

## ТРАНСГЕНЕ ДРВЕНАСТЕ БИЉКЕ У САВРЕМЕНОМ ОПЛЕМЕЊИВАЊУ ДРВЕЋА

ВАСИЛИЈЕ ИСАЈЕВ<sup>1</sup>САША ОРЛОВИЋ<sup>2</sup>МИЛАН МАТАРУГА<sup>3</sup>ВЛАДАН ЖИВАДИНОВИЋ<sup>4</sup>

**Извод:** Растуће потребе за производима од дрвета, као и општи значај еколошких, мелиоративних и економских функција шума захтевају примену савремених метода биотехнологије, при синтези и гајењу култивара и клонова дрвећа. Тестирање трансгених таксона дрвећа тренутно се одвија у 35 држава света, од чега се у 16 држава обављају само испитивања у пољским огледима, и то са малим бројем биљака, 12 – 2850 примерака. Ова релативно млада област биотехнологије и биологије дрвећа усмерена је на: (1) унапређење отпорности на патогене, пестициде и стрес; (2) управљање садржајем и структуром лигнина и (3) побољшање раста. Трансгено дрвеће, такође, има и велики потенцијал у другим областима примењених истраживања, као што је производња фитохемикалија, мелиорација загађених земљишта, унапређење очувања квалитета животне средине те у физиолошким истраживањима. Искуства из пољопривреде не могу се директно применити код шумских врста дрвећа и жбуња. Потребан обим и интензитет примене наведених метода рада у оплемењивању дрвећа и жбуња разликује се код различитих врста, у складу са њиховим биоэколошким карактеристикама. У овом раду представљени су неки од постигнутих резултата у примени биотехнологије код врста родова *Populus*, *Pinus*, *Picea*. Међутим, иако су резултати појединих тестова изузетно добри, генетски модификовано дрвеће још увек се не гаји комерцијално. У раду великог броја тимова, испитивања су фокусирана на четири групе својстава, која су, на основу резултата постигнутих при традиционалном оплемењивању дрвећа, приоритетна: унапређење квантитета и квалитета у производњи дрвне масе, толеранција на хербициде, отпорност према инсектима и контрола цветања.

**Кључне речи:** биотехнологија, ГМО, дрвеће, шумарство

---

<sup>1</sup> др Василије Исајев, ред. проф. у пензији, Универзитет у Београду Шумарски факултет, Београд

<sup>2</sup> др Саша Орловић, ред. проф., Универзитет у Новом Саду Институт за низијско шумарство и животињу средину, Нови Сад

<sup>3</sup> др Милан Мајаруга, ред. проф., Универзитет у Бањој Луци Шумарски факултет, Бања Лука, Република Српска

<sup>4</sup> Владан Живадиновић, дил. инж. шумарства, ЈП за издовање шумама 'Србијашуме' Београд ШГ 'Београд' Београд, директор; Удружење шумарских инжењера и техничара Србије, председник

**Abstract:** The growing needs for wood products and the general importance of ecological, economic and ameliorative functions of forests require the application of modern methods of biotechnology in the synthesis and cultivation of tree cultivars and clones. Transgenic tree taxon testing is currently conducted in 35 countries worldwide, 16 of which carry out investigations only in field trials with a small number of plants, generally from 12 to 2850. This relatively young field of biotechnology and tree biology is aimed at: (1) improving resistance to pathogens, pesticides and stress; (2) managing lignin content and structure and (3) improving growth. Transgenic trees have great potential in other areas of applied research, such as the production of phytochemicals, amelioration of contaminated soils, improvement of the environmental protection quality and physiological research. Experiences from agriculture cannot be directly applied to forest tree and shrub species. The required scope and intensity of applying these working methods to the breeding of trees and shrubs vary with species and depend on their bioecological characteristics. This paper presents some of the results achieved in the biotechnology of *Populus*, *Pinus* and *Picea* species. However, although some tests have produced excellent results, genetically modified trees are still not grown commercially. A large number of teams have directed their work to four groups of properties, which are, according to the results achieved in traditional tree breeding, considered a priority: improving the quantity and quality of wood production, herbicide tolerance, insect resistance and flowering control.

**Keywords:** biotechnology, GMO, trees, forestry

## 1. УВОД

У току историје човечанства спознаја о доприносу и значају шума за опстанак и развој људске заједнице мењала се паралелно са развојем општих знања, односно развојем друштва – од важности шума за склоништа, ловишта, извора сировина – до савремене свести и одговорности о њима као примарним копненим факторима за опстанак цивилизације на планети Земљи.

Биеколошке одлике дрвећа и шума, као и широки спектар њиховог општег значаја и производа, постављају бројне захтеве за очување и одржање њихове стабилност уз истовремено унапређење продуктивности и опште функционалности. Шуме су у јавности, по правилу, синоним за природу, због чега је и општи став јавности негативан према свему што може да поремети или угрози њихову стабилност. У Србији, за потребе шумарства, трансгене дрвенасте биљке - ГМ култивари, морају бити дугорочно тестирани у лабораторијским, расадничким и теренским условима пре комерцијалног коришћења. Без обзира на то, што је потенцијал ГМО дрвећа значајан, за шумарство, заштиту од свих облика ерозија и пејзажну архитектуру, тренутно, према Члану 2. Закона о ГМО Републике Србије, нједан модификован живи организам као ни производ од генетички модификованог организма не може да се стави у промет, односно гајити у комерцијалне сврхе на њеној територији\*\*\*\*.

Резултати примене биотехнологије, код пољопривредних култура и у микробиологији, утицали су да се ове методе динамично развијају и користе код шумског дрвећа. Предуслов за генетички инжењеринг шумског

дрвећа су проучавања и примена културе ткива, ћелије и протопласта, тако да је раст биљака у *in vitro* условима, основа за разумевање, и усмерено коришћење процеса раста, развоја и репродукције организама.

Примена молекуларних и генетских маркера је у методама биотехнологије, посебно утицала на развој оплемењивања дрвећа. Истраживања и примена молекуларних и генетских маркера заснивају се на фундаменталном знању о биолошким процесима, који условљавају раст, метаболизам, развој, репродукцију и интеракцију индивидуа у популацијама главних врста дрвећа. Највише информација о генетској варијабилности популација шумског дрвећа, добијено је у истраживања применом изоензима. Редослед аминокиселина у ензиму у јасном је односу према редоследу база одређених подручја DNA ланца тј. гена. Стога се ензими могу употребити за позиционирање гена, и примењују се као генетски маркери.

Од средине 80-их, број генетских маркера, за истраживања шумских врста дрвећа, растао је динамично (Исајев, В. *et al.*, 2007). Развој ДНК маркера, укључујући RFLP, VNTR, SSR, RAPD, AFLP, SSCP и SNP, створио је основе за унапређење и примену поузданих метода које се користе и код шумских врста дрвећа и жбуња, у истраживањима варијација кодирајућих, некодирајућих и високо варијабилних региона, како код нуклеарних генома тако и код генома органела - хлоропласта, митохондрија.

Молекуларни маркери, нарочито изоензими, су широко и успешно коришћени у утврђивању родитељства. RFLP и RAPD маркери су довољни нумерички показатељи за упознавање генотипова. У програмима оплемењивања одабраних врста, које се гаје плантажно, (највише топола), маркери имају неизоставну примену у процедурама као што су верификација клонског идентитета и детекција контаминације семенске плантаже. За врсте тврдог дрвета и неиндустријске врсте, употреба маркера, нарочито јефтинијих изоензима, условило је њихову убрзану и широку примену у системе оплемењивања. Примена молекуларних маркера, развијених код неких врста шумског дрвећа (нпр. полиморфизми појединачног гена (SNP) у генима *Picea abies*, *Pinus piraster* и *Pinus halepensis*, има велики значај у истраживањима: микросистематике дрвећа, репродуктивних процеса дрвећа, генетичке природе адаптивних и продуктивних особина врста дрвећа и др. (Исајев, В. *et al.*, 2007).

Избор методе биотехнологије, тестирања као и њихова комерцијална примена разликују се у пољопривреди и шумарству у неколико значајних аспеката:

- у пољопривреди култивари се тестирају током више комплетних опходњи, које, ако се изузме дрвенасто воће и винова лоза, трају једну вегетациону периоду (годину);
- у шумарству, закључци се изводе на основу тестова спроведених у делу опходње, с обзиром на то да, код већине комерцијалних врста дрвећа производни циклус – опходња - траје сто и више година.

Огледи за тестирање потенцијалне вредности и примене ГМО у шумарству су вишедеценијски, трају 20 – 30 година, за врбе и тополе; 50 – 80 година, за борове, смрчу, храстове и тд., због чега су комплексни и веома скупи (Исајев, В. *et al.*, 2005).

Прве резултате истраживања протеина електрофорезом објавио је Durzan 1966, проучавајући семе три врсте четинара. Истраживање изоалелног полиморфизма црног бора *Pinus nigra* Arnold (Nikolić, Ђ., 1982), спроведено је маркирањем гена одговорних за синтезу *естеразе* (Est), *ацидфосфатазе* (Acph) и *леуцилне минојейтидазе* (Lap). Варијабилност популација јасике (*Populus tremula* L.) и хибридних линија проучена је електрофорезом изопероксидазе из узорака лишћа (Guzina, V., 1980).

Селекција и контролисана хибридизација су у традиционалном оплемењивању дрвећа још увек највише коришћене методе рада. Међутим, у последњим декадама, савремене методе биотехнологије, као што су:

- техника рекомбинантне ДНК, која користи векторске системе;
- микроиницирање и микрокапсулација - увођење у организам наведеног материјала синтетисаног изван њега;
- технике формирања живе ћелије фузионисањем две или више ћелија, на начин како се то спонтано у природи не може одиграти, све више се тестирају и примењују у оплемењивању шумског дрвећа (Исајев, В. *et al.*, 1997; Konstatinović, В., Воšković, Ј., 2001). Њиховом применом постижу се резултати које није било могуће постићи на основу класичних метода рада, уз истовремену уштеду времена и редуковања трошкова.

## 2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

Биотехнологија се развија веома интензивно. Велик је број држава у којима се, мање-више комерцијално гаје синтетисане културне форме дрвећа (Констатиновић, Б. *et al.*, 2001). Више од десет година оснивају се специјализоване тест-културе у циљу упознавања могућих утицаја при гајења и даљем коришћењу производа добијених од генетички модификованих организама на културне и «дивље» популације биљака и животиња, као и на опште карактеристике животне средине. Оснивање тестова вишеструко је значајно, јер не постоје још увек поуздане информације о могућим утицајима гајења ГМО на екосистеме, односно, да ли постоје и какви су ефекти њихове примене на стабилност екосистема и здравље хумане популације. Последња чињеница посебно изазива пажњу и опрез код јавности.

Методе биотехнологије, које се примењују у шумарству, могу се класификовати на више начина (Исајев, В. *et al.*, 1997; Yanchuk, A.D., 2001; Wheeler, N. *et al.*, 2005; Henderson, A.R. *et al.*, 2006; Trontin, J.F. *et al.*, 2007). У основи оне припадају следећим категоријама:

- маркери (биохемијски и молекуларни);
- размножавање и мултипликација;

- геномика (функционална, структурна, компаративна);
- Marker-assisted селекција (MAS) и оплемењивање;
- генетске модификације;
- техника рекомбинантне ДНК, која користи векторске системе;
- микроиницирање и микрокапсулација - увођење у организам наследног материјала синтетисаног изван њега;
- технике формирања живе ћелије фузионисањем две или више ћелија, на начин како се то спонтано у природи не може одиграти.

Број земаља у којим се тестира примена ГМ дрвећа и жбуња још увек је мали (табела 1. и 2). У примени генетичког инжењерства код шумских врста, добри резултати постигнути су при трансферу азотобактерија, које фиксирају азот у микоризној гљиви *Rhizopogon*, која је у симбиотској заједници са кореном *Pinus radiata* (Аћуја, М. Р., 1983). Битан предуслов за примену генетичког инжењерства код шумског дрвећа је овладавање методама рада које ће обезбедити да раст биљака, добијених *in vitro* условима, прати касније њихов успех у преживљавању и развоју у пољским условим, ван стерилних, лабораторијских погодности.

**Табела 1.** Врсте и хибриди дрвећа који се тестирају применом ГМ, у земљама ЕУ (Исајев, В. *et al.*, 2005)

**Table 1** Species and hybrids of trees tested using GM in EU countries (Isajev, V. *et al.*, 2005)

ВРСТЕ И ХИБРИДИ / SPECIES AND HERBICIDES							
<i>Eucalyptus</i> sp.		1			1		2
<i>Populus tremula</i>	2						2
Хибридна врста <i>Populus alba x tremula</i>				1			1
Различити културари врста рода <i>Populus</i>				2	1		3
<i>Populus canescens</i>		1		4	1		6
<i>Betula alba</i>			2				2
<i>Robinia pseudoacacia</i>				2			2

Примена биотехнологије у шумарству има растући тренд, како у активностима за унапређење производње сировина на бази дрвета, тако и опште корисних функција шума. У зависности од одлика врсте, као и намена производа у чију се сврху примењују, примена наведених метода се веома разликују. Рад са трансгеним биљкама у шумарству усмерен је на:

- унапређење толерантности на патогене, пестициде и стрес;
- побољшање раста и развоја;
- управљање синтезом, садржајем и структуром лигнина;

- продукцију фитохемикалија;
- мелиорацију загађених земљишта (фиторемедијацију);
- унапређење очувања квалитета животне средине (Herschbach, С., Коррива, S. (2002)).

**Табела 2.** Број тестова са ГМО у земљама ЕУ  
**Table 2** Number of GMO tests in EU countries

Држава / State	Година / Year												Укупно / Summary
	91	92	93	94	95	96	97	98	99	01	02	03	
Аустрија						2	1						3
Белгија		26	16	17	11	7	7	6	8	16	5	7	126
Данска		5	1	5	4	5	10	4	5	1			40
Финска					1	3	6	3	3	3	1		20
Француска		1	35	57	69	91	72	70	64	34	17		510
Немачка		3	1	8	12	17	20	18	23	7	8	5	122
Грчка						1	5	7	6				19
Ирска							2	2				1	5
Италија			5	19	43	50	46	43	51	18	5	9	289
Холандија	4	15	9	25	16	10	14	19	5		19	4	140
Норвешка									1				1
Португалија			2	2	1		3	3	1				12
Шпанија			3	10	11	16	44	39	39	19	19	3	203
Шведска					8	10	9	8	19	6	2	2	64
Велика Британија		16	17	23	37	27	25	22	13	25	12	4	221
Укупно	4	66	89	166	213	239	264	244	238	129	88	35	1775

### 3. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА И ДИСКУСИЈА

У даљем тексту дат је краћи приказ неких од добијених резултата у раду са ГМ шумским врстама дрвећа на светском нивоу.

Тополе (Genus *Populus L.*) су одабране за моделне организме у шумарској биотехнологији, применом генетских модификација, јер су до сада постигнути резултати у оплемењивању врста и културних таксона овог рода, и рода врба – (Genus *Salix L.*), неупоредиво већи у поређењу са резултатима постигнутих код врста из родова *Fagus*, *Quercus*, *Acer*, *Fraxinus*, *Ulmus* и других, привредно значајних лишћарских таксона. У генетској модификацији топола, истраживања, тестирања и оперативна примена усмерена су на четири групе својстава, која имају и највећи комерцијалним потенцијал: модификација дрвета, толеранција на хербициде, отпорност према инсектима и контрола цветања.

Експериментима са генетички трансформисаним врстама, хибриди-ма и клоновима рода *Populus L.*, анализирано је више појава и својстава (Fladung, M. *et al.*, 1997):

- миграција гена и потенцијални ефекти на животну средину;
- у области физиологије - раст, водни стрес, микориза;
- отпорност на хербициде;
- отпорност на болести и инсекте;
- биосинтеза, садржај и састав лигнина;
- редукција токсина после хемијске прераде дрвета;
- већи принос пуле.

Активност инсектицида и утицај трансгеног хибридног клона тополе 741, који садржи ген *Bacillus thuringensis* (BtCry1Ac) и ген за инхибиторну протеиназу штитастих ваши (API), испитивана је током две године на раст и развој различитих инсеката дефолијатора (Yang, M.S. *et al.*, 2003). Стабилност експресије трансгена током овог периода је доказана. Биолошки утицаји трансгеног клона тополе 741 на ларве губара, и других инсеката дефолијатора испитивани су на годишњем нивоу. Раст и развој преживелих ларви био је знатно умањен, каснио је и у неким случајевима чак није могао бити ни завршен стадијумом лутке.

У циљу утврђивања вегетативног капацитета распостирања трансгених стабала јасике (*Populus tremula L.*) постављен је у Немачкој, 1996. године, први експеримент са генетички трансформисаним индивидуама ове врсте (Fladung, M. *et al.*, 2003). Теренски оглед основан је са 457 једногодишњих биљака, укључујући осам трансгених линија јасике са 35S-rolC или rbcS-rolC генском конструкцијом и три контролна клона. Током 1998. и 2000. године, 12 биљака из трансгених линија - са 35S-rolC генском конструкцијом формирало је пупољке женских цвасти. Укупно је 234 избојка посечено у 2000. и 2001. години и анализиран је њихов трансгени статус. Више од половине испитаних избојака показало је присуство rbcS-rolC генске конструкције. Добијени резултати спроведених истраживања указали су на то да је могућност распрострањења вегетативних трансгених вишегодишњих биљака такође важан и мора бити укључен у исраживања процене ризика при гајењу генетички модификованих топола.

DNK која доспева у земљиште приликом разлагања лишћа и корења трансгених култивара топола истовремено је доступна за земљишну микрофлору и фауну. Обављена испитивања потврдила су постојаности рекомбинантних маркер гена биљака у распаднутом лисном материјалу трансгених топола (Hay, I. *et al.*, 2002). Проучана је стабилност DNK помоћу неомицин-фосфотрансферазе II, резистентног маркера коришћеног у генетичком инжењерингу дрвећа. Трајност DNK у спољашњој средини одређивана је тако што су вреће са лишћем трансгених топола остављане, у природним условима на огледном пољу 12 месеци на тлу. Ова испитивања су први сегмент квантитативних анализа стабилности DNK дрвећа у природним шумским условима. Добијени резултати су показали да фрагменти генетички модификоване DNK могу бити детектовани на терену у трајању до 14 месеци.

Доказана је стабилност експресије трансеног хибридног клона тополе 741, који садржи ген *Bacillus thuringensis* (BTCRY1AC) и ген за инхибиторну протениазу штитастих ваши (API) на раст и развој различитих врста инсеката дефолијатора (Yang, C.P. *et al.*, 2001).

Могућност преживљавања биљака у анаеробним условима у току поплава, анализиран је код трансгених хибрида трепетљике и беле тополе (*Populus tremula* x *P. alba*). Код овог трансеног хибрида, ген из кукуруза (GAPC4) сигнификантно је утицао на преживљавање биљака у анаеробним условима поплаве.

Упознавање природе стабилности трансгених експресија код топола обављено је упоредним анализама клона хибрида трепетљике и беле тополе – (*Populus tremula* x *P. alba*). Анализе трансене експресије применом гас флуорометрије и хистометрије обављене су на неколико стотина стабала. Трансгени су у витро условима, у условима расадника и на терену имали стабилну експресију током 6-годишњег периода. На основу ових резултата може се смтрати да трансене експресије код дрвећа остају стабилне током дужег периода.

Поред интензивних истраживања са јасиком и њеним унутарврским и међуврским хибридама, у јужној Финској основан је теренски оглед са 15 трансгених линија брезе у које је уграђен ген IV изданака шећерне репе. Оглед је основан у циљу испитивања утицаја нивоа експресије гена IV на отпорност брезе на гљивична обољења (Rasonen, HL. *et al.*, 2004). Симптоми изазвани патогеним гљивама, *Pyrenopeziza betulicola* (пегавост лишћа) и *Melampsorium betulinum* (рђа), анализирани су на терену током три године. Линије које су показале висок ниво акумулације mRNK IV изданака шећерне репе у расаднику, такође су показале висок ниво експресије овог гена после три године на терену. Ниво експресије гена IV изданака шећерне репе није битно утицао на отпорност трансене брезе на болест пегавости лишћа. Неке од трансгених линија су чак биле подложније пегавости лишћа од контроле. Ниво експресије гена IV изданака шећерне репе имао је позитиван ефекат на већину параметара болести рђе брезе; групе линија које су показивале високу или интермедијарну експресију трансена биле су отпорније на рђу од оних које су показивале ниску експресију.

Комбиновањем економске ефикасности са смањењем непожељних утицаја и могућег нарушавања стабилности животне средине, потврђена је оправданост даљњих истраживања и примене биотехнологије у плантажном гајењу меких лишћара, као и у хортикултури. Успеси постигнути у примени ГМО у гајењу топола и других лишћарских врста, условили су да се и код четинара, посебно у земљама где су оне привредно најзначајније врсте, актуелизују примену ових метода биотехнологије. Генетичка трансформација четинара је усмерена на побољшање динамике раста, физичких, механичких и хемијских својстава дрвета, толеранције на болести и стрес и резистентност на хербициде. Основне методе рада које се примењују при генетичкој модификацији четинара су партикуларно бомбардовање и трансформације помоћу агробактериума.



Две основне методе рада - “партикуларно бомбардовање” и трансформација помоћу агробактериума, примењују се и код четинара (Tang, W. *et al.*, 2003). Употребом партикуларног бомбардовања произведене су стабилне трансгене биљке врста: *Picea abies*, *P. glauca*, *P. mariana* и *Pinus radiata*. Трансгене биљке врста: *Larix decidua*, *Picea abies*, *P. glauca*, *P. mariana*, *Pinus strobus*, *P. taeda* и *P. radiata*, добијене су путем трансформације помоћу агробактериума. Трансформације посредством агробактериума показале су извесне предности над партикуларним бомбардовањем јер је једноставније обједињавање узорака и ограничене су измене унешене ДНК. Генетичка трансформација четинара тренутно је усмерена на унапређење динамике раста, својстава и квалитета дрвета, отпорности на болести, толеранције на стрес и резистентности на хербициде, што за шумарство представља нову еру побољшања продуктивности и квалитета.

### 3.1 Садржај и биосинтеза лигнина

Лигнин је поред целулозе и хемицелулозе једна од три основе градивне компоненте дрвета у којој учествује приближно са 25-30%. Синтетише се полимеризацијом основне јединице – фенилпропена. Редукција биосинтезе лигнина је изузетно битна, код врста које се примарно користе у производњи пулпе. Редукцијом садржаја лигнина смањују се трошкови индустријског процеса њене производње и редукују се издаци неопходни за спровођење стандарда за очување квалитета животне средине. Ну, W. - J. *et al.* (1999); међу првима су указали на значај примене генетског инжењерства за квантитативну модификацију синтезе лигнина у дрвету, код врста које се користе у индустрији целулозе и папира. У експерименту је применом коензима ligase (4CL), код америчке трепетљике (*Populus tremuloides* L.) постигнута је редукција лигнина за 45% .

### 3.2 Контрола цветања

Постоји изражен опрез о могућим нежељеним ефектима, које може индуковати цветање ГМ дрвећа, из ког разлога се спроводи контрола код цветања трансгеног дрвећа (Meilan, R. *et al.*, 2001). Применом генетског инжењерства могуће је условити репродуктивну стерилност – индуковањем полиплоидије, порамећајима или прекидима процеса који регулишу микро-и макрогаметогенезу, отклањањем пријемљивост фертилних љуспи или жига тучка, или блокадом процес сазревања урода. Одсуством функционалности полена спречиће се контаминација природних популација ГМ поленом, семеном и плодовима. Допунски позитиван ефекат одсуства урода биће у повећању прираста дрвне масе.

### 3.3 Фиторемедијација

Коришћењем трансгених биљака, у фиторемедијацији је реалативно нов методски приступ, чији су ефекти изузетно успешни. Експериментално је

утврђено да су трансгене биљке ефективне у транслокацији арсена и селена из земљишта у коренов систем и стабло (Dhankher, O.P. *et al.*, 2002; LeDuc, D.L. *et al.*, 2006). Трансгене биљке су толерантније и поседују израженији потенцијал за деградацију експлозива у земљишту (French, C.E. *et al.*, 1999; Hannik, N. *et al.*, 2001) и за детоксикацију локација контаминираних живом (Bizily, S.P. *et al.*, 2000; Meagher, R.B., 2000).

Код дрвенастих врста, трансгена америчка црна топола (*Populus deltoides*) може се сматрати „кључним дендроремедијентом“. У селекциона стабла ове врсте транспонован је из *E. coli merA18* меркурни редуктаза (*mer*), према Rugh, C.L. *et al.* (1998). Резултати експеримента показали су да је редукција присуства јона живе, у односу на контролне површине, била 78% већа.

#### 4. ЗАКЉУЧЦИ

Примена генетички модификованих организама у шумарству подразумева вишедеценијске тестове, уз истовремено унапређивање знања о компаративним предностима и ризицима којима се карактерише примена биотехнолошких метода рада. На основу до сада постигнутих резултата, у бројним огледима, као и при оснивању и коришћењу комерцијалних плантажа лишћара и четинара у САД, Кини, Бразилу и другим државама, може се закључити да је:

- преношење гена и њихова манипулација код дрвећа комплексна и захтева пажљиво разматрање;
- генска експресија код вегетативно умножених трансгених врста дрвећа стабилна;
- соматска варијација међу клоновима умерена и контролисана;
- теренски огледи су поуздан метод за анализу функционалне геномике;
- трошкови огледа са трансгеним биљкама су велики, али их редукују потенцијалне вредности у примени добијених резултата;
- доместификација трансгена отвара нове путеве за унапређење биосигурности;
- трансфер гена путем полена, ветром ношеног семена и(или) плодова, као хумификација лишћа и четина у земљишту, представљају могућу опасност за очување биодиверзитета шумских заједница, као и земљишне флоре и фауне.

Према расположивим подацима, до сада није утврђен ни један специфичан неповољан ефекат индукован ГМ дрвећем. Нису евидентирани ни негативни утицаји ГМ дрвећа на еколошки и специјски диверзитет или утицај на људско здравље. С обзиром на растуће потребе за свим комерцијалним производима шума, као и њиховим општекористним и функцијама, уз последице које доносе глобалне климатске промене, питање је времена и уложених средстава када ће се постојећи однос и динамика примене ГМО у шумарству променити.

На основу бројних резултата добијених тестирањем и гајењем трансгених лишћарских и четинарских врста дрвећа у лабораторијама и на терену, може се сматрати да је трансформација применљив метод рада за истраживања у биотехнологији и функционалној геномици дрвенастих биљака.

Без обзира на то, што је потенцијал ГМО дрвећа значајан, за шумарство, заштиту од свих облика ерозија и пејзажну архитектуру, тренутно, према Члану 2. Закона о ГМО Републике Србије\*\*\*\*, ниједан модификован живи организам, као ни производ од генетички модификованог организма, не може да се стави у промет, односно гаји у комерцијалне сврхе на територији Србије.

## ЛИТЕРАТУРА

- Ahuja, M.R. (1983): Short note: Isolation and culture of mega and normal protoplasts in aspen. *SILVAE GENETICA* 32 (5-6):66-77
- Bizily, S.P., Rugh, C.L., Meagher, R.B. (2000): Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. *Nature Biotechnology*, 18: 213–217.
- Dhankher, O.P., Li, Y., Rosen, B. P, Shi, J., Salt, D., Senecoff, J.F., Sashti, N.A., Meagher, R.B. (2002): Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and gamma-glutamylcysteine synthetase expression. *Nature Biotechnology*, 20: 1140–1145
- Durzan, D.J. (1984): Potential for genetic manipulation of forest trees: totipotency, somaclonal aberration and trueness to type. International Symposium of Recent Advances in Forest Biotechnology, Grand Traverse Resort Village, Travers City, Michigan, June 10-13, 1984:104-125
- Fladung, M., Grossmann, K., Ahuja, M.R. (1997): Alterations in hormonal and developmental characteristics in transgenic *Populus* conditioned by the *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Plant Physiology*, 150: 420–427.
- French, C.E., Rosser, S.J., Davies, G.J., Nicklin, S., Bruce, N.C. (1999): Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing penta-erythritol tetranitrate reductase. *Nature-biotechnology*, 17: 491–494.
- Fladung, M., Nowitzki, O., Ziegenhagen, B., Kumar, S. (2003). Vegetative and generative dispersal capacity of field released transgenic aspen trees. *TREES-STRUCTURE AND FUNCTION*, 17 (5): 412-416
- Guzina, V. (1980): Estimation of the genic variability of aspen (*Populus tremula* L.) by the use of polymorphism of isoperoxidase. Poplar Research Institute. Novi Sad, Yugoslavia. WORKS. Book 9:1-146
- Hannink, N., Rosser, S.J., French, C.E., Basran, A., Murray, J.A.H., Nicklin, S., Bruce, N.C. (2001): Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase. *Nature Biotechnology*, 19: 1168–1172.
- Hay, I., Morency, M.J., Seguin, A. (2002): Assessing the persistence of DNA in decomposing leaves of genetically modified poplar trees. *Canadian Journal of Forest Research*. Canada.
- Herschbach, C; Kopriva, S. (2002): Transgenic trees as tools in tree and plant physiology. *Trees-Structure and Function*. 16 (4-5): 250-261
- Henderson, A.R., Walter, C. 2006. Genetic engineering in conifer plantation forestry. *Silvae Genetica*, 55(6): 253–262.
- Hu, W.-J., Harding, S.A., Lung, J., Popko, J.L., Ralph, J., Stokke, D.D., Tsai, C.-J. & Chiang, V.L. 1999. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. *Nature Biotechnology*, 17: 808–815. -*Revue Canadienne de Recherche Forestiere*, 32 (6): 977-982

- Isajev, V., Konstatinov, K. (1997): Biotechnology and the genetic improvement of forest trees. The 3<sup>rd</sup> International conference on the development of forestry and wood science/technology. Proceedings book volume I, Belgrade: 38-44
- Isajev, V., Orlović, S., Bošković, J. (2005): Significance of genetically modified forest trees and shrubs for forestry. *Journal of Scientific Agricultural Research*. Vol. 66, No. 237. p: 79-87
- Исајев, В., Младеновић Дринић, С., Лучић, А. (2008): Примена молекуларних маркера у oplemeњивању четинара. Гласник Шумарског факултета, бр 98. Универзитет у Београду Шумарски факултет. Београд. (7-24) .
- Isajev, V., Lavadinović, V., Ivetić, V., Lučić, A. (2008): The use of genetically modified trees in forestry. Proceedings – International Scientific Conference: Forests and Forestry – Risks, Challenges, Solutions; 2-4 September 2008, Zvolen. Pp. 79-83
- Konstantinović B., Bošković J. (2001): Biotehnologija u zaštiti bilja. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu. Stylos. Novi Sad:9-29
- LeDuc, D.L., Abdel Samie, M., Montes-Bayon, M., Wu, C.P., Reisinger, S.J. & Terry, N. (2006): Overexpressing both ATP sulfurylase and selenocysteine ethyltransferase enhances selenium phytoremediation traits in Indian mustard. *Environmental Pollutants*, 144: 70-76.
- Libby W.J., Stettler R.F., Seitz, F.W. (1966). Forest genetics and forest-tree breeding. *Annual Review Genetics*. 3:469-495
- Meagher, R.B. (2000): Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinions in Plant Biology*, 3: 153-162.
- Meilan, R., Brunner, A., Skinner, J., Strauss, S. (2001): Modification of flowering in transgenic trees. pp. 247-256, in: A. Komamine & N. Morohoshi (editors). *Molecular breeding of woody plants*. Elsevier Science BV, Amsterdam, Netherlands.
- Nikolić, D. (1982): Izoenzimski polimorfizam crnog bora (*Pinus nigra* Arn.) u Jugoslaviji i nekim drugim delovima njegove prirodne rasprostranjenosti. Beograd. Doktorska disertacija u rukopisu. Str.:1-177
- Pasonen, HL; Seppanen, SK; Degefu, Y; Rytkonen, A; von Weissenberg, K; Pappinen, A. (2004). Field performance of chitinase transgenic silver birches (*Betula pendula*): resistance to fungal diseases. *Theoretical and applied Genetics*. 109 (3): 562-570
- Rugh, C.L., Senecoff, J.F., Meagher, R.B. & Merkle, S.A. (1998): Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nature*, 16: 925-928.
- Tang, W; Newton, R.J. (2003): Genetic transformation of conifers and its application in forest biotechnology. *Plant Cell Reports*. 22 (1): 1-15
- Tang, W., Tian, Y. 2003. Transgenic loblolly pine (*Pinus taeda* L.) plants expressing a modified {delta}-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* with enhanced resistance to *Dendrolimus punctatus* Walker and *Crypytothelea formosicola* Staud. *Journal of Experimental Botany*, 54: 835-844.
- Trontin, J.F., Walter, C., Klimaszewska, K., Park, Y.-S. & Walter, M.-A. 2007. Recent progress in genetic transformation of four *Pinus* spp. *Transgenic Plant Journal*, 1(2): 314-329).
- Wheeler, N., Jermstad, K.D., Krutovsky, K., Aitken, S.N., Howe, G.T., Krakowski, J. & Neale, D.B. 2005. Mapping of quantitative trait loci controlling adaptive traits in coastal Douglasfir. IV. Cold hardiness QTL verification and candidate gene mapping. *Molecular Breeding*, 15: 145-156.
- Yanchuk, A.D. 2001. The role and implications of biotechnological tools in forestry. *Unasylva*, 204: 53-61.
- Yang, C.P., Liu, G.F., Liang, H.M., Zhang, H. (2001): Study on the transformation of *Populus simonii* × *P. nigra* with salt resistance gene Bet-A. *Scientia Silvae Sinicae*, 37(6): 34-38.
- Yang, M.S., Lang, H.Y., Gao, B.J., Wang, J.M., Zheng, J.B. (2003): Insecticidal activity and transgene expression stability of transgenic hybrid poplar clone 741 carrying two insect-resistant genes *Silvae Genetica* 52. (5-6): 197-201
- (2009): Закон о іенейички модификованим орїанизмима (Сл. гласник РС, бр. 41/2009)

*Vasilije Isajev*  
*Saša Orlović*  
*Milan Mataruga*  
*Vladan Živadinović*

The growing needs for wood products and the general importance of ecological, economic and ameliorative functions of forests prove the necessity and soundness of the application of modern methods of biotechnology in the synthesis and cultivation of cultivars and clones. The growing importance of genetically modified trees is accompanied by the testing of GM trees, currently taking place in 35 countries worldwide, 16 of which carry out cultivation only in field trials, with a small number of plants from 12 to 2850. Transgenic woody plants are the main product of modern tree breeding. This relatively young field of biotechnology and tree biology is aimed at: (1) improving resistance to pathogens, pesticides and stress; (2) managing lignin content and structure and (3) improving growth. Transgenic trees have great potential in other areas of applied research, such as the production of phytochemicals, amelioration of contaminated soils, improvement of the environmental protection quality and physiological research. The use of various biotechniques, such as genetic engineering, molecular markers, somaclonal variation, protoplast fusion and micropropagation, will foster the introduction and targeted rearrangement of the genetic potential of tree and shrub species. However, agricultural experiences cannot be directly applied to forest tree and shrub species. The required scope and intensity of applying these working methods to the breeding of trees and shrubs vary with species and depend on their bioecological characteristics. This paper presents some of the results achieved in the biotechnology of *Populus*, *Pinus* and *Picea* species. However, although some tests have produced excellent results, genetically modified trees are still not grown commercially. A large number of teams have directed their work to four groups of properties, which are, according to the results achieved in traditional tree breeding, considered a priority: improving the quantity and quality of wood production, herbicide tolerance, insect resistance and flowering control. Although GMO trees have significant potential for forestry, protection against all forms of erosion and landscape architecture, currently, according to Article 2 of the Law on GMOs of the Republic of Serbia, no modified living organism or product of genetically modified organism cannot be placed on the market, i.e., cultivated for commercial purposes on the territory of Serbia.