Analiza pasz w zakresie występowania nasion rzepaku genetycznie zmodyfikowanego

© MAŁGORZATA MAZUR, © ZBIGNIEW SIERADZKI, BEATA KRÓL, © KRZYSZTOF KWIATEK

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

Otrzymano 18.05.2021

Zaakceptowano 20.08.2021

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

Analysis of feed in terms of the presence of genetically modified oilseed rape

Summary

The labeling of products containing GMOs above 0.9% results from the provisions of the law in force in the European Union. The aim of the study was to evaluate the presence of genetically modified rape in feed used in feeding farm animals in Poland. The research was based on the real-time PCR technique, using primers and event-specific probes. A total of 900 samples were analyzed. The research identified canola line GT73, resistant to glyphosate. Only in 12 samples did the content of this oilseed rape exceed the threshold above which the product must be labeled as containing GMOs. Conducting such controls is extremely important because of the possibility of contamination of feed free from genetically modified organisms, which are increasingly used in animal nutrition.

Keywords: genetically modified rapeseed, GMO feed, real-time PCR technique

Pasze rzepakowe są cennym źródłem białka w żywieniu zwierząt, przede wszystkim ze względu na wysoką zawartość aminokwasów siarkowych, takich jak metionina i cystyna. Wykorzystywane są w żywieniu drobiu, bydła i świń. Do produktów rzepakowych stosowanych do produkcji pasz zalicza się przede wszystkim śrutę poekstrakcyjną i makuchy rzepakowe, powstające po pozyskaniu oleju z nasion tej rośliny. W tym celu stosuje się podwójnie ulepszone odmiany rzepaku (tzw. dwuzerowe), pochodzące głównie z upraw krajowych. Charakteryzują się one obniżoną zawartością składników antyodżywczych – takich jak kwas erukowy i glukozynolany. Związki te negatywnie wpływają na zdrowie i produktywność zwierząt (1, 7, 12). Mając na uwadze odpowiednie wytyczne obowiązujące w chowie różnych grup zwierząt gospodarskich oraz zasady wymagane przy wykorzystaniu pasz zawierających rzepak, z powodzeniem można stosować go jako dodatkowe lub uzupełniające źródło białka paszowego.

W żywieniu zwierząt w Polsce poza krajowymi odmianami rzepaku stosuje się również rzepak pochodzący z importu. Poza odmianami tradycyjnymi na terenie Unii Europejskiej dopuszczone obecnie do stosowania są różne linie rzepaku genetycznie zmodyfikowanego, charakteryzujące się odpornością na różne typy herbicydów. Zalicza się do nich rzepak z odpornością na glufosynat (linia GT73, MON 88302) oraz

na glifosat amonowy (linia Ms8, Rf3), a także krzyżówki tych odmian (Ms8xRf3, MON88302xMs8xRf3, MON88302xMs8, MON88302xRf3) (https://webgate.ec.europa.eu/dyna/gm_register/index_en.cfm). Zgodnie z regulacjami prawnymi obowiązującymi na terenie UE istnieje konieczność monitorowania obecności genetycznie zmodyfikowanych organizmów (GMO – genetically modified organism) w żywności i paszach (5, 6). W związku z tym żywność i pasze, które zawierają powyżej 0,9% GMO muszą być odpowiednio oznakowane (5, 6). Do kontrolowania pasz w tym zakresie wyznaczone są na terenie naszego kraju odpowiednie laboratoria. W prowadzeniu tego typu monitoringu stosowane są metody analityczne, wykorzystujące najczęściej technikę PCR i/lub real-time PCR. Pozwalają one na wykrywanie i identyfikowanie genetycznie zmodyfikowanych surowców paszowych, w tym również rzepaku. Dzięki odpowiednim parametrom, którymi charakteryzują się te metody, takim jak: wysoka czułość, specyficzność, dokładność czy możliwość wykrycia GMO na bardzo niskim poziomie, nawet kilku kopii poszukiwanego fragmentu genetycznego, są one powszechnie wykorzystywane w tego typu badaniach. Przed wprowadzeniem do badań metody te podlegają procesowi optymalizacji i walidacji, aby zostały odpowiednio dostosowane i sprawdzone, gwarantując tym samym uzyskanie wiarygodnych wyników analiz. Celem pracy była ocena występowania

rzepaku genetycznie zmodyfikowanego w paszach i materiałach paszowych, które są powszechnie stosowane w żywieniu zwierząt na terenie naszego kraju.

Materiał i metody

Do badań wykorzystywano próbki poekstrakcyjnej śruty rzepakowej, ziarna rzepaku, makuchu rzepakowego oraz mieszanki paszowe zawierające w składzie produkty rzepakowe. Próbkę były pobrane przez lekarzy weterynarii z powiatowych inspektoratów weterynarii zgodnie z wytycznymi Programu Wieloletniego realizowanego przez Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach. W okresie od 2012 do 2020 r. zbadano łącznie 900 próbek pasz, w tym: 570 próbek śrutę rzepakowej, 213 mieszanek paszowych, 58 próbek makuchu rzepakowego i 59 próbki ziarna rzepaku (4). Badania prowadzone były wg procedury badawczej obowiązującej w Zakładzie Higieny Pasz PIWet-PIB, wykorzystującej technikę real-time PCR i metody rekomendowane przez Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej ds. Żywności i Pasz Genetycznie Zmodyfikowanych (EURL GMFF). Dla rzepaku GT73 wykorzystano metodę qt-eve-bn-004, dla Ms8 qt-eve-bn-002, dla Rf3 qt-eve-bn-003, dla T45 qt-eve-bn-001, a dla MON 88302 qt-eve-bn-010 (<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods>). Są to metody specyficzne dla zdarzenia transformacyjnego, tzw. event-specific, co oznacza, że amplifikacji podlega fragment DNA charakterystyczny tylko dla konkretnej linii GMO. Metody te przed wprowadzeniem do badań poddane zostały optymalizacji, podczas której ustalono skład mieszanin reakcyjnych (tab. 1), a następnie podlegały walidacji. Granica wykrywalności metody wyznaczona została na poziomie 0,01% dla każdej badanej linii rzepaku. Granicę oznaczalności dla rzepaku linii Rf3 określono na poziomie 0,04%, dla rzepaku GT73, Ms8, MON 88302 na poziomie 0,05%, a dla rzepaku linii T45 0,06%. Do izolacji DNA zastosowano metodę

chemiczną z wykorzystaniem bromku heksadecylotrimetyloamonowego (CTAB). Po ocenie czystości i jakości DNA, reakcję amplifikacji prowadzono z użyciem starterów i sond typu TaqMan. W badaniach wykorzystywano aparat firmy Applied Biosystem ABI7500, a na profil temperaturowy reakcji składały się: etap UNG trwający 2 minuty, wstępna 15-minutowa denaturacja prowadzona w 95°C, a następnie 45 cykli obejmujących denaturację w 95°C przez 15 s oraz przyłączanie i wydłużanie starterów z jednoczesnym pomiarem fluorescencji w 60°C przez 1 minutę. Po otrzymaniu dodatniej amplifikacji świadczącej o obecności konkretnej linii rzepaku GM w badanej próbce wykonywano analizę ilościową, wykorzystując metodę krzywych standardowych. Zawartość procentową rzepaku GM oznaczano na podstawie ilości kopii, poprzez określenie ilości transgenu w stosunku do ilości genu referencyjnego rzepaku (ilość kopii sekwencji GM/ilość kopii g. referencyjnego $\times 100$) i przeliczając taki wynik na procentowy udział masy rzepaku GMO w masie ogólnej składnika rzepakowego, wg danych zawartych w certyfikacie CRM rzepaku GMO.

Wyniki i omówienie

W ramach realizowanego programu badawczego w latach 2012-2020, w Zakładzie Higieny Pasz PIWet-PIB w Puławach badaniom w kierunku wykrywania i oznaczania rzepaku genetycznie zmodyfikowanego poddano łącznie 900 próbek. Na przestrzeni tych lat odnotowano obecność tylko jednej linii rzepaku GM, tj. linii GT73, charakteryzującej się odpornością na herbicyd RoundupReady, którego aktywny składnik – glifosat – hamuje enzym uczestniczący w biosyntezie aminokwasów aromatycznych i witamin. W ten sposób zostaje zablokowany proces biosyntezy białka, co prowadzi do śmierci rośliny. Odporność na glifosat uzyskano dzięki wprowadzeniu do genomu rzepaku genu *epsps* kodującego enzym syntazę odporną na

Tab. 1. Schemat przygotowania mieszanin reakcyjnych dla reakcji real-time PCR

Skład mieszaniny reakcyjnej	CruA	GT73	Ms8	Rf3	T45	MON88302
MasterMix 1 $\times$ stężony	12,5 μ l					
Startery	MD8510 0,15 μ l	GT73 1 0,25 μ l	KVM085 0,15 μ l	KVM084 0,15 μ l	KVM172 0,15 μ l	88302QF 1,125 μ l
Stężenie wyjściowe (10 μ M)	MD8511 0,15 μ l	GT73 2 0,25 μ l	HCA048 0,15 μ l	DPA165 0,15 μ l	MD8599 0,15 μ l	88302QR 1,125 μ l
Sonda	TM003 0,1 μ l	GT73 0,2 μ l	TM011 0,15 μ l	TM010 0,15 μ l	TM026 0,15 μ l	88302QP 0,5 μ l
Stężenie wyjściowe (10 μ M)						
H ₂ O	7,1 μ l	6,8 μ l	7,05 μ l	7,05 μ l	7,05 μ l	4,75 μ l
DNA	5 μ l (do 40 ng/1 μ l)					

Tab. 2. Wyniki badań pasz w kierunku rzepaku w latach 2012-2020

Rodzaj próbki	Liczba próbek ogółem	Liczba próbek dodatnich rzepaku linii GT73		
		poniżej granicy oznaczalności	poniżej 0,9% GMO	powyżej 0,9% GMO
Śrutę poekstrakcyjną	570	83	18	8
Mieszanki paszowe	213	14	2	2
Makuchy rzepakowe	58	6	–	2
Ziarno rzepaku	59	–	–	0

działanie glifosatu oraz genu *gox*, kodującego oksydoreduktazę przyspieszającą rozkład tego związku (2, 9). Rzepak tej linii zidentyfikowano w 135 próbkach (15%) (tab. 2). Próbkę dodatkowo poddano następnie badaniom ilościowym. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono występowanie rzepaku GT73 poniżej granicy oznaczalności w 83 próbkach śrut rzepakowych, 6 makuchach i 14 mieszankach paszowych (11,4% ogółu próbek, 76% próbek dodatknych). Zawartość rzepaku GT73 na poziomie poniżej 0,9% oznaczono w 18 śrutach rzepakowych i 2 mieszankach paszowych (2,2% ogółu próbek, 14,8% próbek dodatknych). 12 próbek (8 śrut rzepakowych, 2 makuchy, 2 mieszanki paszowe) ze 135 dodatknych podlegało konieczności etykietowania produktu, jako zawierające GMO powyżej progu legislacyjnego 0,9%.

Prowadzone na przestrzeni ostatnich kilku lat badania wykazują każdego roku zbliżony odsetek próbek dodatknych. W 2020 r. wyniósł on 14%, a w latach ubiegłych wahał się w granicach 14-23%. Obecność rzepaku GT73 w paszach w szczególności na jego niewielkim poziomie świadczy prawdopodobnie o zanieczyszczeniu materiałów paszowych tym surowcem. Pomimo tego, że dużą część zapotrzebowania na rzepak z przeznaczeniem na cele paszowe pokrywają przede wszystkim źródła krajowe, odnotowywany jest import tego surowca i właśnie prawdopodobnie w nim należy szukać przyczyny zanieczyszczenia pasz rzepakiem GM. Jest to technicznie często trudne do uniknięcia. Obecność nawet niewielkiej ilości rzepaku transgenicznego może prowadzić do kontaminacji pasz wolnych od GMO w trakcie ich przygotowania, przechowywania lub podczas transportu. Ze względu na biologiczne właściwości rzepaku, łatwość rozprzestrzeniania się i możliwość krzyżowania się rzepaku GT73 z rzepakiem tradycyjnym czy gatunkami pokrewnymi, niezbędne jest prowadzenie kontroli w tym zakresie. Wysoka produktywność nasion oraz zachowanie długiej zdolności do kiełkowania w niesprzyjających warunkach stwarza prawdopodobieństwo niekontrolowanego rozprzestrzeniania się transgenów (2, 3, 8). Badania dowodzą, że w miejscach, gdzie uprawiano rzepak genetycznie zmodyfikowany razem z rzepakiem nGMO nastąpił przepływ genów, w konsekwencji którego powstały rośliny charakteryzujące się odpornością na dany typ herbicydu (2, 3, 8, 10, 11). Sytuacje takie mogą prowadzić do zanieczyszczenia upraw konwencjonalnych lub ekologicznych roślinami genetycznie zmodyfikowanymi, co w konsekwencji może skutkować ogromnymi stratami nie tylko dla plantatorów. Obecność rzepaku GT73 nawet tylko i wyłącznie na poziomie zanieczyszczeń, niesienie za sobą możliwość naruszenia przepisów związanych z obrotem paszami wolnymi od GMO, co w konsekwencji będzie stanowić problem dla hodowców, którzy deklarują stosowanie pasz oznakowanych jako wolne od organizmów genetycznie zmodyfikowanych.

Piśmiennictwo

1. Brzóska F., Śliwiński B., Michalik-Rutkowska O.: Pasze rzepakowe – miejsce w bilansie białkowym kraju oraz wartość pokarmowa. Cz. 1. Wiadomości Zootechniczne 2010, 2-3, 11-18.
2. Hecht M., Oehen B., Schulze J., Brodmann P., Bagutti C.: Detection of feral GT73 transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) along railway lines on entry routes to oilseed factories in Switzerland. Environ. Sci. Pollut. Res. 2014, 21, 1455-1465.
3. Hüskens A., Dietz-Pfeilstetter A.: Pollen mediated intraspecific gene flow from herbicide resistant oilseed rape (*Brassica napus* L.). Transgenic Res. 2007, 16, 557-569.
4. Mazur M., Sieradzki Z., Król B., Kwiatek K.: Występowanie rzepaku genetycznie zmodyfikowanego w paszach. Med. Weter. 2017, 3, 180-182.
5. Rozporządzenie (WE) Nr 1829/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. w sprawie zmodyfikowanej genetycznie żywności i paszy. OJ, 2003, L 268, 1-23.
6. Rozporządzenie (WE) 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. OJ, 2003, L 268, 24-28.
7. Smulikowska S.: Wartość odżywcza wytlóków rzepakowych produkowanych w kraju dla drobiu. Wiad. Zootechniczne 2006, 3, 22-28.
8. Squire G. R., Breckling B., Dietz Pfeilstetter A., Jorgensen R. B., Lecomte J., Pivard S., Reuter H., Young M. W.: Status of feral oilseed rape in Europe: its minor role as a GM impurity and its potential as a reservoir of transgene persistence. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2011, 18, 111-115.
9. Tan S., Evans R., Singh B.: Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. Amino Acids 2006, 30, 195-204.
10. 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.
11. 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.
12. Zduńczyk Z.: Glukozynolany rzepaku – wpływ na spożycie pasz, zdrowie i produktywność zwierząt oraz jakość produktów zwierzęcych. Post. Nauk Roln. 1995, 5, 41-54.

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