

PATVIRTINTA
Lietuvos Respublikos aplinkos
viceministras Zdislovas
Truskauskas 2007 m. gruodžio 21
d.

GENETIŠKAI MODIFIKUOTŲ ORGANIZMŲ (AUGALŲ) RIZIKOS APLINKAI IR
ŽMONIŲ SVEIKATAI VERTINIMO METODINĖS REKOMENDACIJOS

I. ĮVADAS

1. Rizikos aplinkai ir žmonių sveikatai vertinimas yra vienas iš pagrindinių Lietuvos Respublikos genetiškai modifikuotų organizmų įstatymo (Žin., 2001, Nr. 56-1976; 2003, Nr. 34-1419; 2006, Nr. 77-2967), Europos Parlamento Tarybos direktyvos 2001/18/EB dėl genetiškai modifikuotų organizmų apgalvoto išleidimo į aplinką, Tvarkos aprašo, patvirtinto LR aplinkos ministro, sveikatos apsaugos ministro, žemės ūkio ministro, Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2002 m. gruodžio 31 d. įsakymu Nr. 681/689/525/753 "Dėl genetiškai modifikuotų organizmų ir genetiškai modifikuotų produktų rizikos žmonių bei gyvūnų sveikatai, aplinkai ir žemės ūkiui vertinimo tvarkos patvirtinimo" (Žin., 2003, Nr. 12-456; 2004, Nr. 154-5620), ir Europos Komisijos 2002 m. liepos 24 d. sprendimo 2002/623/EB, pateikiančio nurodymus, papildančius Direktyvos 2001/18/EB II priedo, reikalavimų ir Kompetentingai institucijai, ir Pranešėjui. Rizikos žmonių sveikatai ir aplinkai vertinimo tikslas - kiekvienu konkrečiu atveju nustatyti ir įvertinti galimą neigiamą genetiškai modifikuotų organizmų (toliau - GMO) poveikį žmonių sveikatai, aplinkai, kuris gali būti tiesioginis arba netiesioginis, greitas arba uždelstas ir kuris gali pasireikšti dėl apgalvoto GMO išleidimo į aplinką. Aplinkos ministerija, gavusi GMO rizikos aplinkai ir žmonių sveikatai vertinimo išvadas iš GMO priežiūros ir GMO ekspertų komitetų, priima sprendimą išduoti arba neišduoti leidimo.

2. Technologijos, leidžiančios svetimą organizmą genetinę medžiagą įvesti į augalo recipiento genomą ir paskatinti funkcinę raišką, atsirado šiek tiek daugiau kaip prieš du dešimtmečius. 1983 m. T. Hall perkėlus į saulėgražą pupų geną, prasidėjo intensyvus augalų genetinės modifikacijos tyrimų laikotarpis. Ši sritis sparčiai vystėsi. Nuo to laiko transgeninių augalų su pakeistais įvairiausiai požymiais skaičius nepaliaujamai didėjo, tobulėjo transgenų įvedimo į augalo recipiento genomą metodai, plėtėsi naujai sukurtų augalų ekonominio panaudojimo sritys. Augalų genetinės transformacijos metodas sudaro selekcininkams galimybę suteikti augalams tokius požymius, kokių neįmanoma suteikti kitais selekcinio darbo metodais. Genetiškai modifikuoti augalai (toliau - GMA) užima apie 10 procentų išsivysčiusių ir besivystančių valstybių žemės ūkio. Fundamentinių žinių kūrimo ir technologinės pažangos prasme GMA vertinimai yra optimistiški ir teigiami, tačiau žinios apie GMA yra kol kas labai neišsamios, todėl reiktų nuosekliai ištirti modifikuotus augalus prieš pradėdant juos auginti dideliuose plotuose. Kol kas nėra mokslinių faktų, įrodančių, kad GMA auginimo rizika žmogui yra didesnė nei auginant veisles, sukurtas mutagenezės ar tolimosios hibridizacijos būdu.

II. GENETIŠKAI MODIFIKUOTŲ AUGALŲ GALIMYBĖS IŠPLISTI APLINKOJE
DĖL PAKITUSIO GYVYBINGUMO ĮVERTINIMAS

3. Priklausomai nuo to, ar augalai yra dominuojantys tam tikrame areale, ar invaziniai, skiriasi galimybėmis paskleisti genus ir daryti poveikį aplinkai. Genetiškai modifikuoti jie taip

pat skirtingai veiks aplinką. Todėl konkrečiam regionui jie laikomi kaip darantys mažą, vidutinį ar didelį poveikį. Didelį poveikį darantiems augalams priklauso kryžmadulkiai, turintys daug laukinių giminaičių, su kuriais lengvai gali susikryžminti. Vidutinio poveikio augalams priklauso kryžmadulkiai, galintys kryžmintis su kai kuriais laukiniais giminaičiais. Mažo poveikio augalams priklauso vienmečiai ar dvimečiai augalai, dažniausiai savidulkiai, turintys mažai laukinių giminaičių, su kuriais sunkiai kryžminasi. Aplinkai didelį poveikį daro tie GMA, kurių reprodukcija ar invazinės savybės paspartėja.

III. ATSPARUMO ABIOTINIAMS SUNKUMAMS (ATSPARUMO ŠALČIUI, SAUSRAI, PADIDĖJUSIAI DRUSKŲ KONCENTRACIJAI) NUSTATYMAS

4. Atsparumas šalčiams yra svarbiausias sodo augalų žiemojimo komponentas. Augalų pažeidimai arba jų žūtis nuo šalčio - labai sudėtingas biologinis procesas, pirmiausiai nulemtas ląstelės protoplazmos struktūrų suirimu. Citoplazminių struktūrų pažeidimai - pagrindinis veiksnys, nulemiantis temperatūrų diapazoną, kuriame galimas genties, rūšies arba veislės auginimas. Veikiant žemai minusinei temperatūrai, ląstelėse formuojasi įvairios formos bei struktūros ledo kristalai. Ledas gali susidaryti ląstelės viduje arba tarpląstelinėje erdvėje. Dėl susidariusio ledo protoplazmos viduje ląstelė visada žūsta. Tačiau ląstelė taip pat gali žūti susidarius ledui tarpląstelinėje erdvėje. Tai priklauso nuo audinių aprūpinimo vandeniu laipsnio, ląstelių koloidų gebos surišti vandenį. Koloidų sugebėjimas surišti vandenį didele dalimi apsprendžia augalų atsparumą šalčiui. Augalų ištvermingumo žiemą veiksniai komplekse svarbiausią vietą užima jų atsparumas šalčiui įvairiais žiemojimo tarpsniais (P. Duchovskis, 1998). Išskiriami tokie svarbiausi augalų ištvermingumo žiemą komponentai: 1 - gebėjimas gerai užsigrūdinti rudenį; 2 - aukštas atsparumas šalčiui pirmoje žiemos pusėje; 3 - atsparumas šalčiui atodrėkių metu; 4 - atsparumas šalčiui padidėjus apikalinių meristemų mitotiniam aktyvumui anksti pavasarį; 5 - pumpurų, žiedų ir užuomazgų atsparumas pavasario šalnoms. Įvairūs šio komplekso komponentai nėra vienodai svarbūs skirtinguose augalų auginimo arealuose. Lietuvos sąlygomis pavojingiausias žiemojimo laikotarpis sodo augalams - sausio mėnesio antra pusė ir vasario mėnuo, kai temperatūra labai svyruoja, ne visos sodo augalų formos po atodrėkių sugeba išlaikyti užsigrūdinimo savybes arba naujai užsigrūdinti.

5. Egzistuoja keli būdai augalų atsparumui šalčiui įvertinti. Galimas viso augalo šaldymas kontroliuojamomis sąlygomis žemų viduržiemo temperatūrų pažeidimams įvertinti; elektrinės varžos spektrometrija pasikartojančių užšalimo-atšilimo ciklą daromiems pažeidimams įvertinti; kontroliuojamas šaldymas atskiriems ištvermingumo žiemai savybės komponentams nustatyti. Augalo atsparumo šalčiams vertinimas tiesioginio šaldymo metodu laikomas vienu objektyviausių. Vienas iš objektyvesnių netiesioginių atsparumo šalčiams vertinimo metodų yra diferencialinės terminės analizės metodas (DTA). Šio metodo esmė yra ta, kad, nuosekliai mažinant temperatūrą tiriamo audinio aplinkoje, audinio termogramoje galima išskirti temperatūrų skirtumo tarp audinio ir aplinkos didėjimo pradžią, kada prasideda vandens kristalizacija audinyje, šių procesų, taigi ir temperatūrų skirtumų maksimumą ir pabaigą, kada ledo kristalai formuojasi ląstelių vakuolėse, negrįžtamai pažeisdami citoplazmos membranas (? Daaęaęaeao, I. Aę. Aąoea, 1983). Augalai šaldomi įvairioje temperatūroje, pasirenkamoje priklausomai nuo augalo rūšies ir veislės atsparumo šalčiui, prieš tai grūdinant teigiama artima 0 °C temperatūrai 2-4 savaites. Nustatyta, kad įvairių augalų veislių ir sėjinukų atsparumas šalčiui in vitro patikimai skyrėsi tik šaldant

grūdintus augalus.

6. Vertinant sumedėjusius augalus tiesioginio šaldymo metodu, metūgliai šaldomi 4 kartus per žiemojimo sezoną: 1) vėlai rudenį - lapkričio pabaigoje, gruodžio pradžioje; šis šaldymas rodo veislių pasiruošimą žiemai; 2) maksimalaus užsigrūdinimo laikotarpiu - sausio mėnesio viduryje; 3) antroje žiemos pusėje - vasario mėnesį po atodrėkių ir pakartotinio užsigrūdinimo; šiam laikotarpiui būdingi dideli temperatūros svyravimai; 4) anksti pavasarį - kovo mėnesį, prasidėjus mitotiniam aktyvumui augalų audiniuose. Kiekvieno pavyzdžio 3-5 metūgliai šaldomi žemų temperatūrų kameroje dviejose temperatūrose, kurių parametrai parenkami atsižvelgiant į temperatūrų dinamiką lauke. Metūgliai prieš šaldymą grūdinami 3 dienas esant -5°C ir 3 dienas esant -10°C . Vėliau šaldymo temperatūra kameroje pasiekama mažinant po 3°C per valandą. Šaldymo temperatūroje ūgliai laikomi 14 val. Po šaldymo ūgliai laikomi išjungtoje uždarytoje kameroje, kol temperatūra joje susivienodina su aplinkos temperatūra. Vėliau ūgliai pamerkiami į silpną sacharozės tirpalą (1 %) ir po 1-2 savaičių vertinamas jų audinių pažeidimas pjūviuose. Metūglių atskirų audinių pažeidimai vertinami pagal 0-5 balų skalę: 0 - nepažeista, 0,5 - pažeista 1-10 % audinio, 1 - 11-20 %, 2 - 21-40 %, 3 - 41-60 %, 4 - 61-80 %, 5 - 81-100 % audinio. Kiekvieno ūglio audinių pažeidimai vertinami trijose vietose: apačioje, viduryje ir viršutinėje dalyje. Apskaičiuojamas vidutinis audinio pažeidimo balas. Metūglio pažeidimo laipsnis paskaičiuojamas taip: audinių pažeidimo balai dauginami iš sutartinių koeficientų, pasiūlytų I. Mičiurino genetinės laboratorijos (Rusija): brazdui - 9; žievei - 3; medienai - 2; apyšerdei - 2; šerdžiai - 1, o gauta sandauga sumuojama. Pagal pažeidimo laipsnį veislės grupuojamos taip: 0 - nepažeistos; 1-20 santykinų vienetų - labai mažai pažeista; 21-40 - mažai pažeista; 41-60 - vidutiniškai pažeista; 61-80 - stipriai pažeista; 81-100 - labai stipriai pažeista.

7. Diferencialinė terminė analizė (DTA) vykdoma specialiu prietaisu, pritaikytu dirbti su automatine augalų tyrimo sistema Ekoplant XI pagal metodiką, paruoštą Moldovos augalų fiziologijos institute (A. Kirilov et. al., 1998). Temperatūrų skirtumas matuojamas tarp aplinkos ir metūglio žievės. Prietaisas su tiriamais metūgliais laikomas šaldymo kameroje, kur temperatūra žeminama staigiai, pradėdant nuo aplinkos temperatūros.

8. Galimybė atrinkti atsparias šalčiui veisles in vitro, modifikuojant maitinamąją terpę. Braškių veislių, besiskiriančių savo atsparumu šalčiui in vivo, mikroaugalai auginami ir šaldomi in vitro trimis maitinamosios terpės Murashige ir Skoog (1962) variantais: 1) su fitohormonais BAP, ISR ir giberelino rūgšt.; 2) terpėje be fitohormonų; 3) terpėje su sumažintu sacharozės kiekiu (10 mg/l) ir jose šaldomi in vitro. Augimo regulatoriai terpėje lemia didesnę braškių atsparumą šalčiui in vitro.

9. Šalčio sukeltiems pažeidimams nustatyti naudojami keli metodai. Paprasčiausias - augalų būklės stebėjimas ir atsistatymo tyrimas po šaldymo, vėliau juos auginant šiltnamyje ir lauke (H. A. Quamme, 1991). Netiesioginių atsparumo šalčiui tyrimo metodų kriterijus yra ne absoliuti parametro reikšmė, o jo santykinis skirtumas tarp atsparių ir neatsparių šalčiui veislių.

10. Augalų atsparumo druskoms tyrimams naudojami vandeniniai skirtingos koncentracijos druskų tirpalai. Kontroliniame variante naudojamas distiliuotas vanduo (pH 5, 8). Norint išvengti papildomo įvairių ligų poveikio, sėklos prieš bandymus dezinfekuojamos. Po dezinfekcijos sėklos 5 kartus perplaunamos distiliuotu vandeniu, kiekvieną kartą jame pamirkus 10-15 min. Tada sėklos beriamos į daigintuvus ir daiginamos tamsoje. Sudygosios sėklos sėjamos į Petri lėkšteles su tam tikros koncentracijos druskos tirpalu. Daigai auginami $+24^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Septynių parų daigai išimami iš tirpalo,

išmatuojamas daigelių aukštis ir ilgiausia šaknis. Po to šaknys ir daigeliai atskiriami nuo sėklos, išdžiovinami +105 °C temperatūroje ir pasveriami.

11. Augalai gali nukentėti dėl vandens trūkumo dirvoje ir sausų orų. Žalingiausia augalams oro ir dirvožemio sausra vienu metu. Atsparumas sausrui priklauso nuo augalų amžiaus ir raidos tarpsnio. Atsparumas sausros stresui tiriamas kontroliuojant drėgmės režimą.

Literatūra

Duchovskis P. Problems of resistance to abiotic factors of horticultural plants in Lithuania and their solution // Sodininkystė ir daržininkystė. Mokslo darbai. 1998. Nr. 3. P. 3-12.

Quamme H. A. Application of termai analysis to breeding fruit crops for increased cold hardiness. // Hort. Sci.. 1991. 26:513-517.

Kirilov A., Kleiman E., Toma S. Express-method of the comparative assessment of frost resistance in perennial fruit crops // Sodininkystė ir daržininkystė. Mokslo darbai. 1998. Nr. 3. P. 39-48.

Daaęaęaead N., Aaęea I. Aę. Aęoaieia iaoaioeaaęaaiea o ?o?afloa?ęoaęae oiaę Pyrus, Prunus č Rosa/Oi é la inoi e nou oand?iće. 1983.

IV. REAKCIJOS Į AGROTECHNIKOS PRIEMONES (ATSPARUMAS HERBICIDAMS, AUGALŲ REGENERAVIMO IŠ ŠAKNŲ, VEGETATYVINIO DAUGINIMO SPARTOS, ĮSKIEPIO IR POSKIEPIO SUDERINAMUMO, TRAŠŲ ĮSISAVINIMO EFEKTYVUMO) NUSTATYMAS

12. Visi po genetinės transformacijos atsiradę augalo pakitimai gali paveikti kultūros augimą ir vystymąsi. Priklausomai nuo to, kokių tikslu augalas buvo transformuotas, kur jis bus auginamas ir kaip panaudojamas, gali skirtis jo reakcija į agrotechnikos priemones augalų recipientų atžvilgiu. Siekiant gauti optimalų modifikuotų augalų derlių, turi būti ištirta jų reakcija į agrotechnikos priemones ir augalo biologiniai požymiai: atsparumas herbicidams, augalų regeneravimas iš šaknų, vegetatyvinio dauginimo sparta, įskiepio ir poskiepio suderinamumas, trašų įsisavinimo efektyvumas. Agrotechnikos priemonių įtakos įvertinimas modifikuotų augalų kultūrai yra atliekamas pagal tradicines sodo, daržo ar lauko augalų vertinimo metodikas. Tačiau šalia kontrolinio varianto, be agrotechnikos priemonės, turėtų būti atliekami ir lyginamieji vertinimai su augalo recipientų kultūra.

13. Atsparūs amonio gliufosinatui GMA leidžia naudoti šios rūšies herbicidus reikalingomis koncentracijomis priklausomai nuo piktžolių kiekio ir rūšinės sudėties, nepaisant auginamos kultūros vystymosi tarpsnių. Tai leidžia padidinti piktžolių kontrolės efektyvumą, lanksčiau ir ekonomiškiau naudoti mažai liekanų dirvoje paliekančius herbicidus siekiant optimalaus derliaus kiekio, kokybės ir kainos. Tokiu atveju būtini atskirų kultūrų pasėlių piktžolėtumo, purškimų laiko ir kiekio tradiciniai lauko bandymai.

14. GMA regeneravimas iš šaknų ir vegetatyvinės dauginimo spartos tyrimai aktualūs genetiškai modifikuotiems augalams. Svarbu parinkti tinkamas agrotechnikos priemones, kai reikia išvengti sėklomis dauginamų augalų vegetatyvinės reprodukcijos. Tam reikalingi vegetatyvinio dauginimo atskiromis morfologinėmis augalo dalimis lauko ar laboratoriniai kiekybinių morfologinių ir fiziologinių, kokybinių genetinio kintamumo ir stabilumo požymių tyrimai.

15. Norint įvertinti, kaip genetiškai modifikuotas įskiepis ar poskiepis veikia morfologines ir fiziologines augalo savybes,

reikalingi tarpusavio suderinamumo tyrimai. Naudojamos iš augalų kultivuotų fitotranuose ir vegetaciniuose induose klasikinės lauko bandymų ir laboratorinių tyrimų metodikos. Trešimas - vienas iš svarbiausių faktorių siekiant optimalaus derlingumo. Maisto medžiagų kiekis, rekomenduotas augalams recipientams, nesubalansuotas genetiškai modifikuotai augalų kultūrai. Todėl norint užtikrinti maksimalų šių augalų bendrą derlingumą ar optimalią atskirų pirminio ar antrinio metabolizmo produktų sintezę, reikalingi išsamūs trešimo bandymai. Siekiant subalansuoti mineralinę GMA mitybą, atliekami daugiafaktoriniai trešimo bandymai pagal tradicines metodikas.

V. GALIMO POVEIKIO DĖL ĮTERPTOS GENETINĖS MEDŽIAGOS NUSTATYMAS POPULIACIJŲ GENETINEI ĮVAIROVEI PRIIMANČIOJE APLINKOJE

16. Genų dreifas galimas dėl kryžminimosi su laukiniais giminaičiais. Genų dreifas galimas per žiedadulkes ir sėklas. Plintant transgenams per sėklas, svarbūs atstumai tarp donorinio augalo ir recipiento, žiedadulkių gamybos produktyvumo, jų kokybės, paskleidimo lygio ir būdo. Genų dreifas per sėklas priklauso nuo augalų dauginimosi būdo. Prognozuojant genų dreifo galimybes, siūloma:

16.1. įvertinti hibridinių individų susidarymo galimybę natūraliomis sąlygomis;

16.2. įvertinti transgeno įvedimą populiacijos genofonde;

16.3. įvertinti transgeninių augalų stabilumą.

17. Čia svarbūs 4 rizikos analizavimo informacijos lygiai:

17.1. tarp savidulkių ar kryžmadulkių augalų vykstantis genų dreifas;

17.2. informacija apie transgenus;

17.3. informacija apie transgenus ir jų konstrukcijas;

17.4. speciali informacija apie transgeninio augalo genotipą.

Žiedadulkių gyvybingumo ir daigumo nustatymas

18. Atsižvelgiant į žiedadulkių funkciją per visą augalo gyvavimo ciklą, žiedadulkių gyvybingumą patikrinti galima panaudojant žiedadulkes augalams apdulinti ir išanalizuojant sėklų rinkinį. Tačiau tai daug laiko užimantis metodas. Todėl žiedadulkių gyvybingumui nustatyti dažnai naudojami kiti metodai. Pirmoje lentelėje pateikti dažniausiai naudojami metodai (A. Dafni, D. Firmage, 2000).

1 lentelė. Žiedadulkių gyvybingumo nustatymo metodai

Metodas	Privalumas	Trūkumas
X-gal testas (Trognitz 1991), Baker's procedūra (A. Dafni 1992), peroksidazinis rodiklis	Kintamas, priklauso nuo testo	Kintamas, dažniausiai taikomas tik kelioms rūšims
Gyvybingų žiedadulkių dažymas (FCR, TTC)	Labai greitas, tinkamas iš esmės visoms rūšims. Patikrinami citoplazmos fermentai ir kai kuriais atvejais plazminės membranos vientisumas	Ne visada koreliuoja su sėklų rinkiniu

Žiedadulkių daiginimas in vitro	Daug tikslesnis, nesudėtingas protokolas daugumai rūšių	Ne visų rūšių žiedadulkės lengvai sudygsta, optimali dygimo terpė gali skirtis rūšims. Be to, sudygimo dažnis in vitro gali būti mažesnis nei ant purkos. Šis metodas patikimesnis nei dažymas
Žiedadulkių dygimas in vivo	Imituoja natūralų apsidulkinimą, daug efektyvesnis nei žiedadulkių dygimas in vitro	Daug pastangų reikalaujantis metodas. Suderinamumo mechanizmai gali trukdyti kai kurių rūšių žiedadulkių dygimui
Sėklų rinkinys	Natūraliausias ir patikimiausias metodas nustatyti žiedadulkių gyvybingumą	Daug pastangų reikalaujantis metodas. Rankinis apdulkinimas gali nulemti žiedadulkių gyvybingumo rodiklius

19. Greičiausias būdas išanalizuoti žiedadulkių gyvybingumą - panaudoti dažus, reaguojančius su gyvybingos žiedadulkės fermentais ir parodančiais, kad ląstelinis turinys yra nepažeistas. Tam dažniausiai naudojami fluorochromatiniai dažai. Ši reakcija parodo esterazės aktyvumą žiedadulkėje, turinčioje nepažeistą plazminę membraną (K. R. Shivanna, J. Heslop-Harrison, 1981). Testą galima labai greitai atlikti laboratorijoje. Dažnai žiedadulkių gyvybingumo rezultatai koreliuoja su sėklų rinkimu. Žiedadulkių gyvybingumas gali būti nustatomas panaudojant įvairius dažus: aniline blue, iodine arba 1,2,3-triphenyl tetrazolium chloride.

20. Kitas dažnai naudojamas metodas yra žiedadulkių sudygimas in vitro. Daugumos rūšių žiedadulkių grūdėliai lengvai sudygsta ant terpės, turinčios boro rūgšties ir osmotiko (L. P. Taylor, P. K. Hepler, 1997). Tačiau, nepaisant paprastų pagrindimų reikalavimų terpei, optimali terpės sudėtis gali skirtis priklausomai nuo rūšies. Šiuo metodu gaunami patikimesni rezultatai nei dažant žiedadulkes.

Žiedadulkių gyvybingumas gali būti nustatytas ir po apdulkinimo, analizuojant jų sudygimą ant purkos arba po apdulkinimo gautą sėklų rinkinį. Abu metodai užima daug laiko.

21. Vaismedžių (abrikoso, vyšnios, trešnės) žiedadulkių gyvybingumui nustatyti buvo panaudota nemažai dažų testų: acetokarmino, propione carmin, anilin blue, safranin, Alexander's stain, IKI (iodine + potassium iodide), FDA (fluorescein diacetate), NBT (p-nitro blue tetrazolium), MTT (2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ir TTC (2, 2, 5-triphenyl tetrazolium chloride) (G. D. Oberle, R. Watson, 1953; D. J. Werner, S. Chang, 1981; M. P. Widrlechner, 1983; H. M. Pearson, P. M. Harney, 1984; C. W. Lee et al., 1985; S. Eti, R. Stosser, 1988; D. E. Parfitt, S. Ganeshan, 1989). Siekiant nustatyti tikslų gyvybingų žiedadulkių kiekį, būtini daigumo testai. Paprastai žiedadulkių daigumo dažniui nustatyti naudojami kabančio lašo ir agaro lėkštelių testai.

22. Vaismedžių žiedadulkėms sudygti paprastai užtenka tik

vandens ir angliavandenių šaltinio, o kitų rūšių augalai reikalauja pilnesnių terpių (C. W. Lee et al., 1985). Vaismedžių žiedadulkių daigumo dažnis priklauso nuo terpės ir reagentų koncentracijos. Todėl terpę reikia parinkti priklausomai nuo tyrimui naudojamos augalo rūšies ar veislės. Buvo atlikti keli tyrimai sąryšiai tarp žiedadulkių gyvybingumo ir daigumo nustatyti. G. D. Oberle ir R. Watson (G. D. Oberle, R. Watson, 1953) tokio sąryšio nepastebėjo, o D. J. Werner ir S. Chang (D. J. Werner, S. Chang, 1981), H. M. Pearson ir P. M. Harney (H. M. Pearson, P. M. Harney, 1984), D. E. Parfitt ir S. Ganeshan (D. E. Parfitt and S. Ganeshan, 1989), J. D. Norton (J. D. Norton, 1966) paskelbė teigiamą koreliaciją tarp šių dviejų charakteristikų.

Transgenų perdavimo lytiniu dauginimosi keliu nustatymas

23. Tyrimas atliekamas keliais etapais. Pirmame etape nustatomas transgeno perdavimas tos pačios rūšies nemodifikuotiems augalams. Tam atliekamas abipusis kryžminimas modifikuoto su nemodifikuotu augalu, išauginami iš gautų sėklų augalai ir PGR metodu įvertinimas transgeno pasiskirstymas palikuonyse.

24. Antrame etape identifikuojami visi laukimai modifikuoto augalo giminaičiai, kurie gali susikryžminti su GMA specifinėmis ekologinėmis sąlygomis. Į tai įeina žydėjimo laiko studijos lauke ir giminingų rūšių charakteristika, laukimų giminingų augalų susikryžminimo galimybių kryžminant rankomis įvertinimas ir spontaniška tarprūšinė hibridizacija šiltnamyje. Turi būti įvertintas spontaninių mutacijų laukinių augalų kultūroje koeficientas.

25. Trečias etapas apima natūralių hibridų ir jų tėvų augimo, vystymosi ir natūralios produkcijos palyginimą. Vėliau atliekama seka introgresijos tarp GMA ir laukimų giminingų augalų stebėseną, kaip chromosomų identifikavimo priemonė ir DNR markeris tarp hibridų ir tolesnių kartų.

Literatūra

Bolat I., Pirlak L. An Investigation on Pollen Viability, Germination and Tube Growth in Some Stone Fruits. Tr. J. of Agriculture and Forestry. 1999. 23. 383-388.

Dafni A. Pollination ecology: a practical approach. Oxford University Press. 1992.

Dafni A., Firmage D. Pollen viability and longevity: Practical, ecological and evolutionary implications. Plant Systematics and Evolution. 2000. 222: 113-13.

Eti S. and Stosser R. Fruchtbarkeit der Mandarinensorte V' Clementine' (Citrus reticulata Blanco) I. Pollenqualität und Pollenwachstum. Gartenbauwissenschaft. 1988. 53 (4): 160-166.

Lee C. W, Thomas J. C. and Buchmann S. L. Factors affecting in vitro germination and storage of jojoba pollen. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1985. 110 (5): 671-676.

Norton J. D. Testing of plum pollen viability with tetrazolium salts. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 1966. 89, 132-134.

Oberle G. D. and Watson R. The use of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride in viability tests of fruit pollens. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 1953. 61, 299-303.

Parfitt D. E. and Ganeshan S. Comparison of procedures for estimating viability of Prunus pollen. HortScience. 1989. 24 (2):354-356.

Pearson H. M. and Harney P. M. Pollen viability in rosa. HortScience. 1984. 19 (5): 710-711.

Shivanna K. R., Heslop-Harrison J. Membrane state and pollen viability. Annals of Botany. 1981. 47: 759-770.

Taylor L. P., Hepler P. Kl. Pollen germination and tube growth. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular

Biology. 1997. 48: 461-491.

Trognitz B. R. Comparison of different pollen viability assays to evaluate pollen fertility of potato dihaploids. Euphytica. 1991. 56: 143-148.

Werner D. J., Chang, S. Stain testing viability in stored peach pollen. HortScience. 1981. 16 (4):522-523.

Widrechner M. P., Pellett H. M., Ascher P. D. Fuhrman S. In vivo pollen germination and vital staining in deciduous azaleas. HortScience. 1983. 18 (1): 86-88.

VI. GENETIŠKAI MODIFIKUOTŲ AUGALŲ FENOTIPINIO IR GENOTIPINIO PATVARUMO ĮVERTINIMAS

26. Vienas iš būdų atskirti tradicinius ir genetiškai modifikuotus augalus - nustatyti molekulinis skirtumus tarp jų. Šie duomenys būtini charakterizuojant modifikuotą ar įkelta požymį, vertinant produkto saugumą ir siekiant išsiaiškinti, ar įvyko nenumatyta genetinė modifikacija.

Įterptos genetinės medžiagos raiškos dėsningumų augalo ontogenezės eigoje nustatymas

27. Aprašant transformacijai naudotą genetinę medžiagą, būtina pateikti išsamius visų vektorių aprašymus, DNR fragmentų skaičių, tvarką, orientaciją vektoriuje ir tinkamas restrikcijos vietas. Kiekvienam transformacijai naudotam vektoriui turi būti pateiktas išsamus visų genetinių elementų sąrašas ir seka, įskaitant koduojančią ir nekoduojančią seką (replikacijos pradžios, Agrobacterium DNR T galus, promotorius, žymenis). Kiekvienam iš šių elementų privaloma pateikti:

27.1. genetinės medžiagos tikslų apibūdinimą arba nuorodą į laisvai prieinamose duomenų bazėse esantį šaltinį, kur aprašyta genetinės medžiagos kilmė ir išskyrimas;

27.2. duomenis apie į vektorių integruoto genetinio elemento dalį, dydį ir jo vietą vektoriuje;

27.3. informaciją apie fragmento kilmę - donorinio organizmo mokslinis ir trivialūs vardai, išsami informacija apie donorinio organizmo sukeliamas ligas ar pažeidimus (gaminamus toksinus, alergenų, dirgiklius ar kitokius patogeninius agentus);

27.4. duomenis apie genetinio elemento koduojamus ar veikiamus baltymus, kurie galėtų sukelti kitų organizmų ligas ar pažeidimus;

27.5. duomenis apie molekulinės, biocheminės ir fiziologinės produkto savybes ir donoriniame organizme, ir siekiamas gauti transgeniniame augale.

28. Turi būti pateikti eksperimentiniai duomenys apie transformacijoje naudotos DNR įvedimo vietas genome, privaloma nurodyti, ar šie fragmentai yra branduolyje, mitochondrijose ar chloroplastuose. Aloploidinių augalų atveju nurodyti, kuriame tėviniame genome yra intarpas (insertas).

29. Kiekvienam intarpui turi būti pateikta:

Viso intarpo seka ir šoninių regionų sekos (apie 500 bp, būtina parodyti, kad visiškai atitinka augalo DNR). Skirtinga genetinė medžiaga ir jos integravimas turi būti tiksliai apibrėžta, bet kokie transgeno lokuso pertvarkymai turi būti pateikti schematiškai. Taip pat būtina pateikti šoninių sekų tyrimus naudojantis bioinformaciniais metodais. Naudojant bioinformacinius metodus, būtina patikrinti naujų chimerinių skaitymo rėmelių buvimą ir funkciją visoje sekoje. Jei aptinkamas chimerinis skaitymo rėmelis, išsiaiškinantis už šoninių sekų ribų, būtina praplėsti šoninių sekų tyrimą, kol bus pasiekta rėmelio pabaiga. Visų chimerinių skaitymo rėmelių raiška privalo būti ištirta. Tyrimo metodai turi būti aiškiai ir tiksliai nurodyti. Genetiškai modifikuotuose augaluose sukurtų nuskaitymo rėmelių

raiška turi būti nustatyta erdvinė, laikina baltymo struktūra ir specifiškumas. Jei transformacijos tikslas yra pakeisti endogeninių genų raišką (priešpasmės konstrukcijos, RNR interferencija), būtina iširti genų taikinių raišką. Visų kitų transformacijai naudotų ir iš dalies įkeltų į GM augalą genų tyrimų metu turi būti atlikti transkripto ir baltymo raiškos specifiniuose audiniuose tyrimai. Tokių tyrimų galima neatlikti tik tuo atveju, jei parodyta, kad nuskaitymo rėmelio sekoje nėra reguliacinių sekų, kad nuskaitymo rėmelis prijungtas prie augaluose neveikiančio neaugalinės kilmės promotoriaus. Reikia nurodyti, kur transkriptas yra transliuojamas, jei vyksta transkripcija. Transkripto transliavimo lygis ir specifiškumas augalo audiniuose turi būti parodytas visiems chimeriniams nuskaitymo rėmeliams.

30. Privaloma aiškiai aprašyti augaluose transliuojamus naujus baltymus ir jų savybes, jų taikinio baltymų, kurių raiška buvo planuota pakeisti, savybes. Jei DNR modifikacijos taikinyse buvo augalo baltymo sekoje esančios amino rūgštys ar jų seka, būtina pateikti modifikuotą amino rūgščių seką. Turi būti pateikti visi duomenys apie gautus ir tikėtinus baltymo savybių pakeitimus dėl amino rūgščių modifikacijos. Baltymo stabilumo ląstelėje ir aplinkoje tyrimai taip pat privalomi.

31. Turi būti pateikti statistiškai patikimi duomenys apie paveldimumo modelį ir įterptų sekų stabilumą, taip pat duomenys apie visų augalų naujai ekspresuojamų baltymų ir baltymų su koreguota raiška stabilumą. Sunkiau besidauginančių augalų (vegetatyviškai dauginamos vyriško steriliteto bulvės, vėlavai derantys medžiai) atveju privaloma pateikti duomenis apie GM požymio stabilumą ir perdavimą vegetatyvinio dauginimo metu.

32. Privaloma pateikti specifinių GMA pradmenų sekas, kurios leistų aiškiai identifikuoti transformacijos atvejį, taip pat detalius jų panaudojimo protokolus GMA aptikimui, nustatymui ir kiekybiniam įvertinimui. Pareikalavus privaloma pateikti GMA kontrolinę medžiagą.

33. Genų raiškos tyrimų metodai turi būti atlikti keliais iš šių metodų: Northern blot hibridizacija, EST (expressed sequence tags), SAGE (serial analysis of gene expression), AP-PCR RNR fingerprints (arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA), DNR gardelių. Visus duomenis reikia patikrinti realaus laiko PGR metodu. Turi būti pateikti visi šių metodų panaudojimo protokolai ir nuorodos į mokslinius šaltinius, įvertintas nustatymo metodu tikslumas ir jautrumas.

Transgenų kopijų skaičius ir organizacija

34. Transgenų kopijų skaičiui nustatyti tradiciškai naudojamas nukleorūgščių blotingo metodas - Southern blot (E. M. Southern, 1975). Šis metodas yra klasikinis nustatant tikslų inserto lokusų skaičių ir inserto organizaciją - vientisumą, kryptį. Pastaruoju metu plačiausiai taikomas transgeno kopijų nustatymo metodas yra realaus laiko kiekybinė polimerazės grandininė reakcija (Q-PCR) (D. J. Ingham et. al, 2001; M. G. Mason et. al, 2002). Dažniausiai kiekybinės PGR metu naudojamas TaqMan metodas. Norint nustatyti GMA kopijų skaičių pirmiausia reikia išskirti genomine DNR. Tai atliekama naudojant įvairius komercinius genomines DNR išskyrimo rinkinius arba pagal paskelbtas metodikas (J. J. Doyle, L. J. Doyle, 1990). Vėliau kuriami TaqMan zondai (pradmenys) pagal RT-PGR prietaiso gamintojo rekomendacijas, pvz., ABI User Manual 303014D. Pradmenys turi būti specifiški ieškomam genui. Realaus laiko PGR mišinys ruošiamas pagal įprastines procedūras (S. Bustin, 2000; D. J. Ingham et. al, 2001; S. Bustin, 2002; D. G. Ginzinger, 2002). Kiekybinės PGR metu stebimas TaqMan zondo fluorescencijos intensyvėjimas (S. Bustin, 2000). Pasibaigus PGR reakcijai,

skaičiuojamos transgeno kopijos pagal D. J. Ingham (D. J. Ingham et al, 2001) arba naudojama prietaiso gamintojo pateikta programa.

Genų raiškos transgeniniuose augaluose tyrimas

35. RNR tyrimai labai svarbūs genų raiškos tyrimams. Pagrindiniai genų raiškos tyrimų metodai yra Northern blotingas ir atvirkštinės transkriptazės PGR (RT-PGR), taip pat naudojami Western blotingas, ELISA ir kt. Sukurtos metodikos įvairių genų mRNR kiekių nustatymui. Genų raiškos tyrimas pradedamas nuo RNR išskyrimo, šio etapo kokybė yra lemiamą visame tyrime. RNR išskyrimas atliekamas naudojant komercinius RNR išskyrimo rinkinius arba pagal paskelbtas metodikas (M. G. Mason, S. Schmidt, 2002). Išskirtos RNR švarumą ir kiekį reikia patikrinti spektrofotometriškai (J. Sambrook et. al, 1989). Atliekama elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis, blotingas ir RNR perkėlimas (J. Sambrook et. al, 1989). Paruošiamas radioaktyvus žymuo (L. J. Kricka, 1995; L. J. Kricka, 2002). Vykdoma hibridizacija ir Dot-Blot hibridizacija (J. Sambrook et. al, 1989). Kitas genų raiškos metodas yra atvirkštinės transkriptazės PGR (RT-PGR). RNR išskyrimas vykdomas naudojant komercinius RNR išskyrimo rinkinius arba pagal paskelbtas metodikas (M. G. Mason, S. Schmidt, 2002). Kuriami TaqMan zondai, specifiki tiriamam genui (ABI User Manual 303014D). Nuo gautos RNR sintetinama kopijinė DNR (kDNR) panaudojant atvirkštinę transkriptazę (pagal rinkinio gamintojo pateiktas metodikas). Gauta kDNR naudojama ruošiant kiekybinę RT-PGR (W. M. Freeman, 1999). Vienos reakcijos metu galima nustatyti iki keturių genų naudojant skirtingus dažus. Kiekybinę RT-PGR atliekama pagal metodikas (C. A. Heid et. al., 1996; L. N. Sellner, 1998; W. M. Freeman, 1999), genų raiškos lygis paskaičiuojamas pagal gamintojo pateiktą programą.

Transgenų nustatymas augalų chromosomose

36. Transgenų nustatymas augalų chromosomose atliekamas fluorescencinės in situ hibridizacijos metodu (FISH). FISH metodas padeda nustatyti, kurioje chromosomos vietoje yra transgenas. Metodika apima žymėto zondo (homologiško ieškomai sekai) paruošimą, zondo hibridizaciją su chromosomomis ir hibridizuoto zondo aptikimą. Zondų paruošimo metodika plačiai aprašyta H. Salvo-Garrido ir kt. (H. Salvo-Garrido et al., 2001). Hibridizacijos atlikimui ir pavyzdžių paruošimui dirbti su mikroskopu, naudojamos T. Schwarzacher ir P. Heslop-Harrison pateiktos metodikos (T. Schwarzacher ir P. Heslop-Harrison, 2000). Naudojami mikroskopai, kurie pasižymi aukšta skiriamąja galia (pvz., Nikon Microphot-SA) naudojant gamintojo metodikas ir analizės programas (pvz., LUCIA KARYO + FISH).

Literatūra

Bustin S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 2002. 29, 23-39.

Bustin S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Mol. Endocrinol.* 2000. 25, 169-193.

Doyle J. J., Doyle J. L. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus.* 1990. Vol. 12, p. 13-15.

Freeman, W.M., Walke S. J., Vrana K. E. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. *Bio Techniques.* 1999. 26, 112-125.

Ginzinger D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp, Hematol.* 2002. 3ft, 503-512.

Heid C. A., Stevens L., Livak K. J., Williams P. M. Real-time

quantitative PCR. *Genome Res.* 1996. 6, 986-994.

Ingham D. J., Beer S., Money S., Hansen G. Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *Bio Techniques.* 2001. 31, 132-140.

Kricka L. J. Chemiluminescence and bio luminescence. *Anal. Chem.* 1995. 67, R499-R502.

Kricka, L. J. Stains, labels and detection strategies for nucleic acids assays. *Ann. Clin. Biochem.* 2002. 39, 114-129.

Mason G., Provero P., Vaira A. M., Accotto G. P. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. *BMC Biotechnol.* 2002. 2, 20.

Mason M. G., Schmidt S. Rapid isolation of total RNA and genomic DNA from *Hakea Actities*. *Funct. Plant Biol.* 2002. 29, 1013-1016.

Page A. F., Minocha S. C. Analysis of gene Expression in Transgenic Plants. *Methods in Molecular Biology. Transgenic Plants: Methods and Protocols.* 2005. 286, 291-312.

Salvo-Garrido H., Travella, S., Schwarzacher T., Harwood W. A., Snape J. W. An efficient method for the physical mapping of transgenes in barley using in situ hybridisation. *Genome.* 2001. 44, 104-110.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

Sellner L. N., Turbett G. R. Comparison of three RT-PCR methods. *BioTechniques.* 1998. 25, 230-234.

Schwarzacher T., Heslop-Harrison P. *Practical In Situ Hybridisation.* BIOS. 2000.

Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 1975. 98, 503-517.

VII. GENETIŠKAI MODIFIKUOTŲ AUGALŲ TEORINIS ALERGINĖS REAKCIJOS NUSTATYMAS

37. Alergija yra neigiama organizmo fiziologinė reakcija, pagrįsta imuninės sistemos jautrumu tam tikriems cheminiams junginiams - alergenams. Alergija būdinga individams su genetiniu polinkiu į alergiškumą. Alergenai augaliniame maiste ar žiedadulkėse yra baltymai. Kai kurių baltymų alerginės savybės gali išlikti skaidymo produktuose, pvz., peptidų fragmentai, todėl jie taip pat priskiriami prie alergenų.

38. GMA transformacija pagrįsta įterptos DNR genų raiška ir augalo-šeimininko genų raiškos reguliacija. Baltymų sudėties ir su tuo susijusių augalo alergeninių savybių pokyčiai gali turėti neigiamą poveikį augalinės produkcijos vartotojams, todėl būtina įvertinti GMA alergiškumo riziką. GMA alergijos riziką lemia:

1) transgeninio baltymo raiška maistui naudojamose augalo dalyse ar žiedadulkėse;

2) genetinės modifikacijos sąlygojami augalo ir iš jo gaminamų produktų alergijos pokyčiai, tokie kaip natūralių endogeninių alergenų raiškos padidėjimas.

39. Įvertinti baltymo alergiškumo galimybę yra sudėtinga. Dažniausiai alerginės reakcijos pasireiškimui svarbi alergenų sąveika su IgE tipo antikūnais. Kadangi numatyti alerginės reakcijos galimybę daugeliu atveju sudėtinga, įvertinti alergiškumo riziką naudojamas įvestas (integruotas), kelių pakopų, individualius atvejus atitinkantis vertinimo procesas. Suvestinė duomenų analizė leidžia įvertinti GMA ir produktų alergiškumo rizikos galimybę.

40. GMA alergijos pavojaus vertinimo metodikos gairės parengtos remiantis Europos maisto saugumo administracijos (EFSA), FAO/WHO ir Codex Alimentarius komisijos rekomendacijomis (Codex Alimentarius, 2002; EFSA, 2006; FAO/WHO, 2001; FAO/WHO, 2001A).

Īterptu genų baltyminių produktų alerginės reakcijos vertinimas

41. Naujų, iki transformacijos augalui nebūdingų baltymų raiškos sąlygojamas GM augalų alerginė reakcija priklauso nuo transgeninio baltymo prigimties. Transgeninių baltymų alerginė reakcija analizuojama naudojant kelių pakopų vertinimo procesą.

42. Pirmame etape atliekamas transgeninio baltymo sekos ir (ar) struktūros lyginimas su žinomais alergenais. Šio vertinimo tikslas - nustatyti transgeninio baltymo ir žinomų alergenų struktūros panašumą. Tokia informacija naudinga įvertinant baltymo alergiškumo potencialą. Paieška atliekama naudojant įvairius bioinformatikos metodus ir sekų/struktūros palyginimo algoritmus. Naudojamas veiksmų planas, įvertinantis alternatyvių tyrimo rezultatų galimybę. Moksliniais pagrindais yra įvertinama homologiškų sekų ilgio ir amino rūgščių panašumo sekose ribos, taip siekiant sumažinti klaidingų rezultatų apimtį.

43. Antrame etape įvertinama transgeninių baltymų alergiškumo galimybė *in vitro*, testuose panaudojant alergiškų pacientų serumus:

1) jei augalas transgeno šaltinis pasižymi alerginėmis savybėmis, tačiau transgeninio baltymo sekos panašumo su žinomais alergenais nenustatyta, tai alerginė reakcija vertinama imunocheminiais tyrimais, naudojant pacientų, pasižyminčių alergiškumu transgeno šaltiniui, serumo pavyzdžius. Teigiama IgE reakcija rodo didelę transgeninio baltymo alergiškumo tikimybę. Jei IgE reakcija yra neigiama, privaloma atlikti pepsino skaidymo ir kitus toliau nurodytus papildomus tyrimus;

2) jei transgeno šaltinis nepasižymi alerginėmis savybėmis, tačiau yra nustatytas transgeninio baltymo sekos homologija žinomo alergeno sekai, tuomet imunocheminiai tyrimai atliekami su alergiškų šiam alergenai pacientų serumais;

3) jei augalas transgeno šaltinis nepasižymi alerginėmis savybėmis ir nenustatyta transgeno sekos panašumo žinomų alergenų sekoms arba esant neapibrėžtiems serumų imunocheminių tyrimų rezultatams, tokiu atveju atlikti atsparumo pepsinui testą arba alergiškų serumų atranką.

44. Norint pagrįsti baltymų sekų/struktūros homologiškumo, imunocheminių tyrimų rezultatus ir papildyti nepakankamą alerginės reakcijos analizę, turi būti atlikti papildomi biocheminiai ir imunocheminiai tyrimai:

1) nustatyta, kad alergeniniai baltymai pasižymi atsparumu skaidymui proteolitiniais fermentais. Nors baltymų atsparumas pepsino proteazei ne visais atvejais tiesiogiai susijęs su alergiškumu, skaidymo pepsinu testas yra naudojamas kaip papildomas kriterijus įvertinant alergiškumo riziką. Pepsino skaidymui atsparių baltymų alergiškumas įvertinamas vélesniuose tyrimuose. Šiuo atveju reikėtų palyginti pepsino ir temperatūra denatūruoto baltymo sąveiką su IgE;

2) alergiško serumo atrankos tikslas yra nustatyti transgeninio baltymo sąveiką su IgE antikūnais. Trūkstant reikiamų serumų tyrimai gali būti atliekami naudojant modelines gyvūnų sistemas arba atliekant T-ląstelių epitopų, struktūrinių motyvų ir kt. paiešką;

3) papildomi duomenys apie transgeninio baltymo biologinę kilmę, funkciją ir struktūros ypatumus.

Genetinės transformacijos sąlygojamų viso augalo ir produktų alergijos pokyčių vertinimas

45. Jei genetinei transformacijai naudojamas augalas šeimininkas pasižymi alerginėmis savybėmis, tokiu atveju būtina įvertinti alergenų sudėties ir raiškos pokyčius lyginant su tradicinėmis augalų veislėmis.

VIII. ALERGINĖS REAKCIJOS VERTINIMO PROCESO ETAPAI

46. Identifikuoti genus, kurie buvo įterpti į GMA ir kuriems būdinga baltyminių produktų raiška šiuose augaluose.

47. Atlikti identifikuotų genų baltyminių produktų amino rūgščių sekos palyginimą su žinomų žmogaus alergenų sekomis, panaudojant alergenų duomenų bazes, ir įvertinti identifikuotų panašumų reikšmingumą.

48. Išanalizuoti teorinius duomenis ir nustatyti tiriamų GMA šeimininkų žinomų alergenų sudėtį.

49. Paruošti rekomendacijas apie tolesnį vertinamų GMA alergiško rizikos tyrimą.

IX. METODAI

Homologų paieška alergenų duomenų bazėse ir sekų palyginimo metodai

50. Siekiant vertinti į augalus įterptų genų baltyminių produktų alergiško panašumus žinomiems žmogaus alergenams, transgenų koduojamų baltymų aminorūgščių sekos palyginamos su žinomų alergenų sekomis, naudojant duomenų bazių duomenis (1 lentelė). Pirmiausiai atliekamas palyginimas naudojant FASTA metodą (P. Pearson, 1988), su pasikliovimo lygmens maksimalia verte $E = 10$. Patikimumo lygmens rodiklis E įvertina atsitiktinio panašumo tikimybę: kuo šio rodiklio didžiausia reikšmė mažesnė, tuo didesnis randamo panašumo patikimumas. Paprastai giminingoms (homologiškoms) sekoms būdinga $E < 0,1$ reikšmė. Didžiausia pasikliovimo lygmens E reikšmė: $E = 10$ užtikrina galimybę identifikuoti sekas, pasižyminčias nedideliu panašumo laipsniu, ir sukaupti daugiau duomenų, kurių reikšmingumas vėliau įvertinamas atsižvelgiant į kitus toliau nurodytus parametrus. Kiti FASTA metodo parametrai naudojami pagal kiekvienai duomenų bazei būdingus nustatymus.

1 lentelė. Alergenų duomenų bazės ir baltymų sekų paieškos ir palyginimo metodai.

Nr.	Pavadinimas	Organizacija	Interneto adresas	Paieškos metodai
1.	Allermatch	University of Wageningen	http://www.allermatch.org	1. FASTA, 2. > 35 % 80 a. r. atkarpoje 3. 6 a.r. identiškumas
2.	Allergen Database of the Central Science Laboratory	Department for Environment Food & Rural Affairs	http://www.csl.gov.uk/allergen	1. FASTA
3.	Allergen Online database v.7	Food Allergy Research and Resource Program (FARRP). University of Nebraska	http://allergenonline.com	1. FASTA, 2. > 35 % 80 a. r. atkarpoje
4.	Structural	University of	http://fermi	1. FASTA,

51. Įvertinti identifikuotų panašumų reikšmingumą tolesniam sekų palyginimui naudojamos Clustal W v.1.83 (J. Thompson et al., 1994) ir Jalview v2.07 programos (M. Clamp et al., 2004).

Antrinės baltymo struktūros modeliavimui naudojamos JNet serveris (J. Cuff et al., 2000). Alerginei reakcijai būdinga sąveika su antikūnais lemia trumpos alergeno amino rūgščių sekos sritys (5-10 a.r. liekanos), vadinamos epitopais. Mokslinėje literatūroje skelbiami alergeniškumo tyrimai rodo, kad bendras sekų panašumo įvertinimas gali būti nepakankamas siekiant identifikuoti galimus epitopus ilgose mažai giminingų baltymų a. r. sekose (S. M. Gendel, 1998). Todėl FAO/WHO rekomendacijose (FAO, 2001) nurodoma, kad šiam tikslui tinkamesnis alergeniškumo rodiklis yra didesnis nei 35 % sekų identiškumo laipsnis "slenkančioje" 80 amino rūgščių atkarpoje arba nuoseklus 6 amino rūgščių atkarpos identiškumas. Todėl atliekama papildoma alergenu sekų paieška naudojant specializuotus algoritmus, pateikiamus 1, 3 ir 4 duomenų bazėse (1 lentelė), kurie lygina sekas "slenkančioje" 80 a.r. atkarpoje arba atlieka 6 a.r. identiškų atkarpų paiešką.

GMA alergenu sudėties vertinimas

52. GMA alergeniškumo savybės įvertinamos remiantis šių maisto alergenu duomenų bazių duomenimis:

- 1) Food Allergens, Institute of Food Research, (<http://foodallergens.ifr.ac.uk/>);
- 2) Food Allergen Database, release 4, National Center for Food Safety and Technology, (<http://www.iit.edu/~sgendel/fa.htm>).

Alerginės reakcijos rizikos vertinimas

53. Alergijos rizika vertinama remiantis GM augalų alergiškumo rizikos vertinimo gairėmis, panaudojant sekų palyginimo rezultatus ir literatūroje skelbiamų tyrimų, tiesiogiai susijusių su vertinamais genais ar augalais, duomenis.

Literatūros sąrašas

Clamp M., Cuff., Searle S., Barton G. The Jalview java alignment editor. 2004. 20: 426-427.

Cuff J., Barton G. Application of multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. 2000.40:502-511.

Gendel S. M. The use of amino acid sequence alignments to assess potential allergenicity of proteins used in genetically modified foods. 1998. 42: 45-62.

Pearson W., Lipman D. Improved tools for biological sequence comparison. 1988. 85: 2444-2448.

Thompson J., Higgins D., Gibson T. Clustal w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. 1994. 22: 4673-4680.

Codex Alimentarius. Codex ad hoc intergovernmental task force on foods derived from biotechnology, third session, joint FAO/WHO food standards programme. 2002.

EFSA. Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. EFSA Journal. 2006. 99: 1-100.

FAO/WHO. Evaluation of allergenicity of genetically modified

foods, report of a joint fao/who expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. 2001.

FAO/WHO. FAO/WHO expert consultation on foods derived from biotechnology, evaluation of allergenicity of genetically modified foods. 2001.