

UTJECAJ GM BILJAKA NA LJUDSKO ZDRAVLJE

Mr. sc. Krunoslav Capak, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb

Tijekom tisućljetne povijesti ljudi su primjenjivali različite metode mijenjanja genetičkog materijala biljaka i životinja kako bi povećali urod i poboljšali kvalitetu hrane. Takav tradicionalni oblik genetske manipulacije je selektivni uzgoj. Ljudi su svjesno birali sjeme većih i otpornijih biljaka, kravu koja daje više mlijeka ili kukuruz s većim klipom. Na taj način kod malog broja biljnih i životinjskih vrsta pronađena su, odabrana i selektivno uzgajana specifična svojstva koja pogoduju čovjeku. Već početkom XIX. stoljeća čovjek je uzgajao biljke dobivene unakrsnim oprašivanjem, odabirući i prenoseći gene za korisne i poželjne karakteristike, čime je hotimice i svjesno narušavao i usmjeravao prirodnu učestalost, tzv. rekombinacije nasljednih osnova kao sredstva da se dobiju nove kombinacije gena, a time i nova svojstva. No, svi su ti procesi bili dugotrajni, moralo je proći i više generacija kako bi se dobio željeni rezultat, a ponekad su se prenijeli i nepoželjni geni. Razvojem znanosti te putem razmjene znanja i vještina čovjek je poželio brže doći do željenih rezultata. I uspio je (1).

Tehnike rekombinantne DNA ili popularnijeg naziva genetičko inženjerstvo najrevolucionarnije je dostignuće na području prirodnih znanosti poslije otkrića i primjene mikroskopa u biološkim istraživanjima. Te tehnike uzrokovale su i izazvale pravu revoluciju u biologiji i to naročito u onom dijelu koji se odnosi na proučavanje nasljednih osnova i funkcioniranje živih organizama. Zbog mogućnosti široke primjene na području prirodnih znanosti kao što su biologija, medicina, agronomija, biotehnologija i druge, te tehnologije postale su naša svakodnevnica. Na žalost, putem javnih glasila, senzacionalističkog tiska i televizijskih programa, s jedne strane te bahatosti znanstvenika koji su smatrali da su dobiti znanstvenih dostignuća sama po sebi razumljiva, stvorena je u javnosti uglavnom negativna slika o genetičkom inženjerstvu, pa je ta tehnologija i danas predmet različitih rasprava. Za širu javnost principi manipulacije nasljednim osnovama nisu jednostavni za razumijevanje jer se baziraju na prilično apstraktnim konceptima s kojima većina pučanstva nije upoznata. Često se negativistički stavovi prema tim dostignućima znanosti i tehnologijama mogu objasniti neinformiranošću društva i općenito nepovjerenjem u znanost. Stoga treba širu javnost stalno informirati o dostignućima znanosti na području molekularne biologije da bi se razumjelo što znanstvenici rade i zbog čega.

Komercijalni uzgoj GM kultura počeo je 1995. godine, a od tada do danas ukupna površina obradive zemlje zasijane GM kulturama u neprekidnom je porastu. Tako je s početnih 1.7 milijuna hektara 1996. godine ta površina narasla na više od 100 milijuna hektara i to ponajviše s četiri kulture – sojom, kukuruzom, pamukom i uljanom repicom. U 17 zemalja svijeta (SAD, Kanada, Argentina, Brazil, Kina, Paragvaj, Indija, JAR, Urugvaj, Australija, Rumunjska, Meksiko, Španjolska, Filipini, Honduras, Kolumbija i Njemačka) više od 8,5 milijuna farmera uzgaja GM kulture. Pri tome više od 95% ukupne proizvodnje odvija se u prvih pet navedenih zemalja, a više od 60% u SAD.

Do sada je tehnologija rekombinantne DNA uspješno primjenjena na velikom broju biljnih vrsta, od kojih je više od 50 došlo do faze pokusnog uzgoja u polju, međutim, za sada je dozvoljen komercijalni uzgoj sljedećih biljaka: soja, uljana

repica, pamuk, karanfil, lan, kukuruz, dinja, papaja, krumpir, riža, bundeva, šećerna repa, duhan, rajčica, cikorija, šljiva i pšenica. Među njima su ekonomski najznačajnije upravo one s kojima se i počelo: soja, kukuruz, pamuk i uljana repica. Soja je ujedno i prva biljna vrsta kod koje više od 50% svjetske proizvodnje potječe od GM kultura (danas preko 60%).

GMO hrana dostupna je potrošačima u zadnjih deset godina. Širom svijeta, a naročito u Americi ljudi je konzumiraju bez vidljivih utjecaja na zdravlje, što je evidentirano kroz brojne recenzirane znanstvene časopise i dokumente te izvještaje regulatornih tijela i agencija. No, o teoretski mogućim dugotrajnim utjecajima za sada ne možemo govoriti. Osnovni princip procjene rizika i neškodljivosti GM proizvoda je da se ocjenjuje individualni proizvod, a ne tehnologija. Strategija procjene rizika za GMO uključuje: informacije o karakteristikama modifikacije uključujući funkciju i osobine novog gena; neškodljivost, alergnost i prehrambena vrijednost novih supstancija/produkata ekspresije; identifikacija i evaluacija svih promjena u sastavu modificiranog proizvoda, ispitivanje neželjenih pojava; utjecaj modifikacije na toksikološka svojstva; uloga nove hrane u prehrani; potencijalni učinci prerade i kvarenja na GM proizvod itd. Osiguranje neškodljivosti takvih namirnica zahtijeva potpuno drugačiji pristup jer, za razliku od konvencionalnih namirnica s kojima smo kroz stoljeća uporabe postigli ravnotežu i poznati su nam njihov sastav, namjena i mogućnosti štetnog djelovanja, za genetski modificirane namirnice, s kojima se sve dogodilo u posljednjih deset godina, to sasvim sigurno ne možemo reći. Svjetska zdravstvena organizacija razvila je, u suradnji s drugim agencijama, glede ocjene neškodljivosti genetski modificiranih i drugih novih namirnica (namirnice koje su dobivene novim tehnologijama ili se nisu u bitnoj mjeri koristile u prehrani), poseban pristup koji se temelji na dokazivanju «ekvivalentnosti u bitnoj mjeri», tj. da se za svaku novu namirnicu utvrdi istovjetnost s njezinim konvencionalnim pandanom te, ako istovjetnost postoji, nova namirnica se tretira kao i njezin «original», a ako nije, treba biti podvrgnuta rigoroznim ispitivanjima neškodljivosti (toksikološka, alergološka, prehrambena i druga ispitivanja). Po tom principu dakle, ocjenjuje se da li hrana ili proizvod ima iste razine varijacija ključnih nutrijenata i toksikanata kao konvencionalni pandan ili ne. Princip ekvivalentnosti u bitnoj mjeri nije dakle metoda za ocjenu neškodljivosti sama po sebi nego kriterij po kojem se na nekoj novoj namirnici treba primijeniti testiranje neškodljivosti. Pri ocjeni neškodljivosti svakog GMO-a nužno je zadržati individualni pristup, tj. ocjenjivati neškodljivost svakog GMO ili proizvoda za sebe (8). Neke od zabrinutosti za zdravlje ljudi koje se vežu uz komercijalnu uporabu i konzumaciju GMO-a su pojava alergija, novih toksičnih produkata, prijenos rezistencije na antibiotike, modifikacija mikrobiološke flore crijeva ili interakcija transgena s DNK čovjeka. Potencijalni negativni utjecaji na bioraznolikost i okoliš su razvoj rezistencije štetočina, učinci na neciljane vrste i prijenos transgena na divlje ili konvencionalne uzgojne biljke (9).

Dodatna pitanja koja si postavljaju potrošači odnose se na to treba li nam uopće GM hrana te ukoliko i postoji nekakva dobrobit za proizvođače, kakva je dobrobit za potrošača? Čini se da je dosta zabrinutosti i odbijanja GM hrane potaknula bahatost vlasti i nedovoljna njihova komunikacija s potrošačima glede sigurnosti i koristi GM tehnologije, što u budućnosti svakako treba ispraviti. Svaka nova tehnologija koja se uvodi u praksu izaziva skepsu i donosi sa sobom i potencijalne opasnosti i zlouporabe, koje njezini tvorci ne mogu predvidjeti. Dosadašnje iskustvo nam govori da genetski modificirana hrana sama po sebi nema neki generalno štetan učinak, kao i da GM biljke oslobođene u okoliš neće prerasti

divlje i konvencionalno uzgojene biljke. Stoga je potencijalne opasnosti i utjecaje na zdravlje i okoliš potrebno ispitivati na individualnoj bazi i strogim zakonskim režimom osigurati da se na tržište puste samo oni proizvodi koji donose dobrobit bez štetnih utjecaja, te ih na tržištu i u okolišu sustavno kontrolirati i pratiti u svim aspektima njihova potencijalnog utjecaja na čovjeka i ekosustav. Pri tome se svakako ne smije zanemarivati i pravo potrošača na vlastiti izbor, pa takve namirnice i drugi proizvodi trebaju biti označeni i ponuđeni na izbor. Na kraju potrošači će sami odabrati žele li ili ne žele konzumirati takve namirnice, što će kao konačni regulatorni mehanizam odrediti isplati li se proizvoditi GM hranu (10). Hrvatska se odredila slijediti u regulatornom smislu Europsku uniju, što osigurava najveći mogući stupanj zaštite zdravlja i interesa potrošača u svijetu. Treba reći da je hrvatski regulatorni sustav usklađen sa EU, a na tržište se mogu stavljati GMO-i i proizvodi, ali se prethodno mora podnijeti zahtjev kompetentnom tijelu za dopuštenjem. Slijedom te činjenice u Hrvatskoj se od 2003. godine kontinuirano provodi kontrola prisustva GMO na tržištu, kao i prilikom uvoza u laboratoriju Odsjeka za kvantifikaciju GMO i procjenu rizika Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo.

O genetski modificiranoj hrani postoje različita mišljenja. Prva generacija ovih proizvoda pokazuje malo dobrobiti za proizvođače, a gotovo nikakve za potrošače. Tijekom uvođenja tehnologije rekombinantne DNA u poljoprivrednu proizvodnju, premalo se komuniciralo s javnosti što je rezultiralo time da još uvijek postoji veliki oprez i otpor za uvođenje i širenje poljoprivrednih kultura dobivenih GM tehnologijom. U novije vrijeme se istražuju aplikacije koje će dobrobit potrošača staviti na prvo mjesto kao što su npr. nutricionistički povoljne modifikacije uzgojnih biljaka, što će zajedno s kontinuiranim informiranjem i edukacijom javnosti promijeniti negativnu percepciju potrošača.

Literatura:

1. Capak, K. Moguće opasnosti za zdravlje ljudi zbog oslobađanja GMO-a u okoliš, u urednici Čvorošćec, B. Capak, K., Genetički preinačena hrana – zdravstveni rizik, da ili ne? Zagreb, 2001, Akademija medicinskih znanosti Hrvatske
2. WHO : Legislativa EU dostupno na : http://www.who.it/programmes/food_safety.htm
3. WHO: Release of GMOs in the environment: is it a health hazard?, Proceedings of WHO Seminar, Rome, Italy, 7-9 September 2000, ECEH Rome Division, 2000.
4. Hoffman M. Food biotechnology: friend of friend in the safe food fight: in Current studies of biotechnology – volume III, Medicinska naklada, Zagreb, 2003.1-60.

Primjena biljaka u proizvodnji stranih proteina i antigena - *molecular farming*

Dr. sc. Hrvoje Fulgosi, Institut Ruđer Bošković

Uvod

Iako je koncept korištenja biljaka da bi se proizveli vrijedni farmaceutici, kao što su cjepiva, star dvadesetak godina njegovo je provođenje kao uspostavljene tehnologije tek nedavnog vijeka. Početno oslanjanje na transgenične biljke većim je dijelom zamijenjeno korištenjem prolazne transformacije, uspostavljene su tehnike za stvaranje humanih i animalnih cjepiva i pokazana je njihova efikasnost, nekoliko je cjepiva proizvedenih u biljkama prošlo Fazu I kliničkih ispitivanja na ljudima, uspostavljeni su dobri i jasni regulatorni okviri, a dostupni su i proizvodni procesi za produkciju materijala kliničke kakvoće. Početni je koncept jeftinih jestivih vakcina zamijenjen spoznajom da su potrebni posebno formulirani proizvodi koje se može po potrebi i injicirati. Tehnologija se potvrdila kao način dobivanja jeftinih, jednostavno proizvodivih i skalabilnih proizvoda. Posebno treba istaknuti potencijal ove tehnologije za produkciju cjepiva za brzu primjenu u smislu novih virusa s pandemijskim potencijalom ili agensa namijenjenih bioterorizmu.

Tehnologija proizvodnje stranih proteina u biljkama

Proizvodnja jestivih cjepiva u biljkama pokazala se je kao idealistička tehnologija koja nikada nije zaživjela. Mnogi problemi povezani s nereproducibilnim nakupljanjem antigena u plodovima, nestabilnošću unesenih gena, potencijalnim širenjem transgena u okoliš, nemogućnošću kontroliranja doze, kao i brojna etička pitanja zaustavila su primjenu ove tehnologije. Ideja da se jestive biljke i voće koriste kao nosioci za primjenu cjepiva nije međutim napuštena, i to većinom zato što se cjepiva mogu „uzgajati“ na područjima na kojima su potrebna te zato što je primjena oralnim putem daleko jednostavnija od injiciranja.

Danas ekspresijski sustavi uključuju stabilne transgenične ili transplastomičke biljke ili linije biljnih stanica s inducibilnom ili konstitutivnom ekspresijom, ekspresijom specifičnom za sjeme, kao i biljne sustave koji se temelje na prolaznoj (tranzijentnoj) ekspresiji putem virusa ili bakterija *Agrobacterium tumefaciens*. Od biljnih vrsta koje se koriste za proizvodnju antigena najviše se koriste varijeteti duhana (*Nicotiana* sp.), uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*), lucerna, špinat, krumpir, vodena leća, jagoda, mrkva, rajčica, aloa i jednostanične alge. Proteini su također ekspimirani i u sjemenkama kukuruza, riže, duhana i u grašku, a moguća je proizvodnja u suspenzijskim staničnim kulturama duhana i kukuruza, kao i kulturama dlakavog korijenja (hairy root) te transformiranim kloroplastima različitih biljnih vrsta. Kulture jednostaničnih organizama i stanične kulture uglavnom su od manjeg značaja za proizvodnju cjepiva. Razlog ovome je složenost uzgoja za kojeg je potrebna veća tehnička obučenost, kao i cijena ovakvog uzgoja koja

ne omogućava značajne uštede u usporedbi s konvencionalnim bakterijskim ili eukariotskim staničnim kulturama. Osim toga, za uspješan uzgoj potrebni su visoko sterilni uvjeti, a i prinosi su znatno manji. Istraživan je i potencijal nekih mikroalgi, kao što su *Chlorell* i posebice *Chlamydomonas* spp., no cjepiva nisu zauzela značajno mjesto među dobivenim proizvodima.

Osim u jestivim biljkama koje imaju i značajnu biomasu, mnogi su antigeni proizvedeni u uročnjaku. Među njima treba istaknuti antigene prenosivog gastroenteritisa svinja (Gomez i sur., 1998), zarazne bolesti burze kod pilića (Wu i sur., 2004), ESAT-6 antigen bakterije *Mycobacterium tuberculosis* (Rigano i sur., 2006), rekombinantni hepatitis B/čovječki HIV antigen te protein L1 ljudskog papiloma virusa (Greco i sur., 2007; Lindh i sur., 2008). Iako se ova platforma pokazala kao izuzetno pogodna za ekspresiju stranih antigena, zbog male biomase uročnjaka ekonomski je neisplativa proizvodnja u velikim količinama. U kontekstu jestivog voća i gomolja, rajčica je modificirana kako bi proizvodila glikoprotein G virusa bjesnoće (McGarvey i sur., 1995), glikoprotein F respiratornog sincicijskog virusa (Sandhu i sur., 2000), površinski protein virusa E hepatitisa (Ma i sur., 2003), antigen F1-V bakterije *Yersinia pestis* (Alvarez i sur., 2006), sintetički HBV/HIV antigen (Shchelkunov i sur., 2006), kapsidni antigen Norwalk virusa (Zhang i sur., 2006) te neki drugu. Transgenični gomolji krumpira korišteni su između ostaloga za proizvodnju VP60 antigena hemoralgične bolesti zečeva (Castanon i sur., 1999), proteina E7 i L1 ljudskog papiloma virusa (Franconi i sur., 2002; Biemelt i sur., 2003; Warzecha i sur., 2003). Izolirani antigeni pokazali su izuzetnu imunogenost kada su primijenjeni u obliku injekcija. Jestive lisnate biljke kao što su lucerna, špinat, salata i vučji bob također su korištene za proizvodnju antigena. Primjena ovako dobivenih antigena vjerojatno je najbolje pokazana korištenjem hemaglutininskog proteina MV-H boginja proizvedenog u transgeničnoj salati za imunizaciju miševa (Wingdorovitz i sur., 1999). Osim listova korišteno je i sjeme kukuruza i riže za proizvodnju različitih proteina i antigena, no ovdje treba napomenuti da je opasnost od širenja transgeničnih vrsta u ljudski prehrambeni lanac velika. Nekoliko incidenata u SAD u kojima je pokazano prisustvo transgeničnog kukuruza koji proizvodi virusne antigena u hrani, dovelo je do moratorija na istraživanja i primjenu jestivih vakcina. Stabilna transformacija kloroplasta pokazala se je pogodnom za ekspresiju proteina bakterijskog porijekla. U ovom je sustavu postignuta i dosad najveća količina proizvedenog rekombinantnog proteina, ~3 g/kg proteina HPV-16 L1 dobivenog iz listova duhana (Fernandez-San Millan i sur., 2008). Dobiveni protein poprimio je pravilnu konformaciju i potaknuo je stvaranje antitijela u organizmu primatelju. Moderna istraživanja stoga su se velikim dijelom usmjerila na biljke duhan. Vrsta *Nicotiana tabacum* danas se koristi za proizvodnju velikog broja rekombinantnih proteina. U SAD 2009. pokrenut je program brze i jeftine proizvodnje cjepiva na nove viruse gripe, posebice virusa H1N1. Program „Blue Angel“ razvija se pod okriljem agencije DARPA (Defense Advanced Research Projects Agency), a pokazano je da se u roku od 4 tjedna može proizvesti milione doza cjepiva za što je konvencionalnim metodama potrebno 6 mjeseci. Također, kompanija iBio Inc. pokrenula je i prve kliničke pokuse sa cjepivima na H1N1 proizvedenim u duhanu, a treba istaknuti i kanadsku tvrtku Medicago Inc. Osnova za ekspanziju istraživanja i veliki interes za antigenima proizvedenim u biljkama svakako je razvoj tehnologije prolazne ekspresije stranih gena u lisnatim dijelovima biljke. Za unos gena koriste se vektori na bazi virusa ili infiltracija bakterijama *Agrobacterium*. U oba slučaja moguće je dobiti velike količine proteina u roku od

nekoliko dana za razliku od mjeseci koliko je potrebno u slučaju transgениčne ekspresije. Kod viralnih vektora najviše se koristi mozaični virus duhana (TMV), a strani se protein stvara kao površinski epitop. Metoda se pokazala vrlo uspješna za ciljanu (specifičnu za svakog pacijenta) produkciju cjepiva na jednolančani Fv epitop tumora non-Hodking limfoma te papiloma virusa zečeva CRPV i ROPV (Palmer i sur., 2006). Uspješno se koriste još i krumpirov virus X (PVX), mozaični virus bambusa (BaMV), mozaični virus papaje (PapMV), mozaični virus krastavca (CMV) i još neki drugi (pregled u Brenan i sur., 2001 i Canizares i sur., 2005). Osim štapičastih biljnih virusa koriste se i Gemini virusi.

Uporaba suspenzije agrobakterija za infiltraciju međustaničnog prostora listova još je jednostavnija, a uneseni se gen može eksprimirati ili sa odsječka DNA unesenog u genom biljke pomoću T-DNA, ili sa episomalnog plazmida. Danas postoje brojni vektori koji omogućavaju korištenje različitih promotora ili signalnih sljedova za različite stanične kompartimente. Možemo razlikovati dva osnovna tipa, vektore koji se temelje na binarnim plazmidima i one koji su u osnovi modificirani biljni virusi. Potonje vektore razvija nekoliko kompanija, kao što su MagnICON iz Njemačke, Icon Genetics i Fraunhofer iz SAD-a. Glavno je ograničenje ovih vektora njihova uska specifičnost za domaćina koji je većinom duhan *Nicotiana benthamiana*. Neki od antigena koji su uspješno proizvedeni u ovim sustavima su; F1-V fuzijski protein iz *Yersinia-pestis* (Santi i sur., 2006), kapsidni protein ljudskog Norwalk norovirusa (Dylewski, 2009; Rybicki, 2009), HPV E7 protein (Musychuk et al., 2007) te H5N1 hemaglutinin iz virusa influence. Tvrtka Farmacule Bio-Industries iz Australije razvila je sustav INPACT (In-Plant Activation technology) koji se zasniva na gemini virusima. Prednost sustava je proizvodnja molekula koje su jako toksične za biljku domaćina.

Važno je napomenuti da je za sve heterologne ekspresijske sustave u većini slučajeva potrebno izvršiti optimizaciju uporabe kodona, odabrati pogodnog domaćina (promjena kultivara), odabrati odgovarajući signalni slijed za substaničnu lokalizaciju stranog proteina ili pokušati dobiti pravilnu post-translacijsku modifikaciju rekombinantnog proteina.

Budućnost tehnologije

U budućnosti treba očekivati snažan razvoj ove tehnologije posebice za proizvodnju cjepiva za životinje. U segmentu uobičajenih cjepiva za ljudsku uporabu ne očekuje se snažan prodor u područje biljnih sustava i to većinom stoga što postoje brojne kompanije s dobro razvijenim klasičnim metodama proizvodnje. Razvoj ove tehnologije u budućnosti se očekuje u smislu brze proizvodnje cjepiva protiv pandemijskih virusa, kao što je pokazano u slučaju virusa H1N1. Što se tiče regulatornog okvira, mnoge su zemlje znatno pojednostavile postupke dobivanja dozvola za klinička istraživanja ovako dobivenih cjepiva i proteina, što otvara tržišnu nišu za male i srednje biotehnoške tvrtke.

Literatura

- Alvarez, M.L., Pinyerd, H.L., Crisantes, J.D., Rigano, M.M., Pinkhasov, J., Walmsley, A.M., Mason, H.S. i Cardineau, G.A. (2006) Plant-made subunit vaccine against pneumonic and bubonic plague is orally immunogenic in mice. *Vaccine* 24, 2477–2490.
- Biemelt, S., Sonnewald, U., Galmbacher, P., Willmitzer, L. i Muller, M. (2003) Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J. Virol.* 77, 9211–9220.
- Brennan, F.R., Jones, T.D. i Hamilton, W.D. (2001) Cowpea mosaic virus as a vaccine carrier of heterologous antigens. *Mol. Biotechnol.* 17, 15–26.
- Canizares, M.C., Lomonosoff, G.P. i Nicholson, L. (2005) Development of cowpea mosaic virus-based vectors for the production of vaccines in plants. *Expert. Rev. Vaccines.* 4, 687–697.
- Castanon, S., Marin, M.S., Martin-Alonso, J.M., Boga, J.A., Casais, R., Humara, J.M., Ordas, R.J. i Parra, F. (1999) Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J. Virol.* 73, 4452–4455.
- Dylewski, A. (2009) Tobacco plants yield the first vaccine for the dreaded “cruise ship virus”. <http://tinyurl.com/ykz6un3>.
- Fernandez-San Millan, A., Ortigosa, S.M., Hervas-Stubbs, S., Corral-Martinez, P., Segui-Simarro, J.M., Gaetan, J., Coursaget, P. i Veramendi, J. (2008) Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant Biotechnol. J.* 6, 427–441.
- Franconi, R., Massa, S., Illiano, E., Mullar, A., Cirilli, A., Accardi, L., Di, B.P., Giorgi, C. i Venuti, A. (2006) Exploiting the plant secretory pathway to improve the anticancer activity of a plant-derived HPV16 E7 vaccine. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 19, 187–197.
- Gomez, N., Carrillo, C., Salinas, J., Parra, F., Borca, M.V. i Escribano, J.M. (1998) Expression of immunogenic glycoprotein S polypeptides from transmissible gastroenteritis coronavirus in transgenic plants. *Virology* 249, 352–358.
- Greco, R., Michel, M., Guetard, D., Cervantes-Gonzalez, M., Pelucchi, N., Wain-Hobson, S., Sala, F. i Sala, M. (2007) Production of recombinant HIV-1 / HBV virus-like particles in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants for a bivalent plant-based vaccine. *Vaccine* 25, 8228–8240.
- Lindh, I., Kalbina, I., Thulin, S., Scherbak, N., Savenstrand, H., Brave, A., Hinkula, J., Strid, A. i Andersson, S. (2008) Feeding of mice with *Arabidopsis thaliana* expressing the HIV-1 subtype C p24 antigen gives rise to systemic immune responses. *APMIS* 116, 985–994.
- Ma, Y., Lin, S.Q., Gao, Y., Li, M., Luo, W.X., Zhang, J. i Xia, N.S. (2003) Expression of ORF2 partial gene of hepatitis E virus in tomatoes and immunoactivity of expression products. *World J. Gastroenterol.* 9, 2211–2215.
- McGarvey, P.B., Hammond, J., Dienelt, M.M., Hooper, D.C., Fu, Z.F., Dietzschold, B., Koprowski, H. i Michaels, F.H. (1995) Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology (N. Y.)* 13, 1484–1487.
- Musiychuk, K., Stephenson, N., Bi, H., Farrance, C.E., Orozovic, G., Brodelius, M., Brodelius, P., Horsey, A., Ugulava, N., Shamloul, A.M., Mett, V., Rabindran, S., Streatfield, S.J. i Yusibov, V. (2007) A launch vector for the production of vaccine antigens in plants. *Influenza. Other Respi. Viruses.* 1, 19–25.

Rigano, M.M., Dreitz, S., Kipnis, A.P., Izzo, A.A. i Walmsley, A.M. (2006) Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine. *Vaccine* 24, 691–695.

Rybicki, E.P. (2009a) Plant-produced vaccines: promise and reality. *Drug Discov. Today* 14, 16–24.

Sandhu, J.S., Krasnyanski, S.F., Domier, L.L., Korban, S.S., Osadjan, M.D. i Buetow, D.E. (2000) Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Transgenic Res.* 9, 127–135.

Shchelkunov, S.N., Salyaev, R.K., Pozdnyakov, S.G., Rekoslavskaya, N.I., Nesterov, A.E., Ryzhova, T.S., Sumtsova, V.M., Pakova, N.V., Mishutina, U.O., Kopytina, T.V. i Hammond, R.W. (2006) Immunogenicity of a novel, bivalent, plant-based oral vaccine against hepatitis B and human immunodeficiency viruses. *Biotechnol. Lett.* 28, 959–967.

Warzecha, H., Mason, H.S., Lane, C., Tryggvesson, A., Rybicki, E., Williamson, A.L., Clements, J.D. i Rose, R.C. (2003) Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *J. Virol.* 77, 8702–8711.

Wigdorovitz, A., Perez Filgueira, D.M., Robertson, N., Carrillo, C., Sadir, A.M., Morris, T.J. i Borca, M.V. (1999b) Protection of mice against challenge with foot and mouth disease virus (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant tobacco mosaic virus expressing the FMDV structural protein VP1. *Virology* 264, 85–91.

Wu, J., Yu, L., Li, L., Hu, J., Zhou, J. i Zhou, X. (2007) Oral immunization with transgenic rice seeds expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus induces protective immune responses in chickens. *Plant Biotechnol. J.* 5, 570–578.

Zhang, X., Buehner, N.A., Hutson, A.M., Estes, M.K. i Mason, H.S. (2006) Tomato is a highly effective vehicle for expression and oral immunization with Norwalk virus capsid protein. *Plant Biotechnol. J.* 4, 419–432.

Sigurnost i nesigurnost hrane koja potječe od GMO

mr. sc. Marijan Katalenić, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb

Uvod : Za svaki GMO ili proizvod koji sadrži GMO-e, a koji se namjerava prvi put staviti na tržište, treba podnijeti zahtjev i pribaviti dopuštenje. Dopuštenje za stavljanje na tržište GMO-a ili proizvoda koji sadrži GMO-e koji se upotrebljavaju u kozmetici, farmaciji, zdravstvenoj zaštiti ljudi, u prehrambenim proizvodima i proizvodima koji se upotrebljavaju u prehrambeno-prerađivačkoj industriji ili su njen proizvod izdaje Ministarstvo zdravlja. Prema pravilniku o označavanju hrane, svaki proizvod koji se stavlja na tržište a sadrži ili potječe od GMO mora na vidljivom mjestu na ambalaži i na popratnoj dokumentaciji imati izjavu da je proizvod sam po sebi GMO ili da sadrži sastojke GMO-e, kao i druge propisane podatke vezane za proizvod ili njegovu uporabu. Oznaka mora jasno navoditi "genetički modificiran organizam" ili sadržavati rečenicu "ovaj proizvod sadrži genetički modificirane organizme".

Potrošači smatraju da su tradicionalne namirnice, koje se jedu već tisućama godina, zdravstveno ispravne. Pri razvoju novih usjeva pomoću tradicionalnih metoda, neke od postojećih karakteristika namirnica mogu se promijeniti. Nije uobičajeno da se nove biljke razvijene pomoću tradicionalnih uzgojnih tehnika istražuju dovoljno detaljno metodama procjene rizika koji se primjenjuje kod GMO usjeva, pa nastaje znatna razlika u postupku provjere i procjene zdravstvene ispravnosti prije njihove prodaje

Kod genetički modificiranih organizama uspostavljeni su posebni sustavi za detaljnije analiziranje, vrednovanje i provjeravanje GM organizama i od njih dobivenih namirnica s obzirom na ljudsko zdravlje i okoliš.

Namirnice dobivene od GMO-a, koje se danas mogu nabaviti na međunarodnom tržištu, prošle su detaljnu provjeru. Prema sadašnjim spoznajama, ne postoji veći zdravstveni rizik u konzumiranju takvih namirnica u usporedbi s tradicionalnim namirnicama.

Još od davnih dana hrana je empirijski povezana s unosom prehrambeno korisnih sastojaka, ali i štetnih tvari u organizam. Prikladno tadašnjim spoznajama, te druge tvari bile su prirodni sastojci nekih biljaka ili životinja koje su vješti pripremljivači hrane znali izdvojiti tako da sačuvaju zdravlje ili čak život potrošača. Ono što nisu znali predvidjeti su mnogo opasniji i podmukliji štetni sastojci koji nastaju tijekom pripremanja hrane ili se sami po sebi unose tijekom nepravilne prehrane. Drugi štetni sastojci ili njihovi ostaci mogu postati sastavni dio sirovina ili gotove hrane, mogu doći iz okoliša, posuđa za pripremu hrane ili nastati kao sekundarni metaboliti nekih plijesni koji se stvaraju na sirovinama.

Osim hrane kao takve, higijenski uvjeti pri obradi, pripremi i čuvanju hrane bili su i danas jesu dodatni rizik za konzumenta. Biti sit, i prije kao i danas, nije preduvjet za zdravlje i dug život.

Sigurnost hrane kao pojam nije definiran Zakonom o hrani. Sam po sebi predstavlja nešto širi pojam nego zdravstvena opasnost a obuhvaća sve radnje od primarne proizvodnje, uključujući i uvjete za njenu proizvodnju do konačnog proizvoda na stolu krajnjeg potrošača. Sigurnost hrane uključuje i pojmove kao što su rizik i opasnost . Rizik je funkcija vjerojatnosti štetnih utjecaja na zdravlje i jačine tih utjecaja povezanih s opasnostima u hrani (npr. obolijevanje nakon konzumiranja određene hrane i sl.), dok je opasnost konkretno određena bakterija, pesticid, strano tijelo u hrani i sl.

Zdravstveno ispravnom hranom smatra se hrana prihvatljiva za konzumaciju i bez štetnih tvari u količinama koje bi akutno ili kronično mogle ugroziti ljudsko zdravlje. To

bi značilo da hrana koja ne sadrži opasnosti ili sadrži dopuštene opasnosti u minimalnim količinama ne predstavlja rizik za potrošača.

Jasnije, opasnost se povezuje s rizikom s obzirom na patogenost ili toksičnost neživog ili živog uzročnika i prisutnost u hrani u dovoljnoj količini da utječe na zdravlje. Veća ili manja ekspozicija potrošača samo pojedinim opasnostima često je povezana s prehranbenim navikama koje mogu povećati ali i smanjiti rizik. U suvremenom „društvu rizika“ nove se opasnosti strukturno proizvode u svakodnevnicu tehnološkog okruženja, a pojedine opasnosti dobivaju sve veće značenje („emerging risks“). Pretpostavlja se da je „društvo rizika“ u stanju razviti dovoljne, potrebne i djelotvorne mjere za nadzor opasnosti i smanjenje rizika pa tako i u pogledu GMO.

Opasnosti u hrani općenito se dijele na kemijske, biološke i fizičke opasnosti i identificiraju se i kvantificiraju kemijskim, mikrobiološkim i senzorskim analizama.

Prema propisima koji vrijede kod nas i u EU, zdravstveno ispravna hrana ne smije sadržavati ili ne smije sadržavati više od MDK :

- Metala i metaloida
- Radioaktivnih tvari
- Određenih ostataka pesticida
- Mikotoksine
- Određene mikroorganizme
- PAH, Dioksine, PCB, Nitrate, 3-MCPD,
- Određene aditive
- Toksine morskih plodova, histamin
- Ostatke veterinarskih lijekova, hormone
- Neverificirani GMO
- Štetna bojila tipa Sudan, metilensko žutilo, Para Red i 4-(dimethylamino)azobenzene (Butter Yellow)

Hrana je svojim hranjivim sastojcima idealna podloga za rast mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje hrane te je čine nepogodnom za potrošnju, a patogene vrste ili njihovi otrovi čine hranu opasnom za konzumaciju. Postoje brojne različite vrste opasnih tvari koje mogu nastati prirodnim putem ili humanim aktivnostima, a hrana se može kontaminirati opasnim tvarima tijekom bilo koje faze proizvodnje, procesa prerade i distribucije hrane. Svi u lancu hrane „od polja do stola“, primarni proizvođači, prerađivači i distributeri hrane, ali i potrošači odgovorni su za zdravstvenu ispravnost i sigurnost hrane.

Stvaranje većih naselja, industrijalizacija te drugačiji pristup čuvanju i distribuciji postavilo je sasvim nove zahtjeve pred proizvođače hrane. Otvaranjem granica, prodajom sirovina i hrane iz cijelog svijeta, prehranbeni lanac postaje dulji i složeniji, što povećava mogućnost kontaminacije. Uz to, mijenjaju se prehranbene navike, raste standard, što rezultira većom potrošnjom hrane životinjskog podrijetla. Raste i udio starije populacije, putovanja i migracije potiču rasprostranjenost, a također se teško ulazi u trag bolestima koje su uzrokovane hranom. To se posebno odnosi na kemijski štetne tvari čije djelovanje može imati dovoljno odgođen učinak da se namirnici-uzročniku ne može ući u trag.

Posljedica svega je generiranje novih opasnosti i povećanje ponajprije tehnološkog rizika kod konzumirane hrane.

Razvojem analitičkih postupaka i tehnika, stručnjaci usavršavaju mjerne instrumente za otkrivanje opasnosti i sve preciznije procjenjuju rizik. Javnost često nije dobro upućena u aspekte rizika i zato od neovisnih stručnjaka traži potvrdu ili reduciranje vlastitih strahova. Dugoročno gledano, takav stav je koristan za proizvođače hrane i u

konačnici im pruža priliku za povratak povjerenja potrošača. Strukturna uvjetovanost rizika postala je uobičajeni dio svakodnevnice suvremenog društva u kojem je prisutnost rizika neupitna, a rizični sustavi često izvan dometa individualne regulacije. Institucionalne okvire sustava sigurnosti hrane javnost često percipira kao apstraktne ustupajući time mjesto laičkoj percepciji rizika od hrane. Pritom varijable koje utječu na percepciju rizika su proživljena iskustva, konkretno znanje, predrasude, stupanj suživljavanja s rizikom, karakter inicijalnih iskustava, poznavanje ili nepoznavanje rizika, moguća šteta od rizika, imaginacija ili slika o riziku, pretpostavke o utjecaju rizika na život i zdravlje, socioekonomski status pojedinca i sl.

Apsurdno, problem civilnog društva u 21. stoljeću je problem komunikacije i problem poljuljanog povjerenja u stručnjake na području zdravstvene ispravnosti i sigurnosti hrane. Potrošači pokušavaju vratiti povjerenje osnivanjem neovisnih agencija s panelima neovisnih znanstvenika koji na sebe preuzimaju komunikaciju sa sudionicima procesa i daju procjene i tumačenja rizika.

Dakle, potenciranje problema zakonodavca ili proizvođača hrane kada je riječ o štetnim tvarima, sigurnosti hrane i zdravstvenoj ispravnosti hrane služi kao trojanski konj koji u svojoj utrobi nosi razarače u obliku loše kvalitete hrane, ali i štetnih sastojaka koji nastaju pripremom određene hrane i obično nisu predmet analitičkog određivanja. Jasnije, sigurna hrana prema zakonskim propisima prividno donosi sigurnost potrošača s pozicije trovanja te zadovoljstvo proizvođača, što opet prividno akutno, trenutno, ne truje potrošača, koji će zbog toga privida i dalje tu hranu kupovati.

Svi GM proizvodi trenutno prisutni na međunarodnom tržištu prošli su procjenu opasnosti, koju su obavile državne institucije, pri čemu se općenito slijede isti osnovni principi, uključujući i ocjenu opasnosti za okoliš i ljudsko zdravlje. Navedena su ocjenjivanja temeljita, koriste se trenutno poznatim metodama i postupcima i do sada još nisu upozorila na opasnosti za ljudsko zdravlje.

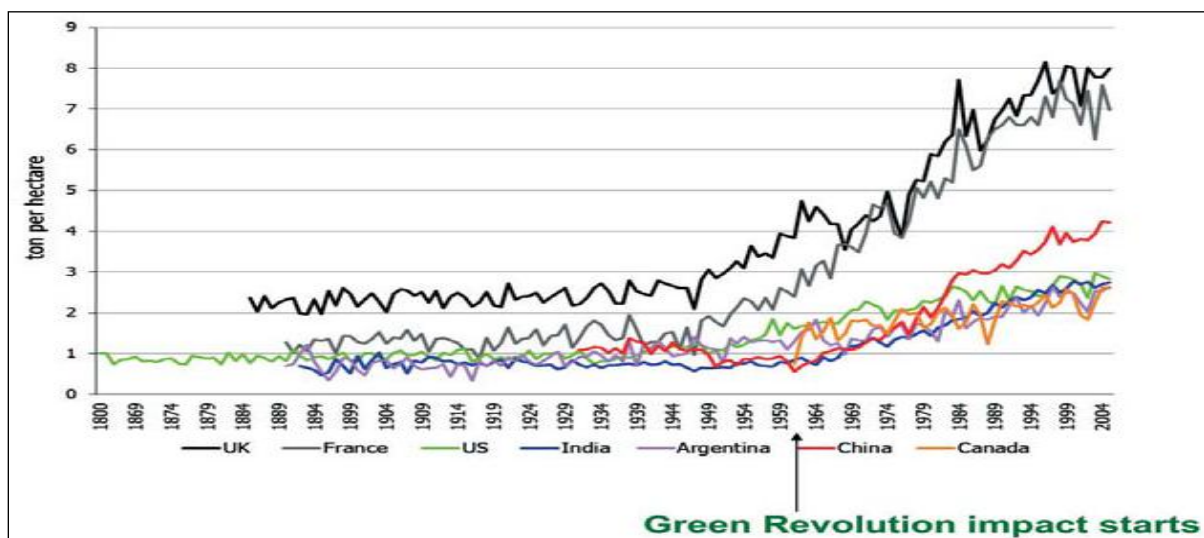
Međutim rizici kao i za svu ostalu konvencionalnu hranu ostaju prisutni, jer GMO hrana ili sirovine koje potječu od GMO hrane prolaze isti put od polja do stola, s istim rizicima agrotehničkih mjera, tehnologije prerade i distribucije do krajnjeg potrošača.

GMO i oplemenjivanje poljoprivrednog bilja

prof. dr. sc. S. Kereša i prof. dr. sc. I. Pejić
Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet

Uvod

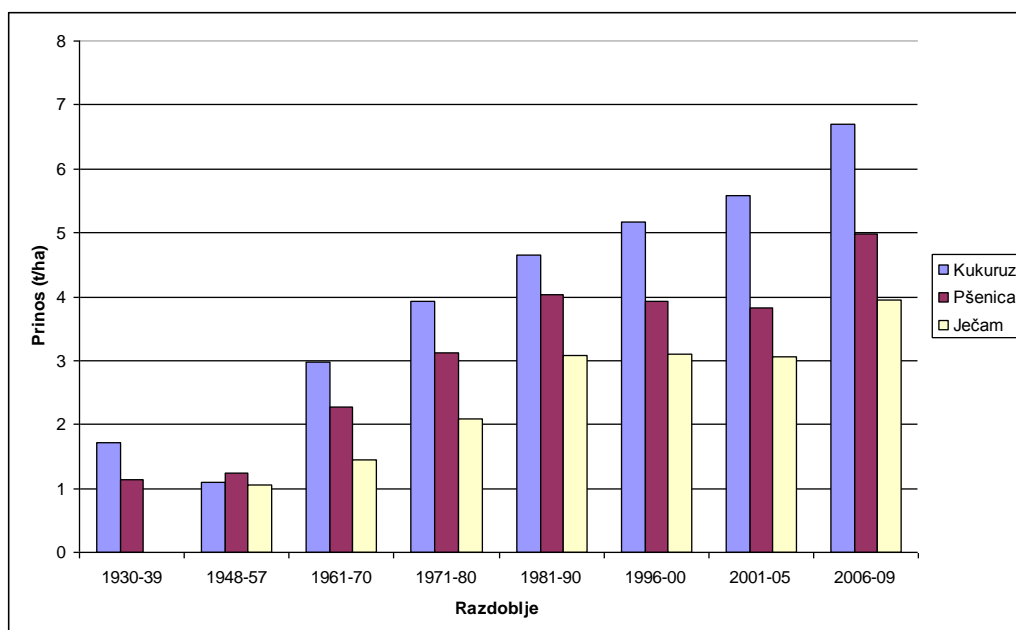
Početak znanstveno utemeljenog oplemenjivanja bilja veže se uz otkriće spolnosti biljaka tijekom 18. stoljeća i Mendelovih zakona nasljeđivanja u drugoj polovici 19. stoljeća. Ipak, svoj glavni razvoj i profiliranje u struku oplemenjivanje bilja doživljava tijekom zadnjih stotinu godina. U ovom periodu dogodio se revolucionarni iskorak u poljoprivrednoj proizvodnji koji je rezultirao višestrukim povećanjem prinosa najvažnijih poljoprivrednih kultura poput pšenice (graf 1), riže, kukuruza i mnogih drugih (Ortiz, 2011).



Graf 1. Povećanje prinosa pšenice u zadnja dva stoljeća. Izvor: R. Ortiz, 2011.

Na temelju nekoliko opsežnih studija široko je prihvaćeno mišljenje da je pored niza drugih inovacija u poljoprivrednoj proizvodnji poput unapređenja ishrane i zaštite bilja, razvoja mehanizacije i sl., glavni doprinos (40-60% povećanja) posljedica razvoja genetike i oplemenjivanja bilja, tj. boljih sorata. Tako su primjerice u Hrvatskoj prosječni prinosi pšenice u zadnjih 80 godina povećani skoro pet puta, a kukuruza i ječma četiri puta (graf 2.). Uspjeh hrvatskih oplemenjivača u kreiranju visokorodnih sorata ima za posljedicu visoku neovisnost o sjemenskom materijalu stranih kompanija što omogućuje visoku dodanu vrijednost u poljoprivrednoj proizvodnji (tablica 1.).

Tijekom razvoja danas klasičnih metoda oplemenjivanja bilja dogodilo se nekoliko revolucionarnih otkrića koja su značajno utjecala na veliko povećanje produktivnosti najvažnijih poljoprivrednih kultura, kao i unapređenje kvalitete, otpornosti na bolesti i štetnike, te prilagodbu različitim okolinskim čimbenicima. Sve ovo omogućilo je intenziviranje i širenje poljoprivredne proizvodnje u područja koja prije nisu bila prikladna za ovu svrhu te je rezultiralo značajnim povećanjem ukupne svjetske proizvodnje hrane. Trend povećanja prinosa i prilagodbe suvremenim zahtjevima proizvodnje i tržišta nastavlja se i danas.



Graf 2. Porast prinosa najvažnijih poljoprivrednih kultura u RH. Izvor: Kozumplik i Pejić (2012.) u: Oplemenjivanje poljoprivrednog bilja u Hrvatskoj (monografija)

Tablica 1. Udio sjemena (%) domaćih sorti u strukturi sjetve u RH. Izvor: Kozumplik i Pejić (2012.) u Oplemenjivanje poljoprivrednog bilja u Hrvatskoj (monografija)

Kultura	Domaće sorte				Inozemne sorte			
	2007/ 2008	2008/ 2009	2009/ 2010	prosjeak	2007/ 2008	2008/ 2009	2009/ 2010	prosjeak
Pšenica	89,3	87,4	87,0	87,9	10,7	12,6	13,0	12,1
Kukuruz	60,3	52,5	46,4	53,1	39,7	47,5	53,6	46,9
Ječam ozimi	92,9	86,8	79,5	86,4	7,1	13,2	20,5	13,6
Soja	74,8	83,4	81,6	79,9	25,2	16,6	18,4	20,1

Ograničenja klasičnog oplemenjivanja bilja

Metode klasičnog oplemenjivanja zasnivaju se na kontroliranoj hibridizaciji genotipova unutar (ali između različitih) vrsta, te selekciji superiornih jedinki u poljskim uvjetima.

Osnovna slabost klasičnih metoda oplemenjivanja koje za prijenos gena iz genoma donora u genom recipijenta koriste prirodnu seksualnu reprodukciju odnosi se na unos, pored poželjnog gena, i brojnih drugih (nepoželjnih) gena. Tijekom dugotrajne selekcije, ponekad praćene povratnim križanjima, nastoji se eliminirati što više nepoželjnih gena, a zadržati samo one korisne. Pored ovoga, ekspresija agronomski važnih svojstava opterećena je interakcijom genotipa i okoline (*GEI*) koja je uslijed recentnih klimatskih promjena danas još naglašenija.

Zbog navedenih ograničenja, metode klasičnog oplemenjivanja bilja se sve više komplementiraju s novim biotehnoškim (i/ili molekularnim) metodama koje povećavaju učinkovitost selekcije i skraćuju vrijeme potrebno za razvoj novog kultivara.

Era molekularnog oplemenjivanja bilja

Biotehnoške metode koje se koriste u selekciji i oplemenjivanju bilja mogu biti

- a) Dijagnostičke: metode napredne selekcije pomoću molekularnih markera (prepoznavanja superiornih biljaka na temelju informacija iz njihove DNA ili rekonstrukcija roditeljskih linija postojećih hibrida metodom inverznog oplemenjivanja) koje u pravilu slijede nakon prirodne intra i interspecijes hibridizacije
- b) Invazivne: mutageniza, fuzija protoplasta, genetičko inženjerstvo (transgeniza, cisgeniza) koje pretpostavljaju aktivno zadiranje u genom i njegovu modifikaciju

Primjenom selekcije pomoću molekularnih markera (*Marker Assisted Selection* - MAS) danas je moguće rutinski u vrlo ranom stadiju razvoja izabrati iz populacije srodnih biljaka baš one koje posjeduju gene za poželjna agronomska svojstva, za što bi klasičnim metodama selekcije bilo potrebno više godina. Međutim, u svojoj osnovi MAS je osuvremenjena dijagnostička metoda klasičnog oplemenjivanja, bez izravnog utjecaja na transfer i inkorporaciju poželjnog gena u genom domaćina.

Revolucionarna novina koja je našla svoju primjenu u oplemenjivanju poljoprivrednog bilja je tehnologija izravnog prijenosa poželjnih pojedinačnih gena u genom domaćina. Ova metoda se naziva genetička modifikacija ili genetička transformacija, a široko prihvaćeni naziv ove tehnologije je i genetičko inženjerstvo. Metode genetičkog inženjerstva omogućuju oplemenjivačima „popravljanje“ postojećih komercijalno uspješnih sorata u relativno kratkom vremenu i bez razdvajanja blokova poželjnih gena postignutih višegodišnjim klasičnim oplemenjivanjem. Dosezi i mogućnosti genetičkog inženjerstva su vrlo veliki i imaju veliki kapacitet u oplemenjivanju bilja. Međutim, kako su umjetne manipulacije koje koristi ova tehnologija vrlo sofisticirane, nije do kraja poznato i sigurno u kojoj mjeri introducirani „strani“ geni, imaju neželjene interakcije sa ostatkom genoma. Još više od ovoga strah izaziva i puštanje ovakvih organizama u okoliš i mogućnost interakcije ovakvih genotipova s prirodnim populacijama iste i srodnih vrsta.

U nastavku teksta, iznosimo naš pogled na današnju primjenu, rizike i perspektivu genetičkog inženjerstva u razvoju genetički modificiranih (GM) sorata poljoprivrednog bilja.

Komercijalizirane/kultivirane genetički modificirane biljke

Od 1995-2012 godine odobrenje za komercijalizaciju, bilo gdje u svijetu, dobilo je ukupno 25 različitih genetički modificiranih biljnih vrsta (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>). Neke od tih vrsta promijenjene su samo za jedno, a neke za više različitih svojstava (tzv. „stacked traits“). Najveći broj komercijaliziranih genetičkih događaja ima kukuruz (65), pamuk (39), uljana repica (15) i soja (14), a nekoliko vrsta ima samo po jedan komercijalizirani genetički događaj.

Međutim, nisu svi komercijalizirani „genetički događaji“ već u proizvodnji; možda nikad i neće biti. Postoje i primjeri s tržišta povučenih „genetičkih događaja“ kao npr. Flavr-Savr rajčica sa sporijim prezrijevanjem (Flavr-Savr rajčica je bila prva komercijalno (1994) uzgajana GM biljna vrsta), te krumpir otporan na krumpirovu zlaticu i viruse (npr. Russet Burbank New Leaf Plus, Russet Burbank New Leaf Y).

U komercijalnoj poljoprivrednoj proizvodnji u 2011. godini je bilo 15 različitih biljnih vrsta. Prvo mjesto zauzima soja s modifikacijom za tolerantnost na totalne herbicide, a proizvodi se i soja s izmijenjenim sastavom ulja – visokim sadržajem oleinske kiseline. U 2012. godini

odobrena je i komercijalizacija soje s piramidiranim svojstvima (stacked traits) - tolerantnošću na herbicid i otpornošću na kukce.

Genetički modificirani kukuruz ima promijenjena svojstva tolerantnost na totalni herbicid (ili dva različita herbicida), otpornost na kukce ili kombinaciju ovih svojstava.

Pamuk ima promijenjena svojstva otpornosti na kukce, tolerantnosti na herbicid (ili dva različita herbicida), te ista svojstva piramidirana.

GM uljana repica, šećerna repa i lucerna u komercijalnom uzgoju tolerantne su na totalni herbicid. Navedenih 6 kultura zauzima najveće površine zasijane GM usjevima.

U komercijalnom uzgoju su još papaja, tikvice i paprika otporne na viruse, rajčica sa sporijim prezrijevanjem, krumpir s povećanim sadržajem amilopektina u škrobu i duhan sa smanjenim sadržajem nikotina. Od ukrasnih vrsta komercijalno se uzgajaju karanfili s promijenjenom bojom cvijeta i usporenim venućem i ruže s izmijenjenom bojom cvijeta, a od drvenastih vrsta uzgaja se GM topola otporna na lisne štetočinke.

Tolerantnost na herbicide

Genetički modificirane dikotiledonske biljne vrste (soja, pamuk, uljana repica, lucerna) tolerantne na totalni herbicid glifosat većinom sadrže transgen koji kodira za glifosat tolerantan enzim 5-enolpiruvilšikimat-3-fasfat sintazu (*EPSPS*). Gen je uzet iz bakterije *Agrobacterium tumefaciens* soj CP4. Ovaj enzim, inače ključan u biosintezi aromatskih aminokiselina postoji i u biljkama, ali tip enzima u biljkama inhibiran je glifosatom. Kukuruz (monokotiledona) tolerantan na glifosat sadrži mutagenezom u kulturi tkiva promijenjen, a potom izoliran i genetičkom transformacijom u kukuruz unešen gen za glifosat tolerantan *epsps*. Druga strategija za tolerantnost na glifosat je modifikacija biljke genom za enzim koji detoksicira glifosat – gen za enzim glifosat oksidazu (*gox*) porijeklom je iz bakterije *Ochrobactrum anthorpi* soj LBAA (Slater i sur., 2008). Samostalno se u praksi ovaj mehanizam ne koristi, ali se detoksikacija glifosata kao piramidirano svojstvo s tolerantnošću na glifosat sve više primjenjuje.

Drugi po važnosti totalni herbicid na kojeg su GM biljne vrste tolerantne je glufosinat (fosfotricin-PPT). Glufosinat kompetitivno inhibira glutamin sintetazu, a kao posljedica ove inhibicije u biljci se nakupljaju toksične koncentracije amonijaka te je inhibirana fotosinteza. Biljke tolerantne na ovaj herbicid modificirane su *bar* genom iz *Streptomyces hydroscopicus* ili *pat* genom iz *Streptomyces viridochromogens*. Jedan i drugi gen kodiraju za enzim acetil-transferazu koji acetilira PPT te ga na taj način inaktivira.

Osim ova dva totalna herbicida, na tržištu je za komercijalizaciju sve više odobrenih genetičkih događaja koji imaju tolerantnost na neselektivne herbicide sulfonilureu, bromksinil, joksini i imidazolin.

Otpornost na kukce

Otpornost na kukce, kao drugo najučestalije promijenjeno svojstvo (iza tolerantnosti na herbicide), u GM biljkama se postiže unosom u biljke jednog (ili više) od nekoliko stotina identificiranih *cry* gena iz bakterije *Bacillus thuringiensis*. Geni kodiraju za različite Bt-toksine čije je insekticidno djelovanje na kukce selektivno tj. insekticidno za kukce iz pojedinih redova (Lepidoptera, Coleoptera, Diptera).

Otpornost na viruse

Otpornost na viruse u GM biljkama je postignuta s transgenima za proteine kapside samih virusa (CP mediated resistance) koji spriječavaju „raspakiravanje“ virusne RNA i na taj način razmnožavanje virusa u biljci. Drugi mehanizam tolerantnosti na viruse, upotrijebljen npr. kod graha modificiranog za otpornost na zlatni mozaični virus graha (odobren za kultivaciju u Brazilu) postignut je antisense tehnologijom, tj. utišavanjem (post-transkripcijsko utišavanje gena) određenog gena virusa unosom u biljku tog istog gena u anti-sense orijentaciji. Anti-

sense tehnologijom utišavanja gena proizveden je i GM krumpir s izmjenjenim sadržajem škroba, a istom tehnologijom usporava se i prezrijevanje plodova, bilo smanjenjem proizvodnje etilena ili supresijom poligalaktouronaze.

Obećavajuće GM biljke

Dugo očekivane sorte tolerantne na abiotske stresove nadomak su komercijalizaciji. U 2013 godini očekuje se komercijalizacija prvog hibrida kukuruza tolerantnog na sušu (Monsanto). Hibrid u sebi ima „cold shock protein B“ (CspB) iz bakterije *Bacillus subtilis*. CSP su klasificirani kao RNA čaperoni (chaperons) koji imaju sposobnost ne-kovalentnog vezanja na pogrešno uvijenu, npr. dvolančanu RNA (dsRNA), odvijanje istih i vraćanje takvih RNA molekula u normalnu biološku funkciju - translaciju. Pogrešno uvijanje makromolekula pospješeno je stresnim uvjetima (suša, hladnoća). Čaperoni ne reagiraju s makromolekulama čije je uvijanje u sekundarnu (ili daljnje strukture-tercijarna, kvarterna-u slučaju proteina) strukturu normalno tj. koje imaju normalnu biološku funkciju. U slučaju CSP proteina to dokazuju i transgene biljke kukuruza čiji je prinos u optimalnim uvjetima isti kao prinos konvencionalnog kultivara, ali u stresnim uvjetima pokazuju veći prinos (do 13.4%) (Castiglioni i sur. 2008).

U Nizozemskoj je proizveden cisgenični krumpir otporan na peronosporu krumpira (*Phytophthora infestans*). R-geni koji daju otpornost na bolest izolirani su iz divljih srodnika krumpira i preneseni u kultivirani krumpir. Zahtjev za komercijalizaciju još nije poslan. Međutim, zadnji primjer vezan je uz inicijativu europskih znanstvenika da se za cisgenične biljke pojednostavni procedura odobravanja (u odnosu na transgenične) za uvođenje u okoliš i komercijalizaciju. Niže su objašnjene razike između cisgeničnih, transgeničnih i intrageničnih biljaka.

Cisgeneza, transgeneza i intrageneza

Cisgeničnim krumpirom, ali i nekim drugim biljnim vrstama (jabuka, jagoda) modificiranim istom tehnologijom, započela je, možda, jedna nova era genetičkih modifikacija.

Cisgeneza, kao tehnologija opisana je i upotrijebljena prvi puta u Nizozemskoj (Schaart, 2004).

Cisgeneza, nasuprot transgenezi, je genetička modifikacija organizma primaoca (biljke) genom/genima seksualno kompatibilne vrste (iste ili usko srodne). Cisgeni sadrže originalne introne kao i vlastite regulatorne sekvence promotor i terminator, te su uvijek „normal sense“ orijentirani. Za proizvodnju cisgeničnih biljaka, može biti korištena bilo koja prikladna tehnika genetičkih modifikacija. Cisgenične biljke ne smiju sadržavati selektivne marker gene. Ponekad se ova tehnika veže uz unos gena u biljku pomoću agrobakterija koje mogu prenijeti i dio T-DNA (graničnih sekvenci) pa se govori o cisgenezi s T-DNA graničnim sekvencama (kao jedinim stranim genima u genetički modificiranoj biljci). Prednost cisgeneze u odnosu na klasično oplemenjivanje (hibridizaciju) je što se cisgenozom u organizam primaoca unose samo poželjni, bez usko vezanih često nepoželjnih gena, tj. isključuje se „linkage drag“.

Transgeneza (klasična genetička modifikacija) s druge strane uključuje prijenos bilo kojeg stranog gena (transgena) u genom primaoca. Transgeni potječu iz seksualno inkompatibilnih vrsta, koje vrlo često pripadaju različitim carstvima (geni iz bakterija uneseni u biljke). Regulatorne sekvence transgena također potječu iz različitih organizama (npr. virusa), a transgenične biljke posjeduju i selektivni marker gene (najčešće gen za tolerantnost na antibiotik).

Negdje između ova dva termina je **intrageneza**, koja je definirana kao genetička modifikacija organizma primaoca genima iste ili seksualno kompatibilne vrste (kao i kod cisgeneze), ali u slučaju intrageneze ti geni ne moraju biti cjeloviti, znači mogu biti korišteni njihovi fragmenti, ili npr. geni bez introna; takvi geni mogu biti unešeni u genom primaoca i u „antisense“ orijentaciji, a mogu imati i regulatorne sekvence koje potječu od drugih, seksualno inkompatibilnih organizama. Selektivni marker gen ne smije biti prisutan u biljci dobivenoj intragenezom kao niti granična sekvenca T-DNA (Molesini i sur., 2012).

Budući da cisgenične biljke ne sadrže strane gene i u tom pogledu su slične biljkama oplemenjenim klasičnim metodama, Europska komisija je uputila upit EFSA-i da preispita metodiku za procjenu rizika za cisgenične i intragenične biljke (a) za uvođenje u okoliš, (b) kao hranu za ljude i životinje. EFSA GMO Panel je zaključio da postojeće upute i dokumente koji se odnose na procjenu rizika genetički modificiranih (transgeničnih) organizama („*case by case*“ metodom) treba primjenjivati i na cisgenične kao i intragenične biljke, što otežava njihovu komercijalizaciju. Ipak, opasnosti (rizike) vezane uz cisgenične biljke izjednačavaju s onima vezanim uz biljke oplemenjene klasičnim (konvencionalnim) oplemenjivanjem, dok eventualne opasnosti intrageneze i transgeneze izjednačavaju (EFSA, 2012). To budi optimizam kod znanstvenika i potencijalnih aplikanata za priznavanje novih GM cisgeničnih kultivata, da će proces priznavanja ovih ipak biti pojednostavljen.

I istraživanje Eurobarometra u europskim zemljama također pokazuje da su biljke dobivene cisgenezom ili intragenezom prihvatljivije, prema javnom mišljenju, nego transgenične biljke.

Korisni utjecaji postojećih GM biljaka

Utjecaj GM kultura na povećanje prinosa

Povećanja prinosa kao posljedicu sjetve GM kultura potrebno je razmatrati po pojedinoj vrsti i svojstvu. Analizirajući 11 godišnju proizvodnju (1996-2006) GM kukuruza, uljane repice i soje, Brooks i sur. (2010) dolaze do slijedećih rezultata:

GM kukuruz tolerantan na kukce pridonio je povećanju prinosa u svim zemljama gdje se uzgaja (uspoređujući prinose s prinosima konvencionalnog kukuruza). Povećanje prinosa iznosi od +5% (+0.31 t/ha) u Sjevernoj Americi do čak +24% (+0.72 t/ha) na Filipinima. U prosjeku, povećanje prinosa od uzgoja kukuruza tolerantnog na kukce za sva područja gdje se je u proučavanom razdoblju uzgajao iznosi +5.7% (+0.45 t/ha) što preračunato znači oko 47 milijuna tona dodatnog uroda.

U GM soji tolerantnoj na totalni herbicid eliminacija korova primjenom totalnih herbicida znatno je jednostavnija, učinkovitija i jeftinija u odnosu na onu kod klasičnih kultivara gdje su gubici prinosa uslijed kompeticije soje i korova za hranjivima značajni. Povećanje prinosa kao indirektna posljedica navedenog rijetko je zabilježena (npr. u Rumunjskoj je to povećanje iznosilo čak +30%). Ali, ova soja je omogućila primjenu reducirane obrade tla ili čak no-tillage sistema što je ubrzalo (eliminiralo) prethodnu agrotehničku pripremu tla te u Južnoj Americi omogućilo sjetvu soje kao drugog usjeva odmah iza žetve pšenice. Između 1996-2006 taj drugi usjev donio je 53.1 milijun tona dodatnog zrna soje u Argentini i Paragvaju.

GM uljana repica tolerantna na herbicide pridonosi znatno efikasnijoj kontroli korova u odnosu na konvencionalne usjeve (Brooks i sur. 2010; Gusta i sur. 2011). Kao posljedica toga u SAD-u je za 11-godišnje razdoblje zabilježeno povećanje prinosa od +6% (+0.1 t/ha), a u

Kanadi za 10% (+0.15 t/ha). Ukupno je u Sjevernoj Americi u razdoblju od 1996-2006 proizvedeno dodatnih 3.2 milijuna tona uljane repice zahvaljujući genetičkoj modifikaciji za toleranciju na herbicide.

Kukuruz tolerantan na totalne herbicide pridonio je, kao i soja, povećanju prinosa u pojedinim područjima npr. u Argentini za +9% (+0.36 t/ha) i Filipinima za +15% (+0.72 t/ha) (dvogodišnje razdoblje za Argentinu i jednogodišnje za Filipine).

Autori Brooks i sur. (2010) također predviđaju da bi prestanak uzgoja GM kukuruza, soje i uljane repice u prvim godinama nakon prestanka uzgoja na globalnom tržištu povisio cijenu istih za +5.8%, +9.6% i +3.8%.

Utjecaj GM kultura na okoliš: smanjenje korištenja insekticida, herbicida i emisije stakleničkih plinova

Većina današnjih GM biljnih vrsta tolerantna je na totalne herbicide pa je uz njih vezana primjena tih herbicida ili je otporna na kukce pa je iz njihovog uzgoja isključena ili bitno smanjena primjena insekticida. Insekticidi i herbicidi su najčešće štetni za ljude kao i druge žive organizme pa stoga postoji rizik kod njihove primjene. Taj rizik odnosi se na zdravlje ljudi, utjecaj na bioraznolikost i kontaminaciju podzemnih voda.

Studija Brookes-a i Barfoot-a (2012) koja se bavi globalnim utjecajem GM usjeva na okoliš za razdoblje od početka njihova uzgoja 1996-2010 promatra utjecaj GM usjeva na promjene količine insekticida i herbicida primjenjenih u GM u odnosu na konvencionalne usjeve.

Od 1996 do 2010 godine upotrijebljena količina pesticida u GM usjevima manja je za 443 milijuna kg aktivne komponente nego u konvencionalnim usjevima. To je relativno smanjenje korištenja pesticida za 9.1%, a utjecaj na okoliš vezan za herbicide i insekticide u GM usjevima pao je za 17.9% (izraženo kao EIQ indikator – environmental impact quotient). Podaci se odnose na GM soju, kukuruz, uljanu repicu, pamuk i šećernu repu tolerantne na totalne herbicide, te na kukuruz i pamuk otporne na kukce. U apsolutnim brojkama najveća dobit za okoliš je od GM pamuka otpornog na kukce za čiji uzgoj je trebalo 170.5 milijuna kg aktivne tvari insekticida manje nego za konvencionalne usjeve. Slijedi GM kukuruz tolerantan na herbicide za kojeg je upotrijebljeno 169.9 milijuna kg aktivne tvari herbicida manje nego u konvencionalnom, pa GM kukuruz otporan na kukce (-42.9 milijuna kg aktivne tvari insekticida) i GM soja tolerantna na totalni herbicid (-34.2 milijuna kg aktivne tvari herbicida).

Potrebno je naglasiti da su totalni herbicidi glifosat i glufosinat koji se koriste u kombinaciji s GM usjevima za okoliš manje štetni („more environmentally friendly“) od nekih drugih selektivnih herbicida. U kontaktu s tlom, glifosat se brzo veže na čestice tla i postaje inaktivan, a nevezani glifosat razgrađuju bakterije tla. Zbog toga je mala vjerojatnost njegova ispiranja u podzemne vode. Kad je u pitanju utjecaj na ljudsko zdravlje, EPA (Environmental Protection Agency) je svrstala Roundap (čiji aktivna komponenta je glifosat) u III kategoriju toksičnosti (od I-IV pri čemu su pesticidi na skali toksičnosti ocijenjeni s IV najmanje toksični). Glufosinat, za razliku od glifosata potencijalni je kandidat za kontaminaciju podzemnih voda, ali je kao i glifosat svrstan u III kategoriju toksičnosti.

Dakle, brojkama rečeno, postoji evidentan pad uporabe herbicida i insekticida u trenutno uzgajanim GM usjevima, što bi se logično trebalo odraziti i na smanjenje globalnog štetnog utjecaja istih.

Brookes i Barfoot (2012) pišu i o doprinosu GM usjeva globalnom smanjenju emisije stakleničkih plinova. Uzgoj GM usjeva doprinosi smanjenju emisije stakleničkih plinova zbog smanjene potrošnje energije (goriva) za kultivaciju. Smanjena potrošnja goriva proizlazi iz (1) rjeđe aplikacije herbicida i insekticida na GM usjevima (2) reducirane obrade tla (reduced-till, no-till) koja je vrlo prihvaćena uz genetički modificirane usjeve tolerantne na herbicide. Reducirana obrada tla posebno je raširena u proizvodnji GM soje i uljane repice, a moguća je uslijed efikasne kontrole korova totalnim herbicidom. Najveća uštede goriva i emisije stakleničkih plinova vezane su uz uzgoj GM soje tolerantne na totalni herbicid (oko 85% uštede), posebno u Južnoj Americi. Kumulativno od 1996-2010 zbog uzgoja GM usjeva emisija ugljičnog dioksida u atmosferu manja je za 12232 milijuna kg (nego što bi to bilo da su uzgajani konvencionalni usjevi), što je proizašlo iz uštede 4582 milijuna litara goriva.

Kao posljedica primjene reducirane obrade tla uz GM usjeve, dodatne velike količine ugljika ostaju sekvistirane u tlu. Procjenjuje se da uslijed navedene pojave ukupno 133639 milijuna tona ugljičnog dioksida od 1996-2010 nije otišlo u atmosferu.

Utjecaj Bt kukuruza na smanjenje sadržaja mikotoksina u zrnu

Iako trenutno uzgajani dominantni GM usjevi (s tolerantnošću na herbicide i otpornošću na kukce) potrošačima ne pružaju očigledan benefit, ipak je jedna činjenica vezana uz Bt kukuruz ovdje bitna za spomenuti. Bt kukuruz sadrži manje količine mikotoksina, vrlo štetnih kako u ljudskoj prehrani, tako i u hrani za životinje (Wu, 2006). Oštećenja koje kukuruzni moljac radi na zrnu (u polju) mjesta su na kojima *Fusarium verticillioides* i *F. proliferatum* inficiraju zrno. Ove patogene gljivice proizvode fumonisin, koji je vrlo kancerogen za ljude, a u većim koncentracijama u hrani za životinje dokazano izaziva povećanu smrtnost kod svinja i konja (Marasas, 1996). Kako kod Bt kukuruza štete od kukuruznog moljca nema, ili je znatno manje nego kod konvencionalnog, redukcija fumonisina u Bt-kukuruzu u odnosu na konvencionalni kreće se od 1.8-15 puta (Dowd, 2001). Koncentracija aflatoksina kod Bt kukuruza međutim nije signifikantno niža u odnosu na ne-Bt kukuruz zbog toga što gljivica *Aspergillus flavus* i *A. parasiticus* koje proizvode aflatoksine mogu zrno inficirati i kroz svilu (a ne samo na mjestu oštećenja) (Wu, 2006).

Rizici uzgoja GM kultura

Hibridizacija GM kultura s ne-GM usjevima iste vrste i divljim srodnicima

1) Stranooplodne GM biljke hibridizirat će s ne-GM biljkama iste kultivirane vrste ukoliko se uzgajaju u blizini – udaljenost na kojoj je moguća hibridizacija specifična je za pojedinu vrstu obzirom na mehanizam oplodnje, ali i vezana za vremenske uvjete – postojanje vjetrova.

Do sada kultivirane stranooplodne/fakultativno stranooplodne GM biljne vrste koje će hibridizirati sa susjednim usjevom iste vrste su: kukuruz, uljana repica, šećerna repa (ako slučajno procvjeta prvu godinu ili kao ostatak na polju od prethodne godine), lucerna te tikvice. Ovo stvara realne probleme farmerima koji su deklarirani proizvođači ne-GM usjeva

da im usjevi budu „kontaminirani“ polenom sa susjednih parcela sa svim posljedicama koje kasnije iz toga proizlaze, ali i farmerima koji proizvode GM usjeve koji su (npr. prema europskim zakonskim regulativama) tada odgovorni za tu kontaminaciju i snose posljedice. Europska unija je zbog toga uvela u zakonodavstvo mjere koje definiraju uvjete moguće koegzistencije GM s ne-GM i organskim usjevima.

2) Stranooplodne GM biljne vrste hibridizirat će s divljim srodnicima ukoliko na području uzgoja takve vrste postoje. U Europi, tako i u Hrvatskoj, divlje srodnike imaju uljana repica, šećerna repa i krumpir. Kukuruz u Europi nema divljeg seksualno kompatibilnog srodnika pa ne postoji ova opasnost, a za krumpir iako ima divljih srodnika ne postoji dokaz da je ijedan od njih seksualno kompatibilan krumpiru. Opasnost koja proizlazi iz hibridizacije GM biljaka tolerantnih na totalni herbicid sa divljim srodnim vrstama jest da će uslijed rezistentnosti na herbicid takve divlje vrste postati „neuništivi“ korovi („super-weeds“). Rezistentnost se dakako može prenijeti i već je dokazano da je transgen (za tolerantnost na glifosat) iz uljane repice pobjegao u divljeg srodnika *Brassica rapa* (Warwick i sur., 2008), međutim teorija nastanka super korova koji bi narušili prirodnu ravnotežu malo je vjerojatna, posebice jer se izvan uzgojnih površina herbicidi vrlo rijetko ili uopće ne primjenjuju za suzbijanje korova pa ovakve vrste neće biti ni u kakvoj prednosti u odnosu na nerezistentne.

S problemom (iako rješivim) bi se međutim ponovno mogli suočiti farmeri koji u slučaju pojave rezistentnih korova iste u svojem usjevu neće moći suzbiti određenim totalnim herbicidom. Isto se može dogoditi sa samim GM usjevima tolerantnim na totalni herbicid koji mogu biti korovi („volunteer weed“) u slijedećem usjevu ako je on tolerantan na isti herbicid. Npr. GM uljana repica tolerantna na totalni herbicid (a sjeme uljane repice u tlu može preživjeti i izniknuti slijedeće godine) može postati korov u GM kukuruzu ili soji tolerantnima na isti herbicid.

Pojava rezistentnosti korova na totalne herbicide uslijed selekcijskog pritiska

Kad se govori o tolerantnosti korova na herbicide, ona nije nova pojava vezana samo uz GM usjeve, te se općenito kod korova pojavljuje uslijed mutacija izazvanih selekcijskim pritiskom zbog dugogodišnjih, ponavljanih tretiranja određenim herbicidom.

Tako su se i uslijed svake godine ponavljanih tretiranja GM usjeva glifosatom u SAD-u, Argentini i Brazilu već pojavili novi rezistentni korovi u područjima uzgoja na glifosat tolerantnih usjeva soje, kukuruza i pamuka (WeedScience.com, 2012, Duke i Powels, 2009). Među rezistentnim korovima su i neki vrlo konkurentni poljoprivrednim kulturama kao npr. *Amaranthus palmeri*, *Amaranthus tuberculatus*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Ambrosia trifida*, *Conyza* spp, *Euphorbia heterophylla*, *Lolium* spp, *Sorghum halepense* što je posebno zabrinjavajuće. Novonastala situacija zahtijeva da farmeri uz totalni apliciraju još neki herbicid koji će uništiti na glifosat tolerantne korove. Ubrzano širenje rezistentnosti korova na glifosat bi moglo u doglednoj budućnosti ugroziti njegovu primjenu te daljnju sjetvu GM kultura tolerantnih na ovaj herbicid iz razloga što će farmerima možda postati neatraktivne. Razlozi zašto su farmeri vrlo brzo i rado prihvatili GM usjeve tolerantne na glifosat su: manji troškovi inputa (reducirana obrada tla, jeftiniji herbicid), bolja kontrola korova i jednostavnost primjene. Nestankom zadnja dva razloga, smanjit će se i interes farmera za sjetvom GM usjeva. No, u Kanadi gdje se na glifosat tolerantna uljana repica također uzgaja na vrlo velikim površinama, nije zabilježena pojava rezistentnih korova uslijed selekcijskog pritiska. Razlog tome je činjenica da kanadski farmeri uljanu repicu siju u plodoredu sa pšenicom i ječmom pa uljana repica dolazi na iste parcele u prosjeku svake tri-četiri godine. Selekcijski

pritisak na korove zato nije toliko velik kao kad se glifosat primjenjuje iz godine u godinu npr. kod rotacije na glifosat tolerantne soje i kukuruza.

Velike biotehnološke kompanije su iz razloga pojave rezistentnosti korova na glifosat počele modificirati GM kulture na način da piramidiraju transgene za tolerantnost na više različitih herbicida (npr. glifosat + glufosinat, glifosat + sulfonil urea, glifosat + dicamba itd.).

Pojava rezistentnosti kukaca na Bt toksine uslijed selekcijskog pritiska

Problem rezistentnosti kukaca na Bt toksine eksprimirane u GM kukuruзу i pamuku bio je predvidiv jer je tolerantnost na bioinsekticid koji sadrži spore i kristalizirane proteine iz *B. thuringiensis* bila evidentirana kod kukaca i prije pojave Bt usjeva.

Istraživanja su pokazala da je rezistentnost na Bt toksin većinom uvjetovana recesivnim alelima, ili je intermedijarna, uvjetovana aditivnim djelovanjem poligena kao što je dokazano kod kukuruznog moljca, *Ostrinia nubilalis* (Alves i sur., 2006) pa je sjetva zaštitnih pojaseva s ne-GM usjevom iste vrste oko ili između Bt usjeva, u kojima se razmnožavaju osjetljivi kukci i zatim pare s eventualno rezistentnima iz Bt usjeva, postala obavezan dio agrotehnike Bt usjeva. Potomstvo iz ovakvog parenja je većinom i dalje osjetljivo na Bt toksine u modificiranoj kulturi, što omogućava daljnju uspješnu uporabu Bt kultura.

Međutim, kod jednog štetnika pamuka u SAD-u već je između 2003-2006 primijećena rezistentnost na Bt toksine u GM pamuku, a kineski znanstvenici čija zemlja je svjetski lider po proizvodnji pamuka otkrili su kod štetnika *Helicoverpa armigera* dominantnu mutaciju za rezistentnost na Bt toksin (Zhang i sur., 2012). Srećom, ona u polju još nije znatno proširena. Međutim, u slučaju dominantne mutacije štetnika na Bt toksine, mjera kao što je sjetva zaštitnih pojaseva oko Bt kulture više ne pomaže.

Rješenje se za ovakve situacije nalazi u piramidiranju gena za više različitih mehanizama rezistentnosti na štetnika u istoj kulturi.

Vrlo recentno su znanstvenici upozorili i na potrebu puno većih zaštitnih pojaseva (50% od ukupne površine parcele) kod sjetve Bt kukuruza koji sadrži Cry3Bb1 protein za otpornost na kukuruznu zlasticu (*Diabrotica virgifera virgifera*) jer se kukci tolerantni na ovaj Bt kukuruz pojačano šire. Rezistentnost kukuruzne zlatice na navedeni Bt kukuruz primijećena je šest godina nakon komercijalizacije kultivara, i samo jednu godinu nakon što su ovi hibridi bili zasijani na više od 10 milijuna ha u SAD-u (Tabashnik i Gould, 2012).

Neutralan učinak Bt kukuruza na ne-štetne kukce

Prema dosad objavljenoj literaturi, nema dokaza da su trenutno uzgajani hibridi Bt kukuruza direktno štetni za pripadnike koljena Arthropoda kojemu pripadaju kukci, osim ako nisu vrlo srodni ciljanim kukcima i ako se hrane na GM kukuruзу (Romeis i sur. 2006; Álvarez – Alfageme i sur., 2011). Razlog tome je što su Bt toksini usko insekticidni na pojedine redove kukaca ili još specifičniji. Njihov toksičan učinak mogao bi se još indirektno odraziti na predatore i parazite štetnika koji se hrane na Bt kukuruзу, ali je većina istraživanja potvrdila da su prisutnost i aktivnost parazita i predatora slične u Bt kao i ne-Bt usjevima (Romeis i sur. 2006). Egzaktna istraživanja Álvarez – Alfageme i sur. (2011) potvrdila su da Bt kukuruz nema štetnog utjecaja na ličinke božje ovčice (*Adalia bipunctata*) koja je predator na štetnim

kukcima, pri realnim uvjetima izloženosti Bt toksinu. Božje ovčice su u ovom eksperimentu bile izložene Bt toksinima (Cry1Ab za kontrolu kukuruznog moljca i Cry3Bb1 za suzbijanje kukuruzne zlatice) posredno preko grinja koje se hranile na Bt kukuruza, a božja ovčica se hrani ovim grinjama. Izloženost božjih ovčica Bt toksinu je inače vrlo mala jer lisne uši, kao njihova glavna hrana, zbog mehanizam kojim se hrane – šišu iz floema- unose u sebe vrlo malo ili ništa Bt toksina (Raps i sur. 2001).

Suprotno ovome, primjena konvencionalnih insekticida, a oni se u nekim uzgojnim područjima (ne i u Hrvatskoj) primjenjuju u kukuruza za suzbijanje kukuruznog moljca i/ili kukuruzne zlatice, uništava većinu kukaca u usjevu, pa i onih korisnih u biološkoj kontroli štetnika.

Istraživanje koje je „podiglo prašinu“ u kojem je utvrđeno da Bt kukuruz može naštetiti leptiru monarhu *Danaus plexippus* (Losey isur., 1999) kasnije je demantirano (Hellmich i sur. 2001) osim za jedan genetički događaj (Event 176) koji je imao koncentraciju Bt toksina Cry1Ab dovoljnu da naštetiti monarhu preko polena spalog na cigansko perje (*Asclepias syriaca* L.) na kojem se ovaj leptir hrani.

Perspektive uzgoja GM usjeva u Hrvatskoj: zaključna razmatranja

U analizi prednosti i rizika GMOa i mogućih preporuka o njihovom korištenju u RH, ne može se govoriti generalno za ili protiv, već se treba držati „case by case“ principa koji je općeprihvaćen za GMOe.

Brzo povećanje površina zasijanih GM kultivarima soje i kukuruza u SAD-u i zemljama Latinske Amerike gdje je uzgoj GM usjeva izjednačen s konvencionalnim posljedica je velikog interesa farmera za ovu tehnologiju i isti se nikako ne može objasniti samo pritiskom ili monopolom kompanija, već primarno profitom farmera.

Iz perspektive hrvatskih farmera, korištenje GM soje tolerantne na totalne herbicide vjerojatno bi bilo prihvatljivo jer proizvođači soje u Hrvatskoj imaju svake godine značajne gubitke u vidu pada prinosa uslijed nedovoljno dobre kontrole korova, najčešće kao posljedica nestručnog odabira selektivnih herbicida, nepravovremenih tretmana, ali i nepredviđenih učinaka vremenskih prilika koje nije moguće kontrolirati (ispiranje kišom ili jako sunce). Soja nema srodnika u Europi te je k tome i samooplodna kultura pa nema opasnosti od hibridizacije s ne-GM sojom na susjednim poljima te bi se mogla preporučiti farmerima za uzgoj.

Nerazumljivo je zašto Europska Unija koja ovisi o GM soji iz Sjeverne i Južne Amerike za proizvodnju stočne hrane, i istu uvozi, ne dozvoljava uzgoj GM soje?

Rizik od pojave rezistentnih korova, prije elaboriran, postoji, ali isti rizik postoji i kod uzgoja konvencionalnih kultivara. I u njima se primjenjuju herbicidi (samo ne totalni), korovi su pod selekcijskim pritiskom i mnogi su već razvili rezistentnost na selektivne herbicide.

Biotski čimbenici općenito skloni su brzom evoluciji, i oplemenjivači bilja imaju permanentni izazov razvoja novih sorata koje su u stanju nositi se sa izazovima svog vremena. Pri tome je tehnologija genetičkog inženjerstva u prednosti nad klasičnim oplemenjivanjem za ista svojstva jer može značajno brže polučiti odgovore na aktualne probleme.

Jednako kao kod soje, za farmere bi i proizvodnja GM kukuruza tolerantnog na totalne herbicide pojeftinila proizvodnju i agrotehniku, te povećala prinose. Razlika je međutim u

tome što je kukuruz stranooplodna kultura i što bi se kod njegove proizvodnje trebalo držati strožih mjera prostorne izolacije, a to bi bilo moguće samo na vrlo velikim poljoprivrednim kompleksima. Na malim rasparceliranim posjedima koji prevladavaju u RH, koegzistencija GM i ne-GM kukuruza teško bi se postigla.

Kad je u pitanju Bt kukuruz tolerantan na kukuruznog moljca, njegova primjena u Hrvatskoj vjerojatno ne bi bila opravdana jer su gubici prinosa od ovog štetnika samo sporadično visoki. U prilog toj činjenici ide i podatak da u RH nema niti jednog insekticida registriranog za suzbijanje kukuruznog moljca (Poljoprivredna savjetodavna služba), a pravilnim mjerama agrotehnike (jesensko zaoravanje kukuruzovine) i plodoredom, ovog kukca je u Hrvatskoj moguće za sada dobro kontrolirati. Sve prije rečeno o potrebi veće prostorne izolacije kod uzgoja GM kukuruza vrijedi i ovdje.

Za farmere u RH, koju sve češće pogađa suša tijekom kasnih proljetnih i ljetnih mjeseci, pri čemu stradava velik broj usjeva, bit će vjerojatno zanimljivi GM kultivari s novom tehnologijom RNA čaperona tolerantniji na sušu od konvencionalnih kultivara.

Perspektive primjene genetičkih modifikacija (GM) u oplemenjivanju bilja

Pretpostavka je da su svi GMOi stvoreni s motivom dobre namjere i za dobrobit čovječanstva jer su proistekli iz akademske i znanstvene zajednice koju u pravilu prate visoki moralni i etički kriteriji. Također, kreiranje i puštanje jednog GMO je vrlo složen i dugotrajan postupak koji nužno podrazumijeva suradnju većeg broja istraživača i suradnika te su rezultati očekivanih pozitivnih, ali i negativnih i sporednih efekata, pod kontrolom šireg kruga suradnika, a ne pojedinca.

Danas je postalo vrlo teško praćenje objektivnih informacija o mogućnostima i koristima genetički modificiranih organizama, kao i rizicima i dokazanim negativnim sporednim učincima istih. Objektivne stručne informacije se miješaju s površnim selektivnim izjavama za medije, te brojnim nepotpisanim i nerecenziranim internetskim i novinskim člancima. U izvještavanju o GMOima prevladava koncept članaka za „dnevni tisak“ nad stručnim i kritičnim pristupom.

Kao model „objektivnog informiranja“ najčešće se koristi metoda sučeljavanja koja se zasniva na jednakoj distribuciji vremena ili prostora za iznošenje suprotnih argumenata, a da se pri tome nedovoljno vodi računa o kompetencijama izvora. Tako primjerice, o agronomskim svojstvima GM kultivara dobivaju priliku govoriti i pisati potpuno netočno osobe koje nemaju nikakvo praktično znanje i iskustvo. Također, čest je slučaj i praksa da stavove farmera zastupaju poduzetnici, ekolozi ili sociolozi, a ne oni sami. Na ovaj način, fokus šire javnosti odlazi sa biti problema i racionalne prosudbe o omjeru koristi i rizika GMO kao nove tehnologije, a usmjerava se na medijski atraktivne iracionalne sukobe pojedinaca i skupina koji najčešće egzistencijalno nisu povezani ni sa poljoprivrednom proizvodnjom niti sa stvaranjem GMO.

Za objektivno prosuđivanje o mogućim koristima i rizicima potrebno je koristiti visoko stručna znanja zasnovana na specijaliziranom obrazovanju i izravnom iskustvu. Ovakve informacije najčešće dolaze iz kvalitetnih eksperimenata i proizvodne prakse, u formi recenziranih stručnih i znanstvenih radova.

Zaključno, neosporno je da genetičko inženjerstvo nudi rješenja koja mogu unaprijediti poljoprivrednu proizvodnju i biti od koristi poljoprivrednicima, u društvenom formatu u

kakvom se oni nalaze danas. Gledajući kroz povijest, mnoge druge ljudske djelatnosti nastale razvojem novih tehnologija vodile su ugrožavanju zdravlja ljudi, životinja i okoliša. Brojna iskustva iz povijesti ljudskog roda nedvojbeno pokazuju da je prihvatljivost omjer potencijalnih rizika i šteta s mogućim dobrobitima novih tehnologija uvijek određivala realnost života. Da bi se moglo raspravljati (i odlučivati) o željenom omjeru, nužno je ispravno sagledati sve čimbenike koji na njih utječu, uključujući i razne dionike čiji interesi nisu uvijek nužno u korelaciji s objektivnim sagledavanjem potencijalnih koristi i šteta. Zato je „pitanje GMO“ nužno sagledavati ponajprije sa znanstvenog i stručnog aspekta. Kod ulaženja u šire društvene rasprave, potrebno je ozbiljno analizirati i omjer subjektivnosti i objektivnosti dionika obzirom na profesionalni i interesni status.

Međutim, namjerno ili nenamjerno, zaboravlja se još jedan rizik koji je od posebnog značaja za RH, a to je „tehnološka apstinencija“. Naime, potrebno je razmotriti i koliki rizik predstavlja nametnuto odbacivanje primjene GMO ukoliko su oni s tehnološkog aspekta superiorni, a vrijeme pokaže da rizik od primjene GMO nije opravdan. U slučaju ovakvog scenarija posljedice tehnološke apstinencije (zaostajanje u razvoju i primjeni tehnologija utemeljenih na GMO) mogle bi imati velike štetne posljedice na gospodarstvo RH, prije svega na poljoprivredu i same farmere. Treba se prisjetiti kako su hrvatski oplemenjivači u zadnjih 5-6 desetljeća (graf 2, tablica 1) stvorili naprednu oplemenjivačku školu, razvili vrhunski sortiment i osigurali stratešku neovisnost RH u segmentu proizvodnje bazične hrane za ljude i stoku.

Naše je mišljenje da bi za unapređenje poljoprivrede RH i zadržavanje neovisnosti u kreiranju sorata i proizvodnji reproduktivnog materijala strateških poljoprivrednih kultura bilo nužno poticati nacionalna istraživanja iz područja biotehnologije i genetičkog inženjerstva. Ovo bi trebalo činiti kroz multidisciplinarnu i „konkurentno-komplementarnu“ projekat s ciljanom primjenom u oplemenjivanju poljoprivrednog i šumskog bilja uz istovremeno napredno istraživanje potencijalnih rizika. Odbacivanje ili prihvaćanje GMO vrlo je odgovorna odluka koja će utjecati na našu budućnost i zahtijeva kompleksna znanja i ravnopravno tretiranje svih rizika. Ovakva znanja i potrebne kompetencije stječu se kroz seriozan istraživački rad i vrhunsko obrazovanje.

Zahvala: Autori zahvaljuju dr. sc. Domagoju Šimiću (Poljoprivredni institut Osijek) na kritičkom čitanju i korisnim sugestijama.

Literatura

1. Álvarez-Alfageme F., Bigler F., Romeis J. (2011) Laboratory toxicity studies demonstrate no adverse effects of Cry1Ab and Cry3Bb1 to larvae of *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae): the importance of study design. *Transgenic Res* 20: 467-479.
2. Alves A. P., Spencer T. A., Tabashnik B. E., Siegfried B. D. (2006) Inheritance to the Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* toxin in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* 99, 494–501.
3. Brookes G., Barfoot P. (2012) Global impact of biotech crops; Environmental effects, 1996-2010. *GM Crops & Food: Biotechnology in Agriculture and Food Chain* 3 (2): 1-9.
4. Brookes G., Yu T.H., Tokgoz S., Elobeid A. (2010) The Production and Price Impact of Biotech Corn, Canola, and Soybean Crops. *AgBioForum* 13(1): 25-52.

5. Castiglioni et al. (2008) Bacterial RNA chaperons confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiology* 147: 2446-2455).
6. Dowd P.F. (2001) Biotic and abiotic factors limiting efficacy of Bt corn in indirectly reducing mycotoxin levels in commercial fields. *J. Econ. Ent.* 94(5): 1067–1074.
7. Duke S., Powels S. B. (2009) Glyphosate-resistant crops and weeds: now and in the future. *AgBioForum* 12 (3&4): 346-357.
8. European Food Safety Authority (EFSA) (2012) Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA Journal* 10(2):2561.
9. Gusta M., Smyth S.J., Belcher K., Phillips P.W.B., Castle D. (2011) Economic Benefits of Genetically-modified Herbicide-tolerant Canola for Producers. *AgBioForum* 14(1): 1-13.
10. Hellmich R. L., Blair D. Siegfried B. D, Sears M. K., Stanley-Horn D. E., Daniels M. J., Mattila H. R, Spencer T., Keith G. Bidne K. G., Lewis L. C (2001) Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*- purified proteins and pollen. *PNAS* 98 (21): 11925-11930.
11. Kozumplik V., Pejić I. (2012) Oplemenjivanje poljoprivrednog bilja u Hrvatskoj. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.
12. Losey J. E., Rayor L. S., Carter M. E. (1999) Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* 399: 214.
13. Marasas W.F.O. (1996) Fumonisin: History, World-Wide Occurrence and Impact. In: Jackson L. (ed.), *Fumonisin in Food* Plenum Press, New York.
14. Molesini B., Pii Y., Pandolfini T. (2012) Fruit improvement using intragenesis and artificial microRNA. *Trends in Biotechnology* 30: 80-88.
15. Ortiz R. (2011) Revisiting the green revolution: Seeking innovations for a changing world. *Chronicae horticulture* 51(1): 6-11.
16. Poljoprivredna savjetodavna služba, <http://www.savjetodavna.hr>
17. Romeis J, Meissle M, Bigler F. (2006) Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxin and biological control. *Nature Biotechnology* 24: 63-71.
18. Schaart Jan G. (2004) Towards consumer-friendly cisgenic strawberries which are less susceptible to *Botrytis cinerea*. PhD Thesis, Netherland.
19. Slater A., Scott N. W., Fowler M. R. (2008) *Plant biotechnology, the genetic manipulation in plants*. Second edition. Oxford University Press.
20. Tabashnik B. E., Gould F. (2012) Delaying corn rootworm resistance to Bt corn. *Journal of Economic Entomology* 105(3): 739-1106.
21. Tranel P., Wright T. International survey of herbicide resistant weeds. <http://www.weedscience.org/>.
22. Warwick S. I., Legere A., Simard M. J., James T. (2008) Do escaped transgenic persist in nature? The case of an herbicide resistant transgene in a weedy *Brassica rapa* population. *Molecular Ecology* 17 (5): 1387-1395.
23. Wu F. (2006) Mycotoxin reduction in Bt corn: potential economic, health, and regulatory. *Transgenic research* 15(3): 277-289.
24. Zhang H., Tian W., Zhao J., Jin L., Yang J., Liu C., Yang Y., Wu S., Wu K., Cui J., Tabashnik B. E., Wu Y. (2012) Diverse genetic basis of field-evolved resistance to Bt cotton in cotton bollworm from China. *PNAS* 109 (26) 10275-10280.

„Procjena utjecaja širenja polena GM biljaka“

Dr. sc. Solveg Kovač, Ministarstvo zaštite okoliša i prirode

Polen ili kako ga često nazivaju „cvjetni prah“ su zapravo muške spolne stanice cvjetnih biljaka, a predstavlja mala zrnca nevidljiva golim okom koja se nalaze u prašniku pri osnovi tučka cvijeta. Prašnik u sebi ima prah (polen) koji kada sazrije postaje sposoban za oplodnju, a u prirodi se polen raznosi vjetrom ili putem insekata.

Svako zrnce polena je biološko jedinstvo koje sadrži sve sastojke neophodne za nastajanje i razvoj života. Sadrži bjelančevine, vitamine, aminokiseline, masti, ugljikohidrate, enzime, koenzime, hormone, a najbitnije od svega je što sadrži tajnu života - molekule DNA i RNA koje igraju ključnu ulogu kod nasljeđivanja u prirodi pošto u svojoj građi sadrže gene koji su nositelji nasljednih osobina pojedine biljke, odnosno biljne vrste.

Svjedoci smo da se i u prirodi događaju promjene u genotipu i fenotipu biljnih organizama i takve evolucijske promjene nazivamo mutacijama, ali se takve promjene događaju rijetko i u pravilu će oko 70% tih mutacija biti štetno, a ostale će biti neutralne ili pomalo korisne.

Genetika je znanost koja se bavi genima i varijacijama kod živih organizama. Potrebno je razlikovati mutacije u somatskim stanicama koje se događaju samo kod njihovog dijeljenja i ne prenose se na potomstvo od mutacija u spolnim stanicama i takva promjena se prenosi iz generacije u generaciju.

Suvremeni razvoj pojedinih grana znanosti, omogućio je čovjeku da prodre duboko u strukturu molekule DNA pa su danas u velikom usponu znanosti koje nazivamo biotehnologija, molekularna genetika, genetički inženjering i tome slično. Rezultat njihovog djelovanja je nastanak genetički modificiranih organizama (GMO). Pod genetički modificiranim organizmima podrazumijevaju se oni organizmi kojima je genski sastav izmijenjen na način koji se nikada ne bi dogodio klasičnim razmnožavanjem, dakle, u prirodi. Genske konstrukcije kojima je izmijenjen genom domaćina najčešće potječu od sasvim nesrodnih vrsta, čime se brišu ili pomjeraju granice u prirodnom genskom toku izmjena nasljednih informacija. GMO u svojoj DNA sadrže strani gen ili gene koji su uneseni laboratorijskim metodama i tehnikama. Izvori gena kojim se manipulira u DNA domaćina nalaze se u biljnom svijetu, u svijetu mikroorganizama, insekata i životinja, uključujući i ljude, a u posljednje vrijeme spominju se i tzv. sintetički geni.

Kratki pregled naprijed iznesenih činjenica potrebno je promatrati u smislu spolnog nasljeđivanja roditeljskih svojstava kod biljke potomka, a kako je polen muška spolna stanica, činjenica je da je ogroman njegov utjecaj u pogledu generativnog razmnožavanja cvjetnih biljaka pa samim time i na svojstva biljaka koje nastaju prirodnim razmnožavanjem.

Pristaše uporabe GMO zagovaraju pozitivan utjecaj kod povećanje kvaliteta i rodnosti poljoprivrednih kultura, poboljšanje kvaliteta prehrambenih proizvoda (dužu trajnost i bolju otpornost na transport plodova), kao i bolju otpornost usjeva na bolesti, štetnike i korove. Smatra se da se GM-tehnologijom želi postići širi areal gajenja usjeva, poboljšanje tolerantnosti na niske temperature ili sušu i veće iskorištavanje trenutno neproduktivnih degradiranih poljoprivrednih površina gajenjem bolje prilagođenih poljoprivrednih kultura. Sastav tako dobivene hrane bio bi kvalitetniji i obogaćen esencijalnim amino-kiselinama, mineralnim tvarima, vitaminima i slično. Pristalice naglašavaju i moguća ljekovita svojstva genetički modificiranih biljaka pa i njihov pozitivan učinak na zaštitu okoliša kroz

mikrobiološko čišćenje onečišćenih vodotoka i otpadnih voda te manju uporabu kemijskih sredstava u poljoprivredi (herbicida i pesticida) kreiranjem vrsta koje su otporne na bolesti i štetočine ili čak svojim biokemijskim procesima proizvode tvari koje djeluju kao pesticidi.

Međutim, zagovornici uglavnom ne govore o pojedinim negativnim rezultatima ispitivanja proizvoda od GMO-a pa tako ne govore o mogućem riziku GM proizvoda po ljudsko zdravlje, štetnom utjecaju na okruženje ili generalno pogoršanje kvaliteta poljoprivrednih kultura. Ne uzimajući sve činjenice u obzir i uzimajući u obzir korporativnu moć novca, ponekad se direktno utječe na donošenje propisa kojima se može nanijeti nepopravljiva šteta sadašnjim i budućim generacijama zbog izmijenjenog biološkog nasljeđa koje će ugroziti biološku raznolikost mnogih područja u kojima se GM organizmi budu uzgajali na širokom prostoru u monokulturi. Ova pojava može nanijeti najviše štete u onim regijama svijeta iz kojih potječu pojedine vrste važnih poljoprivrednih kultura tako što će GM-kultura prenositi gene na divlje srodnike koji su prirodni izvori korisnih gena i koriste se u konvencionalnom oplemenjivanju za proširivanje genetičke varijabilnosti.

Bioetički promatrano, pristalice GMO-a pozivaju se na činjenicu da se i u prirodi događaju mutacije, odnosno promjene unutar populacije pojedine biljne vrste, a protivnici GMO-a tvrde da je prihvatljivo samo kontrolirano oplemenjivanje koje se ne odvija na razini DNA.

Genetički gledano, polen kao muška spolna stanica, nositelj je nasljednih svojstava biljke potomka unutar biljne vrste i njegova uloga je nepobitna u nasljeđivanju roditeljskih gena od strane potomaka, kao i rasprostranjenosti gena, varijacijama i promjenama u populaciji. Međutim, iako genetika igra važnu ulogu u izgledu i ponašanju organizama, krajnji rezultat daje kombinacija genetike i onoga što je organizam iskusio u svom prirodnom okruženju. Na primjer, iako geni igraju glavnu ulogu u određivanju visine organizma, na to svojstvo velik utjecaj imaju i životni čimbenici kroz koje organizam prolazi. Znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem razdiobe i međusobnih odnosa među živim bićima te među živim bićima i njihovom okolišu naziva se Ekologija.

Znanstvena istraživanja potvrdila su da križanjem genetski modificiranih biljaka s ostalim biljkama unutar iste vrste, biljke potomci u svojoj DNA također nose gene od GM roditelja. Ukoliko na ovaj način križamo genetski izmijenjenu biljku koja proizvodi insekticid s njezinom rođakinjom iz prirode, dobijemo novu biljku koja se ponaša kao superkorov pošto djeluje insekticidno pa u vrlo kratkom roku preplavljuje vrlo široke prostore. Približno polovica hibrida koja nastaje ovakvim križanjem, također proizvodi insekticid pa moramo biti svjesni da više nema povratka kad jednom u prirodu pustimo biljke s izmijenjenim genima.

Zaključno, nisu posve u pravu korporacije i pojedini znanstvenici kao što je molekularna biologinja Anne Glover, koja je preuzela ulogu "prve znanstvenice EU" stala je u obranu GMO rekavši kako se rasprava o toj temi u Europi vodi emocijama, a ne znanstvenim dokazima te dodaje kako će se kao znanstvena savjetnica za politike Europske komisije zalagati da se ukinu neke zabrane povezane sa GMO-om. Znanstvenica također navodi da "Moramo ozbiljno razmišljati o genetski modificiranom sjemenu kao dijelu borbe protiv klimatskih promjena i potrebe da se nahrane svi ljudi u svijetu".

Za razliku od Anne Glover, postoje i drugi molekularni biolozi kao što je Michael Antoniou, savjetnik u istraživanju koje je otkrilo kako su štakori koji su hranjeni GMO kukuruzom kojeg prodaje američka kompanija Monsanto oboljeli od tumora i drugih komplikacija koje uključuju oštećenja bubrega i jetre. Antoniou naglašava potrebu da se testiraju svi GMO usjevi i kaže "Vjerujem da su ovi podaci dovoljni da se privremeno povuče dopuštenje za oglašavanje ove vrste GMO kukuruza, dok se studija ne dopuni i ponovi na većem broju životinja, kako bi dobili punu statističku sliku koju tražimo".

Sve navedeno upućuje na zaključak da potrebu da se nahrane svi ljudi u svijetu velike kompanije mogu riješiti samo dobrom voljom. Naime, glad u svijetu moguće je riješiti jedino pravdom, odnosno pravednom raspodjelom svjetskih resursa i obrazovanjem nerazvijenih. Također treba istaknuti potrebu nametanja obveze detaljnog i dugotrajnog istraživanja za korporacije koje promoviraju GMO hranu, a ne ići putem napada na protivnike GMO hrane da nemaju dovoljno znanstvenih dokaza kako govori gospođa Anne Glover. Najveću odgovornost ipak nose političari koji su ujedno i zakonodavci i oni moraju biti posebno oprezni kad je u pitanju liberaliziranje prometa GMO hranom, posebice u pogledu njezina označava



HRVATSKI ŠUMARSKI INSTITUT

Zavod za Genetiku, oplemenjivanje šumskog drveća i sjemenarstvo

**Potencijal korištenja GM stabala u
Republici Hrvatskoj**

Izvešće Državnom vijeću za GMO

Autori:

Dr. sc. Tibor Littvay*
Maja Popović dipl. ing. šumarstva*
Dr. sc. Nevenka Čelepirović*
Dr. sc. Mladen Ivanković*

Jastrebarsko, 2012.

GENETSKO MODIFICIRANJE U ŠUMARSTVU

UVOD

Biotehnologija i genetsko modificiranje u šumarskom sektoru koristi se za poboljšanje već superiornih genotipova biljaka selekcioniranih klasičnim oplemenjivanjem. Poželjne osobine prijenose se genima iz različitih vrsta, rodova, pa čak i carstava, koji se inače ne događa u prirodi.

U šumarstvu se najčešće za prijenos željenog gena u tkivo domaćina koristi suspenzija agrobakterija. Prva uspješno provedena tehnika genetskog modificiranja na drvenastim biljkama i to s topolama bila je 1987. godine (Fillatti i dr., 1987) posredstvom bakterija *Agrobacterium tumefaciens*. To je prva studija u kojoj je uspješno regenerirano modificirano tkivo šumske vrste drveća.

Nakon te prve uspješne transformacije pa sve do današnjih dana, pokazalo se kako genetsko modificiranje postaje oruđe za buduću svjetsku socijalnu i ekonomsku korist (FAO, 2004.). Brzim razvojem genetskog modificiranja nastojat će se zadovoljiti globalna potražnja za šumskim proizvodima, biogorivom, vratiti ugrožene vrste, te sačuvati i zaštititi šume od masovnih napada štetnika, bolesti i nadolazećih klimatskih promjena (Forest Biotechnology and its Responsible Use, 2010).

MODIFICIRANA SVOJSTVA

Glavna ciljana modificirajuća svojstva kod većine vrsta šumskog drveća su modifikacija lignina, tolerancija na herbicide, otpornost na bolesti i štetnike, te kontrola cvatnje. Najviše istraživanja napravljeno je na topolama, jer se smatraju modelnim vrstama u šumarstvu prilikom genetskog modificiranja i testiranja. Glavno modificirajuće svojstvo je izmjena sadržaja lignina, te osim tog svojstva testiranja su rađena sa kontrolom cvatnje i plodonošenja, postizanju otpornost na insekte i toleranciji na herbicide, te brzini rasta kod topola.

Prisutnost lignina u staničnim stjenkama predstavlja glavni ograničavajući čimbenik prilikom prerade biomase. Potrebno je ukloniti lignin, čija je prerada skup i dugotrajan proces. Zato se genetskim modifikacijama smanjenja sadržaja lignina u staničnim stjenkama mijenja sastav i sadržaj lignina, kako bi postao više osjetljiv na kemijske degradacije. Skupina gena *4CL* topola kontroliraju sintezu enzima 4-kumarat koenzim A ligaza (engl. 4-

coumarate:coenzymeA ligase), čija funkcija regulira formiranje različitih biljnih fenilpropanoida poput lignina i flavonoida, neophodnih za održavanje kontinuiranog toka metabolita potrebnih za normalno fiziološko funkcioniranje biljaka (Hu i dr., 1998). Određenim smanjenjem sadržaja lignina u biljkama poboljšava se potencijal saharifikacije, te se smanjuje utrošak energije i kemikalija u procesima pred tretmana biomase za stvaranje biogoriva (Van Acker i dr., 2011). Bitno je naglasiti kako je potrebno pronaći ravnotežu između intenziteta genetskih modifikacija te nesmetanog rasta, razvoja i obrambenih mehanizama biljaka. Za to su potrebna mnogobrojna i dugoročna terenska istraživanja.

TERENSKA ISTRAŽIVANJA

Osim samog postupka genetskih transformacija, terenski pokusi genetski modificiranog šumskog drveća predstavljaju vrlo važan segment u cjelokupnom lancu istraživanja. Potrebno je testiranje izmijenjenih svojstava u realnim okolišnim uvjetima radi shvaćanja njihove međusobne interakcije, te zbog ispitivanja stabilne ekspresije unesenih gena i procjene biološke sigurnosti genetski modificiranih biljaka.

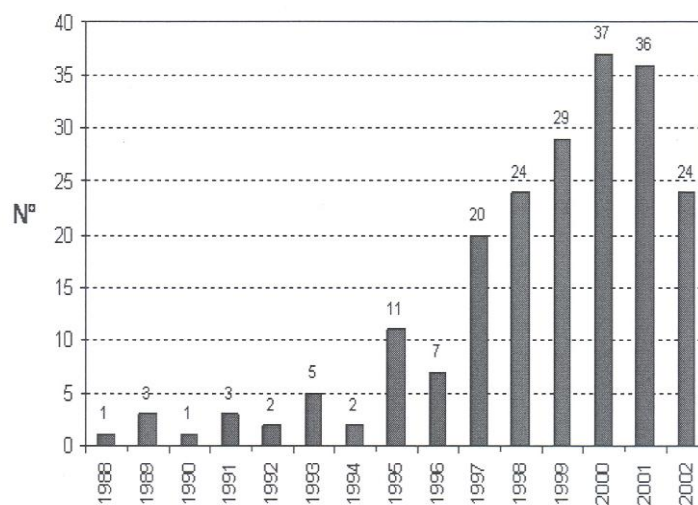
Širom svijeta u prvih petnaest godina istraživanja na području genetskih modifikacija, u 16 zemalja podignuto je oko 210 terenskih pokusa sa genetski modificiranim drvenastim vrstama. Većina takvih istraživanja zabilježena je u Sjedinjenim Američkim Državama, a glavina terenskih pokusa vezana je za četiri roda; *Populus* (51%), *Pinus* (23%), *Liquidambar* (11%) te *Eucalyptus* (7%) (FAO, 2004.). Prema najnovijim procjenama postoji preko 600 takvih terenskih pokusa (Strauss, IUFRO Conference 2011), dok u šumarstvu gotovo nema komercijalne uporabe genetski modificiranih vrsta.

Francuska i Engleska države su sa prvim podignutim terenskim pokusima (Orleans i Jealott Hill, 1995.godine) i provedenim ispitivanjima genetski modificiranih topola sa promijenjenim sadržajem lignina u Europi. U ovom istraživanju praćena su kvantitativna svojstva modificiranih biljaka i sadržaj lignina u pojedinim genetski modificiranim linijama. Biljke su podvrgnute procesima razgradnje lignina koji se koriste prilikom prerade drveta u papirnoj industriji. Istraživanje je pokazalo kako uz blago smanjeni sadržaj lignina nije narušen normalan rast i razvoj biljaka, ali je znatno smanjen utrošak energije i kemikalija, te su poboljšane karakteristike drva za preradu prilikom pridobivanja papira (Pillate i dr., 2002).

Jedino istraživanje kod kojeg su transgenične šumske vrste komercijalizirane provedeno je u Kini. Osnovana su dva terenska pokusa s modificiranim topolama povećane

tolerancije na insekticide; jedan u Institutu za šumarstvo (Peking), te drugi u Manas okrugu (Xinjiang regija). Na temelju ovog istraživanja i preliminarnih rezultata odabrana su tri modificirana klona najboljih šumsko-uzgojnih i insekticidnih svojstava koji se dalje koriste za masovno testiranje i za daljnju komercijalnu proizvodnju u šest Kineskih provenijencija (Wang i dr., 1996).

Broj pokusnih polja s GM drvećem u SAD u periodu od 1998 - 2002

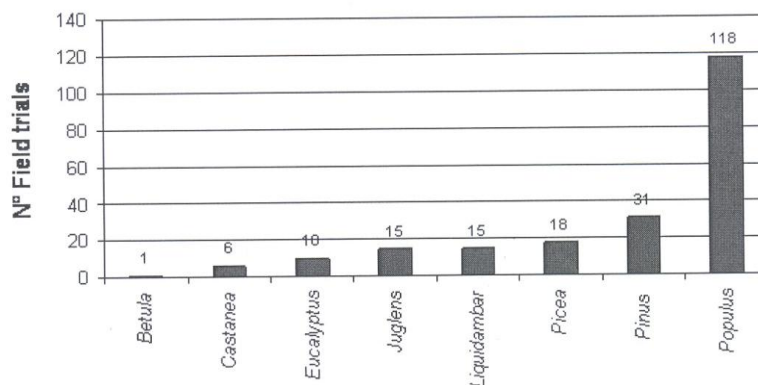


BIOLOŠKA SIGURNOST

Zbog biološke sigurnosti terenski pokusi sa transgeničnim vrstama šumskog drveća za sada su kratkoročni, trajanja nekoliko godina. Istraživanje stabilnosti ekspresije gena u šumarstvu je još uvijek veliki izazov zbog dugog životnog ciklusa šumskih vrsta drveća. Intenzitet i brzina istraživanja su zbog toga djelom ograničeni, te se još ne očekuje masovna uporaba genetski modificiranih šumskih vrsta drveća.

Ispuštanje genetski modificiranih organizama u okoliš i njihovo stavljanje na tržište regulirani su strogim propisima od strane državnih agencija. Tako na primjer, u Sjedinjenim Američkim Državama nadležnost ima Odjel za poljoprivredu, Inspeksijska služba za veterinu i biljno zdravlje (APHIS, engl. Animal and Plant Health Inspection Service). Služba izrađuje okolišne procjene na zahtjev podnositelja prijave za određeno istraživanje. Svaki se zahtjev obrađuje posebno, pristup slučaj po slučaj.

Najzastupljenije vrste GM drveća testirana na pokusnim poljima u svijetu



GENETSKO MODIFICIRANJE U HRVATSKOM ŠUMARSTVU

U Republici Hrvatskoj postupanje sa genetski modificiranim organizmima (GMO) regulirano je Zakonom o genetski modificiranim organizmima (N.N. 70/2005), te četiri pravilnika koji omogućuju provedbu Zakona. Svi zakonski propisi pridonose biološkoj sigurnosti i lakšem praćenju prilikom postupanja sa genetski modificiranim organizmima.

U hrvatskom šumarstvu ne postoje naznake korištenja biotehnologije i genetskog modificiranja. Jedine naznake mogućeg početka istraživanja naziru se s modifikacijama primjene sadržaja lignina prilikom uzgoja plantaža za biomasu. Međutim, šumarski sektor za sada zadovoljava potrebe za biomasom, svojim održivim načinom gospodarenja i umjetno podignutim kulturama i plantažama.

Prilikom izrade okolišnih procjena za odobrenje podizanja nasada za istraživanja genetski modificiranih vrsta šumskog drveća potrebno je razmatrati svaki slučaj zasebno. Procjene se trebaju sastojati od analiza potencijalnih utjecaja modificiranih drvenastih vrsta na moguću štetnu promjenu u osjetljivosti biljnih bolesti i insekata, rizika ispuštanja unesenih gena u okoliš i druge prirodne populacije biljaka. Procjene potencijala vegetativnog razmnožavanja genetski modificiranih biljaka i moguće opasnosti invazivnog učinka.

Potencijalne utjecaje transgeničnih drvenastih vrsta na hidrologiju tla, te moguće utjecaje na ukupnu biološku raznolikost, biljni i životinjski svijet i zdravlje ljudi. Potrebno je provesti i analize svih ostalih specifičnih karakteristika koje posjeduju nemodificirane ishodišne vrste a koje bi se mogle promijeniti unesenim genom i interakcijom modificiranog organizma s okolišem.

Iako za sada ne postoje naznake uporabe genetskog inženjeringa u šumarstvu, potrebo je steći dovoljnu količinu znanja i biti u korak s svjetskim trendovima, što će omogućiti spremnost za upravljanje i korištenje genetski modificiranih šumskih vrsta drveća.

Ministarstvo kulture je na temelju odredbe članka 28. stavka 5. Zakona o genetski modificiranim organizmima („Narodne novine“, broj 70/05 i 137/09) te članka 15. stavka 2. Pravilnika o procjeni rizika za namjerno uvođenje genetski modificiranih organizama u okoliš („Narodne novine“, broj 136/06) i uz suglasnost Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi (klasa: 540-03/10-04/02, ur. broj: 534-08-1-5/1-10-4 do 23.kolovoza 2010.) donijelo rješenje kako Hrvatski šumarski institut dobiva ovlaštenje za obavljanje stručnih poslova izrade procjene rizika u svrhu uvođenja genetski modificiranih organizama (GMO) u okoliš, na rok od 5 godina, od 27.8.2010. godine do 27.8.2015. godine.

U sklopu Hrvatskog šumarskog instituta (HŠI) je Laboratorij za molekularno-genetička ispitivanja koji zadovoljava osnovne uvjete za detekciju GM šumskog drveća. Za detekciju GMO organizama koriste se referentne metode koje su validirane prema principima i zahtjevima ISO 5725 i/ili IUPAC protokolima. Obavezan zahtjev zadan EU zakonskim okvirima je akreditacija laboratorija koji provodi službene kontrole uključujući testiranje na GMO prema određenim Europskim standardima kao što je EN ISO/IEC 17025.

Hrvatski šumarski institut u sklopu svojih ovlaštenja a i sve veće mogućnosti za uvođenjem Genetski modificiranih stabala pratit će i jačati kapacitete za praćenje GM šumskih vrsta koje bi u budućnosti mogle biti korištene u razne svrhe u budućem tehnološkom razvoju u Republici Hrvatskoj.

LITERATURA

Fillatti, J.J., J. Sellmer, B. McCown, B. Haissig, L. Comai, 1987: Agrobacterium mediated transformation and regeneration of Populus. Mol. Gen. Genet., 206:192-199.

FAO, Forestry Department, 2004: Preliminary review of biotechnology in forestry, including genetic modification. Rome, Italy

„Forest Biotechnology and its Responsible Use“ The Institute of Forest Biotechnology, 2010. <http://www.responsibleuse.org/material/biotechtrees.pdf>

Hu, W.-J., A. Kawaoka, C.-J. Tsai, J. Lung, K. Osakabe, H. Ebinuma, V. L. Chiang, 1998: Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). Plant Biology 95, 5407–5412.

Pilate, G., E. Guiney, K. Holt, M. Petit-Conil, C. Lapierre, J.-C. Leplé, B. Pollet, I. Mila, E. A. Webster, H. G. Marstorp, D. W. Hopkins, L. Jouanin, W. Boerjan, W. Schuch, D. Cornu, C. Halpi, 2002: Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. Nature Biotechnology 20: 607-612.

Narodne novine - Zakon o genetski modificiranim organizmima (N.N. 70/2005)

Narodne novine - Pravilnik o procjeni rizika za namjerno uvođenje genetski modificiranih organizama u okoliš (N.N. 136/2006)

Van Acker, R., V. Storme, G. Goeminne, B. Ivens, R. Custers, D. Aerts, W. Soetaert, J. Ralph, N. Santoro, J.-C. Leple, G. Pilate, W. Boerjan 2011: Science, society and biosafety of a field trial with transgenic biofuel poplars. Iufro Tree Biotechnology Conference 2011, Brazil. Conference Proceedings Abstracts, 436.

Strauss, S. H., V. Viswanath, 2011 : Field trials of GM trees in the USA: Activity and regulatory developments. IUFRO Tree Biotechnology Conference 2011. Proceedings

Wang, G., S. Castiglione, Y. Chen, L. Li, Y. Han, Y. Tian, D. W. Gabriel, Y. Han, K. Mang, F. Sala, 1996: Poplar (*Populus nigra* L.) plants transformed with a *Bacillus thuringiensis* toxin gene: insecticidal activity and genomic analysis. Transgenic Research 5, 289-301.

Dr. sc. Mladen Ivanković – Pročelnik Zavoda

Dr. sc. Tibor Littvay - Član Vijeća za GMO

Dr. sc. Nevenka Čelepirović – Voditelj akreditiranog laboratorija

Maja Popović dipl. ing. šumarstva – Znanstveni novak

Strategija procjene rizika GMO

Sanja Miloš, dipl. ing. poljoprivrede, Hrvatska agencija za hranu, Osijek

Uvod

Središnju ulogu procjene rizika i donošenja nezavisnog znanstvenog mišljenja GMO na razini EU ima European Food Safety Agency (EFSA) dok je donošenje odluka u smislu autorizacije, inspekcija i kontrola u nadležnosti Europske komisije te zemalja članica. EFSA savjetuje nadležna nacionalna tijela o svakom zahtjevu za autorizaciju GMO i pruža povratne informacije povezane s znanstvenim činjenicama tijekom procesa procjene rizika. Sva znanstvena mišljenja dostupna su javnosti na njihovim stranicama. Europska komisija prije donošenja konačne odluke o autorizaciji organizira javne konzultacije.

EFSA-in znanstveni odbor (*The Panel on Genetically Modified Organisms (GMO)*) razvio je niz dokumenta o smjernicama koje pokrivaju potpunu procjenu rizika GM biljaka i mikroorganizama te hrane i hrane za životinje dobivene iz njih. Početkom 2012. godine publicirano je mišljenje o procjeni rizika za hranu i hranu za životinje dobivenu od GM životinja. Iako do sada na razini EU nije bilo zahtjeva za odobravanjem ovakve hrane, temeljem saznanja o smjerovima napredovanja biotehnologije u zemljama izvan EU, stručnjaci EFSA-e ovaj iskorak smatraju proaktivnim mjerama u očekivanju mogućih aplikacija u budućnosti. Odvojeno od ovih smjernica tijekom 2012. planirana se pokretanje javnih konzultacija kao osnove za procjenu rizika GM životinja za okoliš (EFSA, 2012.). Također, znanstveni odbor smatra da su opće prihvaćene smjernice procjene rizika za GMO primjenjive i za biljke dobivene cis i intragenom, što je detaljnije opisano u mišljenju odbora (EFSA, 2012.).

Procjena rizika je proces koji se sastoji od četiri koraka a smjernice za identifikaciju mogućih razlika između GM i ne-GM organizama su općenito podijeljene u dva dijela: (1) procjena sigurnosti za okoliš i (2) procjena sigurnosti hrane i hrane za životinje te nutritivni učinak identificiranih različitosti, ako postoje. Također, točno su navedeni i potrebni podaci te detaljan opis pitanja na koje se treba obratiti pažnja pri svakom koraku procjene rizika. To uključuje molekularnu karakterizaciju genetske modifikacije, procjenu modifikacije sa naglaskom na agronomske karakteristike GM biljke, podatke o sastavu, toksičnosti, alergenosti, nutritivnoj vrijednosti. Ključni element okolišne procjene rizika odnosi se na potencijalne promjene i interakciju GM biljaka sa biotičkim i abiotičkim čimbenicima prirodnog okruženja. Zakonska je osnova i daljnje praćenje GM hrane i hrane za životinje na tržištu tzv. post-market monitoring ili praćenje GM biljaka u okolišu što ima za svrhu otkriti bilo kakav potencijalno negativan učinak koji nije bio uočen.

Osnivanjem Hrvatske agencije za hranu (2005.) uspostavljeno je tijelo koje kontinuirano prati problematiku GMO u našoj zemlji. To je Znanstveni odbor za novu hranu i hranu za životinje. Ovaj odbor ima sedam članova koji od osnivanja prate sva najvažnija događanja i propise vezane uz GM hranu i hranu za životinje u RH, te autorizacije na razini EU i šire. Aktivno prate i razvoj te primjenu metodologije i vodiča Europske agencije za sigurnost hrane namijenjene procjeni rizika GMO u svrhu autorizacije.

Principi procjene rizika GM hrane i hrane za životinje

Pojam procjene rizika opisuje "proces procjene koji uključuje identifikaciju pratećih nesigurnosti, vjerojatnosti i težinu štetnog učinka (učinaka) i događaja na ljude ili okoliš. Do štetnog učinka (učinaka) ili događaja dolazi uslijed izloženosti izvoru (izvorima) rizika pod određenim okolnostima." (EC, 2000a). Procjena rizika se sastoji od četiri koraka; identifikacije opasnosti, karakterizacije opasnosti, procjene izloženosti i karakterizacije rizika (EC, 2002c, Codex Alimentarius Commission, 2001).

Svaki korak u procjeni rizika GM biljaka te hrane i hrane za životinje dobivene od njih identificira karakteristike koje mogu uzrokovati štetan učinak, procjenjuje vjerojatnost nastanka rizika svake utvrđene karakteristike GMO-a i evaluira potencijalne posljedice (EC, 2002a). Procjena sigurnosti GMO provodi se za svaki pojedini slučaj zasebno (*case-by-case*), usporedbom svojstava novostvorenog GMO (biljke, hrane ili proizvoda) sa istovjetnim konvencionalnom proizvodom.

Komparativni pristup

Strategija procjene rizika GM biljaka i derivirane hrane temelji se na pronalaženju prikladnih metoda i pristupa pomoću kojih je moguća usporedba GM biljaka te hrane i hrane za životinje dobivene od njih i njihovih odgovarajućih komparatora. Temeljna pretpostavka ovakvog pristupa je da tradicionalno uzgojene biljke i hrana imaju povijest dugogodišnjeg korištenja od strane potrošača i/ili domaćih životinja. Upravo stoga proizvodi uzgojeni i dobiveni tradicionalnim načinom služe za usporedbu pri procjeni sigurnosti GM biljaka (Kok i Kuiper, 2003.). Primjena pristupa komparativne procjene rizika također označava i koncept tzv. značajne jednakosti (*substantial equivalence*) koji se zahtjeva između konvencionalnih i GMO proizvoda (OECD, 1993., FAO/WHO, 2000.). Koncept usporedbe predstavlja polazište za procjenu rizika koja se nadalje usmjerava ka okolišnoj procjeni ili procjeni sigurnosti hrane ili hrane za životinje. Služi u svrhu utvrđivanja namjeravanih i neželjenih razlika i/ili nedostataka uzimajući u obzir raspon prirodnih varijacija.

Procjena rizika započinje sveobuhvatnom molekularnom karakterizacijom GM biljke, a zatim slijedi usporedna analiza odgovarajućih karakteristika GM biljke i njenog odgovarajućeg komparatora. Definicija komparatora opisana je u regulativi EU (1829/2003) dok je EFSA (2011a) objavila vodič za izbor. Pri procjeni se istodobno provode dvije komplementarne provjere: test razlike i test jednakosti (EFSA, 2010b). Test razlike služi za provjeru da li se GM biljka, izostavljajući introducirane genetske modifikacije, razlikuje od svojih komparatora i stoga potencijalno predstavlja opasnost. Test jednakosti se koristi za provjeru da li agronomska, fenotipska i kompozicijska obilježja GM biljke pripadaju rasponu prirodnih varijacija. Raspon prirodne varijacije procjenjuje se iz niza ne-GM referentnih vrsta koje imaju povijesti sigurnog korištenja (EFSA, 2010b). Izlazni rezultati ove analize nadopunjuju strukturu procesa procjene rizika.

Namjeravani i neželjeni učinci

Namjeravani učinci su oni koji ispunjavaju osnovni cilj genetske modifikacije. Promjene u fenotipu se mogu utvrditi putem komparativne analize performansi rasta, prinosa, otpornost na bolesti, i sl.. U odnosu na svoj komparator, namjeravane promjene u sastavu GM biljke mogu se prepoznati utvrđivanjem pojedinih spojeva, npr. ekspresija novih proteina, makro i mikronutrijenata, antinutrijenata i prirodnih toksina i to predstavlja tzv. ciljani pristup. Uvođenje gena u biljke može

rezultirati i neželjenim učincima njene promjene. Procjena rizika nastoji identificirati i karakterizirati namjeravane i neželjene učinke s obzirom na njihov mogući utjecaj na ljudsko ili zdravlje životinja te okoliš. Neželjeni učinci predstavljaju razlike između GM biljke i njenog komparatora i nadilaze namjeravani učinke genetske modifikacije. Neželjeni učinci potencijalno mogli biti povezani s genetskim preinakama ili metaboličkim perturbacijama i moguće ih je predvidjeti ili objasniti. Otkrivaju se pomoću usporedbi agronomskih, fenotipskih i kompozicijska obilježja GM biljke sa svojim komparatorom pod istim uvjetima uzgoja. Polazište u identifikaciji potencijalnih neželjenih učinaka je analiza bočni regija introducirane DNK. Cilj je utvrditi vjerojatnost utjecaja umetanja novog gena na funkciju poznatih endogenih gena. Nadalje, potrebno je provesti i komparativne analize na određene spojeve koji predstavljaju sastavnice važnih metaboličkih putova (specifične metabolite, makronutrijenate, mikronutrijenate, antinutrijenate, toksine). S obzirom na prirodne varijacije, namjeravane i neželjene razlike i/ili nedostatak jednakosti između GM biljke i komparatora, procjena treba sadržavati slijedeće elemente:

- a) karakteristike organizma davaoca i biljke primatelja;
- b) genetičku modifikaciju i njene funkcionalne rezultate;
- c) agronomske i fenotipske karakteristike GM biljke;
- d) karakteristike sastava GM biljke, hrane i hrane za životinje dobivene iz istih;
- e) potencijalnu toksičnost i alergenost produkata gena (proteini, metaboliti) te cijele GM biljke i dobivenih proizvoda;
- f) unos hranom i potencijalan utjecaj na prehranu;
- g) utjecaj prerade i čuvanja na karakteristike proizvoda dobivenih genetičkom modifikacijom.

Procjena rizika GM biljaka koje sadrže složene gene (stacked events)

Procjena rizika GM biljaka koje sadrže složene gene zahtijeva samostalnu procjenu svakog pojedinog događaja i usredotočena je na:

- a) stabilnost umetaka;
- b) ekspresiju introduciranih gena i njihovih produkata;
- c) potencijalne sinergističke ili antagonističke učinke koji proizlaze iz kombinacije događaja.

Navedeni elementi procjene rizika pokrivaju područje i zahtjeve za prva dva koraka procesa procjene rizika; identifikaciju i karakterizaciju opasnosti. Korak procjene izloženosti zahtijeva kvantitativna predviđanja u odnosu na dugotrajan unos i potencijalne nesigurnosti povezane sa unosom transgenih biljaka i hrane dobivene od njih. Da bi to bilo moguće potrebno je imati dostupne podatke o poznatom i predviđenom unosu ljudi/životinja, podatke o uvozu, količinama proizvodnje, itd., imajući u vidu sve moguće putove izloženosti.

Završni korak, karakterizacija rizika, mora jasno pokazati da:

- a) je konzumacija hrane i hrane za životinje koja potječe od GM biljaka je jednako sigurna kao i konzumacije odgovarajućeg komparatora;

- b) hrana i hrana za životinje koja potječe od GM biljke nije prehrambeno nepovoljna za potrošača;

Također, potrebno je navesti pretpostavke kojima je moguće predvidjeti vjerojatnost pojave i težinu štetnog djelovanja na određenu populaciju, te vrstu i veličinu nesigurnosti povezane s procjenom istih. (Wal *et al.*, 2003).

Praćenje GM hrane i hrane za životinje nakon autorizacije i stavljanja na tržište

Program praćenja GM hrane i hrane za životinje nakon autorizacije i stavljanja na tržište potrebno je provoditi uvijek kada je to moguće. Pri tom treba naglasiti da praćenje ne zamjenjuje temeljito provedene postupke procjene sigurnosti (zajedno sa različitim toksikološkim testiranjima) već ih nadopunjuje. Praćenjem se može povećati mogućnost vjerojatnosti otkrivanja, rijetkih, neželjenih učinaka. Da bi to bilo moguće, potrebno ga je provoditi temeljem pouzdanih validiranih protokola kako bi se omogućio nesmetan protok informacija između svih zainteresiranih sudionika. Informacije se mogu odnositi na potrošnju GM hrane i hrane za životinje te na bilo koji uočeni štetni učinak na zdravlje ljudi i životinja. Studije procjene sigurnosti koje se provode u svrhu autorizacije neke GM hrane ne mogu u potpunosti reproducirati različitost populacije koja će konzumirati proizvod te tako ni nuspojave koje se mogu pojaviti kod osjetljivih pojedinaca kao što su oni s posebnim genetskim i fiziološkim statusom te oni koji konzumiraju visoke količine određenog GM proizvoda. Procjena rizika se oslanja na procjenu izloženosti prehranom koja je često promjenjiva i podložna neizvjesnosti stoga se pri privođenju nadzora GM hrane trebaju postaviti slijedeća pitanja: Da li se proizvod koristio kako je predviđeno/preporučeno?, Da li su uočeni štetni učinci ili nuspojave bili predviđeni?, Da li je proizvod izazvao neočekivane nuspojave?, itd. (Wal *et al.*, 2003). Praćenje GM hrane i hrane na tržištu posebno detaljno treba provoditi u slučajevima hrane kojoj je promijenjen prehrambeni sastav i vrijednost ili hrane sa određenim zdravstvenim tvrdnjama.

Okolišna procjena rizika GM biljaka

Rizik koji može imati negativan utjecaj na okoliš uzrokovan GM biljkama (EC 2004c; ACRE 2002b) zahtjeva evaluaciju usporedbe sa postojećim konvencionalnom biljkom, ekvivalentom. Standardna metodologija okolišne procjene rizika obuhvaća slijedeće razine (Wilkinson i sur.2003):

1) Identifikaciju opasnosti

Princip ovog koraka je izložiti organizme visokoj razini GM biljaka i njihovih produkata da bi se determinirali potencijalni negativni učinci na ciljane i ne ciljane žive organizme koji bi mogli biti direktno izloženi GM biljci. Ove se studije uobičajeno provode u kontroliranim laboratorijskim uvjetima rasta kako bi se mogli kvatificirati učinci u odnosu na poznate razine izloženosti.

2) Utjecaji na trofičkoj razini

Korak se sastoji od proučavanja indirektnog utjecaja GM biljke na organizme koji nisu izravno izloženi GM biljci (npr. predatori i paraziti primarnih fitofaga ili uzročnici biljnih bolesti). Ova proučavanja se također provode u kontroliranim uvjetima i mjere se učinci u odnosu na poznate razine izloženosti.

3) Studije izloženosti

Na ovoj se razini provode pokusi modeliranja uzgoja GM biljke u smislu kvantificiranja trenutne razine izloženosti različitim organizama i determinacije potencijalnog štetnog utjecaja na okoliš. Provodi se usporedba sa konvencionalnim komparatorom.

Razine 1) i 2) identificiraju potencijalnu opasnost dok razina 3) utvrđuje vjerojatnost razine izloženosti da bi se omogućila procjena stvarnog rizika.

Nadzor GM biljaka nakon puštanja u okoliš

Poznato je, da je procjena rizika za okoliš dobra u onoj mjeri u kojoj je bio stupanj znanstvenih saznanja kada se ona provodila. Trenutno zakonodavstvo EU nalaže identifikaciju nesigurnosti ili rizika koji su povezani sa područjima izvan trenutnih spoznaja i ograničenog opsega procjene. Ovo podrazumijeva čimbenike kao što su utjecaji velikih razmjera izloženosti različitim okruženjima pri komercijalnoj uporabi GM biljaka, utjecaj izloženosti tijekom dugog vremenskog razdoblja te kumulativne učinke. Zakonodavstvo zahtjeva da se planovi praćenja izrade već pri podnošenju zahtjeva za dopuštenje pri stavljanju na tržište. Također, znanstvene spoznaje i iskustva stečena iz praćenja GM usjeva korisna su saznanja za procjenu i upravljanje rizicima.

Budući razvoj

Analiza sastavnica GM hrane i hrane za životinje osnova je komparativnog pristupa procjene GMO. Daljnji razvoj usmjeren je ka usklađivanju i vrednovanju baza podataka sastava hrane i usjeva, te pružanje pouzdane procjene njihove varijabilnost uslijed različitih ekoloških uvjeta. U slučaju GMO hrane za životinje, preporuča se daljnje prikupljanje i standardizaciju podataka potrebnih za utvrđivanje parametara potrebnih za testiranje u odnosu na prirodne varijacije. Sustavno i standardizirano prikupljanje relevantnih podataka i svih dostupnih znanstvenih dokaza trebalo bi biti moguće na međunarodnoj razini u svrhu što veće pouzdanosti analize sigurnosti GMO. Standardizacija bi trebala uključiti osiguranje kvalitete, provjeru metodologije molekularne karakterizacije, kompozicijske analize, studije toksičnosti, itd.

Razvoj inovativnih tehnika rekombinacije uvjetuje integrirani, multidisciplinarni pristup, te profiliranje novih znanstvenih disciplina, npr. proteomike i sl., u procjeni sigurnosti GM hrane i hrane za životinje. Ovo se posebno odnosi na karakterizaciju složenih interakcija bioaktivnih sastavnica hrane na staničnoj razini kod hrane sa poboljšanim nutritivnim svojstvima (Davies i sur, 2010.).

Smjernice za provođenje postupka procjene rizika za hranu i hranu za životinje dobivenu od GM životinja za sada ne uključuju pitanja vezana za upravljanje rizicima kao što su sljedivost, označavanje, koegzistencija. Stoga će njihov daljnji razvoj biti usmjeren ka pružanju korisnih savjeta za podnositelje zahtjeva, procjenjivače te upravljače rizikom (EFSA, 2012.).

Literatura

Cellini F., Chesson A., Colquhoun I., Constable A., Davies H.V., Engel K.H., Gatehouse A.M., Karenlampi S., Kok E.J., Leguay J.J., Lehesranta S., Noteborn H.P., Pedersen J and Smith M, 2004.

Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 1089-1125.

Codex Alimentarius (2001) Codex Alimentarius Commission – Procedural Manual – Twelfth Edition.

Codex Alimentarius (2003) Codex principles and guidelines on foods derived from biotechnology. Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Food and Agriculture Organisation: Rome.

Davies H.V., Shepherd L.V.T., Stewart D., Frank T., Röhlig R.M. and Engel K.H., (2010) Metabolome variability in crop plant species - When, where, how much and so what? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 58, S54-S61.

EFSA (2006a) Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the Risk Assessment of Genetically Modified Plants and Derived Food and Feed. *EFSA Journal*, 99, 1-100.

EFSA (2007) Guidance Document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the risk assessment of genetically modified plants containing stacked transformation events. *EFSA Journal*, 512, 1-5.

EFSA (2008) Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials. *Food and Chemical Toxicology*, 46, S2-S70.

EFSA (2009) Scientific report of EFSA prepared by the GMO Unit on Public Consultation on the Updated Guidance Document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. *The EFSA Scientific Report*, 293, 1-18.

EFSA (2010a) EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Scientific opinion on Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. *EFSA Journal*, 8(11): 1879, 111pp.

EFSA (2010b) EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Scientific opinion on Statistical considerations for the safety evaluation of GMOs. *EFSA Journal*, 8(1):1250, 59pp.

EFSA (2010c) EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Scientific Opinion on the assessment of allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and feed. *EFSA Journal*, 8(7):1700, 168pp.

EFSA (2011a) EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). Scientific Opinion on Guidance on selection of comparators for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. *EFSA Journal*, 9(5):2149, 22pp.

EFSA (2011b) Opinion of the EFSA Scientific Committee on 90-day feeding trials of whole food/feed. In preparation. EFSA-Q-2009-00941.

EFSA (2012) Guidance on the risk assessment of food and feed from genetically modified animals and on animal health and welfare aspects. *EFSA Journal* 2012;10(1):2501 [43 pp.].

EFSA (2012) Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA Journal* 2012;10(2):2561 [33 pp.].

FAO/WHO (2000) Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Joint FAO/WHO Expert Consultation on foods derived from biotechnology, Geneva, Switzerland.

Kuiper H.A., Kok E.J., and Engel K.H., (2003) Exploitation of molecular profiling techniques for GM food safety assessment. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 238-243.

Kuiper H.A, Gijs A., Kleter, Hub P. J. M., Noteborn and Esther J. Kok (2001) Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *The Plant Journal* 27(6), 503±528.

OECD (1993) *Safety Evaluation of Foods Derived by Modern Biotechnology: Concepts and Principles*. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Paris.

Wilkinson M.J., Sweet, J.B. and Poppy, G. (2003) Preventing the regulatory log jam; the tiered approach to risk assessments. *Trends in Plant Science*, 8, (5) 208-212.

Wal J.-M., Hepburn P.A., Lea L.J., and Crevel R.W.R., (2003) Post-market surveillance of GM foods :Applicability and limitations of schemes used with pharmaceuticals and some non GM Novel Foods.*Regulatory Toxicology and Pharmacology*; 38: 98-104.

Utjecaj GMO-a na prirodu i okoliš

Mr.sc. Jagoda Munić, Zelena akcija, Zagreb

Danas u komercijalnoj upotrebi postoje pretežno dvije vrste genetski modificiranih usjeva. U prvu grupu spadaju oni koji su otporni na nametnike (kukce), jer su modificirani na način da sadrže otrov u sebi, tj. sadrže gene bakterije tla *Bacillus thuringiensis* (Bt) koji stvaraju toksine za insekte.

Druga dominirajuća vrsta su usjevi modificirani na način da su stekli otpornost na herbicide, tj. za razliku od okolnih biljaka (korova), mogu biti tretirani herbicidima bez posljedica. Ova vrsta modifikacije donosi dupli rizik za okoliš i prirodu, prvo kroz utjecaj pesticida na okoliš te kroz utjecaj samog GM usjeva na okoliš.

Procjena negativnih utjecaja proizvodnje i korištenja GMO-a, nije jednostavna, jer istraživanja pod utjecajem različitih sektora daju različite rezultate, zahvaljujući različitim metodološkim pristupima (oblikovanju hipoteze, veličini uzorka, te vremenskom rasponu mjerenja) i različitim stupnjevima neovisnosti i sukoba interesa.

Usjevi koji su otporni na kukce mogu biti toksični i za ostale kukce, na primjer za leptire, a ne samo za ciljane štetočine. Dogotrajna izloženost peludu GM kukuruza, s modifikacijom *Bacillus thuringiensis* (Bt) toksina utječe na ponašanje¹ i preživljavanje² leptira monarh *Danaus plexippus*, najpoznatijeg sjevernoameričkog leptira. Utjecaj na europske leptire nije dovoljno poznat zbog nedovoljnog istraživanja. Ipak neka istraživanja otvaraju zabrinutost zbog utjecaja na leptire^{3, 4, 5, 6}.

GM Bt usjevi loše utječu⁷ na kukce važne za prirodnu kontrolu štetočina na kukuruzu, kao što je slučaj sa zlatookama (*Chrysopidae*).^{8, 9, 10, 11} Primjećena je veća smrtnost u ranijem stadiju razvoja kod vrta zlatooke (*Chrysoperla carnea*) i dvotočkaste bubamare (*Adalia bipunctata*).

¹ Prasifka, P.L., Hellmich, R.L.P., Rasifka, J.R. & Lewis, L.C. 2007E. Effects of Cry1Ab-expressing corn anthers on the movement of monarch butterfly larvae. *Environ Entomology* 36:228-33

² Dively, G.P., Rose, R., Sears, M.K., Hellmich, R.L.S., Tanley-Horn, D.E., Calvin, D.D., Russo, J.M. & Anderson, P.L.. 2004. Effects on monarch butterfly larvae (Lepidoptera: Danaidae) after continuous exposure to Cry1Ab expressing corn during anthesis. *Environmental Entomology* 33: 1116-1125.

³ Lang, A. & Vojtech, E. 2006. The effects of pollen consumption of transgenic Bt maize on the common swallowtail, *Papilio machaon* L. (Lepidoptera, Papilionidae). *Basic and Applied Ecology* 7: 296–306.

⁴ Darvas, B., Lauber, E., Polgár, L., A., Peregovits, L., Ronkay, L., Juracsek, J., et al. (2004). Nontarget effects of DK-440-BTY (Yieldgard) Bt-corn. First Hungarian–Taiwanese entomological symposium, 11–12 October 2004, Budapest Hungarian National History Museum (p. 5).

⁵ Felke, V.M. & Langenbruch, G.A. 2003. Effect of Bt-maize-pollen on caterpillars of *Inachis io* in a laboratory assay. *Gesunde Pflanzen*, 55: 1-7.

⁶ Felke, M., Lorenz, N. & Langenbruch, G-A. 2002. Laboratory studies on the effects of pollen from Bt-maize on larvae of some butterfly species. *Journal of Applied Entomology* 126: 320–325.

⁷ Obrist, L.B., Dutton, A., Romeis, J. & Bigler, F. 2006. Biological activity of Cry1Ab toxin expressed by Bt maize following ingestion by herbivorous arthropods and exposure of the predator *Chrysoperla carnea*. *BioControl* 51: 31-48.

⁸ Andow, D.A. and A. Hilbeck. 2004. Science-based risk assessment for non-target effects of transgenic crops. *Bioscience* 54: 637-649.

⁹ Obrist, L.B., Dutton, A., Romeis, J. & Bigler, F. 2006. Biological activity of Cry1Ab toxin expressed by Bt maize following ingestion by herbivorous arthropods and exposure of the predator *Chrysoperla carnea*. *BioControl* 51: 31-48.

¹⁰ Harwood, J.D., Wallin, W.G. & Obyrcki, J.J. 2005. Uptake of Bt endotoxins by non-target herbivores and higher order arthropod predators: molecular evidence from a transgenic corn agroecosystem. *Molecular Ecology* 14: 2815-2823.

¹¹ Lövei, G.L. & Arpaia, S. 2005. The impact of transgenic plants on natural enemies: a critical review of laboratory studies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 114: 1–14, 2005.

Također utječu na hranjenje i procese učenja kod pčela (*Apis mellifera*), što smanjuje efikasnost oprašivanja¹²

Postoji i prijetnja za ekosustave tla. Bt usjevi ispuštaju toksin preko korijena u tlo¹³, te u tlu ostaju aktivni sastojci Bt otrova^{14, 15, 16}. Dugotrajan, kumulativni učinak uzgajanja Bt usjeva na nekom području nisu uzeti u obzir u europskoj uniji, iako bi to trebalo učiniti prema Smjernici 2001/18 EC o namjernom ispuštanju GMO-a u okoliš¹⁷.

To znači da se povećava izloženost ne-ciljnih organizama BT-toksinu, što može za posljedicu imati pojavu novih štetnika, odnosno povećanje broja štetnika koji nisu prije bili bitni za ekonomiku proizvodnje.

Kod GM usjeva modificiranih da su otporni na insekticide dva su faktora koje utječu na korove, prvo je prekomjerno korištenje herbicida, i drugo prijenos gena sa GM biljke na korov što dovodi do pojave superkorova.

Nakon četiri godine komercijalnog korištenja GM soje Roundup Ready, otporne na glifosat, došlo je do pojave 8 vrsta korova otpornih na taj pesticid. Deset godina kasnije, u zemljama koje intenzivno koriste GM RR usjeve pojavili su se novi korovi – 11 njih u SAD-u, 5 u Brazilu, 5 u Argentini, i 2 u Južnoj Africi.¹⁸ Pojava korova otpornih na pesticid, potiče korištenje dodatnih i novih vrsta pesticida^{19, 20}.

Nadalje, roundup, herbicid koji prodaje tvrtka Monsanto, zajedno sa GM usjevom Roundup ready, ima utjecaj na endokrine žlijezde, odnosno utjecaj na lučenje hormona.²¹ Ovaj je herbicid otrovan za punoglavce, te tako utječe i na populaciju žaba.²²

Studija iz Velike Britanije je pokazala da uz polja GMO uljene repice ima 24% manje leptira nego u poljima koja nisu bila GM jer je bilo manje poljskog cvijeća te manje nektara za

¹² Ramirez-Romero R.; Desneux N.; Decourtye A.; Chaffiol A.; Pham-Delègue M.H. (2008). Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). *Ecotoxicol Environ Saf.* 70:327-33.

¹³ Saxena, D., Flores, S. & Stotzky, G. 2002. Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 133-137.

¹⁴ Flores, S., Saxena, D & Stotzky, G. 2005. Transgenic Bt plants decompose less in soil than non-Bt plants. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 1073-1082.

¹⁵ Stotzky, G. 2004. Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants. *Plant and Soil* 266: 77-89.

¹⁶ Zwahlen, C. Hilbeck, A. Gugerli, P. & Nentwig, W. 2003. Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Molecular Ecology* 12: 765-775.

¹⁷ Directive 2001/18 EC http://europa.eu/legislation_summaries/agriculture/food/128130_en.htm

¹⁸ Weed Science (2010). Glyphosate-Resistant Weeds Globally – 2010.

<http://www.weedscience.org/Maps/GlyphosateMap.htm>

¹⁹ Martinez-Ghersa, M.A.; Worster, C.A.; Radosevich, S.R. (2003). Concerns a weed scientist might have about herbicide-tolerant crops: A revisit. *Weed Technol.* 17:202-210.

²⁰ Van Acker, P. C.; Brule-Babel, A.L.; Friesen, L.F. (2004). Intraspecific gene movement can create environmental risk: The example of Roundup Ready wheat in Western Canada In *Risk Hazard Damage. Specification of Criteria to Assess Environmental Impact of Genetically Modified Organisms*, B. Breckling and R. Verhoeven, ed. (Bonn, Federal Agency of Nature Conservation), pp. 37-47.

²¹ Richard, S., Moslemi, S., SipahutarH, ., Benachour, N. & Seralini, G-E. 2005. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental Health Perspectives* 113: 716–720.

²² Relyea, R.A. 2005. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications* 15: 618-627. Relyea, R.A. 2005. The lethal impact of roundup on aquatic terrestrial amphibians. *Ecological Applications*, 15: 1118–1124. Relyea, R.A., Schoepner, N.M. & Hoverman, J.T. 2005. Pesticides and amphibians: the importance of community context. *Ecological Applications*, 15: 1125–1134.

leptire²³. Korištenje herbicida za GM soju je smanjilo korisne bakterije tla koje fiksiraju dušik.^{24, 25}.

Prijenos GM gena u okoliš je teško kontrolirati i dovodi do opstanka GM gena u okolišu i hranidbenom lancu.^{26, 27}. U slučaju GM Bt kukuruza StarLink, onečišćenje je nađeno u uzorcima hrane nekoliko godina nakon zabrane²⁷. Drugi je promjer GM riža LLRice601, koja nije bila odobrena za konzumaciju, već samo za istraživanja, je nađena u riži komercijalno prodavanoj na Europskom tržištu hrane.²⁸

Utjecaj prijenosa GM gena i njihovo opstanka u okolišu varira jer ovisi o karakteristikama pojedinog GMO-a i ekološkog te sociološkog konteksta područja u kojem se siju. Ti utjecaji mogu biti na poljoprivredu – zbog nastajanja novih ili agresivnijih korova i gubitka vrijednijih poljoprivrednih varijeteta²⁹. Nadalje, prijenos gena može zagaditi gene drugih sorti usjeva ili srodnih divljih vrsta, te time promijeniti njihov genom, što je direktan utjecaj na bioraznolikost i na agrobioraznolikost. Također, prijenos gena može stvoriti superkorove, odnosno vrste koje se u ekosustavu ponašaju kao invazivne vrste. Ovo potonje je naročito moguće kod GM preinaka koje omogućavaju organizmima da se bolje nose sa okolišnim stresom, npr. bolje se prilagođavaju na sušu, slanost tla i ekstremne temperature. Takve karakteristike bi omogućile značajnu prednost GM usjevima u staništima gdje im prije nije bilo moguće opstati, što bi značajno promijenilo sastav tih ekosustava.^{30, 31, 32}. Ovakve mogućnosti naročito zabrinjavaju u područjima specijacije pojedinih vrsta, gdje postoji mnogo divljih srodnika.^{29, 33}, kao što je npr. Meksiko za područje kukuruza ili Europa za uljanu repicu. Širenje GM gena u okoliš može imati utjecaj i na životinje, bilo divlje bilo domaće, jer kao dio stočne hrane može izazvati alergijske reakcije, i imati toksičan utjecaj.

Što se tiče količine korištenja pesticida u uzgoju GMO-a, postoje kontradiktorna i različita istraživanja. Neka od njih dokazuju smanjenje korištenja pesticida^{34, 35}. To se smanjenje

²³ Roy, D.B., Bohan, D.A., Haughton, A.J., Hill, M.O., Osborne, J.L., Clark, S.J., Perry, J.N., Rothery, P., Scott, R.J., Brooks, D.R., Champion, T., Hawes, C., Heard, M.S. & Firbank, L.G. 2003. Invertebrates and vegetation of field margins adjacent to crops subject to contrasting herbicide regimes in the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *The Royal Society Philosophical Transactions B*. 358: 1879–1898

²⁴ King, C.A., Purcell, L.C. & Vories, E.D. 2001. Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in response to foliar glyphosate applications. *Agronomy Journal* 93: 179–186.

²⁵ Zablutowicz, R.M. & Reddy, K.N. 2004. Impact of glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. *Journal of Environmental Quality* 33: 825–831.

²⁶ Clark, A. (2006). Environmental risk of genetic engineering. *Euphytica* 148:47–60.

²⁷ Marvier, A. (2004). Risk assessment of GM crops warrants higher rigor and reduced risk tolerance than traditional agrochemicals. In *Risk Hazard Damage. Specification of Criteria to Assess Environmental Impact of Genetically Modified Organisms*, B. Breckling and R. Verhoeven, ed. (Bonn, Federal Agency of Nature Conservation), pp.119-129.

²⁸ Vermij, P. (2006). Liberty Link rice raises specter of tightened regulations. *Nature Biotechnology* 24:1301-1302.

²⁹ Heinemann, J.A. (2007). A Typology of the Effects of (Trans)Gene Flow on the Conservation and Sustainable Use of Genetic Resources. Background Paper Study No. 35 (Rome, FAO), p. 94. <ftp://ftp.fao.org/ag/cgrfa/bsp/bsp35r1e.pdf>

³⁰ Heinemann, J.A. (2009a). Hope not Hype. The future of agriculture as guided by the International Assessment of Agricultural Knowledge, Science and Technology for Development (Penang, TWN), p. 160.

³¹ Andow, D.A.; Zwahlen, C. (2006). Assessing environmental risks of transgenic plants. *Ecol. Lett.* 9:196-214.

³² Tilman, D. (1999). Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5995-6000.

³³ Ellstrand, N. (2003). Current knowledge of gene flow in plants: implications for transgene flow. *Phil. Trans.R. Soc. Lond. B* 358:1163-1170.

³⁴ Subramanian, A.; Qaim, M. (2009). Village-wide Effects of Agricultural Biotechnology: The Case of Bt Cotton in India. *World Development* 37:256-267.

³⁵ Fernández-Cornejo, J.; McBride, W.D. (2002). Adoption of Bioengineered Crops. *Agricultural Economic Report No. 810* (Washington D.C., Economic Research Service USDA), p 61.

naročito prepoznaje u industrijski vrlo razvijenoj proizvodnji. Smanjenje se odnosi na korištenje pesticida na koji je GM usjev otporan, bez analize o aplikaciji drugih vrsta pesticida na duži rok.

Druga istraživanja pokazuju da smanjivanje upotrebe pesticida nije izgledno u dužem periodu.^{36, 37} Naprotiv, korištenje pesticida na GM usjevima se povećava zbog pojave rezistentnih korova, pojave novih kukaca – štetočina, te povećanje područja na kojima se uzgajaju GM usjevi^{38, 39, 40, 41, 42}. Pojava novih korova i štetočina dovodi do korištenje pesticida veće toksičnosti (2,4-D i atrazin u Argentini^{36, 43}), te se pesticidi primjenjuju češće i u većim dozama⁴⁴. Tako je na primjer u Argentini od 1996 do 2001 na poljima GM soje, raznovrsnost pesticida je porasla za 17%, dok je količina pesticida porasla za više od 100%, a povećala se i njihova toksičnost⁴⁵. Sijanje RR soje u Argentini je povećalo korištenje glifosata sa 14 milijuna na 175 milijuna litara od 1996/97 do 2007⁴⁶. Ovakvo povećanje korištenja pesticida ima za posljedicu akumulaciju toksičnih tvari u tlima i podzemnim vodama⁴⁷.

U Argentini, Brazilu i Paragvaju, širenje poljoprivrednih površina pod GM usjevima je doprinijelo deforestaciji, i smanjenju prirodnih ekosustava³⁶. Samo je u Argentini od 2003 do 2008. Godine povećana proizvodnja GM soje za 98%⁴⁸, odnosno za 4 milijuna hektara.

Na prvom nacionalnom sastanku liječnika iz područja pod utjecajem RR Soje i roundap pesticida izneseni su zabrinjavajući podaci. Drastično se je povećao broj djece rođene s defektima, (npr. sa 19.1 na 10000 rođenih u 1997 na 85.3 na 10000 u 2008.). Povećao se je i broj oboljelih od raka kod djece (sa 10.5 na 10000 u 1984. Na 15.7 na 10000 u 2007.). Broj

³⁶ Pengue, W. (2004). Environmental and socio economic impacts of transgenic crops in Argentina and South America: An ecological economics approach In Risk Hazard Damage. Specification of Criteria to Assess Environmental Impact of Genetically Modified Organisms, B. Breckling and R. Verhoeven, ed. (Bonn, Federal Agency of Nature Conservation), pp. 49-59.

³⁷ Wolfenbarger, LL.; Phifer, P.R. (2000). The Ecological Risks and Benefits of Genetically Engineered Plants. Science 290:2088-2093.

³⁸ Van Acker, P. C.; Brule-Babel, A.L.; Friesen, L.F. (2004). Intraspecific gene movement can create environmental risk: The example of Roundup Ready wheat in Western Canada In Risk Hazard Damage. Specification of Criteria to Assess Environmental Impact of Genetically Modified Organisms, B. Breckling and R. Verhoeven, ed. (Bonn, Federal Agency of Nature Conservation), pp. 37-47.

³⁹ Pengue, W. (2005). Transgenic Crops in Argentina: The Ecological and Social Debt. Bulletin of Science Technology & Society 25:314-322.

⁴⁰ Powles, S.; Preston, C. (2006). Evolved Glyphosate Resistance in Plants: Biochemical and Genetic Basis of Resistance. Weed Technology 20:282-289

⁴¹ Vila-Aiub M.; Vidal, R.; Balbi M.; Gundel P.; Trucco F.; Ghersa, C. (2008). Glyphosate - resistant weeds of South American cropping systems: an overview. Pest Management Science 64:366–371.

⁴² Heinemann, J.A.; Kurenbach, B. (2008). Special threats to the agroecosystem from the combination of genetically modified crops and glyphosate. TWN Biosafety Briefing. August 2008. www.biosafety-info.net/file_dir/4634860148bfa74152746.pdf

⁴³ Tuesca, D.; Niesemsohn, L.; Papa, J. (2007). Para estar alerta: el sorgo de alepo resistente al glifosato In Soja para mejorar la producción 36, INTA/ EEA, pp. 72-75.

⁴⁴ Graef, F.; Stachow, U.; Werner, A.; Schütte, G. (2007). Agricultural practice changes with cultivating genetically modified herbicide-tolerant oilseed rape. Agricultural Systems 94:111-118.

⁴⁵ Qaim, M.; Traxler, G. (2005). Roundup Ready soybeans in Argentina: farm level and aggregate welfare effects. Agricultural Economics 32:73-86.

⁴⁶ SAyDS (Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sostenible) (2008). El avance de la frontera agropecuaria y sus consecuencias (Buenos Aires, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable).

⁴⁷ Dale, P.J, Clarke, B., Fontes, E.M.G. (2002). Potential for the environmental impact of transgenic crops. Nat. Biotechnol. 20:567-574.

⁴⁸ Tomei, J.; Upham, P. (2009). Argentinean soy-based biodiesel: An introduction to production and impacts. Energy Policy 37:3890-3898.

oboljelih u nekom području je u korelaciji s količinama pesticida apliciranim na poljima. Također postoje indicije utjecaja na neuro-kognitivni razvoj djece, a primjećeno je i povećanje broja spontanih pobačaja.⁴⁹

⁴⁹ Report from the 1st NATIONAL MEETING OF PHYSICIANS IN THE CROP-SPRAYED TOWNS Faculty of Medical Sciences, National University of Cordoba. August 27th and 28th 2010 University Campus, Cordoba Coordinators: Dr Medardo Ávila Vazquez, Prof Dr Carlos Nota,

Sigurnost veterinarsko-medicinskih proizvoda koji sadržavaju genetski modificirane organizme

Dr. sc. Svjetlana Terzić, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

Uvod

Veterinarsko-medicinski proizvodi (VMP) odnosno veterinarski lijekovi svrstani su u glavnom u dvije osnovne skupine, a to su kemofarmaceutski (lijekovi) i biološki proizvodi (cjepiva i drugi imunološki proizvodi). Iako cjepiva čine oko 23% svjetskog tržišta VMP-a njihova je uloga u veterinarskoj medicini značajna. Osim konvencionalnih (pripravljenih od atenuiranih ili inaktiviranih mikroorganizama) sve više rekombinantnih vektorskih cjepiva (živih vektorskih i DNA vektorskih cjepiva) odnosno subjediničnih cjepiva. Tu su još i cjepiva koja sadržavaju inaktivirane toksine i tzv. „markirana cjepiva“ tj. DIVA (engl. Differentiating Infected from Vaccinated Animals). Uz virusna i bakterijska cjepiva, kojih je najviše, u veterinarskoj medicini primjenjuju se još i cjepiva protiv protozoarnih infekcija, nezaraznih bolesti i cjepiva za kontrolu reprodukcije.

Cjepiva dobivena genskim modifikacijama mikroorganizama (antigena) mogu se svrstati (prema OIE Terrestrial Manual-u) u tri velike skupine s obzirom na njihova biološka svojstva i neškodljivost tj. sigurnost primjene. Tako cjepiva koja sadržavaju inaktivirane mikroorganizme (cijele ili njihove dijelove) ne predstavljaju posebnu opasnost za okoliš i do sada nisu zabilježeni njihovi neželjeni učinci. Druga skupina su cjepiva koja sadržavaju žive mikroorganizme dobivene dodavanjem ili delecijom jednog ili više gena. Za njih je propisano da niti jedna od modifikacija ne smije utjecati na povećanje virulencije ili patogenosti modificiranog mikroorganizma u odnosu na izvorni. Treća skupina su živa vektorska cjepiva u kojima vektor može nositi jedan ili više gena koji za koje se zna da potiču imunost u određene ciljne vrste. Za takva se cjepiva moraju provesti dodatna istraživanja kojima se potvrđuju biološka svojstva antigena i njegova sigurnost za okoliš. Prije dobivanja odobrenja za stavljanje u promet takvih cjepiva obvezno je provesti analizu rizika koja uključuje svojstva antigena, rizik za zdravlje ljudi i životinja (ciljnih vrsta i ostalih životinja), zadržavanje u okolišu i mogući povratak/porast virulencije. Zbog izuzetnog značaja cjepiva u zaštiti zdravlja životinja obvezna su istraživanja kvalitete, imunogenosti i neškodljivosti prema vrlo strogim zahtjevima. Krovna ustanova za sve medicinske proizvode koji se

primjenjuju u humanoj i veterinarskoj medicini je Europska agencija za medicinske proizvode (eng. European Medicines Agency, EMA) koja nakon znanstveno-stručnih provjera predlaže Europskoj komisiji VMP-e za koje je dokazano da su učinkoviti i sigurni/neškodljivi. Danas je na svjetskom tržištu oko 30 različitih veterinarskih cjepiva dobivenim genetskim modifikacijama mikroorganizama koja su se pokazala neškodljivima/sigurnima i učinkovitima.

Cjepiva

Kriteriji za uspješno cjepivo za životinje nisu isti kao oni za cjepiva koja se koriste u humanoj medicini. Zahtjevi ovise o vrsti životinja za koje su namijenjeni kao i o antigenu. Međutim, zahtjevi za kvalitetu cjepiva za kućne ljubimace sličniji su onima za ljude, dok se za ekonomske kategorije životinja u procjeni uzimaju u obzir još i utjecaj na proizvodnju te omjer rizika i koristi cijepljenja. Specifične zahtjeve s obzirom na sigurnost i učinkovitost imaju cjepiva protiv zoonoza u domaćih i divljih životinja kao i ona za sprječavanje bolesti koje se mogu prenijeti hranom (Meeusen i sur., 2007).

Svaka vrsta cjepiva ima svojstva koja ga u nekoj epizotološkoj situaciji mogu odrediti kao cjepivo od izbora. Tako cjepiva pripravljena od atenuiranih sojeva potiču dobru staničnu i humoralnu imunost, jeftina su i jednostavne za primjenu. Mehanizam njihova djelovanja temelji se izazivanju blage infekcije budući da se antigen umnaža u organizmu ali kod njih postoji mogućnost izlučivanja antigena u okoliš što je izbjegnuto u inaktiviranih cjepiva. Međutim, inaktivirana cjepiva su u odnosu na živa stabilnija, ne predstavljaju opasnost od povratka virulencije ali u glavnom potiču slabiji imunski odgovor zbog nemogućnosti aktivacije citotoksičnih T-limfocita. Zajednički nedostatak obje vrste konvencionalnih cjepiva je nemogućnost razlikovanja protutijela nastalih nakon cijepljenja od onih prirodno stečenih. Zbog toga DIVA cjepiva imaju prednost kada je neophodno razlikovanje inficiranih od cijepljenih životinja što se često koristi u programima nadzora nad nekim zaraznim bolestima. Za izradu „markiranih cjepiva“ koriste se i prirodni mutanti. Jedno od takvih cjepiva je i ono protiv bolesti Aujeszkoga tj. pseudorabijesa (gI- cjepivo). Danas na tržištu postoje subjedinična cjepiva koja također daju solidnu imunost nakon cijepljenja.

Za virusna vektorska cjepiva najčešće se koriste virusi iz porodice *Poxviridae* ili *Adenoviridae* (Voight i sur., 2007) ali i drugi mikroorganizmi. Jedno od subjediničnih cjepiva

koje se istražuju se već više od desetljeća subjedinično cjepivo protiv klasične svinjske kuge koje sadržava jedan od glikoproteina ovojnice virusa (gp E2). Gp E2 dobiva se izdvajanjem iz materijala koji sadržava virus, rekombinantnom DNK tehnologijom ili integriranjem glikoproteina E2 (gp E2) u genom drugog mikroorganizma. Istraživanja su pokazala da je bakulovirus prikladan za pripremu subjedinične (E2) vakcine (Hulst i sur., 1993; Hulst i sur., 1994). Bakulovirus u koji je integriran gp E2, nakon umnažanja u staničnoj kulturi insekata služi za dobivanje čistog gp E2. Značajno je da bakulovirus ne izaziva infekciju u vertebrata nego samo u *Lepidoptera* (insekata) i kao vektor prikladan je jer osigurava relativno veliku proizvodnju imunogena uz relativno nisku cijenu. Ovakav tip cjepiva ima prednost budući se protutijela nastala nakon cjepljenja subjediničnim (E2) cjepivima mogu razlikovati od inficiranih životinja na temelju drugih glikoproteina virusa npr. glikoproteina E^{ms} ili nestrukturnog proteina NS3-3 imunoenzimnim testom (Greiser-Wilke i Moening, 2004). Osim bakulovirusa istražuju se i drugi virusi (ORF virus) koji bi bili prikladni za proizvodnju gp E2 (Voight i sur., 2007). Sličan princip imaju i neka druga cjepiva npr. cjepiva protiv bolesti plavog jezika (engl. Bluetongue). Bakterijska cjepiva koja sadržavaju žive GMO još uvijek su veoma rijetka (Frey, 2007) ali postoje istraživanja (Favre i Viret, 2006) sigurnost za okoliš kandidata za rekombinantna cjepiva (*Salmonella typhi* Ty21a i CVD 908-htr-A, *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR i Peru 15, *Shigella flexneri* 2a SC602 i CVD 1208). U novije vrijeme istražuju se i biljke kao potencijalni vektori u proizvodnji veterinarskih vakcina, a prednost im može biti način primjene (peroralno u hrani), skladištenje i transport i niža cijena (Shams, 2005).

Ova cjepiva kao i ostale vrste cjepiva moraju proći postupak odobravanja za stavljanje u promet tijekom kojega se osim njihove učinkovitosti procjenjuje i njihova sigurnost za životinje, ljude i okoliš. Uredbom 2001/18/EC, II.C.2. propisano je da se u dokumentaciji o živom rekombinantnom cjepivu moraju točno opisati genotip i fenotip živog rekombinantnog vektora kao i metode za identifikaciju, podatci o genotipskoj i fenotipskoj stabilnosti, virulenciji, tkivima i tropizmu kao i validacija proizvodnje kojom se potvrđuje stabilnost rekombinantnog vektora tijekom proizvodnje i u gotovom cjepivu, odnosno potrebno je dokazati da nije došlo do mutacija. U svrhu provjere kvalitete takvih cjepiva proizvođač mora osigurati da se biokemijskim, molekularnim i imunološkim metodama može dokazati kvaliteta gotovog cjepiva.

Prema zahtjevima za veterinarsko-medicinske proizvode opisanim u Uredbi 2001/82 EC i 2004/28 EC i prihvaćenim u Republici Hrvatskoj sigurnost/neškodljivost takvog cjepiva mora se procijeniti na ciljnim vrstama. Prosuđuje se širenje/izlučivanje rekombinantnog vektora

(prijenos vektora s cijepljenih na necijepljene životinje, prijenos vektora s ciljnih vrsta na one koje nisu prirodno prijemljive, prijenos vektora sa životinja na ljude). Također se procjenjuje da li je promjena svojstava vektora koje utječu na njegov tropizam kao i da li je slučajno došlo do povrata virulencije. Nadalje, mora se istražiti eventualna ekotoksičnost što je propisano u Uredbi 2001/82 EC i 2001/18/EC (Annex II). U koliko su postignuti zadovoljavajući rezultati s obzirom na sigurnost cjepiva pristupa se procjeni učinkovitosti, a ona mora zadovoljiti zahtjeve postavljene u Uredbi 2001/82 EC i Europskoj Farmakopeji (Ph.Eur.). Nešto blaži zahtjevi vrijede za inaktivirana cjepiva jer je opasnost od mogućih neželjenih učinaka na životinje, ljude i okoliš nešto manja. Budućnost u suzbijanju zaraznih bolesti svakako su i DNK cjepiva koja su sigurna za primjenu i potiču solidnu tvorbu citotoksičnih T-limfocita (T_c) te daju dugotrajnu imunost. (Spier, 1996; Ganges i sur. 2005).

Dobivanje odobrenja za stavljanje veterinarsko-medicinskih proizvoda u promet

Već u prvoj fazi istraživanja (prije podnošenja zahtjeva za dobivanje odobrenja za stavljanje u promet VMP-a koji sadržava GMO, tzv. registracije) proizvođač mora zatražiti suglasnost i dobiti dozvole nadležnih tijela da se sastojci takvih VMP-a mogu koristiti u veterinarskim cjepivima. Nakon toga slijede laboratorijska istraživanja, kontrolirani pokusi na ciljnim vrstama i drugim životinjama, ograničena terenska istraživanja i pokretanje postupka za dobivanje odobrenja za stavljanje u promet.

Prema europskim propisima koje je prihvatila i Hrvatska svi veterinarsko-medicinski proizvodi koji sadržavaju GMO odnosno koji su dobiveni genskom tehnologijom obvezno moraju proći centralizirani postupak dobivanja odobrenja za stavljanje u promet. Tako dokumentacija mora sadržavati sve dijelove kao i za ostale VMP-e ali i dodatnu dokumentaciju. Za tu vrstu VMP-a dokumentacija mora sadržavati iscrpan opis genetičkog materijala uključujući i njegovu stabilnost, opis svih staničnih kultura i sjemenskim sojevima koji se koriste u proizvodnji, opis vektora (informacije o genetičkoj modifikaciji, biološkim svojstvima, funkcija gena koji su dodani ili deletirani, virulencija, opis sekvenci (uloga u gotovom proizvodu i procjena kvalitete, neškodljivosti i učinkovitosti, opis gotove vektorske vakcine, metode identifikacije, neškodljivost, stabilnost, virulencija antigena, opis proizvodnje i stabilnost tijekom svake faze proizvodnje, stabilnost gotove vakcine, mogućnost dokazivanja antigena biokemijskim, molekularnim ili imunološkim metodama, razvoj i validacija metoda dokazivanja, neškodljivost za ciljne vrste, širenje živog antigena između cijepljenih i necijepljenih životinja (ciljne vrste), širenje antigena s ciljnih vrsta na ostale domaće i divlje životinje koje

se nalaze u istom okruženju, širenje antigena s cjepljenih životinja na ljude, povrat virulencije, usporedba neškodljivosti/sigurnosti s konvencionalnom vakcinom, neškodljivost za gravidne životinje i njihov podmladak, studiju virulencije u ciljnih i drugih životinja, horizontalni prijenos, specifičnost za vrste, ekotoksičnost (moguća diseminacija u okolišu, mogućnost prijenosa na beskralješnjake, fizikalni i kemijski faktori koji utječu na preživljavanje i reprodukciju vektora) i učinkovitost (imunogenost).

Prilikom odobravanja takvih cjepiva traži se i mišljenje javnosti (organizacija javnih tribina, prezentacija proizvođača, nadležnih tijela i stručnjaka). U slučaju da se analizom rizika utvrdi da takvo cjepivo ima značajan utjecaj na okoliš izrađuje se izvješće o utjecaju na okoliš koje sadržava potpunu i korektnu diskusiju o utjecaju na okoliš i upućuje nadležna tijela i javnost o načinima na koje je moguće izbjeći ili značajno smanjiti neželjene utjecaje.

Zaključak

S obzirom na brojne i rigorozne zahtjeve koje mora ispuniti svako cjepivo koje je kandidat za primjenu i stavljanje na tržište (registraciju) cjepiva koja sadržavaju GMO spadaju u najstrože kontrolirane veterinarsko-medicinske proizvode. U zemljama članicama EU moguće ih je staviti na tržište samo uz suglasnost EMA i Europske komisije nakon posebnog postupka procjene i odobravanja (centraliziranog postupka registracije).

U svrhu stavljanja na tržište VMP koji sadržavaju GMO provedena su brojna istraživanja kojima je potvrđena njihova neškodljivost/sigurnost za ljude, životinje i okoliš. Centraliziranim postupkom dobivanja odobrenja za stavljanje u promet VMP koji sadržavaju GMO dodatno se kontrolira njihova kvaliteta i primjena (farmakovigilancija), a veoma strogim zahtjevima i stalnim nadzorom nad primjenom cjepiva koja su dobivena različitim rekombinantnim tehnikama osigurava se njihova sigurna primjena. U Europskoj zajednici trenutno je oko 20 takvih proizvoda koji će danom ulaska u EU biti automatizmom registrirani i u Republici Hrvatskoj.

LITERATURA

1. European Pharmacopoeia: Vaccines for veterinary use
2. European medicines agency (2004): Guideline on live recombinant vector vaccines for veterinary use.
3. Favre, D., J-F. Viret (2006): Biosafety of recombinant live oral bacterial vaccines in the context of European regulation. *Vaccine* 24, 3856-3864.
4. Frey, J. (2007): Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. *Vaccine* 25, 5598-5605.

5. Ganges, L., M. Barrera, J.I. Núñez, I. Blanco, M.T. Frias, F. Rodríguez, F. Sobrino (2005): A DNA vaccine expressing the E2 protein of classical swine fever virus elicits T cell responses that can prime for rapid antibody production and confer total protection upon viral challenge. *Vaccine* 23, 3741-52.
6. Greiser-Wilke, I., V. Moennig (2004): Vaccination against classical swine fever virus: limitations and new strategies. *Animal Health Research Reviews* 5, 223-226.
7. Hulst, M.M.; D.F. Westra, G. Wensvoort, R.J.M. Moormann (1993): Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *Journal of Virology* 67, 5435-5447.
8. Hulst, M.M., G. Himes, E. Newbiggin, R.J.M. Moormann (1994): Glycoprotein E1 of hog cholera virus expression in insect cells and identification as a ribonuclease. *Virology*, 200, 558-565.
9. Meeusen, E.N.T., J. Walker, A. Peters, P-P. Pastoret, G. Jungersen (2007): Current status of veterinary vaccines. *Clinical microbiological reviews* 20, 489-510.
10. OIE Terrestrial Manual (2008): Principles of veterinary Vaccine production. Chapter 1.1.8, 90-104.
11. Shams, H. (2005): Recent developments in veterinary vaccinology. *The veterinary Journal* 170, 289-299.
12. Spier, R.E. (1996): International meeting on the nucleic acid vaccines for the prevention of infectious disease and regulating, nucleic acid (DNA) vaccines. *Vaccine* 13, 1285-1288.
13. Directive 2001/82 EC
14. Directive 2004/28 EC
15. Directive 2001/18/EC (Annex II).
16. Voigt, H., C. Merant, D. Wienhold, A. Braun, E. Hutet, M.F. Le Potier, A. Saalmüller, e. Pfaff, M. Büttner (2007): Efficient priming against classical swine fever with a safe glycoprotein E2 expressing Orf virus recombinant (ORFV VrV-E2). *Vaccine* 25, 915-26.

PROCJENA KORISNIH I ŠTETNIH EFEKATA NADOLAZEĆIH GENETSKI MODIFICIRANIH ORGANIZAMA (GMO-a)

Dr. sc. Jelena Žafran Novak, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb

Ovo poglavlje ima svrhu dati uvid u razvoj biotehnologije i njene uporabe u kreiranju novih generacija genetski modificiranih organizama.

Na temelju intenzivnog rada kao člana grupe stručnjaka kojima ja dat mandat na sveukupno četiri godine, nastojat ću ovdje dati kratak prikazi razvoja GM tehnologije i novih organizama i njihovih primjena. Naime, radna grupa za procjenu rizika i menadžment (AD HOC TECHNICAL EXPERT GROUP ON RISK ASSESSMENT AND RISK MANAGEMENT UNDER THE CARTAGENA PROTOCOL ON BIOSAFETY) je osnovana na međunarodnoj Konferenciji članica potpisnica Konvencije o biološkoj raznolikosti i Kartagenskog protokola, a u svrhu izrade vodiča za procjenu rizika za pojedine specifične grupe živućih modificiranih organizama (living modified organisms – LMO), a vezane za osnovni protokol zadan u dodatku III Kartagenskog protokola o biološkoj sigurnosti. Republika Hrvatska je potpisnica Kartagenskog protokola (Zakon o prihvaćanju Kartagenskog protokola o biološkoj sigurnosti pod Konvencijom o biološkoj raznolikosti, N.N. – Međunarodni sporazumi 7/02; ratifikacija: 29. kolovoz 2002.; stupanje na snagu: 11. rujan 2003.).

Postupak za procjenu rizika prema Protokolu (“Roadmap”) daje pregled postupka procjene rizika LMO-a u odnosu na okoliš, a ima za cilj olakšati stručno i znanstveno provođenje procjene rizika uz objašnjenje svih njegovih koraka, a usvrhu otkrivanja potencijalni štetnih efekata na okoliš u cilju zaštite i održivog razvoja biološke raznolikosti, uzimajući u obzir i rizik po zdravlje ljudi. Vodič pruža informacije relevantne za procjenu rizika LMO-a koji pripadaju različitim taksonomskim grupama, kao i LMO-a koji imaju različite namjeravane uporabe. Premda je razvijen pretežno na osnovu velikog iskustva dobivenog uporabom LM usjeva i mnogim procjenama rizika vezanih na uzgoj i njihov utjecaj na okoliš, ovaj vodič se odnosi na sve tipove LMO-a koji se namjeravaju otpuštati u okoliš (uključivši i komercijalni uzgoj), uzimajući u obzir da dostupnost i potreba za informacijama koje bi podržale provođenje procjene rizika za različite uporabe i otpuštanje u okoliš, mogu varirati od slučaja do slučaja. Glavni problem u slučaju genetičkog inženjerstva na biljkama je do koje mjere će taj transgen moći “pobjeći” izvan okvira uzgoja i prouzročiti

negativne posljedice na divlje srodnike, procese u ekosustavu, kao i biološku raznolikost.

NOVA GENERACIJA GMO-a

Do danas su razvijeni brojni GMO-i koje smatramo novom generacijom GM biljaka i nalaze se u fazi odobravanja na tržištu.

Priroda genetskih modifikacija tih novih GM biljaka se razlikuje od postojeće generacije GM biljaka koje posjeduju otpornost na herbicide i/ili štetočine, zato što su genetički složenije i/ili vode do značajnih metaboličkih promjena. Tu su brojne GM biljke koje proizvode farmaceutske, nutritivne ili industrijske sastojke, a mogu imati i povećanu toleranciju na abiotički stres (kao suša i hladnoća). Kao rezultat, vjerojatnost da te genetičke modifikacije nove generacije dovedu do neželjenih utjecaja na genotip i/ili fenotip biljke su veće nego kod postojeće generacije GM biljaka, pa u izradi novih vodiča za provođenje postupka procjene rizika treba unijeti dodatne specifične korake.

U tu skupinu mogu se ubrojiti i već svepristuni GM usjevi poput tzv. naslaganih događaja („stacked events“), Kao primjer možemo navesti MON 863 x MON 810, koji predstavlja tradicionalno uzgojen kukuruz, dobiven križanjem dviju linija genetski modificirana (GM) kukuruza: MON 863 (YieldGard®1 Rootworm) i MON 810 (YieldGard® Corn Borer). Autorizacija – odobravanje naslaganih svojstava je različito zakonski regulirano u pojedinim državama. SAD, Kanada i Australija ne zahtijevaju novi postupak za naslagane događaje nastale tradicionalnim križanjem ako su pojedinačni produkti prethodno pozitivno prošli zakonske procedure i kao takvi genski produkti su odobreni i imaju povijest sigurne uporabe širom svijeta. Japan, pak, nanovo regulira takve proizvode samo ako je došlo do izmjene u metabolizmu domaćina ili ako je metabolit, koji inače nije prisutan u domaćinu, uveden putem genetske modifikacije. Suprotno tome, u EU i Argentini potrebna je nova autorizacija za sve naslagane događaje.

GM drveće je također sve prisutnije u mnogim zemljama svijeta. Modifikacije na drveću uključuju: promijenjena svojstva drva, ubrzane cikluse uzgoja, šume kao

farmaceutske tvornice, dendroremedijacija tj. melioracija degradiranih šuma, bolja otpornost na štetočine i bolesti, kao i obnova osjetljivih krajolika.

Važno je navesti i noviju primjenu određenih GM biljaka, kao što je proizvodnja biogoriva („biofuels“). Bioenergija omogućuje zamjenu goriva (fosilne rezerve nedostaju) na bazi petroleja sa živućim alternativama u svrhu smanjenja dugoročnog emitiranja ugljičnog dioksida i omogućenja ekonomski održivog pristupa okolišnoj politici. Različite su platforme koje se baziraju na žitaricama i biotehnologiji kako bi poboljšala održivu bioenergetiku (npr. upotreba lignocelulozne biomase za proizvodnju etanola kako bi se postigla veća neto energetska dobit uz niže proizvodne troškove). Poboljšani prinos od postojeće generacije GM žitarica (kukuruza i soje) može pomoći farmerima da zadovolje zahtjeve za većom proizvodnjom biogoriva, a da se istovremeno proizvode dovoljne količine hrane i hrane za životinje. Proizvodnja i razvoj takvih novih produkata se zasniva na bio-rafinerijskom konceptu održivog razvoja. Kao primjer može se spomenuti činjenica da je u 2007. godini od sveukupno uzgojenog kukuruza u SAD-u, 73 % kojeg predstavljaju GM varijeteti, upotrijebljeno za proizvodnju etanola.

GM farmabiljke („pharmaplants“) predstavljaju skupinu biljaka koje imaju ogroman potencijal za produkcijom rekombinantnih farmaceutskih proteina i pogodne su za brzu ekonomsku dobit. Iskustvo sa sličnom proizvodnjom predstavljaju humani inzulin i cjepivo protiv hepatitisa B. Materijali koji bi se koristili u ljudima, a potječu od biljaka, još nisu foramlno ušli u raspravu unutar EU (treba uzeti u obzir biosigurnost i zakonske zahtjeve).

Osim biljaka, vrlo je važno spomenuti i važnost primjene biotehnologije u kreiranju GM životinja (ribe, krave, svinje, konji). Do sada ne postoji niti jedna autorizacija, tj. niti jedna GM životinja nije još odobrena za komercijalni uzgoj (nema ih još na tržištu). Provode se vrlo intenzivna istraživanja, naročito u Kini i Argentini.

U toj skupni možemo navesti nekoliko primjera.

Što se tiče GM riba, jedina transgenična riba koja je komercijalno dostupna nije kreirana za prehranu. To je tzv. "Zebrafish" koja svijetli kad je se osvijetli i dostupna je za vlasnike akvarija pod popularnim imenom - GloFish.

Transgenične ribe su vrlo brojne, a razvijene su u mnogim laboratorijima širom svijeta kao modeli za proučavanje i razumijevanje mehanizama rasta i razvoja, otpornosti na razne bolesti, kao i istaživanja bolesti ljudi. GM ribe mogu imati bolju otpornost na neke bolesti, mogu brže rasti i biti kvalitetnije kao hrana; neke modifikacije mogu povećati ekonomsku dobit u farmama riba, a brže rastuće ribe omogućuju više ribe godišnje uz manju cijenu.

Procjena rizika od nenamjernog otpuštanja u okoliš je zahtjevnija od GM biljaka. Naime, GM riba, jednom ako pobjegne u otvoreni ocean, očigledno se teže kontrolira i može se proširiti puno brže nego GM biljke na tlu. Neka ispitivanja ukazuju na činjenicu da bijeg ne-transgenične udomaćene ribe može prouzročiti podjednaku štetu kao i bijeg GM ribe. Naime, udomaćena riba je selektirana za rast u zatočeništvu gdje je obilje hrane i nema predatora, pa stoga gubi sposobnost da sama nađe hranu i izbjegne predatore. Potencijalni rizik se očituje u tome što u slučaju križanja te ribe s divljim ribama, njihovi geni mogu „zagaditi“ divlji pul gena i prouzročiti opći pad kondicije čitave populacije (Lynch & O'Hely, 2001); u najgorem scenariju prirodne populacije postanu ovisne o komercijalnom otpuštanju (Naylor et al, 2001).

Najbliže autorizaciji za komercijalni uzgoj je GM losos. Losos je vrlo kvalitetna namirnica zbog visokog sadržaja omega-3 masnih kiselina, koje pozitivno djeluju na smanjenje koronarnih bolesti i bolesti srca i neophodne su za fetalni razvoj mozga; također je i bogat izvor proteina. Mnogi u SAD-u su mišljenja da GM losos može biti od velike koristi za zdravlje pučanstva, ako se njime zamijene manje zdravi izvori animalnih proteina. GM losos je modificiran tako da posjeduje 2 strane DNA sekvence ugrađene u genom: 1 – kodira hormon rasta (porijeklom iz tzv. Chinook lososa); 2 – tzv. antifriz gen iz ribe koja živi u sjeverozapadom Atlantskom oceanu; u kombinaciji s hormonom rasta, po principu "on-switch" dovodi do produkcije hormona rasta i u hladno vrijeme što inače nije moguće. Važno je naglasiti da GM losos ne naraste veći od običnog lososa. Oni samo dostignu svoju konačnu veličinu u 16-18 mjeseci umjesto u 3 godine života, što smanjuje troškove uzgoja i povećava

konačnu financijsku dobit. Ako se odobri, GM losos će biti prva transgenična životinja dostupna za konzumaciju ljudi u SAD-u.

Među životinjama od značaja za primjenu biotehnologije, vrlo interesantna skupna su insekti. GM komarci bi mogli pružiti vrlo korisno rješenje za rješavanje problema s malarijom. Malarija je teška infektivna bolest koja se javlja u tropskim i subtropskim područjima, te od koje svake godine oboli između 300 i 400 milijuna, a svake godine umre između 1 i 3 milijuna ljudi. Malariju uzrokuje minijaturni parazit po imenu plazmodij, a njega ugrizom, odnosno preko krvi, prenose komarci. Nakon određenog vremena eksperimenti su pokazali da genetski modificirani komarci imaju daleko više šansi za preživljavanje, a nakon devet generacija, 70 % svih kukaca uključenih u pokus je pripadalo genetski modificiranom soju. Istraživači se nadaju da će genetski modificirani komarci jednostavno zamijeniti normalne komarce te će tako nestati glavni prenositelji te teške i smrtonosne bolesti.

Trenutna situacija odobrenih GMO-a uglavnom predstavljaju GM biljke: kukuruz, soja, pamuk, uljana repica, šećerna repa, krumpir, karanfil, riža, rajčica, pšenica, bundeva, duhan, cikorija, lan, dinja, šljiva i papaja.

Sve je više zahtjeva za odobravanjem novih GMO-a na tržištu EU-a ili onih kojima je potrebna obnova autorizacije.

Na tržištu EU nema za sada odobrenog voća niti povrća koje je namijenjeno konzumaciji. Primjerice, rajčica se komercijalno ne uzgaja već dugo, pa se ne može naći ni na tržištu SAD-a, papaja se uzgaja uglavnom na Havajima (rezistencija na virus), jabuke su još daleko od potencijalnog odobrenja, grožđe je podložno raznim patogenima, pa se očekuje razvoj rezistentnih varijeteta u budućnosti uporabom biotehnologije, šljive se u fazi pokusnoag uzgoja, a banane koje se reproduciraju samokloniranjem bi mogle riješiti problem podložnosti raznim bolestima.

Uporaba biotehnologije znanstvenicima pruža mogućnost da interveniraju u nasljednom procesu biljaka, životinja i mikroba, kako bi se razvilo široko područje primjene kao što je proizvodnja komercijalnih proizvoda i lijekova. Pomoću GMO tehnologije moguće je preoblikovati budućnost čovječanstva revolucijom poljokemijske i biofarmaceutske industrije, te medicinske dijagnostike i liječenja.