Występowanie rzepaku genetycznie zmodyfikowanego w paszach

MAŁGORZATA MAZUR, ZBIGNIEW SIERADZKI, BEATA KRÓL, KRZYSZTOF KWIATEK

Zakład Higieny Pasz, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 07.07.2016

Zaakceptowano 29.09.2016

Mazur M., Sieradzki Z., Król B., Kwiatek K.

Occurrence of genetically modified rape in feedingstuffs

Summary

European Union law enforces labeling of products containing above 0.9% of GMO. The aim of this study was detection and quantification of genetically modified rape in feedingstuffs. Both the qualitative and quantitative analysis was based on Real Time PCR method. Amongst 432 examined samples of feed, 56 contained GM rape line GT73. Only in 8 of them did the content of GM rape exceed 0.9%. The source of GT73 rape contamination was rapeseed meal imported to Poland from the eastern countries, mainly Ukraine, which was confirmed in shipping documents attached to the samples. The efficient monitoring of GMO, especially for rape, is very important, because of the high possibility of contamination of traditional crops with GM varieties.

Keywords: Feed, Genetically modified rape, detection and quantification, real-time PCR

Szczególną uwagę w żywieniu zwierząt hodowlanych skupia się na roślinach będących łatwo przyswajalnym źródłem białka i charakteryzujących się dobrze zbilansowanym składem aminokwasowym. W tym zakresie istotną rolę w żywieniu zwierząt poza soją odgrywa rzepak, będący podstawową rośliną oleistą uprawianą na terenie naszego kraju. W Polsce do produkcji pasz wykorzystuje się przede wszystkim rzepak pochodzący z upraw prowadzonych na terenie naszego kraju, jednak odnotowuje się również znaczący import tego surowca, w tym z krajów spoza UE. Na terenie Unii Europejskiej dopuszczone do stosowania są pasze i żywność zawierające, wyprodukowane lub składające się z genetycznie zmodyfikowanego rzepaku linii: GT73, Ms8, Rf3, Ms8xRf3 oraz T45, odpornych na działanie herbicydów. Jednym z głównych herbicydów stosowanych obecnie w rolnictwie jest glifosat, aktywny składnik herbicydu Roundup. Mechanizm działania glifosatu polega na hamowaniu enzymu EPSPS, który uczestniczy w biosyntezie aminokwasów aromatycznych i witamin. Prowadzi to do zablokowania biosyntezy białka, a w konsekwencji do śmierci rośliny (9, 13). Uzyskanie w roślinach tolerancji na glifosat stało się możliwe poprzez wprowadzenie pochodzącego z *A. tumefaciens* szczepu CP4 genu epsps, kodującego syntazę 5-enolopirogrono-3-fosfotransferazy (EPSPS), która jest odporna na działanie związku czynnego herbicydu. Odporność na ten herbicyd można uzyskać również przez transformację rośliny ge-

nem wyizolowanym z *Ochrobactrum anthropi* szczep LBAA, kodującym oksydoreduktazę glifosatu (gox), która przyspiesza jego rozkład. Dzięki tym genom wprowadzonym do genomu rzepaku GT73 uzyskano odporność na glifosat (13). Z kolei odporność rzepaku linii Ms8, Rf3 i T45 na kolejną grupę herbicydów, tj. herbicydy fosfotrycynowe, uzyskano dzięki genom bar i pat wyizolowanym, odpowiednio, z saprofitycznych bakterii glebowych *Streptomyces hygroscopicus* i *Streptomyces viridochromogenes*. Geny te kodują N-acetylotransferazę fosfotrycyny (PAT), która umożliwia acetylację glufosynatu i jego rozkład (13).

Prawo obowiązujące na terenie UE (10, 11) wymaga etykietowania żywności i pasz zawierających powyżej 0,9% GMO, a kraje członkowskie zobowiązane są do prowadzenia monitoringu GMO przez uprawnione organa urzędowej kontroli. Celem badań było określenie za pomocą techniki real-time PCR częstości występowania rzepaku GM w materiałach paszowych i innych paszach stosowanych w żywieniu zwierząt gospodarczych w Polsce.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły próbki materiałów i mieszanek paszowych zawierających rzepak, pobrane do badań przez lekarzy weterynarii z powiatowych inspektoratów weterynaryjnych, zgodnie z wytycznymi Programu Wieloletniego realizowanego przez Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach.

Tab. 1. Wyniki badań pasz w kierunku obecności rzepaku GM w latach 2012-2015

Rodzaj próbki	Liczba próbek ogółem	Liczba próbek dodatnich		
		ogółem	poniżej 0,9% GMO	powyżej 0,9% GMO
Śruty rzepakowe	282	47	41	6
Mieszanki paszowe	97	7	6	1
Makuchy rzepakowe	29	1	0	1
Ziarno rzepaku	24	1	1	0

W latach 2012-2015 przeanalizowano łącznie 432 próbki, w tym 282 próbki śruty rzepakowej, 24 próbki ziarna rzepaku, 29 próbek makuchu rzepakowego i 97 próbek mieszanek paszowych (tab. 1). Analizę próbek prowadzono w oparciu o technikę real-time PCR, wg metod zalecanych przez Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej ds. Żywności i Pasz Genetycznie Zmodyfikowanych (EURL GMFF). Zostały one zoptymalizowane, zwalidowane i opisane w procedurze badawczej wykorzystywanej w badaniach prowadzonych w Zakładzie Higieny Pasz PIWet-PIB. Wykorzystywane metody, specyficzne dla zdarzenia trans-

formacyjnego, umożliwiającą identyfikację poszczególnych linii rzepaku genetycznie zmodyfikowanego, tj. GT73, Ms8, Rf3 i T45. Granicę wykrywalności dla rzepaku GM linii GT73, Rf3 i Ms8 ustalono na poziomie 0,01%, natomiast dla rzepaku Ms8 na poziomie 0,05%. Granica oznaczalności metody dla rzepaku linii Rf3 wyniosła 0,04%, dla GT73 i Ms8 ustalono ją na poziomie 0,05%, natomiast dla rzepaku T45 granica oznaczalności wyniosła 0,06%.

Otrzymane do badań próbki pasz i materiałów paszowych poddawano homogenizacji, a następnie każdą z próbek analizowano w dwóch powtórzeniach. Ekstrakcję DNA prowadzono w oparciu o metodę wykorzystującą bromek heksadecylotrimetyloamonowy (CTAB). Otrzymane DNA sprawdzano pod względem czystości, która dla przeprowadzenia wydajnej amplifikacji produktu musi zawierać się w granicach 1,7-2,0 przy 260/280 nm. Reakcję amplifikacji z oznaczaniem ilości produktu w czasie rzeczywistym (real-time PCR) prowadzono z użyciem starterów i sond typu TaqMan, specyficznych dla danej linii rzepaku GM. Wykorzystywane w badaniach startery i sondy przedstawiono w tab. 2, natomiast skład mieszanin reakcyjnych w tab. 3.

Tab. 2. Charakterystyka starterów i sond wykorzystywanych w reakcji real-time PCR

Nazwa	Sekwencja	Tm	Źródło
Gen referencyjny rzepaku <i>CruA</i>			
MDB510 MDB511 TM003	5'-GGC CAG GGT TTC CGT GAT-3' 5'-CCG TCG TTG TAG AAC CAT TGG-3' FAM 5'-AGT CCT TAT GTG CTC CAC TTT CTG GTG CA-3'TAMRA	58°C 61°C 70°C	3
Rzepak GT73			
RT73 1 RT73 2 RT73	5'-CCA TAT TGA CCC ATC ATA CTC ATT GCT-3' 5'-GCT TAT ACG AAG GCA AGA AAA GGA-3' FAM 5'-TTC CCG GAC ATG AAG ATC ATC CTC CTT -3'TAMRA	65°C 62°C 68°C	7
Rzepak Ms8			
KVM085 HCA048 TM011	5'-GTT AGA AAA AGT AAA CAA TTA ATA TAG CCG G-3' 5'-GGA GGG TGT TTT TGG TTA TC-3' FAM 5'-AAT ATA ATC GAC GGA TCC CCG GGA ATT C-3'TAMRA	64°C 56°C 69°C	6
Rzepak Rf3			
KVM084 DPA165 TM010	5'-AGC ATT TAG CAT GTA CCA TCA GAC A-3' 5'-CAT AAA GGA AGA TGG AGA CTT GAG-3' FAM 5'-CGC ACG CTTATCGACCAT AAG CCC A-3'TAMRA	63°C 62°C 69°C	12
Rzepak T45			
KVM172 MDB599 TM026	5'-CAA TGG ACA CAT GAA TTA TGC-3' 5'-GAC TCT GTA TGA ACT GTT CGC-3' FAM 5'-TAG AGG ACC TAA CAG AAC TCG CCG T-3'TAMRA	55°C 59°C 67°C	3

Tab. 3. Schemat przygotowania mieszanin reakcyjnych dla reakcji real-time PCR

Składnik mieszaniny	Stężenie końcowe				
	CruA	GT73	Ms8	Rf3	T45
MasterMix	1 × stężony				
Startery stężenie końcowe	MDB510 0,06 µM	GT73 1 0,1 µM	KVM085 0,06 µM	KVM084 0,06 µM	KVM172 0,06 µM
	MDB511 0,06 µM	GT73 2 0,1 µM	HCA048 0,06 µM	DPA165 0,06 µM	MDB599 0,06 µM
Sonda stężenie końcowe	TM003 0,04 µM	GT73 0,08 µM	TM011 0,06 µM	TM010 0,06 µM	TM026 0,06 µM
H ₂ O	do 20 µl				
DNA (5 µl)	do 40 ng/1 µl				

Reakcję amplifikacji obejmującą 45 cykli prowadzono wg następującego profilu termicznego: działanie UNG 50°C 2 min, denaturacja wstępna – 95°C przez 15 min, denaturacja – 95°C przez 15 s, przyłączanie i wydłużanie starterów z pomiarem fluorescencji – 60°C przez 1 min. Do analiz wykorzystywano aparat firmy Applied Biosystems ABI7500. Po stwierdzeniu obecności rzepaku GM w badanej próbce wykonywano analizę ilościową. Zawartość zmodyfikowanego DNA w badanym materiale oznaczano poprzez określenie ilości transgeny w stosunku do ilości tzw. genu referencyjnego. W tym celu wykorzystywano metodę krzywych standardowych,

względem których określano ilość amplifikowanego DNA w analizowanych próbkach. Zawartość procentową rzepaku GM obliczano jako stosunek ilości sekwencji GM do ilości sekwencji genu referencyjnego (ilość kopii sekwencji GM/ilość kopii g. referencyjnego × 100%).

Wyniki i omówienie

W każdej z badanych próbek powielaniu ulegał fragment genu referencyjnego *CruA*, charakterystycznego dla rzepaku. Wydajna amplifikacja tego genu świadczyła o prawidłowo przeprowadzonym procesie ekstrakcji DNA i o odpowiedniej czystości kwasu nukleinowe-

Ryc. 1. Obecność rzepaku GM z podziałem na zawartość procentową GMO

go. Wydajność reakcji PCR dla obu badanych genów wahała się w granicach 90,0%-103,6% dla genu referencyjnego CruA oraz 90,0%-104,3% dla transgeny. W próbkach pobranych i zbadanych w latach 2012-2013 nie stwierdzono rzepaku genetycznie zmodyfikowanego. Na podstawie dokumentów dołączonych do badanych w tym okresie próbek stwierdzono, że pochodziły one z upraw rzepaku prowadzonych na terenie naszego kraju. Analiza próbek otrzymanych w kolejnych latach, tj. 2014-2015 wykazała obecność rzepaku linii GT73 w 56 analizowanych próbkach (tab. 1). W 8 z nich stwierdzono obecność rzepaku GT73 powyżej 0,9%, natomiast w pozostałej części próbek zawartość rzepaku tej linii określono poniżej progu 0,9% (ryc. 1). W związku z obowiązującymi przepisami prawnymi (10, 11) obecność rzepaku genetycznie zmodyfikowanego w badanych próbkach zawierających powyżej 0,9% GMO narzuca obowiązek oznakowania tego produktu jako zawierającego genetycznie zmodyfikowane organizmy.

Uzyskane wyniki badań wskazują na pojawienie się rzepaku genetycznie zmodyfikowanego linii GT73 w żywieniu zwierząt w Polsce na przestrzeni ostatnich dwóch lat. Źródłem rzepaku GM, którego zawartość określono powyżej 0,9%, okazały się partie śrut rzepakowych importowanych do naszego kraju z Ukrainy. Próbkę rzepaku zawierającą linię GT73 poniżej wartości 0,9% prawdopodobnie mogły zostać zanieczyszczone rzepakiem GM w trakcie transportu lub przechowywania. Dodatnie wyniki przeprowadzonych analiz świadczą o konieczności prowadzenia kontroli tego typu organizmów w środowisku, szczególnie w przypadku rzepaku. Biologia tego gatunku sprzyja bowiem niekontrolowanemu rozprzestrzenianiu się rzepaku w środowisku i możliwości łatwej kontaminacji tradycyjnych upraw tej rośliny odmianami transgenicznymi. Rzepak jest rośliną częściowo samo-, a częściowo obcopylną. Ułatwionemu rozprzestrzenianiu się genów i przekrzyżowaniu sprzyja produkcja dużych ilości pyłku, który może być przenoszony przez owady czy wiatr, a także zdolność krzyżowania się rzepaku z gatunkami pokrewnymi, takimi jak np.: *Brassica rapa*, *B. juncea*, *B. adpressa*, *B. oleracea*,

Raphanus raphanistrum, *Hirschfeldia incana*. Duże znaczenie ma także wysoka produktywność nasion, brak konieczności okresu ich spoczynku oraz zachowanie długiej zdolności do kiełkowania w niesprzyjających warunkach. W wielu badaniach prowadzonych w miejscach, gdzie uprawia się rzepak GM wykazano przepływ genów pomiędzy osobnikami transgenicznymi a odmianami tradycyjnymi i powstawanie roślin charakteryzujących się odpornością na dany herbicyd (1, 4, 14, 15). Rozprzestrzenianie się tego typu organizmów w środowisku może prowadzić do powstawania tzw. superchwastów (8) i zmniejszenia bioróżnorodności ekosystemów (2, 5). Biorąc pod uwagę powyższe informacje, należy zwrócić szczególną uwagę na konieczność prowadzenia efektywnego monitoringu w zakresie GMO. Brak takich badań może skutkować niekontrolowanym rozprzestrzenianiem się transgenów w środowisku, co z kolei stanowić może zagrożenie dla upraw konwencjonalnych i ekologicznych.

Piśmiennictwo

1. Aono M., Wakiyama S., Nagatsu M., Nakajima N., Tamaoki M., Kubo A., Saji H.: Detection of feral transgenic oilseed rape with multiple-herbicide resistance in Japan. *Environ. Biosafety Res.* 2006, 5, 77-87.
2. Clark E. A.: Environmental risks of genetic engineering. *Euphytica* 2006, 148, 47-60.
3. Delobel C. C., Bogni A., Mazzara M., Savini C., Van Den Eede G.: Event-specific Method for the Quantification of Oilseed Rape Line T45 Using Real-time PCR – Validation Report and Protocol – Sampling and DNA Extraction of Oilseed Rape. Joint Research Centre 2006.
4. Gasson M. J.: Gene transfer from genetically modified food. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2000, 11, 505-508.
5. Kuiper H. A., Kleter G. A.: The scientific basis for risk assessment and regulation of genetically modified food. *Trends Food Sci. Techn.* 2003, 14, 277-293.
6. Mazzara M., Bogni A., Savini C., Van Den Eede G.: Event-specific Method for the Quantification of Oilseed Rape Line Ms8 Using Real-time PCR – Validation Report and Protocol – Seeds Sampling and DNA Extraction of Oilseed Rape. Joint Research Centre 2007.
7. Mazzara M., Grazioli E., Savini C., Van Den Eede G.: Event-Specific Method for the Quantification of Oilseed Rape Line RT73 Using Real-Time PCR – Validation Report and Protocol – Seeds Sampling and DNA Extraction of Oilseed Rape. Joint Research Centre 2007.
8. Munier D. J., Brittan K. L., Lanini W. T.: Seed bank persistence of genetically modified canola in California. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2012, 19, 2281-2284.
9. Padgett S. R., Kolacz K. H., Delannay X.: Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.* 1995, 35, 1451-1461.
10. Rozporządzenie nr 1829/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. w sprawie genetycznie zmodyfikowanej żywności i paszy.
11. Rozporządzenie nr 1830/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. dotyczące możliwości śledzenia i etykietowania organizmów zmodyfikowanych genetycznie oraz możliwości śledzenia żywności i produktów paszowych wyprodukowanych z organizmów zmodyfikowanych genetycznie i zmieniające Dyrektywę 2001/18/WE.
12. Savini C., Bogni A., Mazzara M., Van Den Eede G.: Event-specific Method for the Quantification of Oilseed Rape Line RF3 Using Real-time PCR – Validation Report and Protocol – Seeds Sampling and DNA Extraction. Joint Research Centre 2007.
13. Tan S., Evans R., Singh B.: Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids* 2006, 30, 195-204.
14. Warwick S. I., Beckie H. J., Hall L. M.: Gene flow, invasiveness, and ecological impact of genetically modified crops. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009, 1168, 72-99.
15. Yoshimura Y., Beckie H. J., Matsuo K.: Transgenic oilseed rape along transportation routes and port of Vancouver in western Canada. *Environ. Biosafety Res.* 2006, 5, 67-75.

Adres autora: dr Małgorzata Mazur, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: mwalczak@piwet.pulawy.pl