

2. znanstvena konferenca z mednarodno udeležbo

Konferenca VIVUS – s področja naravovarstva, kmetijstva, hortikulture in živilstva

»ZNANJE IN IZKUŠNJE ZA NOVE PODJETNIŠKE PRILOŽNOSTI«

24. in 25. april 2013, Biotehniški center Naklo, Strahinj 99, Naklo, Slovenija

2nd Scientific Conference with International Participation

Conference VIVUS – Environmentalism, Agriculture, Horticulture, Food Production and Processing

»KNOWLEDGE AND EXPERIENCE FOR NEW ENTREPRENEURIAL OPPORTUNITIES«

24th – 25th April 2013, Biotechnical Centre Naklo, Strahinj 99, Naklo, Slovenia

Transformacije plastidnih genomov kot biotehnološki izziv v kmetijstvu

Liliana Vižintin

Biotehniški center Naklo, Slovenija, lili.vizintin@gmail.com

Izveček

Javnomnenjske raziskave v Evropi potrjujejo dejstvo, da so potrošniki in proizvajalci zelo zadržani glede gensko spremenjenih organizmov (GSO), kar je razvidno tudi na osnovi kompleksnega evropskega zakonodajnega sistema in nadzora nad GSO. Kljub temu je še veliko neizkoriščenega potenciala novejših biotehnoloških raziskav, ki bi lahko ponudile rešitev za bodoče izzive kmetijstva. V tem pogledu so pomembne raziskave rastlinskih plastidov, kot alternativno okolje za gensko spreminjanje rastlin. S tem bi premagali nekatere slabosti klasičnih gensko spremenjenih (GS) rastlin, ki zbuja v javnosti odpor in zaskrbljenost. Prednost takih transformacij je prav zagotavljanje večje varnosti za potrošnika in okolje. V članku so prikazane tehnologije, raziskave in dosežki na področju transformacije plastidnega genoma ter so izpostavljene prednosti za okolje in zdravje potrošnikov.

Ključne besede: genom kloroplastov in mitohondrijev, genske transformacije

Plastid transformation as agro-biotechnological challenge

Abstract

The strong resistance and awareness of Europeans regarding genetically modified organisms (GMO) are confirmed by surveys. The consequence of this attitude is a very complicated European system of regulations and restrictions concerning GMO. Nevertheless, a lot of biotech research could be useful to find solutions of future agricultural challenges. Between them, key area of plant biotech researches is the potential of plastid transformation as a new and more suitable alternative environment of improvement of some important crops traits. Transplastomic plants allows overcoming some limitation of classic genetically modified plants (GM) that rise concern about the cost to the environment or risk to the consumer. This article reviews the achievements, technologies and approaches used in plastid transformation of plants and discuss the environmental and health benefits for consumers.

Key words: chloroplast in mitochondrial genome, genetic transformation

1 Uvod

Zaradi resnosti svetovnega okoljskega izziva in zaskrbljenosti glede dejavnikov, ki ogrožajo preživetje in trajnostni razvoj, raziskovalci iščejo nove možnosti izboljšanja tehnologij in produktov v kmetijstvu. Ena od možnih rešitev je uporaba znanstvenih dosežkov na področju biotehnologije.

Človek je od vedno iskal načine izboljšanja lastnosti kultiviranih rastlin: na primer so pridelovalci že pred 8000 leti načeli z razvojem koruze in divjega sorodnika teozinta, ki je bil podoben plevelu in brez velikih zrn, značilnih za današnjo koruzo. Klasične metode žlahtnjenja rastlin vključujejo križanja, izzivanje naključnih mutacij in nadaljnjo selekcijo rastlin z izbranimi lastnostmi. Z razvojem rekombinantne tehnologije, pa so biotehnologi začeli spreminjati genom rastlin in s tem so vnašali v rastline nove lastnosti. Prva generacija GS rastlin je bila osredotočena na izboljšave v kmetijstvu, ampak je ponujala prednosti predvsem za pridelovalce poljščin in semenarska podjetja, le druga generacija pa se je usmerila v izboljšanje prehranske vrednosti hrane in krme. V tretji generaciji so raziskovalci razvili rastline za proizvodnjo npr. farmacevtikov, biogoriv ali biorazgradljivih materialov (Žel, 2008).

Na tržišču so danes najbolj uveljavljene rastline prve generacije, čeprav so le-te v javnosti izvale številne diskusije kot na primer o smiselnosti uporabe transgenih rastlin v kmetijstvu ter o zaskrbljenosti za zdravje potrošnika in vplivov na okolje (Hoban, 1998). Javnost je še posebej zaskrbljena glede gensko spremenjene hrane in transgenih poljščin ter vrtnin, kar dokazujejo številne javnomnenjske raziskave (Sjoberg, 2004). Zahtevajo predvsem zagotovila o varnosti za zdravje ljudi in varovanje okolja. Posledično, biotehnološke aplikacije in še posebej GSO se običajno ne pojmujejo kot elementi sonaravnega ali trajnostnega kmetijstva. Kljub temu pa se odpirajo možnosti, da bi biotehnologija lahko imela vlogo tudi pri trajnostnem ali sonaravnem kmetijstvu. Predvsem lahko strmimo k temu, da bo biotehnologija v prihodnosti lahko zagotovila varnejši alternativo k vse večji porabi biocidov v kmetijstvu ter večjo hranilno vrednost pridelane hrane.

Številne študije so želele preučiti realne prednosti biotehnoloških aplikacij v kmetijstvu, ki ne bi terjale tudi pretiranega tveganja za ljudi in okolje (Falk et al., 2002; Key et al. 2008). V sklopu tega so bile odločilne biomedicinske raziskave usmerjene v ugotavljanje alergenosti (Buchanan, 2001), ugotavljanju asimilaciji transgenov v človeškem telesu (Netherwood et al., 2004) in realnemu izboljšanju hranilne vrednosti GS rastlin iz vidika potreb prebivalstva (Tucker, 2003; Pusztai et al., 1999). Pozornost je bila usmerjena predvsem v predele sveta, kjer še vedno ljudje umirajo zaradi pomanjkanja hrane ali specifičnih hranil, saj pri reševanju teh problematik ima lahko biotehnologija pomemben doprinos (Borlaug, 2000; Bouis, 2003). Ne na zadnje, soočiti se je potrebno tudi z zahtevo po trajnostni oskrbi s hrano zaradi bodoče velike rasti svetovne populacije, ki bo predvidoma dosegla 8 milijard ljudi v letu 2025, od tega bo večino povečanja rasti (90%) prispevale države v razvoju (Population Reference Bureau, 2006). Posledično bo vse večja zahteva po učinkovitih načinih pridelovanja poceni hrane. Predvidevajo, da bo biotehnologija lahko z nekaterimi komercialnimi aplikacijami v kmetijstvu in z novo tehnologijo imela pomembno razvojno vlogo (Rosegrant et al., 2001), ampak ob zagotavljanju varnosti te tehnologije.

Bazične in aplikativne študije v biotehnologiji lahko pomembno vplivajo na bodoči razvoj kmetijstva, ki se bo soočalo z novimi izzivi. Da bi zagotovili večjo varnost za potrošnika in okolje, se kot alternativna možnost genskega inženiringa že nekaj let raziskuje tudi plastidni genom rastlin.

Rastlinske celice poleg jedrne DNK vsebujejo tudi DNK v plastidih, to je v mitohondrijih in kloroplastih. Posamična celica vsebuje eno jedro in več plastidov. Geni jedra se dedujejo po obeh starših, medtem ko se plastidi dedujejo večinoma le po enem staršu, največkrat po materi (Bohanec et al., 2004). V večini kmetijskih rastlin, pelod izgubi plastide med dozorevanjem in jih ne more prispevati v zigoto, zato so plastidi podedovani po materi. Ker se transformirani plastidi ne bodo nahajali v pelodu, se izniči tudi možnost, da bi škodili insektom, ki se z pelodom hranijo, ali da bi le-ti prenašali transgen pelod v okolje. Obstajajo pa še številne druge prednosti, ki so raziskovalce motivirale k raziskovanju tega alternativnega okolja genskih transformacij. 275

V članku bodo predstavljene raziskave plastidnega genoma, načini transformacije plastidov ter uspehi, ki so privedli do izboljšav pri nekaterih modelnih rastlinah. Opisane bodo prednosti, ki nam to alternativno okolje ponuja v primerjavi s klasičnimi transformacijami jedrnih genov in bodoči izzivi še premalo raziskanega mitohondrijskega genoma.

1.1 Kloroplastni genom

Kloroplasti so rastlinski celični organeli z lastnim genomom, kateri vsebujejo celoten mehanizem za opravljanje fotosinteze. Študije o strukturi in ekspresiji kloroplastnega genoma so se začele v poznih '70 letih, ko so prvič kartirali koruzni kloroplastni genom (Bedbrook in Bogorad, 1976) in klonirali prvi kloroplastni gen (Bedbrook et al., 1977). V naslednjih letih so sekvencirali kloroplastne genome še številnih drugih rastlin: kompletna kloroplastna genomska sekvenca je poznana na primer za tobak (Shinozaki et al., 1986a), riž (Hiratsuka et al., 1989), koruzo (Maier et al., 1995), črni bor (Wakasugi et al., 1994), pšenico (Ogihara et al., 2000).

Genom sestavljajo številne kopije krožne DNA molekule, ki je v povprečju velikosti od 120 do 160 kbp (Sugiura, 1992). DNA molekula nosi zapis za kloroplastno ribosomsko RNA (3 do 5 genov), okoli 30 genov za tRNA ter približno 100 proteinskih genov. Vsebuje tudi 2 veliki invertirani ponovljivi sekvenci (IR) dolžine od 6 do 76 kbp. IR sekvence ločujejo kratek in dolg predel (LSC in SSC) z geni, ki niso ponovljeni, oziroma z nizko ponovljenimi sekvencami. Večina variacij v dolžini kloroplastne DNA molekule je posledica razlik v dolžini IR sekvenc. IR sekvence manjkajo v nekaterih stročnicah (Palmer and Thompson, 1982) in v nekaterih vrstah iglavcev (Strauss et al. 1988, Tsumura et al. 1993). Sklepajo, da so bile v skupnih prednikih kopenskih rastlin IR sekvence prisotne in so se tekom evolucije v nekaterih vrstah zgubile.

V številnih kloroplastnih genih višjih rastlin so prisotni introni (Shinozaki et al., 1986b). Kloroplasti nosijo zapis za vse tRNA, ki jih potrebujejo pri lastni beljakovinski sintezi, iz jedra pa uvažajo nekatere ribosomske beljakovine potrebne za sestavo 70S ribosomov in tudi nekatere beljakovine vključene v fotosintezo. V primeru ribulozne-1,5-bifosfatne karboksilaze/oksigenaze (Rubisco), kodira kloroplastni genom za njene velike podenote, jedrni genom pa za male. Kloroplastni genom kodira tudi za lastno RNA polimerazo, ki je podobna bakterijski (Sugiura, 1992).

Analize kloroplastnega genoma so večkrat zelo uporabne za evlucijske in filogenetske raziskave pri višjih rastlinah (Tsumura et al. 1993).

1.2 Mitohondrijski genom

Mitohondriji so zelo pomembni celični organeli, saj v njih poteka oksidativna fosforilacija. Pri tem se porablja kisik in nastaja ATP, primarni vir celične življenjske energije (Macanzie & McIntosh, 1999).

Rastlinski mitohondrijski genom je v primerjavi z živalskim in glivičnim največji in strukturno zapleten. Velikost mitohondrijskega genoma se giblje med 100 do 2700 kbp. Najmanjšega (nekaj več kot 100 kbp) so našli znotraj rodu *Physcomitrella* (Terasawa et al., 2007) in najobsežnejšega (2,7 Mbp) v meloni (Rodriguez-Moreno et al., 2011). Kljub temu ne vsebuje sorazmerno več genov, ima le več nekodirajočih sekvenc in intronov. Prisotni so številni pseudogeni, nekaj genskih družin in ena ali več kratkih ponovljivih sekvence (Palmer et al., 2000). Vzrok za tako obsežni ne-informativni del genoma so tudi vnosi sekvenc iz kloroplastnega in jedrnega genoma. Veliko zanimivih podatkov so raziskovalci najprej pridobili s kompletnim sekvenciranjem mitohondrijskega genoma rastlinske vrste *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Marienfeld et al. 1999), danes pa so sekvencirani mitohondrijski genomi več kot 30 rastlinskih vrst (pregled v Mower et al. 2012b). Kljub temu natančna strukturna organizacija mitohondrijskega genoma višjih rastlin ostaja še negotova.

Celotno mtDNA lahko prikažemo kot eno samo krožno molekulo DNA ("master circle"). Sklepa se, da se ta glavna molekula lahko razdeli preko homologne rekombinacije v več manjših krožnih podgenomskih molekul (Mower et al., 2012a). Nekatere raziskave pa poročajo o prisotnosti populacije heterogenih linearnih mtDNA molekul velikosti 50 do 250kbp (Scissum-Gunn et al., 1998). To potrjuje tudi hipoteza o replikaciji rastlinskih mitohondrijskih genomov na podlagi mehanizma "rolling circle", saj naj bi mtDNA v času replikacije prevzela obliko linearne razvejane molekule (Mackenzie in McIntosh, 1999).

2 Transformacije plastidov

Stabilna genetska transformacija plastidov vključuje tri faze:

- vnos kloniranega DNA v tarčno tkivo, v našem primeru plastidni DNA,
- selekcija celic, kjer je prišlo do transformacije,
- regeneracija transformiranih tkiv v novo rastlino.

2.1 Metode vnosa transgenega DNA v plastide

Vnos kloniranega DNA v plastid je najprej uspel z biolistično metodo (Daniell et al. 1998, 2001; Sidkar et al. 1998). Postopek temelji na nanosu DNK na drobne (0,1-1,5 μm) delce zlata ali volframa. Delce naneseemo na membrane ali na plastične "izstrelke", jih nato s pomočjo potisnega plina (helij ali dušik) močno pospešimo in "ustrelimo" v tarčno tkivo. Delci zlata predrejo celične stene in omogočijo vnos DNK (kloniran DNA oziroma plastidni vektor). S takimi delci zadevamo z veliko hitrostjo ob kultivirane tarčne celice ali tkivo. Pri tem poškodujemo večino celic, nekatere pa vseeno preživijo in imajo v notranjosti vnesen tuj DNA (Russell et al., 1992). To je tehnično enostavna metoda z relativno visoko učinkovitostjo. Slabost te metode so izgube in poškodbe genskega materiala med mehanično vezavo na delce težke kovine in med obstreljevanjem (Heifetz, 2000). Raziskovalci so izdelali univerzalni kloroplastni vektor na podlagi pBBL plazmida in specifičen tobakov kloroplastni vektor iz pZS plazmida, ki jih je možno uporabljati prav pri tej metodi (Daniell et al., 1998). V ta plazmida integriramo gene, s katerimi želimo transformirati kloroplastni genom.

Alternativna metoda je tudi transformacija plastidov znotraj protoplastov z uporabo polietilen glikola (PEG). V protoplastih se nahajajo vsi plastidi v bližini celične membrane. Zato je možna hkratna permeabilizacija vseh treh membran, ki ločijo plastidno stromo od medija za *in vitro* kultiviranje protoplastov. To metodo so uspešno izvedli predvsem pri tobaku (Koop et al., 1996). Omejena je na relativno majhno število vrst, kjer so odkrili protokol za učinkovito regeneracijo rastlin iz protoplastov. V nasprotju s prvo, je to tehnično dosti bolj zahtevna metoda; potrebno je znanje in spretnost pri delu s tkivnimi kulturami. Oprema pa je relativno bolj skromna.

Novejša metoda na tem področju je mikroinjeciranje transgenega DNA direktno v plastid, ne da bi pri tem poškodovali rastlinsko celico. V živalskih celicah se metodo široko uporablja za vbrizgavanje DNA direktno v celično jedro. Pri rastlinskih celicah pa je uspešnost nižja zaradi rigidne celične stene, katero je težje prebosti in jo pri tem tudi večkrat poškodujemo. Elektroda z tanjšim koncem bi povzročila manj škode, toda v tem primeru je potrebna sorazmerno močnejša sila za vbrizgavanje tekočine (Van Bel et al., 2001). Femtobrizgavke (GEF – "galinstan expansion femto syringe") so uspešno uporabili za vnos v notranjost celičnih organelov femtolitrskve volumne tekočine. Na primer so vnašali gen za GFP ("green fluorescent protein") v kloroplaste in opazovali njegovo ekspresijo (Knoblauch et al., 1999).

2.2 Integracija preko homologne rekombinacije

Geni plastidov so podobno kot pri bakterijah urejeni v operone. Prednost integracije zelenih genov v plastidni DNA je možnost večkratne homologne rekombinacije na specifičnih mestih (Kavanagh et al., 1999), ki je tudi značilnost bakterij. To omogoča posebna lastnost plastidnega genoma in sicer rekombinantna aktivnost (Cerutti et al., 1992). Na ta način vnesemo DNK na točno določeno mesto na kromosomu. Kljub večjemu številu kopij genoma in večjemu številu plastidov v celicah pa je značilnost kloroplastov zelo velika genetska izenačenost: posamična celica torej vsebuje kloroplaste, ki imajo vsi enako strukturo DNK. Zato so v primeru transformacij vsi kloroplastni genomi nosilci vnesenih genov – temu pojavu pravimo homoplastičnost (Bohanec et al., 2004).

Stabilizacijo transformacije in homoplastičnost zagotovimo tudi s selekcijo in dolgotrajnim razmnoževanjem celic v *in vitro* kulturi. Žal podaljšano kultiviranje bistveno zmanjša možnosti ponovne regeneracije. Alternativna metoda je začasno oziroma reverzibilno zmanjšanje števila plastidov v celici pred transformacijo preko uporabe inhibitorje plastidne delitve (Bogorad, 2000).

Homoplastično stanje kloroplastnih genomov bi lahko preverjali na dva načina (Malaga in Nixon, 1998):

- Southern blot analiza ali PCR analiza plastidnega DNA,
- analiza semen transgenih rastlin –v primeru homoplastičnega stanja, bi morali dobiti iz semen samo transgene rastline.

2.3 Pregled nekaterih dosedanjih uspehov in aplikacij pri transformaciji plastidov

Največji uspehi pri transformacijah plastidov so bili doseženi pri tobakovih kloroplastih (Svab in Maliga, 1993). To je omogočilo veliko novih odkritij o kloroplastni biologiji in o poteku fotosinteze. Pri višjih rastlinami, zabeležimo samo v tem primeru regeneracijo fertlnih rastlin s trajno spremenjenim kloroplastnim DNA. Sledile so tudi transformacije plastidov ostalih rastlin, kot na primer krompirja (Sidorov et al., 1999) in paradižnika (Ruf et al., 2001). V primeru transformacije kloroplastov vrste *A. thaliana* (Sidkar et al., 1998) je bila učinkovitost nizka in regenerirane rastline niso bile fertile. Transformacijo kloroplastov so poskušali tudi v primeru riža (Kahn & Maliga, 1999). Transformacija ostalih plastidov je prehodno uspela v amiloplastih krompirja ter kromoplastih ognjičevih cvetov, korenja in rdeče paprike (Hibbard et al., 1998).

Razvoj metodologij plastidnega genetskega inženiringa nam odpira številne možnosti za uporabne aplikacije le-tega. In sicer predvsem na treh področjih:

- spreminjanje plastidnega metabolizma,
- preučevanje plastidnega genoma,
- vnašanje in ekspresija tujih genov v plastidih.

Možnost izboljšanja rastlinske fotosinteze bi bila zelo uporabna pri žlahtnjenju rastlin. Fotosintetično fiksacijo CO₂ v sladkor katalizira encim Rubisco, katerega so raziskovalci skušali spremeniti, da bi s tem izboljšali fotosintetično učinkovitost. Encim Rubisco je multimer, ki ga sestavljajo 8 velikih podenot (LSU) in 8 malih podenot (SSU). Velike podenote kodira gen *rbcL* v plastidnem genomu, male podenote pa jedrni gen *rbcS*. V raziskavi so Kanevski in sodelavci (1999) tobakov *rbcL* gen nadomestili z homolognim genom iz cianobakterije (*Synechococcus* sp., sev pcc 6301) in sončnice (*Helianthus annuus* L.). Samo v drugem primeru je prišlo do tvorbe funkcionalnega hibridnega Rubisco encima. V podobnem poskusu so tudi preučevali tobakov *rbcL* gen (Whitney et al., 1999) in so dokazali funkcionalno pomembnost določene aminokisliline, ki so jo predhodno modificirali.

Spodbudne so tudi raziskave ekspresije *Bacillus thuringiensis* (Bt) toksina v plastidih (Kota et al. 1999, DeCosa et al. 2001).

Transformacija tobakovih kloroplastov za proizvodnjo bioproduktov je uspela v primeru PBP-bioelastičnega polimera (Guda et al., 2000), ki se uporablja v medicinske in druge namene, Možna je tudi ekspresija humanih proteinov (Staub et al, 2000).

3 Prednosti transformacije plastidov

Največja prednost je predvsem nezmožnost rastlin, da bi prenašale transgene preko peloda. Na tak način je možno omejiti nepredviden prenos transgenov. S tem preprečimo, da bi se preko peloda prenašala odpornost na herbicide ali na škodljivce tudi na divje sorodnike. To je še posebej pomembno za tiste kulturne rastline, ki se lahko križajo z divjimi sorodniki v neki geografski enoti. Kljub temu je potrebno pri vsaki vrsti preveriti tak prenos in zagotoviti varnost za okolje.

Plastidi so tudi primeren ločen oddelek za potek specifičnih biokemijskih reakcij ali za akumulacijo in shranjevanje večjih količin produktov. Zato jih lahko uporabljamo kot bioreaktorje za produkcijo snovi v industrijske ali farmacevtske namene, saj lahko dosežemo visoko raven ekspresije teh produktov. Plastidna membrana pa predstavlja pomembno oviro, skozi katero bioprodukti ne morejo prehajati, kar je bistvenega pomena v primeru, da bi bile te snovi metabolično aktivne. Težava je za enkrat samo v tehnološki zahtevnosti postopka izolacije bioproduktov iz plastidov (Maliga, 2002).

Transformacije plastidov nam tudi omogočajo, da omejimo predele rastline s transgenimi produkti. Torej pri transformaciji kloroplastov vemo, da bo prišlo do ekspresije transgena samo v zelenih predelih rastline (listih in zelenem stebelu), ne pa v zrelih sadežih ali gomoljih, kjer ni kloroplastov. To je na primer uporabno, če vnašamo odpornost proti insektom, ki se hranijo samo z listi. Sadeži take rastline ne bodo vsebovali transgenih produktov in bodo sprejemljivejši za širšo javnost, ki ima še zadržke glede GS hrane.

Prednosti transformacije plastidov je tudi hiperekspresija vnesenih genov. V vsaki celici zelenega lista najdemo tako okoli 50 kloroplastov, vsak nosi od 60 do 100 kopij cpDNA molekule, kar pomeni da bo vsaka celica lahko vsebovala 3000-5000 kopij vnesenega transgena (Bogorad, 2000). V tem je tudi skrivnost tako močne ekspresije v primerjavi s tisto, ki jo lahko pričakujemo pri jedrnih transformacijah.

Zaradi endosimbiontskega izvora plastidov, je njihov genom v nekaterih pogledih podoben bakterijskemu. Lahko pride do ekspresije bakterijskih genov in tudi človeških cDNA in ni utišanja genov. Številni plastidni geni so razvrščeni znotraj operonov. To nam ponuja možnost vnosa celega bloka genov v enem samem transformacijskem dejanju. V enem operonu lahko vnesemo gene, ki so vključeni v isto biosintetično pot nekega produkta ali za katere želimo, da bi se prepisovali skupaj oziroma bili pod indukcijo istega promotorja. Prisoten je tudi rekombinantni sistem podoben bakterijskemu. Preko homologne rekombinacije lahko vnašamo gene v točno določene predele plastidnega genoma.

4 Sklepi in bodoči izzivi

Uspehi pri transformacijah rastlinskih kloroplastov nas spodbujajo k razvijanju novih aplikacij, ki nam jih ponuja ločeno okolje celičnih organelov. Največji uspehi so zabeleženi predvsem pri modelni rastlini tobak. Učinkovite sisteme vnosa transgenov v rastlinske kloroplaste bi morali razvijati tudi pri ostalih kulturnih rastlinah.

Podobno kot kloroplasti, imajo mitohondriji še veliko neizkoriščenih zmogljivosti. Mitohondriji se prav tako kot kloroplasti običajno dedujejo po materi in zato predstavljajo ugodno alternativo pri genskem spreminjanju. Obstojata tudi nekaj izjem, denimo pri melonah in kumaricah se mitohondriji dedujejo po očetu, vsekakor pa je ta lastnost vrstno specifična. Bohanec in sodelavci (2004) menijo, da genska transformacija mitohondrijev še ni uspela, morda predvsem zato, ker je bilo mnogo več raziskav usmerjenih v transformacije kloroplastov.

Tudi transformacije mitohondrijev bi predstavljale v določenih primerih ugodno rešitev za transformacije specifičnih rastlinskih vrst, saj so biokemijske reakcije v mitohondrijih zelo pomembne za rastlinski metabolizem in vplivajo na njene lastnosti. Kljub temu še niso bile izdelane metode za rutinsko transformacijo mitohondrijev. Težava je predvsem v velikem številu

mitohondrijev v celici in številnih kopij mitohondrijskega genoma v vsakem mitohondriju. Tudi selekcijski markerji, specifični za mitohondrijske transformacije, niso bili še dokončno dodelani.

4 Literatura:

Bedbrook J.R. & Bogorad L., 1976: Endonuclease recognition sites mapped on *Zea mays* chloroplast DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 4309-4319.

Bedbrook J.R., Kolodner R., Bogorad L., 1977: *Zea mays* chloroplast ribosomal RNA genes are part of a 22,000 base pair inverted repeat. *Cell* 11:739-749.

Bohanec B., Javornik B., Strel B. 2004: Gensko spremenjena hrana. Ljubljana, Ministrstvo za okolje, prostor in energijo, Združenje živilske industrije pri Gospodarski zbornici Slovenije in Biotehniška fakulteta, 167 s.

Bogorad L., 2000: Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. *TIBTECH* 18:257-263.

Borlaug N.E., 2000: Ending world hunger: the promise of biotechnology and the threat of antiscience zealotry. *Plant Physiol* 124: 487-490.

Bouis H.E., 2003: Micronutrient fortification of plants through plant breeding: can it improve nutrition in man at low cost?, *Proc Nutr Soc.* 62(2):403-11.

Buchanan B. B., 2001: Genetic Engineering and the Allergy Issue, *Plant Physiology*, Vol. 126: 5-7,

Cerutti H., Osman M., Grandoni P., Jagendorf A.T., 1992: A homolog of *Escherichia coli* RecA protein in plastids of higher plants. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89: 8068-8072.

Daniell H., Datta R., Varma S., Gray S., Lee S-B., 1998: Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnology* 16: 345-348.

Daniell H., Wiebe P.O., Fernandez-SanMillan A., 2001: Antibiotic-free chloroplast genetic engineering – an environmentally friendly approach. *Trends in Plant science* 6 : 237-239.

DeCosa B., Moar W., Lee S.-B., Miller M., Daniell H., 2001: Overexpression of the *Bt cry2Aa2* operon in chloroplast leads to formation of insecticidal crystals. *Nature Biotechnology* 19:71-74.

Falk M.C., Chassy B.M., Harlander S.K., Hoban T.J., McLaughlin M.N., Akhlaghi A.R., 2002: Food Biotechnology: Benefits and Concerns, *J. Nutr.* 132: 1384-1390.

Guda C., Lee S.-B., Daniell H., 2000 Stable expression of biodegradable protein-based polymer in tobacco chloroplast. *Plant Cell Reports* 19: 257-262.

Heifetz P.B., 2000: Genetic engineering of the chloroplast. *Biochimie* 82: 655-666.

Hibbard J.M. et al., 1998: Transient expression of green fluorescent protein in various plastid types following microprojectile bombardment. *Plant J.* 16: 627-632.

Hiratsuka J., Shimada H., Whittier R., Ishibashi T., Sakamoto M., Mori M., Kondo C., Honji Y., Sun C.R., Meng B.Y., Li Y.Q., Kanno A., Nishizawa Y., Hirai A., Shinozaki K., Sugiura M., 1989: The complete sequence of the rice (*Oriza sativa*) chloroplast genome: Intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol Gen Genet* 217:185-194.

Hoban T.J., 1998: Trends in consumer attitude about agricultural biotechnology, *AgBioForm* vol. 1 (n. 1): 3-7.

Kanevski I., Maliga P., Rhoades D.F., Gutteridge S., 1999: Plastome engineering of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase in tobacco small subunit hybrid. *Plant Physiology* 119:133-141.

Kavanagh T.A., Thanh N.D., Lao N.T., McGrath N., Peter O.S., Horvath E.M., Dix P.J., Medgyesy P., 1999: Homeologous Plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events. *Genetics* 152, 1111-1122.

Key S., Ma J K-C., Drake P.M.W., 2008: Genetically modified plants and human health *J R Soc Med* 101: 290-298.

Khan M.S. in Maliga P, 1999: Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nat Biotechnol* 17: 910-915.

- Knoblauch M., Hibberd J., Prasher D.C., Hodge S., 1999: A galinstan expansion femtosyringe for microinjection of eucaryotic organelles and prokaryotes. *Nat Biotechnol* 17: 906-909.
- Koop H.U., Steinmüller K., Wagner H., Rössler C., Eibl C., 1996: Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylen glycol-mediated protoplast transformation. *Planta* 199: 193-201.
- Kota M., Daniell H., Varma S., Garczynski S.F., Gould F., Moar W., 1999: Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplast confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96:1840-1845.
- Mackenzie S., McIntosh L., 1999: Higher plant mitochondria. *The plant cell* 11: 571-585.
- Maier R.M., Neckeremann K., Igloi G.L., Koessel H., 1995: Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J Mol Biol* 251: 614-628.
- Maliga P., 2002: Engineering the plastid genome of higher plants *Current Opinion in Plant Biology*, 5:164–172.
- Malaga P., Nixon P.J., 1998: Judging the homoplasmic state of plastid transformants. *Trends in Plant Science* vol.3 št.10: 376.
- Marienfild J., Unsel M., Brennicke A., 1999: The mitochondrial genome of Arabidopsis is composed of both native and immigrant information. *Trend in plant science* vol.4 no.12: 495-502.
- Mower J.P., Case A.L., Floro E.R., Willis J.H., 2012a: Evidence against Equimolarity of Large Repeat Arrangements and a Predominant Master Circle Structure of the Mitochondrial Genome from a Monkeyflower (*Mimulus guttatus*) Lineage with Cryptic CMS. *Genome Biol. Evol.* 4(5):670–686.
- Mower J.P., Sloan D.B., Alverson A.J., 2012b: Plant mitochondrial genome diversity: the genomics revolution. In: Wendel JH, urednik. *Plant genome diversity volume 1: plant genomes, their residents, and their evolutionary dynamics*. New York: Springer: 123–144.
- Netherwood T., Martín-Orúe S.M., O'Donnell A.G., Gockling S., Graham J., Mathers J.C., Gilbert H.J., 2004: Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract, *Nature biotechnology* 2 (22): 204-209.
- Ogihara Y., Isono K., Kojima T., Endo A., Hanaoka M., et al. 2000: Chinese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) chloroplast genome: complete sequence and contig clones. *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 243-253.
- Palmer J.D., & Thompson, 1982 Chloroplast DNA rearrangement are more frequent when a large inverted repeat sequence is lost. *Cell* 29:537-550.
- Palmer J.D., Adams K.L., Cho Y., Parkinson C.L., Qiu Y.-L., Song K., 2000: Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: mobile genes and introns and highly variable mutation rates. *PNAS* 97:6960-6966.
- Population Reference Bureau, 2006: 2006 World Population Data Sheet. *Economic Information Bulletin Number 18*. Washington, DC: USDA Economic Research Service; August 2006. Dostopno na: <http://www.ers.usda.gov/publications/eib18/eib18.pdf>.
- Pusztai A., S. Bardocz G. G., Alonso R., Chrispeels M. J., Schroeder H.E., Tabe L.M. , Higgins T. J. V.. 1999: Expression of the Insecticidal Bean α -Amylase Inhibitor Transgene Has Minimal Detrimental Effect on the Nutritional Value of Peas Fed to Rats at 30% of the Diet, *J. Nutr.*, 129 (8): 1597-1603.
- Rodriguez-Moreno L., González V.M., Benjak A., Martí M.C., Puigdomènech P., Aranda M. A., Garcia-Mas J., 2011: Determination of the melon chloroplast and mitochondrial genome sequences reveals that the largest reported mitochondrial genome in plants contains a significant amount of DNA having a nuclear origin. *BMC Genomics* 12: 424.
- Rosegrant M.W., Paisner M.S., Mejer S., Witcover J., 2001: *Global Food Outlook Trends, Alternatives and Choices. A 2020 Vision for Food Agriculture and the Environment Initiative*. IFPRI, Washington DC.
- Ruf S., Hermann M., Berger I.J., Carrer H., Bock R., 2001: Stable genetic transformation of tomato plastids: foreign protein expression in fruit. *Nat Biotechnol*, 19:870-875.
- Russell J. A. , Roy M.K., Sanford J.C., 1992 Physical Trauma and Tungsten Toxicity Reduce the Efficiency of Biolistic Transformation. *Plant Physiology* 98, 1050-1056

- Scissum-Gunn K.D., Gandhi M., Backert S., Nielsen B.L., 1998: Separation of different conformations of plant mitochondria DNA molecules by field inversion gel electrophoresis. *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 219-229.
- Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M., Wakasugi T., Hayashida N et a., 1986a: The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: its gene organization and expresion. *EMBO J* 5: 2043-2049.
- Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M., Wakasugi T., Hayashida N., Matsubayashi T., Zaita N., Chunwongse J., Obokata J., Yamaguchi-Shinozaki K., Ohto C., Torazawa K., Meng B.Y., Sugita M., Deno H., Komogashira T., Yamada K., Kusuda J., Takaiwa F., Kato A., Tohdoh N., Simada H., Sugiura M., 1986b: The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: Its gene organization and expression. *EMBO J.* 5:2043-2049.
- Sidkar S.R., Serino G., Chaudhuri S., Maliga P., 1998: Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 18: 20-24.
- Sidorov V.A., Kasten D., Pang S.Z., Hajdukiewicz P.T.J., Staub J.M., Nehra N.S., 1999: Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J* 19: 209-216.
- Sjoberg L., 2004: Principle of risk perception applied to gene technology-EMBO reports 5, Supl. 1: 47 – 51.
- Svab Z., Maliga P., 1993: High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:913-917.
- Staub J.M., Garcia B., Graves J., Hajdukiewicz P.T.J. Hunter P., Nehra N., Paradkar V., Schlittler M., Carroll J.A. Spatola L. 2000: High -yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplast. *Nature Biotechnology* 18:333-338.
- Strauss S.H., Palmer J.D., Howe G.T., Doersken A.H., 1988: Chloroplast genomes of two conifers lack a large inverted repeat and are extensively rearranged. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3898-3902.
- Sugiura M., 1992: The chloroplast genome. *Plant Molecular Biology* 19: 149-168.
- Terasawa, K., Odahara, M., Kabeya, Y., Kikugawa, T., Sekine, Y., Fujiwara, M., and Sato, N., 2007: The mitochondrial genome of the moss *Physcomitrella patens* sheds new light on mitochondrial evolution in land plants. *Mol. Biol. Evol.* 24: 699–709.
- Tsumura Y., Ogiwara Y., Sasakuma T., Ohba K., 1993: Physical map of chloroplast DNA in sugi, *Cryptomeria japonica*. *Theor Appl Genet* 86:166-172.
- Tucker G., 2003: Nutritional enhancement of plants, *Curr Opin Biotechnol.* 14(2):221-5.
- Verma D., Daniell H., 2007: Chloroplast Vector Systems for Biotechnology Applications, *Plant Physiology* 145(4): 1129–1143.
- Van Bel A.J.E., Hibberd J., Prüfer D., Knoblauch M., 2001: Novel approach in plastid transformation. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 144-149.
- Wakasugi T., Tsudzuki J., Ito S., Nakashima K., Tsudzuki T., Sugiura M., 1994: Lost of the all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus Thumbergii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9794-9798.
- Whitney S., vonCaemmerer S., Hudson G.S., Andrews T.J., 1999: Directed mutaiton of the rubisco large subunit of tobacco influences photorespiration and growth. *Plant Physiology* 121:579-588.
- Žel J., 2008: Gensko spremenjene rastline = [Genetically Modified Plants]. *Sporoč. - Urad Repub. Slov. stand. merosl., št.* 6: 13-15.