



Moja życiowa przygoda z Monsanto

Wojciech K. Kaniewski

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

My adventure with Monsanto

Summary

Professor Wojciech Kaniewski after solid education in his native Poland was engaged for past 30 years in research in the United States. His first assignment was to solve epidemic of hop viruses in US. The program was so successful that he got his next assignment by USDA to work on potato viruses in Pacific NW. While working there, he was contacted by leading biotechnology company Monsanto to try using modern genetic engineering to protect major crops from virus infection. For the first few months he and his team generated tobacco and tomato resistant to several viruses using transgenic coat protein approach. These accomplishments were sufficient enough to be hired for permanent position at Monsanto research center in Chesterfield, MO. He spent there 19 years until his retirement and now is still consulting for this company. His major accomplishment was creation of few American potato varieties resistant to PVX and PVY. Later, he was asked to generate commercial products – potatoes resistant to PVY, PLRV (where it was necessary to use replicase technology) and Colorado potato beetles using Bt technology. This program ended up successfully with commercial application in US and Canada. Next, he worked on corn, wheat, soybean, canola and cotton virus resistance, having good results but no practical products. After these research successes, he was assigned to help developing countries with virus and insect problems using transgene technology. His consulting started with potato for Mexico, followed with sweetpotato research in Kenya, Uganda, Tanzania and South Africa. Later, he was helping 5 countries in SE Asia to develop papaya resistant to PRSV and 3 countries in Eastern Europe to develop potatoes resistant to beetles. These researches ended up with valuable products which will be in practical use after registration. At present, Professor Kaniewski is teaching biotechnology at Poznań University and continues his consultation in various agricultural products development.

Adres do korespondencji

Wojciech K. Kaniewski,
Instytut Biologii
Molekularnej
i Biotechnologii,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
ul. Umultowska 89,
61-614 Poznań.

biotechnologia

2 (81) 199–211 2008

Key words:

biotechnology, transgenic crops.

Moja przygoda z Monsanto nie byłaby możliwa bez wcześniejszych wizyt w USA. W 1978 r. zostałem wytypowany do pracy nad wirusami chmielu w Washington State University. Praca nad opanowaniem epidemii wywołanej przez te wirusy w północno-zachodnich Stanach skończyła się sukcesem naukowym i praktycznym. Jeszcze podczas pracy nad wirusami chmielu dostałem ofertę USDA, dotyczącą rozpracowania problemu wirusów ziemniaka w północno-zachodnich Stanach. Na moje nieszczęście postanowiłem wrócić na krótko do Polski, a tu odebrano mi paszport służbowy, niezbędny do legalnego wyjazdu i podjęcia pracy. W efekcie dopiero w styczniu 1986 r., po wielu interwencjach USDA odzyskałem paszport i zgłosiłem się do pracy w laboratorium dr Pete Thomasa w Prosser, Washington. Tam zetknąłem się po raz pierwszy z praktyczną wirusologią i po raz pierwszy byłem na polach eksperymentalnych. Tam także nauczono mnie, że aby rozwiązać problem najlepiej zaufać tylko sobie i wszystkie istotne etapy doświadczeń wykonywać samodzielnie. Wszystkie te doświadczenia zaprocentowały podczas późniejszej pracy w Monsanto.

W owym czasie (a dokładnie w 1983 r.) ówczesny dyrektor naukowy Monsanto dr Ernest Jaworski postanowił rozbudować i zrestrukturyzować dział badań naukowych w firmie. Uznał trafnie, że przyszłość leży w badaniach nad poprawianiem jakości roślin uprawnych metodami inżynierii genetycznej. Była to wielce ryzykowna decyzja, gdyż w tamtych czasach rozwiązywanie jakichkolwiek problemów natury technicznej wiązało się z koniecznością przeprowadzenia wszelakich badań podstawowych. Dr Jaworski pobudował ogromne, nowoczesne laboratoria w Chesterfield (Missouri), pozwalające na zatrudnienie około 1200 naukowców, a zaczął od zatrudnienia trzech młodych ludzi świeżo po doktoratach do „specjalnych poruczeń”. Dr Robb Fraley (obecny dyrektor naukowy Monsanto) podjął badania nad konstrukcjami potrzebnymi do wprowadzania obcych genów do roślin, dr Steve Rogers (obecnie na emeryturze) zajął się usuwaniem z plazmidu *Agrobacterium tumefaciens* genu powodującego tworzenie się guzów na porażonych roślinach, a dr Rob Horsch (obecnie doradca Bila Gatesa do spraw akcji charytatywnych dla krajów rozwijających się) rozpoczął doświadczenia nad transformacją roślin. Wszyscy trzej, po zakończeniu etapu badań wstępnych, zaczęli rozmyślać nad praktycznym zastosowaniem swoich wyników. Po wielu dyskusjach i konsultacjach uznano za celowe podjęcie dalszych, ukierunkowanych na praktykę badań w następujących obszarach: uodpornienie roślin na produkowany przez Monsanto herbicyd Roundup (dr Gerard Barry), uodpornienie roślin na owady genem *Bt* pochodzącym z bakterii *Bacillus thuringiensis* (dr Fred Perlak), uzyskanie odporności roślin na wirusy (dr Nilgun Tumer) oraz badań nad opóźnionym dojrzewaniem (dr Harry Klee), i rozpoczęto tworzenie grup badawczych dla realizacji tych celów.

Dr Tumer początkowo skoncentrowała się na wyszukaniu biologów molekularnych, których rolą byłoby poszukiwanie genów odporności na wirusy i opracowanie strategii dla uzyskania ich ekspresji w roślinach. W 1986 r. postanowiła zatrudnić

także wirusologa, którego zadaniem byłaby ocena efektów działania transgenów w roślinach. Etat wirusologa jako bardzo specyficzny miał być kontraktem na 2 lata, możliwym do przedłużenia wyłącznie w przypadku uzyskania dobrych wyników. Nie było to atrakcyjne dla naukowców z uczelni i ofertę odrzuciło wielu znanych wirusologów, między innymi dr Thomas, mój ówczesny szef z Prosser. To właśnie on zaproponował, aby na ten krótki kontrakt zatrudnić mnie (oczywiście po zakończeniu mojej pracy dla USDA). Pojechałem na „interview” do Monsanto z przeglądowym wykładem przedstawiającym techniki stosowane w wirusologii. Na spotkanie to zaproszono również wirusologów z pobliskich uczelni. Szczególnie interesująca dla mnie była rozmowa z dr Rogerem Beachy z Washington University, który próbował uodpornić tytoń na wirusa mozaiki tytoniu metodami inżynierii genetycznej i uzyskał roślinę, u której objawy chorobowe występowały o 1-2 dni później niż w roślinie nie transformowanej.

Wyniki rozmowy kwalifikacyjnej były dla mnie korzystne – miałem zostać w trybie natychmiastowym konsultantem dla Monsanto, szkolić nowo zatrudnionych pracowników w laboratoriach USDA i w marcu 1987 r. przenieść się do St. Louis. Należało jeszcze uporać się z problemem dotyczącym zgody dyrektora mojej macierzystej, polskiej uczelni i Ministerstwa Rolnictwa. Dyrektor w liście do mnie wyraził obawę, że podjęcie pracy w „fabryce” może być wstydlive dla naukowca, jednak po wyjaśnieniu jakiego rodzaju firmą jest Monsanto, wyraził zgodę na moje zatrudnienie na 6 miesięcy. Potem jeszcze trzykrotnie przedłużał zgodę na kolejne sześć miesięcy.

Wyniki naszych badań w Monsanto były już wówczas na tyle zaawansowane, że dyrekcja firmy zaoferowała mi stały etat kierownika Pracowni Wirusologii oraz pomoc w uzyskaniu stałej wizej. Uzyskanie stałej wizej i podjęcie pracy w USA wymagało zezwolenia ze strony rządu polskiego. Strona amerykańska zasugerowała przyjęcie statusu uchodźcy politycznego (dość łatwy wtedy do uzyskania). Nie wyraziłem na to zgody, bo nie czułem się szczególnie prześladowany przez władze ówczesnej Polski i wybrałem trudniejszą drogę jako „specjalista niezbędny dla gospodarki USA”. W tym celu Monsanto zatrudniło biuro Head Hunters (łowcy głów), które skompletowało dziesięć kryteriów do spełnienia przez kandydata i po skontaktowaniu się z wieloma amerykańskimi naukowcami udowodniło, że nikt oprócz mnie nie spełnia wszystkich warunków potrzebnych do zatrudnienia na wymienionym etacie w Monsanto. Firma zatrudniła także adwokata, którego zadaniem było przekonanie władz USA, że powinni zrezygnować z wymogu mojego powrotu na 2 lata do Polski. Adwokat zaskoczył mnie prośbą, bym szybko skompletował swoje dokumenty (stos papierów o wysokości 30 cm!). Na szczęście miałem już wtedy sporo publikacji i ich kopie dały pierwsze kilkanaście centymetrów. Skompletowane dokumenty zostały rozesłane do urzędników w Washington (DC). W końcu wizej i etat dostałem, a przy okazji udało się załatwić formalności wizowe dla mojej żony.

Praca w Monsanto od początku mnie zafascynowała. Firma zapewniła nam doskonałe warunki pracy, w tym laboratoria wyposażone w najlepszy, nowoczesny

sprzęt, zautomatyzowane, programowane komory klimatyczne i szklarnie (ponad 1 hektar na dachu budynku laboratoryjnego). Ponieważ używaliśmy sprzętu jednorazowego użytku na szeroką skalę, nasz szef dr Fraley, który zwykł odwiedzać nas po południu w laboratorium, po ilości zużytych „jednorazówek” szacował aktywność pracowni. Nie było żadnych ograniczeń finansowych na sprzęt i odczynniki ani żadnych skomplikowanych rozliczeń z wydatków. Nieograniczony był dostęp do najlepszych konsultantów i literatury fachowej. Raz w tygodniu mieliśmy spotkania ze współpracownikami i konsultantami, na których każdy samodzielny pracownik referował przez 5 minut wyniki uzyskane w ciągu tygodnia, a przez dalsze 15-30 minut przedstawiał swoje plany na następny tydzień. Plany te były korygowane w trakcie dyskusji, a współpracownicy zawsze byli chętni do dyskusji i współpracy. No i co też ważne, mieliśmy dobre pensje i ubezpieczenia pozwalające na komfortowe życie i koncentrację na pracy. Mimo że nie było żadnej kontroli obecności ani godzin pracy, entuzjazm był tak wielki, że o każdej porze dnia i nocy można było spotkać kogoś, kto akurat kończył jakieś ciekawe doświadczenie w laboratorium. Większość kolegów pracowała 12-15 godzin na dobę, często także w weekendy. Ja należałem do tych, którzy pracowali zazwyczaj tylko od 8 do 10 godzin. Byłem za to często krytykowany przez dr Fraley, stworzyłem zatem hasło, które powiesiłem w swoim biurze *Who work hard and smart, does not need to work long*. Od tego czasu rozliczano mnie tylko z wyników.

W St. Louis masowo transformowano rośliny tytoniu i pomidorów różnymi genami. Zespół dr Beachy z Washington University wykonywał konstrukty, przekazywał je do Monsanto, a następnie odbierał transformowane rośliny i analizował poziom DNA metodą Southern blot, ilość RNA metodą Northern blot oraz obecność i wielkość białka metodą Western blot. Po zanalizowaniu kilkudziesięciu roślin dla każdego konstruktów wybierano od jednego do trzech transformantów w celu zbadania ich odporności na wirusa. Testowano pojedyncze rośliny uzyskane bezpośrednio po transformacji (tzw. T0). Większość analizowanych roślin nie wykazywała odporności, a kilka roślin jedynie nieznaczne opóźnienie w pojawieniu się pierwszych objawów chorobowych. System ten wymagał wykonywania tysięcy analiz, na podstawie których dokonywano selekcji kilku roślin. Poza tym zakażenie małych, osłabionych transformacją roślin T0 mogło ułatwiać wnikanie wirusa do rośliny i jego namnażanie się.

Postanowiłem zrezygnować całkowicie z analiz DNA i RNA i zastąpić pracochłonny test Western blot ilościowym testem ELISA. Test ten wykonywałem dla białek kodowanych przez wprowadzony transgen (wówczas zwykle było to białko płaszczka wirusa) i białko NPTII używane do selekcji. Ze wszystkich uzyskanych po transformacji roślin pobierałem nasiona i wysiewałem w celu sprawdzenia segregacji, zachowując w T1 tylko linie segregujące 3:1, a zatem posiadające jedną kopię transgeny. Opracowałem prostą i niezbyt pracochłonną metodę selekcji linii homozygotycznych w pokoleniu T2. Wysiewałem nasiona tylko z jednej rośliny z popula-

cji T1, tej która w teście ELISA wykazywała największą ilość białka transgenu, zakładając, że roślina ta produkuje białko na matrycy 2 kopii DNA transgenu (czyli, że jej potomstwo będzie homozygotyczne). Postępowanie takie sprawdziło się w znacznej większości przypadków dla wszystkich testowanych roślin. Wszystkie pozostałe rośliny z populacji T1 zakażałem wirusem i jeśli stosunek liczby roślin niezakażonych do liczby roślin zakażonych był 3:1, to było pewne, że w pokoleniu T2 linia homozygotyczna będzie całkowicie odporna. Ten system działał znakomicie i pozwalał na szybką selekcję linii o jednej kopii genu, homozygotycznej w pokoleniu T2 i całkowicie odpornej na homologicznego wirusa.

Po szybkim wyselekcjonowaniu linii pomidora odpornych na TMV postanowiliśmy natychmiast zrobić test polowy, tak abyśmy mogli jako pierwsi na świecie wykazać praktyczną wartość uzyskanych przez nas roślin transgenicznych. Zespół naukowców i prawników rozpoczął starania o zgodę na test w warunkach polowych, podczas gdy my potwierdziliśmy możliwość uzyskania odpornych linii na poziomie T1. Stan Missouri odrzucił petycję, ale uzyskaliśmy zgodę na ocenę połową naszych pomidorów w Jerseyville, Illinois (z wieloma ograniczeniami). W ramach tego zezwolenia mogliśmy testować linie transgeniczne wyselekcjonowane jako odporne na TMV, linie pomidorów stransformowanych genem odporności na Roundup i rośliny stransformowane genem *Bt* (odporne na stonkę ziemniaczaną). Ze względów politycznych nie pozwolono nam wysadzić na pole tytoniu, którego selekcja była bardziej zaawansowana.

Test biologiczny wypadł wspaniale. Porażone rośliny kontrolne (nie transformowane) można było odróżnić gołym okiem od roślin odpornych, stransformowanych genem CP TMV. Niestety, ku rozpaczy moich kolegów doświadczalne pomidory zostały zniszczone Roundupem albo zjedzone przez stonkę, bowiem w tym okresie uzyskanie silnej ekspresji niektórych większych genów było jeszcze niemożliwe. Problem rozwiązał dopiero nieco później dr Perlak poprzez zaprogramowanie i zsyntetyzowanie syntetycznego genu, co pozwoliło na ponad 3000-krotny wzrost poziomu ekspresji *Bt* w ziemniaku.

Wkrótce potem uzyskaliśmy tytoń i pomidory odporne na ToMV, AIMV, CMV, PVX, PVY. Odkryliśmy też, że różne geny w różnych konstrukcjach prowadzą do uzyskania różnego odsetka roślin całkowicie odpornych, częściowo odpornych i w ogóle nieodpornych. Pomimo wykonania wielu badań wciąż nie rozumiemy tego zjawiska, a więc praktyczne rozwiązanie musi obejmować oznaczenie liczby (%) roślin odpornych, uzyskanych z danego konstruktu i stransformowanie tylu eksplantatów (przy znanej wydajności transformacji), aby można było wybrać najlepsze linie do testów polowych i do potencjalnej komercjalizacji.

Testy przeprowadzone na roślinach z jednoczesną odpornością na TMV i ToMV na Florydzie potwierdziły przydatność uzyskanych transformantów dla praktyki rolniczej. Myślałem wówczas, że mam pierwszą transgeniczną roślinę uprawną, go-

ową do komercjalizacji. Niestety, było na to jeszcze za wcześnie, gdyż nie istniały przepisy niezbędne do rejestracji i legalnej uprawy takich roślin, a biznesmeni z Monsanto nie mieli pojęcia, jak można na tym zarobić. W efekcie nasiona poszły do przechowalni, a program naukowy został zawieszony.

W tym okresie w Monsanto opracowano metodę transformacji ziemniaka. Natychmiast zrobiliśmy konstrukt zawierający geny białka płaszczka dwóch wirusów PVX i PVY, uzyskaliśmy 20 interesujących transformantów i zaczęliśmy je badać. Tu strategia musiała być inna, gdyż nie mieliśmy do dyspozycji nasion ani linii homozygotycznych, a jedynie pojedyncze transformowane rośliny, które można było zakażać dopiero gdy urosły. Doświadczenia te były trudne ze względu na różny wiek i wielkość roślin doświadczalnych oraz relatywnie długi czas oczekiwania na sadzeniaki do namnożeń, ale tu z pomocą przyszły nam kultury *in vitro*, dzięki którym małe, dopiero co zregenerowane po transformacji rośliny zostały szybko namnożone do oczekiwanej przez nas jednorodnej populacji testowej.

Na podstawie wyników testów przeprowadzonych na transgenicznych ziemniakach wykazaliśmy, że jedna linia była całkowicie odporna na oba wirusy, cztery linie były częściowo odporne, a reszta roślin charakteryzowała się podatnością na zakażenie wirusami. Ciągłe mało wiedzieliśmy o korelacji ekspresji i odporności rośliny, postanowiliśmy zatem przebadać dokładnie rośliny wszystkich linii. Ku naszemu zdziwieniu w tkankach roślin linii całkowicie odpornej wykryliśmy dużo białka PVX i nieznaczne ilości białka PVY. Reszta roślin zawierała różne ilości obu białek, co utrudniało wykazanie jakiegokolwiek korelacji. Zrobiliśmy wiele doświadczeń, by zrozumieć, czy dwie linie roślin wykazujących identyczną ekspresję są odporne czy podatne na wirusa i (...) do dziś tego nie wiemy. Wykonaliśmy też serię doświadczeń ze szczepieniem tych roślin z zakażonymi roślinami nietransgenicznymi w różnych kombinacjach. I tu spotkała nas kolejna niespodzianka – w wyniku szczepienia nasza całkowicie odporna linia 303 stała się podatna na PVX i niewrażliwa na zakażanie PVY. Fakt ten oraz odwrotna korelacja z ekspresją białka obu tych wirusów sugerowała istnienie różnych mechanizmów transgenicznej odporności na różne wirusy, co potwierdziliśmy w późniejszych doświadczeniach.

Odporność linii 303 ziemniaka została potwierdzona w warunkach polowych. Niestety, związek producentów stwierdził, że nie jest zainteresowany roślinami odpornymi na PVX, bo w efekcie certyfikacji sadzoniaków wirus ten przestał być problemem w uprawie ziemniaków. Wtedy udostępniliśmy linię 303 uniwersytetom do badań. Do dziś nikomu nie udało się zakazić tych roślin ani zrozumieć, dlaczego właśnie ta linia jest tak odporna. Konstrukt PVX/PVY udostępniliśmy Meksykom do transformacji ich lokalnych odmian ziemniaka Alpha, Rosita i Nortena. Naukowcy meksykańscy przeszli szkolenie w moim laboratorium. Uzyskali po kilka całkowicie odpornych linii z tych trzech odmian, co potwierdzili pięcioma latami testów polowych. Produkty te jednak wciąż nie są w uprawie z powodu przeciągających się procedur rejestracji.

W wyniku przeprowadzonych rozmów z przedstawicielami biznesu wykazaliśmy, że największe straty ekonomiczne spowodowane chorobami wirusowymi były odnotowane dla ziemniaka odmiany Russet Burbank (50 % całej powierzchni uprawy ziemniaków w USA) porażanego masowo wirusem liściozwoju ziemniaka (PLRV). Ziemniaki z pola, na którym stwierdzono kilkuprocentowe porażenie nie nadawały się do sprzedaży ze względu na czarne przebarwienia bulw (tzw. „net necrosis”) i nawet cotygodniowe opryski przeciwko mszycom, będącym wektorami PLRV, nie zabezpieczały przed tym wirusem. Pola całkowicie porażone (co nie było rzadkością) były zaorywane. W tej sytuacji zapadła decyzja, że ziemniak odporny na PLRV będzie pierwszym produktem Monsanto charakteryzującym się odpornością na wirusy. Pierwotnie wydawało się, że osiągnięcie tego celu będzie łatwe. Tymczasem zrobiliśmy kilka konstruktów z genem białka płaszcza PLRV i we wstępnych testach wykazaliśmy brak odporności u transformantów. Zaczęliśmy robić nowe konstrukty modyfikując gen białka płaszcza, duplikując ten gen, a nawet używając genów syntetycznych. W sumie do transformacji użyliśmy 24 różnych konstruktów CP. W efekcie z dwóch konstruktów uzyskaliśmy kilka linii statystycznie odporniejszych niż ziemniak niestransformowany i jedną linię (1040) całkowicie odporną w doświadczeniach w komorach klimatycznych. Natychmiast postanowiliśmy potwierdzić nasze rezultaty w testach polowych. Ku naszemu przerażeniu linia całkowicie odporna w laboratorium była kompletnie porażona w polu. Myśleliśmy o pomyłce przy namnażaniu sadzonek do testu polowego, ale po zakażeniu linii 1040 wirusem pobranym z ziemniaków porażonych w polu uzyskaliśmy w komorach klimatycznych 100% porażenie roślin. Uznaliśmy, że w polu był inny, niehomologiczny szczep wirusa, który przełamał odporność. Chcieliśmy zrozumieć, co jest przyczyną tego zjawiska i zsekwencjonowaliśmy gen białka płaszcza transgenu i wirusa z pola. Były identyczne! Niestety nie pozwolono nam kontynuować badań, gdyż nawet gdybyśmy znaleźli przyczynę, nie przyspieszyłoby to procesu uzyskania produktu.

W tym czasie powstał w Monsanto nowy dział poprawy jakości żywności kierowany przez dr Ganesh Kishore, który zażyczył sobie, aby wirusologia przeszła do nowego działu. Kiedy zreferowałem mu trudności związane z uzyskaniem odporności na PLRV był wściekły, ponieważ jego plany związane były z wykazaniem się tym nowym produktem. Po naszej rozmowie zdecydował, że jeśli przez rok nie uzyskamy ziemniaka całkowicie odpornego na PLRV zlikwiduje grupę wirusologiczną. Grupa liczyła wówczas 15 osób. Postanowiłem z desperacji zastosować podejście zupełnie nienaukowe, z pogranicza loterii. Naszym biologom molekularnym poleciłem strawić genom PLRV różnymi enzymami w dowolny sposób i wszystkie produkty trawienia użyć do wytworzenia konstrukcji do transformacji. Wszystkie linie transformantów rozmnożyliśmy w kulturach *in vitro* i uzyskane rośliny zakażaliśmy wirusem. Dwie spośród nich okazały się całkowicie odporne na PLRV. Natychmiast zaczęliśmy namnażanie roślin dla potrzeb testów polowych. Jednocześnie zanalizowaliśmy działające geny i okazało się, że jeden z nich posiada duży fragment genomu PLRV, a drugi tylko króciutki fragment replikazy z charakterystycznym dla niej motywem

GDD. W tym czasie okazało się, że dr Zaitlin uzyskał patent na odporność na wirusy poprzez ekspresję okrojonych lub zmutowanych replikaz. Wobec tego wyizolowaliśmy cały gen replikaz z naszego dużego fragmentu, uzyskaliśmy patent na kompletną, niezmutowaną replikazę i ten gen miał się stać podstawą dla naszych transgeniczných produktów. Równocześnie w doświadczeniach polowych potwierdziliśmy całkowitą odporność wybranych linii z obu konstruktów. Pomimo że dr Zaitlin w swojej pracy donosił o bardzo wysokiej specyficzności odporności w wyniku ekspresji replikazy, nasze rośliny wytrzymały naturalne warunki polowe i infekcję naturalnie występującymi szczepami i izolatami w trzech Stanach. Byliśmy uratowani! Ogłosiliśmy, że jesteśmy gotowi do przygotowania linii z kompletną replikazą do zarejestrowania i komercjalizacji.

W tym samym czasie uzyskaliśmy ziemniaki odporne na PVY. Nie nastęrczało to żadnych trudności, gdyż każdy zastosowany gen z genomu tego wirusa zadziałał. Ze względu na korzystną sytuację patentową konstrukt zastosowany komercyjnie był oparty na białku płaszczu PVY. Jesienią 1991 r. byliśmy gotowi do komercjalizacji.

Tymczasem przyszły nowe decyzje. Dr Perlak ogłosił, że jest gotowy do komercjalizacji ziemniaków odpornych na stonkę i dyrekcja Monsanto zadecydowała, że nie powinniśmy konkurować na rynku z trzema własnymi produktami. Uznano, że najpierw wprowadzone zostaną na rynek ziemniaki odporne na stonkę, a potem będą one zastąpione roślinami odpornymi na stonkę i PLRV dla zachodnich Stanów oraz roślinami odpornymi na stonkę i PVY dla centralnej i wschodniej Ameryki (USA i Kanada). Strategia zastąpienia dobrego produktu lepszym była rozsądna, ale to oznaczało, że nasz gotowy produkt, rośliny odporne na wirusy PLRV i PVY, nie mógł być bezpośrednio wprowadzony na rynek i musieliśmy zacząć pracę nad następnym produktem od początku. Nie wiedzieliśmy, jakie trudności będą związane z uzyskaniem ziemniaka odpornego jednocześnie na stonkę i wirusa, a mieliśmy wyselekcjonować linie z potencjałem komercyjnym w ciągu roku. Połączyliśmy nasze konstrukty z genem *Bt* i rozpoczęliśmy transformację ziemniaka Russet Burbank z genami *Bt*/PLRV (15 000 eksplantów) i z genami *Bt*/PVY (5000 eksplantów). Otrzymaliśmy ogromną liczbę linii transgeniczných, niemożliwą do przetestowania testem biologicznym. Usunęliśmy zatem wszystkie linie słabo rosnące i wyglądające nietypowo, linie na których larwy stonki zbyt długo żyły, potem linie, które w teście ELISA wykazywały mniej niż 10 ppm białka *Bt*, a na końcu te linie, które w PCR wykazywały obecność sekwencji *spec-strep* z plazmidu. Pozostało ponad 1000 linii *Bt*/PLRV i ponad 500 *Bt*/PVY, ciągle za dużo na testy w komorach klimatycznych i testy polowe. W wyniku desperackiej decyzji namnożyliśmy wszystkie linie pozostałe po wstępnej selekcji (40 sadzonek na linię). Wyszczepiliśmy je bezpośrednio w pole (w Waszyngtonie i Idaho) w układzie dwóch powtórzeń po 10 roślin w każdym, dodaliśmy 40 powtórzeń nietransgeniczných roślin kontrolnych i pole obsadziliśmy dookoła zakażonymi ziemniakami. Następnie uwolniliśmy na tym terenie kilka milionów mszyc, kładąc na każdą roślinę około 10 mszyc zainfekowanych wirusem. Wkrótce na

wszystkich roślinach nietransgenicznym wystąpiły objawy chorobowe. W puli roślin transgenicznym były zupełnie nieodporne, częściowo odporne lub wykazujące odporność. Kolejna selekcja polegała na wyborze roślin charakteryzujących się silnym wzrostem i brakiem objawów chorobowych. W przypadku Bt/PLRV sprawdzono również brak *net necrosis*. Te testy przeszło 39 linii Bt/PLRV i 18 Bt/PVY. Dalsza selekcja (głównie pod kątem plonowania) przebiegała równolegle do analiz wymaganych do rejestracji.

W efekcie zarejestrowano 3 linie z PLRV i 2 linie z PVY i utworzono samorządny dział Monsanto do spraw ziemniaka, który nazwano NatureMark. W 1995 r. wprowadzono na rynek ziemniaki odporne na stonkę pod nazwą NewLeaf, a w rok później te z dodatkową odpornością na PLRV (NewLeaf+) i te z dodatkową odpornością na PVY (NewLeafY). Sprzedaż rozpoczęła się jednocześnie w USA i w Kanadzie. Głównym problemem było zbyt powolne produkowanie sadzeniaków. Rolnicy byli zachwyceni, konsumenci chętnie kupowali te ziemniaki (były oznaczone dla informacji konsumenta i z powodu naszej dumy), a przetwórcy zabiegali o nie ze względu na cenę i wysoką jakość bulw.

Jednocześnie transformowano tymi genami cztery inne, popularne w Stanach odmiany ziemniaków i wprowadzono do sprzedaży. Bardzo chciałem, aby Polska była pierwszym krajem w Europie, uprawiającym rośliny transgeniczne i załatwiłem w Monsanto zgodę na nieodpłatną uprawę ziemniaka odpornego na stonkę w kraju. Trzyletnie testy polowe (1996-1998), przeprowadzone w Instytucie Ochrony Roślin wypadły znakomicie. Transformowaliśmy także polską odmianę Bzura, ale niestety zaczęła się nagonka na GMO i transformowana 'Bzura' nie została nawet przetestowana. Pod naciskiem pseudoekologów i zdezorientowanych konsumentów koncern McDonald ogłosił, że w jego restauracjach na całym świecie sprzedawane będą wyłącznie produkty z ziemniaków nietransgenicznym. Za McDonaldem „poszły” wszystkie tego rodzaju restauracje. Przetwórcy wstrzymali zakup i przerób ziemniaków transgenicznym, a był to główny ich odbiorca. Dobrze rozwijający się przemysł zaczął się chwiać. W efekcie, w 1999 r. firma Monsanto postanowiła sprzedać NatureMark (z produktami, patentami, aparaturą i ludźmi). Byliśmy na Kongresie Wirusologicznym w Australii, gdy w środku nocy obudził mnie telefon informujący o tej decyzji. Na szczęście zażądano takich kwot, że nikt nie zdecydował się na kupno, zwłaszcza, że atmosfera wokół żywności genetycznie zmodyfikowanej robiła się coraz gorsza. Ostatecznie NatureMark zostało rozwiązane, ludzie przeszli do innych działów w Monsanto albo zostali zwolnieni, a badania ziemniaków zostały zawieszane bezterminowo.

Mnie udało się kontynuować pracę w wirusologii. We wczesnej fazie batalii o ziemniaki zajmowaliśmy się także wirusami kukurydzy: MDMV, MCDV i MRDV. Badania nad konstruktami były dość zaawansowane, ale wtedy były jeszcze kłopoty z metodyką transformacji dla tej rośliny, a poza tym ekonomicznie ważniejsze były

prace nad uzyskaniem roślin odpornych na owady i herbicydy. Mieliśmy za to kilka zleceń z zewnątrz m.in. pewna firma duńska zleciła wykonanie konstruktów warunkującego odporność buraka cukrowego na BNYVV (do dziś nie zastosowanego w praktyce). Firma Seminis zaproponowała nam opracowanie konstruktów warunkujących odporność roślin na ZYMV, WMVII i CMV oraz potrójnego konstruktów z odpornością na te trzy wirusy jednocześnie. Wszystkie konstrukty zostały użyte do transformacji dyniowatych, a uzyskane rośliny zarejestrowane i wprowadzone do produkcji. Braliśmy także udział w programie dotyczącym wytwarzania transgenicznego papai, odpornej na PRSV (obecnie większość roślin uprawianych na Hawajach jest transformowana).

We Włoszech pod koniec lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku zaczęła się epidemia na plantacjach pomidorów. Włosi zdiagnozowali chorobę jako spowodowaną przez dwa różne szczepy CMV – na południu panował szczep PG13, zimnolubny, który w kilkanaście dni od infekcji zabijał rośliny, a na północy rozprzestrzenił się ciepłolubny szczep CMV 22, który powodował występowanie czarnego miąższu owoców. Rząd włoski poprosił o pomoc, a firma Monsanto wysłała mnie na negocjacje, zaznaczając, że zależy im na wprowadzeniu upraw roślin transgenicznych do Europy, a więc mogę zgodzić się na pomoc nieodpłatną. Ostatecznie zaproponowałem symboliczną kwotę 1 miliona dolarów, czyli znacznie poniżej kosztów. Program wydawał się ciekawy i łatwy, gdyż wtedy mieliśmy już transgenicznego tytonia odpornego na CMV. Jednakże transformowane naszym konstruktami pomidory nie wykazywały żadnej odporności. Okazało się, że ekspresja białka uzyskana dla tego samego konstruktów jest w tytoniu około 20 razy wyższa niż w pomidorze. Ulepszyliśmy konstrukty przez dodanie lidera, intronu i przez zastosowanie silnego promotora FMV. Ekspresja wzrosła i łatwo było znaleźć linie całkowicie odporne zarówno przy zakażeniu szczepem homologicznym jak i heterologicznym. Na wszelki wypadek zrobiliśmy też konstrukt podwójny z genami białka płaszczka obu włoskich szczepów. Doświadczenia laboratoryjne wypadły pozytywnie i szybko uzyskałem linie homozygotyczne, całkowicie odporne na oba szczepy CMV. Uzyskaliśmy zgodę władz włoskich na testy polowe. Pięcioletnie testy na północy, w centrum i na południu Włoch potwierdziły pełną odporność naszych pomidorów w naturalnych warunkach rolnictwa włoskiego. Kiedy już nadszedł czas na rejestrację i komercjalizację, nastąpił jednak nowy minister rolnictwa i zakazał wszelkich prac nad roślinami transgenicznymi we Włoszech. W ramach wyjątkowego marnotrawstwa pomidory te do dziś nie są uprawiane.

Równoległe do badań nad odpornością włoskich pomidorów prowadziliśmy w USA prace nad uzyskaniem odporności na wirusy WSMV i BYDV pszenicy. Początkowo problem stanowiła metodyka transformacji roślin. Istniała opracowana metoda transformacji tylko dla odmiany Bob White (*particle gun*). Praca była szalenie frustrująca, gdyż z 760 zregenerowanych transformantów tylko cztery miały pojedynczą kopię nieuszkodzonego genu i jedynie częściowo były odporne na WSMV. Dopiero, gdy do transformacji zastosowano szczep *Agrobacterium tumefaciens* pro-

gram można było uruchomić w miarę normalnie. W wyniku przeprowadzania w ciągu dwóch lat doświadczeń polowych w Illinois i w stanie Indiana potwierdziliśmy, że mamy linie o potencjale do praktycznego zastosowania, ale niestety na tym etapie wspomniane badania zostały zatrzymane. W kooperacji z Calgene próbowaliśmy uzyskać także rośliny pomidora odporne na TGMV i TLCV (geminowirusy). Również te doświadczenia nie zostały dokończone.

W tym czasie prace w Monsanto zostały skoncentrowane na uzyskaniu odporności na choroby grzybowe. Choroby grzybowe powodowały trzykrotnie większe straty niż te, których przyczyną były choroby wirusowe, a dodatkowo zapobieganie chorobom grzybowym było związane ze zużyciem dużych ilości pestycydów. Powołano ogromną, sześćdziesięciosobową grupę mającą rozwiązać ten problem. Grupa wirusologiczna została wtedy zredukowana do sześciu osób, a mnie przypadła w udziale funkcja opracowywania metod analizy transgenów dla innych grup. Szczególnie ważne było opracowanie dokładnych ilościowych metod analizy ekspresji białka dla celów rejestracji. Opracowałem analitykę białka CP4, analitykę białka Bt, a wraz z żoną opracowaliśmy trudną metodę ilościowej analizy białka markerowego NPTII oraz wszystkich białek przeciwgrzybowych, które próbowano testować w roślinach uprawnych. Metody te są stosowane do dzisiaj.

W kwietniu 2001 r. zorganizowano sesję planowania prac w wirusologii na kolejne 5 lat. Dobrze się przygotowaliśmy i mieliśmy rzeczowe prezentacje dotyczące naszych planów na przyszłość, ale niestety po miesiącu dowiedzieliśmy się, że nasza grupa (podobnie jak grupa badająca odporność na choroby grzybowe) została rozwiązana. Myślę, że to było postanowione jeszcze przed sesją planowania, ze względu na konieczne oszczędności. Monsanto było wtedy w tarapatkach finansowych i musiało skoncentrować się na głównych produktach generujących pewne dochody.

Tym razem uratowało mnie moje zaangażowanie w tematykę pomocy krajom rozwijającym się. Zaproponowano mi, bym kontynuował ten program jako jednoosobowa jednostka. Realizację programu rozpoczęliśmy w 1991 r. od słodkiego ziemniaka dla Afryki i ziemniaków dla Meksyku (w obu przypadkach chodziło o odporność na wirusy), a polegał on na szkoleniu naukowców z biedniejszych państw oraz na nieodpłatnym udostępnianiu naszych elementów genetycznych, metod i wsparciu finansowym na cele laboratoryjne. Zaczęliśmy od Kenii, gdzie prowadzone były prace nad odpornością słodkiego ziemniaka na SPFMV i SPCSV. Transgeniczne słodkie ziemniaki były testowane w południowej Karolinie, a potem w czterech regionach Kenii. Niebawem do tego programu dołączyła Uganda, Tanzania i Republika Południowej Afryki, a do celów włączono prace nad odpornością manioku na wirusy i kukurydzy na strigę. W Meksyku sprawnie przeprowadzono prace nad uzyskaniem ziemniaka odpornego na PVX/PVY, lecz dodanie odporności na trzeciego wirusa, PLRV wciąż sprawiało trudności.

W 1999 r. pięć państw z południowo-wschodniej Azji zwróciło się z prośbą o pomoc w uzyskaniu papai odpornej na PRSV. Program ten również rozpoczął się od szkoleń i od przygotowywania konstruktywów w rodzimej firmie (dr Stanisław Flasiński). Obecnie notuje się znaczny postęp w realizacji programu Tajlandii, Malezji i na Filipinach, nieco gorszy w Wietnamie i słaby w Indonezji. Na Filipinach podjęto także program mający na celu uzyskanie słodkiego ziemniaka odpornego na SPFMV.

W 1999 r. trzy kraje europejskie (Rosja, Bułgaria i Rumunia) zwróciły się do Monsanto w kwestii pomocy przy uzyskaniu lokalnych odmian ziemniaka odpornych na stonkę. W ramach programu udostępniliśmy nieodpłatnie konstrukty, metodę transformacji i metody analityczne, łącznie z koniecznymi odczynnikami. W Rosji sformowano 6 odmian, które obecnie są gotowe do komercjalizacji. W Bułgarii ulepszono 3 odmiany, które są w trakcie rejestracji. W Rumunii (której laboratoria były kompletnie wyposażone przez Monsanto) wystartowano później, ale dwie własne transgeniczne odmiany są już wprowadzone do testów polowych.

We wszystkich projektach międzynarodowych przez cały czas pomagała mi moja żona Maria Berezowska-Kaniewska.

Od czasu pierwszej komercjalizacji roślin odpornych na wirusy USDA było bombardowane pytaniami o bezpieczeństwo roślin transgenicznych dla ludzi i środowiska. Próbowaliśmy odpowiedzieć na te pytania na drodze eksperymentalnej. Bezpieczeństwo transgeny w żywności łatwo było uzasadnić, gdyż od wieków takie białka były konsumowane w roślinach porażonych wirusami i to w ilościach tysiące razy większych niż istniejące w roślinach transgenicznych. Zarzuty dotyczące rekombinacji, transkapsydacji, synergizmu i komplementacji odparliśmy doświadczeniami porównującymi te zjawiska w układzie podwójnej infekcji wirusowej (PVY/PVA) z infekcją rośliny transgenicznej (ziemniak z genem PVY CP) przez niehomologicznego wirusa PVA. Z doświadczeń tych wynikało, że zjawiska te występują wielokrotnie częściej w przypadku podwójnej infekcji rośliny niż w transgenicznej roślinie porażonej niehomologicznym wirusem, a więc transgeniczne rośliny odporne na wirusy są bezpieczniejsze. Postawiono nam zarzut, że PLRV poraża wyłącznie komórki floemu, a nasz transgen replikazy jest obecny we wszystkich komórkach liścia ziemniaka. Postanowiliśmy opracować metodę *RNA tissue printing* umożliwiającą wykrywanie wirusa w komórkach i wielokrotnie czulszą od dotychczas stosowanej metody immunologicznej. Okazało się, że RNA wirusa jest obecne we wszystkich komórkach porażonego liścia ziemniaka. Co więcej, wykryliśmy minusową nić RNA we wszystkich komórkach, co dowodzi, że PLRV nie tylko jest tam obecny, ale się tam replikuje. Obaliliśmy w ten sposób pięćdziesięcioletni dogmat i uspokoiłoby obawy USDA.

Pod koniec 2003 r. Monsanto zdecydowało się zawiesić subsydiowanie programów międzynarodowych ze względu na oszczędności finansowe. Zaproponowano mi pracę w innym dziale lub przejście na emeryturę. To było inne Monsanto niż to,

w którym zaczynałem moją przygodę. Nowe Monsanto ukierunkowało się głównie na zyski finansowe, a ciekawych badań było jak na lekarstwo. Nie widziałem się w żadnej z proponowanych mi grup i zdecydowałem się na drugą opcję, pod warunkiem, że nadal będę prowadził programy międzynarodowe i konsultacje.

Nie sposób opisać w tak krótkim tekście wszystkiego, co przeżyłem przez te lata pracy w Monsanto. Zaczynałem swoją karierę od najniższego szczebla przewidzianego dla naukowca po doktoracie (Scientist) a skończyłem na najwyższym możliwym do osiągnięcia dla naukowca tytule – Principal Scientist. Wciąż jestem związany z Monsanto, a co najważniejsze, ciągle pomagam w programach dla krajów rozwijających się. Dziękuję bardzo za to wszystko moim przełożonym i współpracownikom.