of environmental effects. Basel (Switzerland): Birkhäuser Verlag; 2001.
31. CAST Issue Paper 12. Application of biotechnology to crops: benefits and risks. Ames (IA): Council for Agricultural Science and Technology; 1999.
32. Siedow JN. Reviewers: Genetic Resources Conservation Program. Los Angeles (CA): University of California; 1995.
33. Richard BF, Dart E, Fuchs RLO, Fraley T. Selectable Marker Genes: Safe for Plants? *Bio/Technol* 1992;10: 27-34.
34. An G. Binary Ti plasmid vectors. In: Walker JM, editor. *Methods in molecular biology*. Totowa (NJ): Humana Press; 1995. p. 47-8.
35. Komari T, Hiei Y, Saito Y, Murai N, Kumashiro T. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J* 1996;10:165-74.
36. Daley M, Knauf VC, Summerfelt KR, Turner JC. Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants. *Plant Cell Rep* 1998;17:489-96.
37. Vines R. Plant Biotechnology. Virginia Polytechnic Institute and State University. Virginia Cooperative Extension. Publication 443-002; 2001.
38. Regulation (EC) No 1829/2003 (OJ L268, p1, 18/10/2003) of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed; 2003.
39. Regulation (EC) No 1829/2003 (OJ L268, p24, 18/10/2003) of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC; 2003.
40. European Commission. Draft of the Commission Recommendation on technical guidance for sampling and detection of genetically modified organisms and material produced from genetically modified organisms as or in products in the context of Regulation (EC) No 1830/2003; 2003.
41. Zagon J, Schauzu M, Broll H, Bögl KW, Winkler D. Methods for the detection of genetic modifications in transgenic organisms. BgVV-Hefte 06/1998. Berlin (Germany): Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin; 1998.
42. Hemmer W. Foods derived from genetically modified organisms and detection methods. BATS-Report 2/1997. Basel (Switzerland): Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss Priority Programme Biotechnology of the Swiss National Science Foundation; 1997.
43. Bonfini L, Heinze P, Kay S, Van den Eede G. Review of GMO detection and quantification techniques. Bruxelles: European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection; 2002.
44. Meyer R, Jaccaud E. Detection of genetically modified soy in processed food products: development and validation of PCR assay for the specific detection of glyphosate-tolerant soybeans. In: Amado R, Battaglia R, editors. *Proceedings of the 9th European Conference on Food Chemistry. Authenticity and adulteration of food – The analytical approach*, vol 1; 24-26 September; Interlaken, Switzerland. Lausanne: Hestle; 1997. p. 23-8.

45. Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantification by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2725-9.
46. DMIF-GEN. Development of methods to identify foods produced by means of genetic engineering. EU-Project SMT4-CT96-2072. DMIF-GEN Final Report; 1999.
47. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6:986-94.
48. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technol* 1992;10:413-7.
49. Association Française de Normalisation (AFNOR). Foodstuffs – Detection and quantification of genetically modified vegetal organisms and derived products – Part 1 – Guidelines and requirements. Paris (France): Association Française de Normalisation; 2000.
50. Dumbroff EB, Gepstein S. Immunological methods for assessing protein expression in plants. In: Glick BR, Thompson JE, editors. *Methods in plant molecular biology and biotechnology*. Washington New York London: CRC Press LCC; 1993. p. 207-23.
51. Gaskell G, Bauer MW, Durant J, Allum NC. Worlds Apart? The Reception of Genetically Modified Foods in Europe and the U.S. *Science* 1999;285:168-75.
52. Nordlee JA, Taylor SL, Townsend JA, Thomas LA, Bush RK. Identification of a Brazil nut allergen in transgenic soybeans. *N Eng J Med* 1996;334:688-92.
53. Matsuda T, Alvarez AM, Tada Y, Adachi T, Nakamura R. Gene engineering for hypo-allergenic rice: repression of allergenic protein synthesis in seeds of transgenic rice plants by antisense RNA. *Proceedings of the International Workshop on Life Science in Production and Food-consumption of Agricultural Products*. Tsukuba, Japan; 1993. p. 4.
54. Kessler D. Genetically engineered food. *Gene Exch* 1992;3:182-90.
55. Nap J.P, Bijvoet J, Strikema WJ. Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants: an overview. *Transgenic Res* 1992;1:239-49.
56. Schloter K, Futterer J, Potrykus L. "Horizontal" gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chryanthemi*) occurs -if at all-at an extremely low frequency. *Bio/Technol* 1995;13:1094-8.
57. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familiar relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 1993;57:138-63.
58. Technical report on the Food Standards Agency project G010008. Evaluating the risk associated with using GMOs in human foods. University Newcastle; 2002. Available from: URL: <http://www.foodsafetynetwork.ca/gmo/gmnewcastlereport.pdf>
59. Jelenić S. Controversy associated with the common component of most transgenic plants – kanamycin resistance marker gene. *Food Technol Biotechnol* 2003;41:183-90.
60. Redenbaugh K, Haitt W, Martineau B, Lindemann J, Emlay D. Aminoglycoside 3'-phosphotransferase II (APH(3')II): review of its safety and use in the production of genetically engineered plants, *Food Biotechnol* 1994;8:137-56.
61. Huppertz JL. Selectable Marker Genes. *Singapore Microbiologist* 2000;2:58-63.
62. Rice M. Monarchs and Bt corn: Questions and answers. *Integrated crop management*. Ames (IA): Iowa State University; 1999. p. 247-69.
63. Johnson B. Genetically modified crops and other organisms: Implications for agricultural sustainability and biodiversity. In: Persley G.J, Lantin M.M, editors. *Agricultural Biotechnology and the Poor*. Washington (DC): Consultative Group on International Agricultural Research (CGIAR); 2000. p. 108-36.
64. International Council for Science. *Agricultural biotechnology, biodiversity and the environment*. Companion Publication Biotechnology and Sustainable Development; 2002. Available from: URL: [http://www.icsu.org/1\\_icsuinscience/GMO/html/WSSD%20chapter\\_4.htm](http://www.icsu.org/1_icsuinscience/GMO/html/WSSD%20chapter_4.htm)
65. Champolivier J, Gasquez J, Messéan A, Richard-Molard M. Management of transgenic crops within the cropping system In: Lutman PJW, editor. *Gene flow and agriculture: relevance for transgenic crops*. Farnham: British Crop Protection; 1999. p. 233-40.
66. Rieger MA, Lamond M, Preston C, Powles SB, Roush RT. Pollen-mediated movement of herbicide resistance between commercial Canola fields. *Science* 2002;145:2296-386.
67. Steinbrecher RA, Latham JR. Horizontal gene transfer from GM crops to unrelated organisms. *GM Science Review Meeting of the Royal Society of Edinburgh on "GM Gene Flow: Scale and Consequences for Agriculture and the Environment"*; Edinburgh 2003.
68. Baker HG. Characteristics and modes of origins of weeds. In: Baker HG, Stebbins HG, editors. *The genetics of colonizing species*. London: Academic Press; 1965. p. 56-91.
69. GM Science Review Panel. Report No 1. 21 July 2003. Available from: URL: <http://www.gmsciencedebate.org.uk/report/pdf/gmsci-report1-pt5.pdf>
70. FAO/WHO. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. Geneva: World Health Organisation; 2000.
71. Kok EJ, Kuiper HA. Comparative safety assessment for biotech crops. *Trends Biotechnol* 2003;21:439-44.

### *Summary*

#### GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS IN FOOD – PRODUCTION, DETECTION AND RISKS

The first genetically modified plant (GMP) was a tobacco resistant to antibiotics in 1983. In 1996, the first genetically altered crop, a delayed-ripening tomato was commercially released. In the year 2003, the estimated global area of GM crops for was 67.7 million hectares. To produce such a plant a gene of interest has to be isolated from the donor. Together with a promoter, terminator sequence and marker gene it has to be introduced into the plant cell which is then stimulated to generate a whole GMP expressing new characteristics (herbicide/insect resistance, delayed ripening). The last few months have seen a strong public debate over genetically modified organisms which has raised scientific, economic, political, and ethical issues. Some questions concerning the safety of GMPs are still to be answered, and decisions about their future should be based on scientifically validated information.

**KEY WORDS:** *allergy, antibiotic resistance, ELISA, herbicide resistance, insect resistance, PCR*

#### REQUESTS FOR REPRINTS:

Dr. sc. Davor Želježić  
Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada  
p. p. 291, HR-10001 Zagreb  
E-mail: [dzeljezi@imi.hr](mailto:dzeljezi@imi.hr)