

Popović M., Ivanković M., Bogdan S., Pilate G. 2013. Dvadeset godina genetskih modifikacija...
Radovi (Hrvat. šumar. inst.) 45 (2): 195–210

Pregledni članak
Review article

Prispjelo - Received: 16. 06. 2013.
Prihvaćeno - Accepted: 11. 10. 2013.

Maja Popović¹✉, Mladen Ivanković¹,
Saša Bogdan², Gilles Pilate³

DVADESET GODINA GENETSKIH MODIFIKACIJA U ŠUMARSTVU

TWENTY YEARS OF GENETIC MODIFICATIONS IN FORESTRY

SAŽETAK

Genetsko modificiranje, genetsko transformiranje ili genetski inženjering skup je tehnika koje pružaju mogućnost dodavanja poželjnih obilježja u superiorne genotipove biljaka, putem prijenosa gena između različitih nesrodnih vrsta, rodova, pa čak i carstava, što se inače ne događa u prirodi. S druge strane, klasičnim se oplemenjivanjem putem selekcije i križanja između jedinki koje pripadaju istoj ili srodnim vrstama također izmjenjuju i ističu određena svojstva radi poboljšanja vrsta prema ljudskim mjerilima, ali je takav prijenos gena moguć i u prirodi. S genetskim modificiranjem na drvenastim biljkama započelo se 1987. godine na topolama (Fillatti i dr. 1987). To je prva studija u kojoj je uspješno regenerirano genetski modificirano tkivo šumske vrste drveća. Svojstva koja su najčešće predmet genetske modifikacije kod biljaka jesu sastav lignina, tolerancija na herbicide, otpornost na bolesti i štetnike te kontrola cvatnje. Osim samog postupka genetskih transformacija, terenski pokusi genetski modificiranoga šumskog drveća predstavljaju vrlo važan segment u cjelokupnom lancu istraživanja. Testiranje izmijenjenih svojstava u prirodnim okolišnim uvjetima pridonosi boljem shvaćanju interakcije okolišnih utjecaja i transformiranih svojstava. Iako se procjenjuje kako postoji preko 600 terenskih nasada s genetski modificiranim drvenastim vrstama širom svijeta, u šumarstvu gotovo nema komercijalne uporabe takvih plantaža. U hrvatskom šumarstvu ne postoje naznake takva korištenja biotehnologije. Međutim, praćenje svjetskih trendova važno je za implementaciju inozemnih iskustava u zakonsku regulativu te za stjecanje dovoljnih količina znanja za provedbe mjera sigurnosti i opreza prilikom takvih istraživanja.

Ključne riječi: genetsko modificiranje, genetska transformacija, genetski inženjering, biotehnologija, oplemenjivanje, modificirajuća svojstva, terenski nasadi

¹ Hrvatski šumarski institut, Cvjetno naselje 41, HR-10450 Jastrebarsko, Hrvatska.

² Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, Svetošimunska 25, HR-10000 Zagreb, Hrvatska.

³ National Institute for Agronomical Research (INRA), Orleans, France.

✉ Dopisni autor/Corresponding author: majap@sumins.hr

UVOD

INTRODUCTION

Klasičnim oplemenjivanjem kontrolirano se provode procesi koji već postoje i događaju se u prirodi. Izmjenom i isticanjem određenih svojstava žele se poboljšati karakteristike vrsta te se provodi prijenos gena koji su u prirodi sastavni dio genetske informacije vrste ili njezinih srodnika. Klasično oplemenjivanje temelji se na poznavanju i korištenju principa genetike radi povećanja frekvencije pozitivnih alela u sljedećim generacijama i time dobivanja poboljšanih (oplemenjenih) populacija neke vrste. Međutim, prilikom takva prijenosa gena uvijek postoji opasnost od gubljenja nekih poželjnih karakteristika uslijed rekombinacije i slučajne segregacije gena. Tehnikama genetskog modificiranja, pak, omogućen je prijenos gena između različitih vrsta, rodova, pa čak i carstava, koji se inače ne događa u prirodi, i to direktno u superiorne genotipove, a bez gubljenja drugih kvalitetnih gena kao nepoželjne popratne pojave (Tamarin 2007, White i dr. 2007).

Biotehnologija kao znanost obuhvaća nekoliko većih kategorija kao što su karakterizacija genetske raznolikosti, genomika, genetsko mapiranje i selekcija pomoću markera, vegetativna propagacija i mikropropagacija te genetsko modificiranje, čijom se primjenom stvaraju ili modificiraju organizmi, stanice, njihovi dijelovi i derivati te se dobivaju proizvodi koji služe za dobrobit čovječanstva (Convention on Biological Diversity, 1992.). Unutar toga genetsko modificiranje (GM) definira se kao korištenje rekombinirane DNK i aseksualni prijenos gena radi promjene strukture ili ekspresije specifičnih gena (FAO, 2004.). Većina biotehnoloških aktivnosti u šumarstvu fokusirala se na samo šest rodova šumskog drveća (*Populus*, *Eucalyptus*, *Pinus*, *Picea*, *Quercus*, *Acacia*) (FAO, 2004.).

Prvi objavljeni rad o genetskim modifikacijama na drvenastim biljkama bio je 1987. godine rad o genetskim modifikacijama na topolama (Fillatti i dr. 1987). U toj je studiji prvi put uspješno regenerirano genetski transformirano tkivo šumske vrste drveća. Transferiran je, odnosno umetnut, gen povećane tolerancije na herbicide, izoliran iz duhana. Otpornost na herbicide važno je agronomsko svojstvo, koje je svoju učinkovitost pokazalo i kod šumskih vrsta drveća. Tijekom prvih petnaest godina istraživanja na području genetskih modifikacija u 16 zemalja širom svijeta podignuto je oko 210 terenskih nasada s genetski modificiranim drvenastim vrstama. Većina takvih istraživanja zabilježena je u Sjedinjenim Američkim Državama, a glavina je terenskih pokusa vezana za četiri roda: *Populus* (51 %), *Pinus* (23 %), *Liquidambar* (11 %) te *Eucalyptus* (7 %) (FAO, 2004.). Prema najnovijim procjenama u svijetu postoji preko 600 takvih terenskih nasada (Strauss, IUFRO Conference 2011).

Od prve uspješne transformacije pa sve do današnjih dana pokušava se pokazati 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 i biogorivom, vratiti ugrožene vrste te sačuvati i zaštititi šume od masovnih napada štetnika, bolesti i nadolazećih klimatskih promjena (Anon. 2010).

U ovom su radu prikazane glavne metode i tehnike genetskih modifikacija šumskog drveća, glavna modificirajuća svojstva te pripadajući ciljani geni. Daje se

pregled najvažnijih dostignuća u zadnjih dvadeset godina rada s genetski modificiranim vrstama drveća.

Svi podaci prikupljeni su iz objavljenih znanstvenih članaka, knjiga, objava, studija, kao i izvješća različitih agencija i organizacija te su dostupni na internetu. Pretraživanje je provedeno na različitim internetskim pretraživačima, u internetskim bazama internacionalnih organizacija, nacionalnim zavodima i institucijama, korporacijama te u znanstvenim bazama podataka, a u sklopu kratkoročne znanstvene misije COST akcije FP 0905 žBiosigurnost transgeničnih vrsta drveća?

S obzirom na dinamičnost ovoga znanstvenog područja i njegovu sve rašireniju primjenu kod šumskog drveća, cilj je rada podignuti razinu informiranosti domaće šumarske struke o principima genetske modifikacije, primjeni u šumarstvu te o nekim prednostima i slabostima genetski modificiranoga šumskog drveća.

GLAVNE FAZE GENETSKOG MODIFICIRANJA

MAIN STAGES OF GENETIC MODIFICATION

Genetsko modificiranje u šumarstvu temelji se na tri osnovna koraka: prijenos modificiranoga gena, regeneracija modificirane biljke te stabilna ekspresija unesenih gena (terenski pokusi). Svaka faza izrazito je važna u cjelokupnom lancu genetskog modificiranja, a sve radi dobivanja kvalitetnog i sigurnog produkta.

METODE I TEHNIKE PRIJENOSA GENA

METHODS AND TECHNIQUES OF GENE TRANSFERE

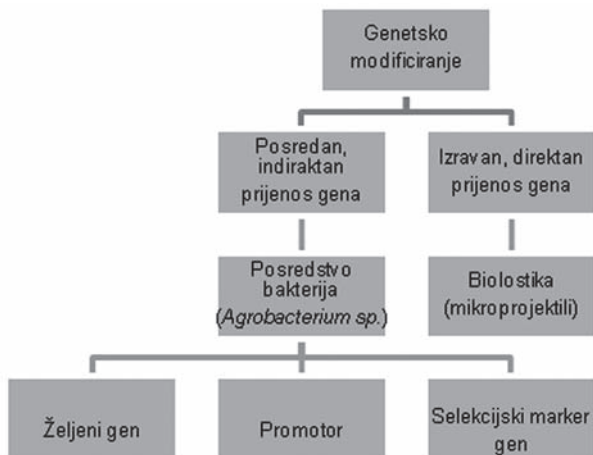
Metode prijenosa gena dijele se u dvije glavne kategorije (Slika 1.): 1) posredan, indirektan prijenos gena i 2) izravan, direktan prijenos gena.

Posredan (indirektan) prijenos gena uključuje posredstvo bakterija *Agrobacterium tumefaciens* i *Agrobacterium rhizogenes* koje unose željeni gen u biljnu stanicu. Takav se prijenos gena vrlo uspješno koristi kod vrsta roda *Populus* sp. zbog njihove visoke transformacijske učinkovitosti (Hawkins i dr. 2003, Meilan i dr. 2002a, Li 2006). Prvobitno je ovaj vid transformacije bio neuspješan kod četinjača, međutim intenzivnim istraživanjima povećala se učinkovitost prijenosa gena kod četinjača posredovana agrobakterijama (Charity i dr. 2005 Levée i dr. 1997). Izravan, direktan prijenos gena ne uključuje posredstvo nekog drugog organizma, već se najčešće provodi uz pomoć uređaja nazvanoga „genetski pištolj“ (eng. *gene gun*), kojim se stanice ili tkivo biljaka bombardiraju sitnim česticama plemenitih metala s vezanim željenim genima – mikroprojektilima (White i dr. 2007). Ova metoda naziva se biolistika. U daljnjem tekstu bit će detaljno prikazana tehnika posrednog prijenosa gena agrobakterijama, koji se najčešće koristi prilikom genetskog modificiranja u šumarstvu.

Agrobacterium tumefaciens je gram-negativna bakterija koja od prirode živi u tlu te uzrokuje tumorske bolesti kod velikog broja kritosjemenjača. Bakterija ima prirodnu sposobnost prijenosa i ugradnje određenog dijela svojega genoma u stani-

cu biljke. *Ti* plazmid (engl. *tumor-inducing plasmid*) koji se nalazi u bakteriji sadržava gene tumorigeneze, koji kontroliraju sintezu biljnih hormona – regulatora rasta. Oni izazivaju nekontroliranu diobu stanica domaćina, uzrokujući nastanak nakupine identičnih biljnih stanica, odnosno tumor. Dio je tog plazmida transferna DNK regija (engl. *T-DNA*), koju bakterija s genima za tumorigenezu prenosi i ugrađuje u biljni genom (White i dr. 2007). Ovaj način prijenosa gena iz prirode iskorišten je u genetskom inženjerstvu.

Tri su glavne komponente genetskog modificiranja, odnosno transformacije (Slika 1.): 1) željeni gen koji se transformira, npr. gen *Pt4CL* kodira sintezu lignina (Hu i dr. 1998); 2) promotor koji regulira ekspresiju ciljanoga gena, npr. CaMV 35S promotor iz mozaičnog virusa cvjetače (White i dr. 2007.); te 3) selekcijski biljeg koji olakšava izolaciju transformiranih biljnih stanica, npr. kanamicin gen za otpornost na antibiotike (Fillatti i dr. 1987, White i dr. 2007). Prije postupka umjetne infekcije izolira se bakterijski *Ti* plazmid. Zatim se izrežu svi geni transferne DNK koja je zadužena za transfer, odnosno prijenos u genom biljne stanice, a ostave se samo rubne sekvencije dugačke 25 nukleotidnih parova baza. Na kraju se na mjesto gdje su izrezani geni transferne DNK, unutar granica rubnih sekvencija, umeću geni koji se žele prenijeti u stanicu biljke (Zupan i Zambryski 1995). Prirodni proces zaraze tako je iskorišten u svrhu genetskog modificiranja.



Slika 1. Glavne metode genetskog modificiranja i sastavnice posrednog prijenosa gena
Figure 1. Genetic modification methods and components of indirect gene transfer

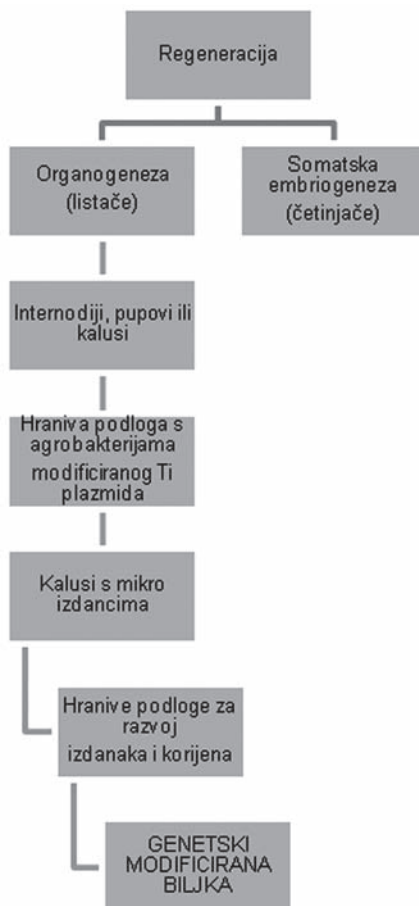
REGENERACIJA REGENERATION

Postoje dvije osnovne metode regeneracije transformiranog tkiva kod šumskog drveća. To su organogeneza i somatska embriogeneza. Regeneracijom se stvaraju potpune biljke iz transformiranih staničja. Oba pristupa koriste se pri transforma-

ciji i regeneraciji biljaka. Kod četinjača somatska embriogeneza pokazala se kao učinkovitija metoda (White i dr. 2007). Stanice biljnog tkiva četinjača (iz pupova ili iglica) teže se regeneriraju metodom organogeneze, iako je razvojem tehnologije regeneracija organogenezom iz zigotskih embrija postala moguća i kod roda *Pinus* sp. (Tang i Quyang 1999).

Organogeneza je razvoj biljaka iz pupova, internodija ili kalusa. Određene vrste biljaka s jakom reproduksijskom sposobnosti poput rodova *Populus* i *Eucalyptus* uzimaju se kao modelne vrste prilikom transformacije i regeneracije organogenezom (Tsai i dr. 1994, Ho i dr. 1997). Prilikom transformacije koriste se čiste linije biljaka, nastale samooplodnjom iste jedinke kroz nekoliko generacija, koje su gotovo istog izgleda. Biljke se uzgajaju *in vitro*, kultiviranjem tkiva izvan živućeg organizma od kojeg potječu. Kod procesa transformacije najprije se izrezuju internodiji *in vitro* uzgojenih biljaka, bez pupova i listova. Kratke stabljičice ozljeđuju se s jedne strane, kako bi se stvorio put za prijenos modificiranoga gena iz bakterije. Internodiji se stavljaju na pripremljenu podlogu s bakterijom *Agrobacterium tumefaciens*. Agrobakterija sadržava već transformirani gen u *Ti* plazmidu koji želimo prenijeti u biljku te selekcijski kanamicin gen za otpornost na antibiotike (Tsai i dr. 1994). Kod modelnih vrsta roda *Populus* najčešći preneseni geni jesu oni koji uzrokuju promjenu sadržaja lignina u stanicama ili povećavaju otpornosti na razne bolesti ili štetnike.

Nakon inkubacijskog perioda internodija se ispiru sterilnom vodom, suše se na filter-papiru te stavljaju na hranjivu podlogu kako bi biljke kalusirale. Hranjiva podloga sadržava i antibiotik koji se koristi za selekciju transformiranih stanica. Transformirane stanice uz gen za modifikaciju određenog svojstva sadržavaju i gen za otpornost na antibiotike, dok netransformirane stanice taj gen ne posjeduju. Antibiotik uništava netransformirane stanice koje ne sadržavaju gen otpornosti na antibiotike. Razvijeni kalus odstranjuje se od internodija, reže se na manje komadiće te ponovno stavlja na hranjivu podlogu kako bi se razvila kultura tkiva. Kada su pojedinačni kalusi promjera ≥ 3 mm, stavljaju se na podlogu za razvoj izdanaka.



Slika 2. Regeneracija biljaka
Figure 2. Regeneration of plants

Zatim se izdanci dužine 2 – 3 cm odvajaju i stavljaju na podlogu za razvoj korijena. Tako razvijene modificirane (transgenične) biljke presađuju se u tlo te nastavljaju rasti u stakleniku (Fillatti i dr. 1987, Tsai 1994).

GLAVNA MODIFICIRANA SVOJSTVA I PRIPADAJUĆI CILJANI GENI

MAIN TARGET TRAITS AND TARGET GENES

Krajnji cilj genetskog modificiranja u šumarstvu jest razvoj drveća kod kojih će ekspresija određenih fenotipskih svojstava biti potpuno umanjena ili pak superior-nija od izvornih vrsta. Zbog toga se provode istraživanja i testiranja izmijenjenih, modificiranih svojstava. Glavna ciljana modificirajuća fenotipska svojstva kod većine biljaka jesu sadržaj lignina, tolerancija na herbicide, otpornost na bolesti i štetnike te kontrola cvatnje. Topole se smatraju modelnim vrstama u šumarstvu za genetsko modificiranje i testiranje, te je najviše istraživanja na toj vrsti provedeno za svojstvo izmijenjenog sadržaja lignina. Također, mnoge su genetske modifikacije i terenska testiranja rađena na kontroli cvatnje i plodonošenja, povećanju otpornosti na insekte i toleranciji na herbicide te brzini rasta kod topola.

Lignin *Lignin*

Lignin je složen kemijski spoj staničnih stijenki drveta koji biljkama daje čvrstoću, no ujedno je i glavna prepreka efikasnoj, ekonomski isplativoj i okolišno prihvatljivoj proizvodnji papira. Prilikom industrijskog procesa proizvodnje papira lignin je potrebno odvojiti od celuloze i iz drveta. Kako je lignin teško topivi spoj, to povećava troškove, ali i negativno utječe na okoliš. Tako je jedan od ciljeva genetskih modifikacija šumskog drveća smanjenje sadržaja lignina u staničnim stijenkama drveta. Međutim, kako je lignin važan za normalno funkcioniranje biljaka, potrebno je naći odgovarajući odnos između smanjenog sadržaja lignina u stanicama, radi ekonomičnosti papirne industrije, i neometanog razvoja i rasta biljaka.

Prisutnost lignina u staničnim stijenkama također je glavni ograničavajući čimbenik prilikom prerade biomase, jer ograničava dostupnost polisaharida u celuloznim vlaknima. Potrebno je, dakle, ukloniti lignin iz biomase, čija je prerada skup i dugotrajan proces. Zato se genetskim modifikacijama smanjenja sadržaja lignina u staničnim stijenkama mijenja sastav i sadržaj lignina, kako bi postao osjetljiviji na kemijske degradacije. Smanjenjem sadržaja lignina u biljkama poboljšava se potencijal saharifikacije te se smanjuje utrošak energije i kemikalija u procesima predtretmana biomase za stvaranje biogoriva (Van Acker i dr. 2011). Provedena su brojna istraživanja genetski modificiranih biljaka sa smanjenim sadržajem lignina. Najvažnija su ona istraživanja koja osim laboratorijskih ispitivanja i modificiranja uključuju i ispitivanja u terenskim nasadima, gdje se modificirane biljke testiraju u realnim okolišnim uvjetima. Kao i kod klasičnog oplemenjivanja i testiranja potomstva, genetski modificirane biljke moraju pokazati dobra obilježja bez obzira na stanište. Dakle, obilježja od interesa moraju se pokazati na različitim terenima.

Prvi terenski nasadi i ispitivanja genetski modificiranih topola kao modelne vrste šumskog drveća, s promijenjenim sadržajem lignina, podignuti su na dva lokaliteta u Francuskoj i Engleskoj (Pillate i dr. 2002). Genetskim modifikacijama smanjena je ekspresija dvaju enzima koji sudjeluju u sintezi lignina, *COMT* kafeinska/hidroferulična kiselina O-metiltransferaza (engl. *caffeic acid/5hydroxyferulic acid O-methyltransferase*) (Van Doorselaere i dr. 1995) i *CAD* cinamil-alkoholna dehidrogenaza (engl. *cinnamyl alcohol dehydrogenase*) (Baucher i dr. 1996). Prvim terenskim istraživanjima praćena su kvantitativna svojstva modificiranih biljaka i sadržaj lignina u pojedinim genetski modificiranim linijama. Također su biljke podvrgnute procesima razgradnje lignina koji se koriste prilikom prerade drveta kod proizvodnje papira. 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 u papirnoj industriji (Pillate i dr. 2002).

Topole sadržavaju gene nužne za održavanje kontinuiranog toka metabolita koji kontroliraju sintezu enzima *4CL* 4-kumarat koenzim A ligaza (engl. *4-coumarate:coenzymeA ligase*), i to dva različita gena, čija odvojena funkcija regulira formiranje različitih biljnih fenilpropanoida poput lignina i flavonoida, potrebnih za normalno fiziološko funkcioniranje biljaka. Gen *Pt4CL1* uključen je u sintezu lignina u ksilemskom staničju, dok gen *Pt4CL2* kontrolira biosintezu ostalih fenola, poput flavonoida koji se nalaze u epidermalnom sloju stabljike i lišća (Hu i dr. 1998). Najnovija istraživanja, u kojima se genetskim modificiranjem smanjuje razina lignina, modificiraju skupine gena *4CL* te omogućuju stvaranje takvih linija koje će potaknuti brz i ekonomičan razvoj nasada za biogoriva. Smanjenjem sadržaja lignina želi se olakšati njegovu ekstrakciju i smanjiti troškove proizvodnje biogoriva.

Istraživanja Voelker i dr. (2010) otkrivaju kako smanjenje ekspresije *4CL* skupine gena te ispitivanje razvoja topola u pokusnim nasadima nije imalo povećanu stopu rasta, već se kod određenih linija pokazala fiziološka ranjivost kada je sadržaj lignina bio znatno smanjen. Također prilikom modifikacija sa znatno smanjenim sadržajem lignina došlo je do smanjenja biomase, niskog rasta i grmastog oblika biljaka u usporedbi s kontrolnim nemodificiranim biljkama. Za linije sa znatno smanjenim sadržajem lignina karakteristično je također smeđe obojenje debla. Voelker i dr. (2011) upućuju kako smanjenje sadržaja lignina od 20 do 40 % znatno utječe na rast, razvoj, osjetljivost i mortalitet biljaka. Linije s 40-postotnim smanjenjem sadržaja lignina imale su znatno smanjenu učinkovitost rasta, deformiranost i smeđe obojenje stabljike s nepravilnim provodnim tracima za transport vode. Ovi rezultati naglašavaju potrebu odgovarajuće lignifikacije kao mehaničke potpore stabljikama biljaka, nesmetano funkcioniranje provodnih trakova te rast i preživljavanje biljaka.

Bitno je naglasiti kako je potrebno pronaći ravnotežu između intenziteta genetskih modifikacija te nesmetanog rasta, razvoja i obrambenih mehanizama biljaka. Zato su potrebni i terenski pokusi s genetski modificiranim vrstama drveća kako bi u konačnici doveli do smanjenja ekološki neprihvatljivih i ekonomski neopravdanih procesa prerade biomase.

Tolerancija na herbicide

Herbicide Tolerance

Tolerancija na herbicide važno je agronomsko svojstvo biljaka te je također još jedno od važnih modifikacijskih svojstava na drvenastim vrstama. U prirodi gen za povećanu toleranciju na herbicide sadržan je u bakterijama i transferira se u biljke. Tolerancija na herbicide može dovesti do smanjenja troškova prilikom aplikacije herbicida, smanjenja njegova štetnog utjecaja na okoliš te do poboljšanja uroda i prirasta. Ovakva vrsta modifikacije važna je prilikom uzgoja mladih biljaka i osnivanja plantaža, kada korovna vegetacija predstavlja problem. Izoliranje i prijenos gena za toleranciju na herbicide, omogućuje preživljavanje, neometan rast i razvoj modificiranih biljaka prilikom tretiranja korovne vegetacije.

Prvi pokušaj unošenja gena za povećanje tolerancije na herbicide proveden je 1987. godine prilikom prvoga uspješnog transfera gena bakterijama *Agrobacterium sp.* (Fillatti i dr. 1987). Herbicid glifosat izaziva inhibiciju enzima enol-piruvil-šikimat-fosfatne sintaze (engl. *5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate (EPSP) synthase*) kod nemodificiranih biljaka, odnosno sprečava sintezu aromatičnih aminokiselina nužnih za proizvodnju staničnih proteina. Bakterije *Salmonella typhimurium* sadržavaju *aroA* gen manje osjetljiv na inhibitorsko djelovanje herbicida glifosata (Comai i dr. 1985), stoga se gen *aroA* koristi prilikom genetskog modificiranja za povećanje tolerancije biljaka na inhibitorna djelovanja herbicida.

Prvo terensko testiranje topola s modificiranim genom za povećanje tolerancije na herbicide izvedeno je 1997. godine u Sjedinjenim Američkim Državama u saveznoj državi Oregon. Testirana su dva gena *CP4 EPSPS* (alternativni oblik enol-piruvil-šikimat-fosfatne sintaze izoliran iz soja *CP4* agrobakteija) i *GOX* (glifosat oksidoreduktaza) koji povećavaju toleranciju na herbicide. Dodatno je odvojeno još i 12 klonskih linija kojima je samo unesen *CP4* gen. Nakon tretiranja s povećanim koncentracijama herbicida dvije trećine svih linija nisu imale vidljivih oštećenja ili su imale samo manje kloroze. Linije u kojima je bio unesen samo *CP4* gen imale su znatno bolji rast od linija koje sadržavaju oba introducirana gena te manje štete nakon tretiranja herbicidom (Meilan i dr. 2002b). Autori navode kako je ovim istraživanjem potvrđena mogućnost proizvodnje linija biljaka s tolerancijom na komercijalno korištene herbicide te neznatnim oštećenjima. Genetski modificirana svojstva ponekad mogu pokazati nestabilnost što bi ugrozilo sigurnost primjene takvih biljaka. Zato je provedeno istraživanje u kojem je tijekom 8 godina praćena stabilnost ekspresije otpornosti na herbicide. Tijekom istraživanja razina tolerancije na herbicide ostala je stabilna, što prema autorima pokazuje veliku pouzdanost za širu komercijalnu upotrebu (Li i dr. 2008).

Otpornost na štetnike

Pest Resistance

Bacillus thuringiensis je gram-pozitivna, sporogena bakterija čija je karakteristika stvaranje kristalnih proteina (*Cry*) i δ -endotoksina koji djeluju kao otrov na ličinke insekata. Istraživanja prirodnog insekticida kristalnih proteina (*Cry*) bakterija *Bacillus thuringiensis* pokazuju kako je svaki kristalni protein vrlo specifičan za

određene vrste insekata, te su skupine *Cry* gena svrstane u grupe prema njihovom djelovanju na redove leptira, dvokrilaca i kornjaša (Höfte i Whiteley 1989).

Pojavom i uporabom genetskih modifikacija, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toksični gen osigurava transformiranim biljkama otpornost na insekte. Istraživanje modificiranih topola provedeno je početkom devedesetih godina prošlog stoljeća. Transformacija je provedena posredstvom agrobakterija za prijenos triju različitih *Bt Cry* gena u biljni materijal mladog lišća topole. Nakon procesa transformacije i regeneracije modificirane biljke razmnožene su reznicama te su osnovana dva terenska nasada u Kini; jedan u Institutu za šumarstvo (Peking) te drugi u okrugu Manas (Xinjiang regija). Nakon dvije godine odabrano je 17 linija na temelju svojstava otpornosti na insekte i ujedno dobrih šumskouzgojnih karakteristika te su na njima provedene daljnje analize. Larve vrsta *Apochemia cineraius* i *Lymantria dispar* hranjene su mladim lišćem modificiranih topola te je toksičnost izražena preko mortaliteta larvi nakon 18 dana. Svi transformirani klonovi pokazali su određeni stupanj insekticidnog djelovanja za obje vrste. Osim učinka mortaliteta, modificirane biljke u preživjelim larvama izazivaju i smanjeni rast i razvoj. Iako je mortalitet larvi od 100 % zabilježen samo u nekoliko slučajeva, broj preživjelih larvi bio je kod modificiranih klonova daleko niži nego kod kontrolnih klonova. Na temelju ovog istraživanja i preliminarnih rezultata odabrana su tri modificirana klona najboljih šumskouzgojnih i insekticidnih svojstava koji se dalje koriste za masovno testiranje. Oko 20 000 modificiranih klonova topola u proljeće 1995. godine sađeno je u šest kineskih provenijencija za daljnju komercijalnu proizvodnju (Wang i dr. 1996). U okviru genetskih modifikacija šumskog drveća ovo je jedino istraživanje kod kojeg su modificirane biljke komercijalizirane.

Osim na topolama, modifikacije za otpornost na štetnike provedene su i na vrstama roda *Eucalyptus*. Modifikacijama uz posredstvo agrobakterija unesen je također *Cry* gen koji povećava otpornost na insekte te uzrokuje mortalitet larvi insekata. Uočena je vrlo visoka toksičnost modificiranih linija eukaliptusa na larve *Chrysophtharta* sp., iznimno važnog štetnika u plantažnom gospodarenju eukalip-tusima u Australiji (Harcourt i dr. 2000).

Otpornost na bolesti

Disease Resistance

Tijekom zadnjih deset godina mnogo istraživanja provedeno je s modifikacijama za otpornosti na gljivične bolesti breze (Pasonen i dr. 2004, Pasonen i dr. 2008, Vauramo i dr. 2006) te vrsta topola i njihovih hibrida (Mohamed i dr. 2001).

Enzim hitinaza hidrolizira hitin polimer u N-acetil-glukozamin. Hitinaza, kao sastavni dio tkiva različitih biljaka, ima važnu ulogu u obrambenom mehanizmu biljaka direktno razlažući strukturu hitina, a samim time i gljivičnih patogena (Punja i Zhang 1993, Sharma i dr. 2011).

Najviše terenskih pokusa koji se baziraju na istraživanju otpornosti gljivičnih bolesti breza (*Betula pendula* Roth) osnovano je u Finskoj. Za testiranje otpornosti na gljivične bolesti osnovan je pokus s 15 modificiranih linija breze koje nose gen

šećerne repe, *hitinaza IV*. Otpornost modificiranih jedinki ispitivana je za dva gljivična patogena (*Pyrenopeziza betulicola* (Fulckel)) i (*Melampsorium betulinum* (Kleb.)), koji uzrokuju pjegastu bolest lista i hrđu lista breze. Simptomi koje uzrokuju navedeni patogeni praćeni su na terenu tijekom tri godine. Ekspresija unesenoga stranog gena provedena je u dva navrata analizom Northern blot (izoliranjem i detekcijom mRNK), kako bi se uočila razina akumulacije unesenoga gena. Sve analizirane linije pokazale su određeni stupanj prisutnosti stranoga gena prilikom obiju analiza, isto tako upućujući na stabilnost ekspresije modificiranoga gena tijekom cjelokupnog trajanja ispitivanja. Linije su grupirane u tri skupine s obzirom na razinu akumulacije gena hitinaze; niskom, srednjom i visokom razinom ekspresije. Grupa linija sa srednjom razinom akumulacije gena *hitinaze IV*, pokazala je najbolji učinak u smislu otpornosti na zarazu patogenom gljivom *Melampsorium betulinum* (Pasonen i dr. 2004).

Kontrola cvatnje i spolna sterilnost

Flowerind Control and Sterility

Šumske vrste drveća imaju dugačak životni ciklus i reproduktivnu zrelost uglavnom dosežu u kasnijoj dobi, a periodicitet cvatnje znatno im varira. Prilikom genetskih modificiranja kontrole cvatnje upotrebljavaju se dva pristupa: poticanje rane cvatnje i poticanje sterilnosti. Cilj su postizanja rane cvatnje što kraći i što brži oplemenjivačko-uzgojni ciklusi, a sterilnost je bitna za postizanje biološke sigurnosti, odnosno sprječavanje širenja modificiranih gena u prirodu (White i dr. 2007). Zbog svoje lake regeneracije i transformacije te razdvojenosti spolova (dvodomnost) topole su modelna vrsta i za ovo svojstvo.

Gen za regulaciju formiranja cvjetova *LEAFY (LFY)* vrste *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. uzrokuje transformaciju meristemskog staničja u reproduktivno (Shultz i Haughn 1991). Unesen u genom topola uzrokuje prijevremenu cvatnju. Lateralni i terminalni cvjetovi formirani su na mladicama nakon samo pet mjeseci rasta u substratu (Weigel i Nilsson 1995). Homologni gen regulacije cvatnje roda *Populus* naziva se *PTLF*, međutim njegova pojačana ekspresija u genomu topola ne pokazuje isti učinak na cvatnju kao *LFY* gen, tako da pojačana ekspresija *PTLF* gena uzrokuje smanjeni rast modificiranih linija u odnosu na kontrolne biljke. Uočena je i znatna negativna korelacija između stupnjeva ekspresije *PTLF* gena i indeksa volumena biljaka. Također je *PTLF* gen nakon unosa detektiran i u postranome meristemskom staničju, mladom lišću i granama, dokazujući utjecaj unesenoga modificiranog gena izvan ciljane regije. Dakle, osim utjecaja na reproduktivno tkivo, primijećen je i neželjeni utjecaj na vegetativni razvoj biljaka (Rottmann i dr. 2000).

Razvoj genetskih modificiranja i istraživanja kontrole cvatnje omogućio je i postizanje reproduktivne sterilnosti kod biljaka. Sprječavanje razvoja reproduktivnog tkiva, uporabom ribonukleinskih gena citotoksina iz bakterija, uzrokuje sterilnost biljaka (Mariani 1990). Unosom citotoksina *barnase* inducirana je i sterilnost muških cvatova kod roda *Populus* (Meilan i dr. 2001). Ovakav pristup zaštite trebao bi pridonijeti smanjenju ekološkog rizika prilikom podizanja plantaža s genetski modificiranim šumskim vrstama drveća, jer postignuta sterilnost drvenastih

vrsta umanjuje mogućnost tzv. genetskog zagađenja iz plantaža sprječavanjem širenja peluda genetski modificiranih jedinki u okoliš.

Međutim, osim postignute sterilnosti uočen je i znatno slabiji rast modificiranih biljaka u usporedbi s kontrolom, što upućuje na utjecaj modificiranoga gena izvan njegove ciljane regije te također na važnost ispitivanja utjecaja izmijenjenih gena u realnim okolišnim uvjetima (Meilan i dr. 2001, Wei i dr. 2006). Osim navedenih metoda i gena prilikom kontrole cvatnje istražuju se i druge metode i geni, njihove kombinacije i zajednički utjecaj, kako bi se zadovoljili zahtjevi za komercijalnu uporabu. Za zadovoljavanje dugoročnih sigurnosnih zahtjeva potrebno je obaviti i opsežna istraživanja i ispitivanja stabilnosti izmijenjenih gena. Potpuna sterilnost, stabilna ekspresija unesenih gena tijekom nekoliko godina i ispitivanje utjecaja sterilnosti na rast važni su izazovi na koje moderna biotehnologija tek treba dati odgovor.

STABILNOST EKSPRESIJE GENA I BIOLOŠKA SIGURNOST

STABILITY OF TRANSGENE EXPRESSION AND BIOSAFETY

Osim komercijalno isplativog i brzog načina transformacije i regeneracije šumskog drveća, bitan je faktor i stabilnost ekspresije unesenih gena koji od prirode ne pripadaju genomu vrste. U šumarstvu je to još uvijek veliki izazov zbog dugoga životnog ciklusa drveća. Zato su tijekom posljednjih 20 godina provedena mnoga terenska testiranja koja predstavljaju vrlo važan segment u cjelokupnom lancu istraživanja. Zbog biološke sigurnosti ovakvi su terenski pokusi za sada kratkoročni, trajanja nekoliko godina, te se na istom lokalitetu osniva nekoliko različitih terenskih pokusa. Tako su npr. u Orleansu (Francuska) terenski nasadi s genetski modificiranim topolama osnivani još od ranih devedesetih godina prošloga stoljeća. Prvi nasad podignut je sa samo nekoliko stabala 1991. godine, a trenutačno je na istom lokalitetu treća generacija genetski modificiranih topola, s modificiranim sadržajem lignina u deblu (Slika 3.).

Stabilna ekspresija unesenih gena za ekonomski važna svojstva vrlo je važan dio ciklusa genetskog modificiranja. Zbog dugoga životnog vijeka šumskih vrsta drveća osiguravanje stabilnosti ekspresije unesenih gena tijekom određenog vremena kod modificiranih biljaka ili pak kroz generacije željeni je cilj genetskog inženjerstva u šumarstvu. Stabilnost modificiranih gena u domaćinu utječe na metodologiju prijenosa gena, tip konstrukcije rekombiniranih gena i fenotip, te isto tako određuje okolišne uvjete u kojima takve biljke mogu rasti. Razna istraživanja (Rottmann i dr. 2000, Meilan i dr. 2001, Wei i dr. 2007, Voelker i dr. 2011) pokazuju kako se modificirana ciljana svojstva različito izražavaju u stakleničkim uvjetima uzgoja, a drugačije u realnim okolišnim uvjetima terenskih nasada. Provedena su također i brojna istraživanja koja ispituju stabilnost ekspresije umjetno unesenih gena kod brojnih vrsta drveća (Meilan i dr. 2002a, Hawkins i dr. 2003, Pasonen i dr. 2004, Li 2006, Charity i dr. 2005, Li i dr. 2008). Testiranje izmijenjenih svojstava u okolišnim uvjetima pridonosi boljem shvaćanju interakcije prirodnih utjecaja i modificiranih svojstava.



Slika 3. Terenski nasad modificiranih topola sa smanjenim sadržajem lignina osnovan 2007. godine, Orleans, Francuska

Figure 3. Field trial of lignin modified poplars set up in 2007, Orleans, France

Ekspresija unesenih gena može mnogo ovisiti i o promotoru koji se koristi prilikom genetskog modificiranja za aktiviranje umjetno unesenih gena. Jedan od najčešće upotrebljivanih promotora jest 35S promotor iz mozaičnog virusa cvjetače (CaMV, engl. *Cauliflower Mosaic Virus*) (White i dr. 2007). Korištenje pogodnog promotora osigurava aktiviranje, ali i sigurnost ekspresije unesenih gena prilikom modificiranja.

Tijek vremena još je jedan bitan faktor koji se mora uzeti u obzir prilikom ovakvih istraživanja u šumarstvu. Ovisno o svojstvu, ekspresija gena može biti kontinuirana, može se izražavati tijekom nekoliko godina ili se pak izraziti tek nakon nekog određenog vremena. Stabilna ekspresija modificiranih svojstava ujedno je i od presudne važnosti za normalan rast i razvoj biljaka. Tako je, na primjer, otpornost na štetnike kontinuirana, odnosno izražava se svake godine prilikom pojave insekata. Kontrola cvatnje, odnosno sterilnost, svojstvo je koje se izražava tek kada biljke dosegnu spolnu zrelost nakon određenog broja godina. Povećana tolerancija na herbicide vidljiva je tijekom prvih godina rasta mladih biljaka, u periodu kada je uporaba herbicida potrebna za uništavanje konkurentnoga korova. Nakon tog perioda ekspresija unesenih gena više nije potrebna te se svojstvo ne izražava. Što se događa nakon 10–15 godina s tim svojstvom, kako se ponašaju geni te postoji li mogućnost ponovne ekspresije modificiranog svojstva, ostaje nepoznanica. Nastavkom istraživanja mogu se dobiti potrebni odgovori na ova i slična pitanja, što je ujedno jedna od znanstvenih zadaća moderne biotehnologije.

Iako se procjenjuje kako postoji preko 600 terenskih nasada s modificiranim drvenastim vrstama širom svijeta (Strauss, IUFRO Conference 2011), u šumarstvu gotovo da nema komercijalne uporabe takvih plantaža. Jedina su iznimka modificirani klonovi topola, sađeni u šest kineskih provincija (Wang i dr. 1996). Zbog dugoga životnog ciklusa šumskih vrsta drveća, intenzitet i brzina istraživanja s ge-

netskim modifikacijama u šumarstvu djelomično su 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 državnih agencija. Tako je, na primjer, u Sjedinjenim Američkim Državama za to ovlašten Odjel za poljoprivredu, Inspeksijska služba za veterinu i biljno zdravstvo (APHIS, engl. *Animal and Plant Health Inspection Service*). Služba izrađuje okolišne procjene na zahtjev podnositelja prijave za određeno istraživanje. Procjene utjecaja na okoliš sadržavaju analize potencijalnih ekoloških i socijalnih rizika, odnosno utvrđuju se i vrednuju opasnosti za biološku raznolikost okoliša te za zdravlje ljudi. Također je važno naglasiti kako se procjene rizika izrađuju posebno za svaki pojedini slučaj (engl. *case by case approach*).

Genetsko modificiranje u Hrvatskoj *Genetic Modifications in Croatia*

U Republici Hrvatskoj postupanje s genetski modificiranim organizmima (GMO) regulirano je Zakonom o genetski modificiranim organizmima (NN 70/2005, 137/2009) te Pravilnikom o sadržaju, opsegu i metodologiji izrade procjene rizika za ograničenu uporabu genetski modificiranih organizama (NN 84/2006), Pravilnikom o sadržaju prijave zatvorenog sustava (NN 84/2006), Pravilnikom o mjerama sigurnosti i standardima objekata za ograničenu uporabu genetski modificiranih organizama u zatvorenom sustavu (NN 84/2006) i Pravilnikom o sadržaju prijave za ograničenu uporabu genetski modificiranih organizama u 2., 3. i 4. razini opasnosti (NN 84/2006), koji omogućuju provedbu Zakona. Svi zakonski propisi pridonose biološkoj sigurnosti i lakšem praćenju prilikom postupanja s GM organizmima. Iako u hrvatskom šumarstvu ne postoje naznake takva korištenja biotehnologije, praćenje svjetskih trendova važno je za implementaciju inozemnih iskustava u postojeću zakonsku regulativu. Stjecanje dovoljnih količina znanja potrebno je za primjenu i provedbu sigurnosti prilikom uporabe GMO-a. Iz takvih inozemnih istraživanja proizlaze iskustva i oprez s kojima moraju biti upoznati domaći stručnjaci kako bi pravovremeno zaštitili prirodni okoliš, bioraznolikost i nemodificirane organizme.

LITERATURA

REFERENCES

- Anon. 2010. Forest Biotechnology and its Responsible Use. Raleigh, North Carolina, USA: The Institute of Forest Biotechnology, 17 str. URL: <http://www.responsibleuse.org/material/bio-techtrees.pdf> (30.03.2013.)
- Baucher, M., Chabbert, B., Pilate, G., Van Doorselaere, J., Tollier, M.-T., Petit-Conil, M., Cornu, D., Monties, B., Van Montagu, M., Inze, D., Jouanin, L., Boerjan, W., 1996. Red Xylem and Higher Lignin Extractability by Down - Regulating a Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase in Poplar. *Plant Physiol.* 112: 1479-1490.
- Convention on Biological Diversity, 1992. Article 2. Use of Terms. URL: <http://www.cbd.int/convention/articles/?a=cbd-02> (07.04.2013.)
- Charity, J. A., Holland, L., Grace, L. J., Walter, C., 2005. Consistent and stable expression of the nptII, uidA and bar genes in transgenic *Pinus radiata* after *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using nurse cultures. *Plant Cell Rep.* 23(9):606-616.

- Comai, L., Facciotti, D., Hiatt, W. R., Thompson, G., Rose, R. E., Stalker, D. M., 1985. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella-Typhimurium* Confers Tolerance to Glyphosate. *Nature* 317 (6039): 741-744.
- Fillatti, J.J., Sellmer, J., McCown, B., Haissig, B., Comai, L., 1987. Agrobacterium mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Mol. Gen. Genet.* 206(2):192-199.
- FAO (The Food and Agricultural Organization of the United Nations) 2004. Preliminary review of biotechnology in forestry, including genetic modification. Forest Genetic Resources Working Paper FGR/59E. Forest Resources Development Service, Forest Resources Division. Rome, Italy.
- Hawkins, S., Leplé, J.-C., Cornu, D., Jouanin, L., Pilate, G., 2003. Stability of transgene expression in poplar: A model forest tree species. *Ann. For. Sci.* 60(5): 427-438.
- Harcourt, R.L., Kyojuka, J., Floyd, R.B., Bateman, K.S., Tanaka, H., Decroocq, V., Llewellyn, D.J., Zhu, X., Peacock, W.J., Dennis, E.S., 2000. Insect- and herbicide-resistant transgenic eucalypts. *Mol. Breeding* 6(3): 307-315.
- Ho, C.-K., Chang, S.-H., Tsay, J.-Y., Tsai, C.-J., Chiang, V. L., Chen, Z.-Z., 1997. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 17(9): 675-680.
- Höfte, H., Whiteley, H. R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 53(2): 242-255.
- Hu, W.-J., Kawaoka, A., Tsai, C.-J., Lung, J., Osakabe, K., Ebinuma, H., Chiang, V. L., 1998. Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4-coumarate:CoA ligase genes in aspen (*Populus tremuloides*). *P. Natl. Acad. Sci. USA* 95(9): 5407-5412.
- Li, J., 2006. Stability of reporter gene expression and RNAi in transgenic poplars over multiple years in the field under vegetative propagation. Thesis. Oregon, USA.
- Li, J., Meilan, R., Ma, C., Barish, M., Strauss, S. H., 2008. Stability of Herbicide Resistance over 8 Years of Coppice in Field-Grown, Genetically Engineered Poplars. *WEST. J. APPL. FOR.* 23(2): 89-93.
- Levéé, V., Lelu, M.-A., Jouanin, L., Cornu, D., Pilate, G., 1997. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of hybrid larch (*Larix kaempferi* × *L. decidua*) and transgenic plant regeneration. *Plant Cell Rep.* 16(10): 680-685.
- Mariani, C., De Beuckeleer, M., Truettner, J., Leemans, J., Goldberg, R.B., 1990. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347(6295): 737-741.
- Meilan, R., Brunner, A.M., Skinner, J. S., Strauss, S.H., 2001. Modification of flowering in transgenic trees. *Progr. Biotechnol.* 18: 247-256.
- Meilan, R., Auerbach, D.J., Ma, C., DiFazio, S.P., Strauss, S.H., 2002 a). Stability of Herbicide Resistance and GUS Expression in target Hybrid Poplars (*Populus* sp.) During Four Years of Filed Trials and Vegetative Propagation. *HortScience* 37(2):277-280.
- Meilan, R., Han, K.-H., Ma, C., DiFazio, S.P., Eaton, J.A., Hoiem, E.A., Stanton, B.J., Crockett, R.P., Taylor, M.L., James, R.R., Skinner, J.S., Jouanin, L., Pilate, G., Strauss, S.H., 2002 b). The CP4 transgene provides high levels of tolerance to Roundup® herbicide in field-grown hybrid poplars. *Can. J. For. Res.* 32: 967-976.
- Mohamed, R., Meilan, R., Ostry, M. E., Michler, C. H., Strauss, S. H., 2001. Bacterio-opsin gene overexpression fails to elevate fungal disease resistance in transgenic poplar (*Populus*). *Can. J. For. Res.* 31: 268-275.
- Punja Z., Zhang, Y.-Y., 1993. Plant Chitinases and Their Roles in Resistance to Fungal Diseases. *J. Nemat.* 25(4): 526-540.
- Pilate, G., Guiney, E., Holt, K., Petit-Conil, M., Lapierre, C., Leplé, J.-C., Pollet, B., Mila, I., Webster, E. A., Marstorp, H. G., Hopkins, D. W., Jouanin, L., Boerjan, W., Schuch, W., Cornu, D., Halpi, C., 2002. Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nat. Biotechnol.* 20(6): 607-612.
- Pasonen, H.-L., Seppanen, S.-K., Degefu, Y., Rytkonen, A., von Weissenberg, K., Pappinen, A., 2004. Field performance of chitinase transgenic silver birches (*Betula pendula*): resistance to fungal diseases. *Theor Appl Genet* 109(3):562-570.

- Pasonen, H.-L., Vihervuori, L., Seppanen, S.-K., Lyytikainen-Saarenmaa, P., Ylloja, T., von Weissenberg, K., Pappinen, A., 2008. Field performance of chitinase transgenic silver birch (*Betula pendula* Roth): growth and adaptive traits. *Trees* 22(4):413-421.
- Pravilnik o sadržaju, opsegu i metodologiji izrade procjene rizika za ograničenu uporabu genetski modificiranih organizama. 2006. Narodne novine 84/2006.
- Pravilnik o sadržaju prijave zatvorenog sustava. Narodne novine 84/2006.
- Pravilnik o mjerama sigurnosti i standardima objekata za ograničenu uporabu genetski modificiranih organizama u zatvorenom sustavu. Narodne novine 84/2006.
- Pravilnik o sadržaju prijave za ograničenu uporabu genetski modificiranih organizama u 2., 3. i 4. razini opasnosti. Narodne novine 84/2006.
- Rottmann, W.H., Meilan, R., Sheppard, L. A., Brunner, A. M., Skinner, J. S., Ma, C., Cheng, S., Jouanin, L., Pilate, G., Strauss, S. H., 2000. Diverse effects of overexpression of LEAFY and PTLF, a poplar (*Populus*) homolog of LEAFY/FLORICAULA, in transgenic poplar and Arabidopsis. *Plant J.* 22(3), 235-245.
- Schultz, E. A., Haughn, G. W., 1991. LEAFY, a Homeotic Gene That Regulates Inflorescence Development in Arabidopsis. *Plant Cell* 3(8): 771-781.
- Sharma, N., Sharma, K.P., Gaur, R.K., Gupta, V.K., 2011. Role of Chitinase in Plant Defense. *Asian Journal of Biochemistry* 6(1): 29-37.
- Strauss, S. H., Viswanath, V., 2011. Field trials of GM trees in the USA: Activity and regulatory developments. IUFRO Tree Biotechnology Conference 2011. From Genomes to Integration and Delivery, Arraial d'Ajuda, Bahia, Brazil. 26 June - 2 July 2011, BMC Proceedings 5 (Suppl 7): O61, str. 61-62.
- Tamarin H.R. 2002. The principles of Genetics (7th Edition). Boston: Mcgraw-Hill, p609.
- Tang, W., Ouyang, F., 1999. Plant regeneration via organogenesis from six families of loblolly pine. *Plant Cell Tiss. and Org.* 58(3): 223-226.
- Tsai, C.-J., Podila, G. K., Chiang, V. L., 1994. Agrobacterium-mediated transformation of quaking aspen (*Populus tremuloides*) and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 14(2-3): 94-97.
- Van Acker, R., Storme, V., Goeminne, G., Ivens, B., Custers, R., Aerts, D., Soetaert, W., Ralph, J., Santoro, N., Leple, J.-C., Pilate, G., Boerjan, W., 2011. Science, society and biosafety of a field trial with transgenic biofuel poplars. IUFRO Tree Biotechnology Conference 2011: From Genomes to Integration and Delivery, Arraial d'Ajuda, Bahia, Brazil. 26 June - 2 July 2011, BMC Proceedings 5(Suppl 7): I23, str. 15-16.
- Van Doorselaere, J., Baucher, M., Chognot, E., Chabbert, B., Tollier, M.-T., Petit- Conil, M., Leple, J.-C, Pilate, G., Cornu, D., Monties, B., Van Montagu, M., Inze, D., Boerjan, W., Jouanin, L., 1995. A novel lignin in poplar trees with a reduced caffeic acid 5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase activity. *Plant J.* 8(6): 855-864.
- Vauramo, S., Pasonen, H.-L., Pappinen, A., Setälä, H., 200.: Decomposition of leaf litter from chitinase transgenic silver birch (*Betula pendula*) and effects on decomposer populations in a field trial. *Appl. Soil Ecol.* 32(3): 338-349.
- Voelker, S. L., Lachenbruch, B., Meinzer, F. C., Jourdes, M., Ki, C., Patten, A. M., Davin, L. B., Lewis, N. G., Tuskan, G. A., Gunter, L., Decker, S. R., Selig, M. J., Sykes, R., Himmel, M. E., Kitin, P., Shevchenko, O., Strauss, S. H., 2010. Antisense Down-Regulation of 4CL Expression Alters Lignification, Tree Growth, and Saccharification Potential of Field-Grown Poplar. *Plant Physiol.* 154(2): 874-886.
- Voelker, S. L., Lachenbruch, B., Meinzer, F. C., Kitin, P., Strauss, S. H., 2011. Transgenic poplars with reduced lignin show impaired xylem conductivity, growth efficiency and survival. *Plant, Cell Environ.* 34(4): 655-668.
- Wang, G., Castiglione, S., Chen, Y., Li, L., Han, Y., Tian, Y., Gabriel, D. W., Han, Y., Mang, K., Sala, F., 1996. Poplar (*Populus nigra* L.) plants transformed with a *Bacillus thuringiensis* toxin gene: insecticidal activity and genomic analysis. *Transgenic Res.* 5(5): 289-301.
- Wei, H., Meilan, R., Brunner, A. M., Skinner, J. S., Ma, C., Gandhi, H. T., Strauss, S. H., 2006. Field trial detects incomplete barstar attenuation of vegetative cytotoxicity in *Populus* trees

- containing a poplar LEAFY promoter::barnase sterility transgene. *Mol. Breeding* 19(1): 69-85.
- Weigel, D., Nilsson, O., 1995. A Developmental Switch Sufficient for Flower Initiation in Diverse Plants. *Nature* 377(6549): 495-500.
- White, T. L., Adams, W. T., Neale, D. B., 2007. *Forest Genetics*. Wallingford, UK, Cambridge, MA: CAB International, p682.
- Zakon o genetski modificiranim organizmima (s izmenama i dopunama) 2009. *Narodne novine* 70/2005, 137/2009.
- Zupan, John R., Zambryski, P., 1995. Transfer of T -DNA from *Agrobacterium* to the Plant-Cell. *Plant Physiol.* 107(4): 1041-1 047.

TWENTY YEARS OF GENETIC MODIFICATIONS IN FORESTRY

SUMMARY

Genetic modification, genetic transformation or genetic engineering are synonyms for technique that permits adding desirable traits into superior genotypes by gene insertion between different species, families and even kingdoms which dose not occur in nature. On the other hand, traditional breeding relies primarily on selection and crosses within species or within closely related genera which exist in nature, to emphasize certain characteristics. But this method has no control over additional genetic material being incorporated within desired phenotype. Genetic modification is defined as use of recombinant DNA and asexual gene transfer methods to alter the structure or expression of specific genes and traits (FAO, 2004).

The first report of genetic modified trees was in 1987 on Populus sp. (Fillati et al. 1987). For the first time it was successfully regenerated transformed tissue of forest tree species. Applications of genetic modification in forest tree species include lignin modification, herbicide tolerance, disease and pest resistance and flowering control, so called target traits.

Besides genetic modification techniques, field trial experiments are also very important step in genetic transformation. After first successful regeneration of transformed tissue, in the next 15 years more than 210 field trials of genetically modified trees were established in 16 countries worldwide. The great majority of field trial experiments occur in the United States (FAO, 2004). According to the newest assessment there are over 600 field trials with genetically modified trees in the world (Strauss, IUFRO Conference 2011). But there are hardly any commercial use of genetic modified forest trees. The rapid development of genetic engineering it will attempt to meet global demand for forest products, biofuels, to restore threatened species, and to protect future forests from invasive pests and climate change. When used responsibly, society and the environment can benefit from advanced biotechnology (Anon. 2010).

There is no indication for using biotechnology or genetic modification in Croatian forestry. But gathering existing knowledge and capacity building can only contribute for implementation of world knowledge into national legislation, and prepare experts for future development.

Key words: *genetic modification, genetic transformation, genetic engineering, biotechnology, traditional breeding, target traits, field trials*