

Wykrywanie w paszach kukurydzy i soi genetycznie zmodyfikowanych

ZBIGNIEW SIERADZKI, KRZYSZTOF KWIATEK

Zakład Higieny Środków Żywnienia Zwierząt Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Sieradzki Z., Kwiatek K.

Occurrence of genetically modified maize and soybean in feed

Summary

Genetically modified crops are widely used to produce feed mixtures. European Community law requires products containing above 0.9% of GMO to be labeled. The purpose of the study was to detect, identify and quantify GMO by analyzing DNA. The qualitative methods used were based on PCR technique; however, quantitative GMO analysis based on Real Time PCR technique and Roche LightCycler 2.0 instruments was also applied. 59 of the 109 examined samples of feed contained GM crops. The presence of GMO was detected in 31 samples of soybeans and Soya meal, 4 samples of maize and 24 samples of feed mixtures. The most commonly used GMO in animal feed in Poland is Soya Roundup Ready, tolerant to Roundup herbicide, and it was present in 57 samples of feed. Genetically modified maize was present in only 2 of the 69 samples of maize corn and compound feeds. Additionally, 2 samples of maize were contaminated by Soya Roundup Ready.

Keywords: GMO, feed

Stosowane obecnie w rolnictwie rośliny, które uprawiane są dla potrzeb żywienia ludzi i zwierząt charakteryzują się właściwościami kształtowanymi przez człowieka od tysiącleci. Uważa się, że tradycyjne metody udoskonalania roślin uprawnych osiągnęły kres swoich możliwości. W związku z tym od kilkunastu lat istnieje szerokie zainteresowanie ich genetycznym modyfikowaniem. Pierwszymi roślinami modyfikowanymi genetycznie (GMO) były gatunki powszechnie uprawiane na świecie: kukurydza, ziemniaki, pomidory, soja, rzepak, buraki cukrowe, bawełna. Wykorzystywane obecnie w rolnictwie rośliny transgeniczne poddane zostały modyfikacjom nadającym im odporność na choroby, szkodniki, środki ochrony roślin (15).

Stosowanie nowej i tak kontrowersyjnej technologii, jak modyfikacje genetyczne, spowodowało opór ze strony organizacji ekologicznych i konsumenckich. W Unii Europejskiej w związku z koniecznością ochrony rynku wewnętrznego i obawami społeczeństwa opracowano i wdrożono uregulowania prawne, mające na celu ścisłą kontrolę stosowania roślin genetycznie zmodyfikowanych (3, 11-13). Prawo wspólnoty wymaga etykietowania produktów żywnościowych i pasz dla zwierząt zawierających powyżej 0,9% GMO. Zobowiązuje to kraje członkowskie do prowadzenia monitoringu GMO przez uprawnione organa urzędowej kontroli.

Celem badań było określenie przydatności metod opartych na analizie DNA w wykrywaniu i oznaczeniu ilościowym GMO w paszach.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły losowo pobrane próbki materiałów paszowych i gotowych mieszanek paszowych, dostarczone do PIWet-PIB przez inspekcję weterynaryjną z 8 województw wschodniej Polski w ramach urzędowej kontroli pasz w roku 2004 i pierwszym półroczu 2005 roku. Materiał obejmował 109 próbek, w tym: 34 próbki ziarna soi i poekstrakcyjnej śruty sojowej, 36 próbek ziarna kukurydzy i poekstrakcyjnej śruty kukurydzianej, 33 próbki mieszanek paszowych, 5 próbek ziarna pszenicy i otrębów pszennych oraz 1 próbkę śruty słonecznikowej.

Do wykrywania i identyfikacji kukurydzy oraz soi genetycznie zmodyfikowanych stosowano metody jakościowe oparte na technice PCR, obejmujące metody skryningowe i metody specyficzne gatunkowo. Metody skryningowe opierały się na wykrywaniu fragmentów DNA obecnych w promotorze CaMV 35S i terminatorze NOS (1, 2, 7). Elementy te używane są najczęściej w kasetach genowych wykorzystywanych do wprowadzania obcych genów do roślin poddawanych modyfikacjom genetycznym. Metody specyficzne gatunkowo polegały na detekcji genów referencyjnych soi i kukurydzy, lektyny i inwertazy (1, 2, 8, 9). Geny te występują wyłącznie w wymienionych gatunkach w liczbie 1 kopii w genomie. Metodyka identyfikacji poszczególnych modyfikacji genetycznych opierała się na

Tab. 1. Elementy DNA charakterystyczne dla poszczególnych roślin transgenicznych

Rodzaj GMO	Metody skryningowe		Metody identyfikacji występującej modyfikacji genetycznej
	Promotor CaMV 35S	Terminator NOS	Charakterystyczny fragment DNA
Soja Roundup Ready (GTS 40-3-2)	+	+	Transgen EPSPS-CP4
Kukurydza MON810	+	-	Promotor CaMV 35S i fragment DNA genomu kukurydzy
Kukurydza Bt11	+	+	Transgen PAT
Kukurydza Bt-176	+	-	Transgen cryIA(b)
Kukurydza T25	+	-	Transgen PAT

Objaśnienie: + występuje; - nie występuje

detekcji fragmentów DNA charakterystycznych dla poszczególnych roślin transgenicznych, opisanych w tab. 1 (1, 2, 4, 8, 9, 14, 16).

Ekstrakcję DNA prowadzono stosując metodę z użyciem buforu lizującego CTAB (2). Do pomiaru ilości i jakości DNA stosowano spektrofotometr Nicolet Evolution 300.

Jako wyniki pozytywne określano te próbki, w których wykryto obecność genu referencyjnego, promotora 35S CaMV i/lub terminatora NOS oraz sekwencji charakterystycznej dla GMO.

Próbki zawierające GMO poddano oznaczeniom ilościowym za pomocą techniki Real Time PCR z wykorzystaniem aparatu Roche LightCycler 2.0. Używano komercyjnych kitów firmy Roche (LightCycler GMO Soya Quantification Kit), GeneScan (Roundup Ready™ Soy DNA Quantification Kit), CONGEN Biotechnology GmbH (SureFood® GMO MON810 Corn i SureFood® GMO T25 Corn) oraz metody wykrywania soi GTS 40-3-2 z zastosowaniem sond typu TaqMan opisanej przez Pietsch i wsp. (10).

Ostatnia z wymienionych metod została wytypowana do dalszych badań. Metoda ta opiera się na reakcji Real Time PCR z wykorzystaniem sond znakowanych barwnikami FAM (reporter) na końcu 5' sondy i barwnikiem TAMRA na końcu 3' (wygaszacz). Fluorescencja emitowana przez barwnik FAM wygaszana jest przez TAMRA, gdy barwniki te są blisko siebie. Pomiar fluorescencji przy długości fali 530 nm następuje w momencie wydłużania nici DNA i degradacji sondy przez polimerazę Taq, mającą właściwości 5'-3' egzonukleazy. Rozpad sondy powoduje rozdzielenie barwnika od wygaszacza i emisję promieniowania FAM. Wraz z rosnącą liczbą produktów reakcji, w każdym cyklu, wzrasta również poziom fluorescencji, wyrażany graficznie za pomocą krzywych fluorescencji. Dla każdej próbki przeprowadzono, w tym samym czasie, dwie reakcje Real Time PCR – określenia ilości kopii transgeny (amplifikowany fragment obejmował część promotora 35S i część genu CTP – Chloroplast Transit Peptide) oraz ilości kopii genu referencyjnego (lektyny). Do obliczania zawartości

Tab. 2. Schemat przygotowania mieszanin reakcyjnych Real Time PCR dla soi Roundup Ready™

	Stężenie końcowe	Objętość (µl)
Woda	-	7,0
Starter 1 (5 pmol/µl)	0,25 µM	1,0
Starter 2 (5 pmol/µl)	0,25 µM	1,0
Sonda (1,5 pmol/µl)	0,15 µM	2,0
LightCycler TaqMan Master (5×)	1×	4,0

procentowej GMO porównywano ilości kopii tych genów w badanej próbce. Liczba kopii genu obliczana jest przez oprogramowanie urządzenia z krzywych kalibracyjnych, określanych na podstawie reakcji referencyjnych materiałów odniesienia o znanej zawartości GMO. Krzywą kalibracyjną dla każdego genu opracowywano w oparciu o pomiar fluorescencji pięciu różnych ilości kopii genu w mieszaninie reakcyjnej. Ilość kopii genów obliczano na podstawie stężenia DNA wyekstrahowanego z CRM i masy 1 kopii genomu soi.

Stężenia składników w mieszaninie reakcyjnej (tab. 2) oraz schemat reakcji Real Time PCR były takie same dla genu referencyjnego i fragmentu transgeny. Do kapilar, w których prowadzono reakcję, dodawano 15 µl mieszaniny reakcyjnej i 5 µl roztworu DNA.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań przedstawiono w tab. 3. Badaniom poddano 109 próbek pasz. Organizmy genetycznie zmodyfikowane wykryto w 59 próbkach (54%), z których 57 zawierało soję Roundup Ready, 1 próbka zawierała kukurydzę MON810 i w 1 próbce stwierdzono obecność kukurydzy T25. Występowanie soi genetycznie zmodyfikowanej Roundup Ready wykryto w 31 próbkach na 34 próbki soi poddanych badaniom. W pozostałych 3 próbkach nie wykryto obecności GMO. Na ogółem zbadanych 36 próbek kukurydzy, 4 z nich zawierały GMO. W 2 próbkach kukurydzy wykryto obecność kukurydzy genetycznie zmodyfikowanej

Tab. 3. Zestawienie wyników badań GMO w PIWet-PIB w latach 2004 i 2005

Rodzaj materiału	Liczba próbek	Próbki pozytywne		Rodzaj modyfikacji genetycznej
		Poniżej 0,9% GMO	Powyżej 0,9% GMO	
Ziarno soi i śruta sojowa	34	2	29	Roundup Ready
Ziarno kukurydzy i śruta kukurydziana	36	2 MON810; T25	2 Roundup Ready × 2	Roundup Ready × 2 MON810 × 1 T25 × 1
Mieszanki paszowe	33	0	24	Roundup Ready
Pszenica i otręby pszenne	5	0		-
Śruta słonecznikowa	1	0		-
Ogółem	109	4	55	Roundup Ready × 57 MON810 × 1 T25 × 1
		59 (54%)		

wanej. W pierwszym przypadku była to odmiana transgeniczna MON810, w drugim T25. Ponadto w 2 próbkach kukurydzy wykryto obecność, niedeklarowanej przez właściciela, soi Roundup Ready. W 24 próbkach mieszanek paszowych wykryto obecność soi Roundup Ready. Pozostałe 9 próbek nie zawierało soi i kukurydzy genetycznie zmodyfikowanych. W próbkach ziarna pszenicy, w otrębach pszennych i śrucie słonecznikowej nie wykryto obecności transgenicznej soi i kukurydzy.

Dane uzyskane z wyników badań ilościowych w kierunku GMO wykazały, że tylko 4 próbki środków żywienia zwierząt określone jako pozytywne względem zawartości GMO, zawierały rośliny genetycznie zmodyfikowane poniżej 0,9%. Probki te obejmowały: 1 próbkę kukurydzy zawierającą MON810, 1 próbkę kukurydzy zawierającą T25 i 2 próbki soi w których wykryto obecność soi Roundup Ready. Najczęściej stosowaną w żywieniu zwierząt rośliną transgeniczną jest soja Roundup Ready. Związane jest to z powszechnym stosowaniem poekstrakcyjnej śruty sojowej jako źródła białka, zastępującego używane dotąd mączki mięsno-kostne (6).

Podobne dane uzyskano podczas kontroli środków spożywczych i żywienia zwierząt wykonanej w roku 2003 przez IJHARS. Wyniki kontroli wykazały, że najczęściej stosowaną rośliną zmodyfikowaną genetycznie była soja Roundup Ready. Soję GTS 40-3-2 wykryto w 15 na 17 próbek zawierających GMO powyżej 1%, z ogólnej liczby 38 próbek poddanych badaniom szczegółowym. Pozostałe 2 próbki zawierały transgeniczną kukurydzę (5). Najczęściej GMO stwierdzano w środkach żywienia zwierząt, sporadycznie w artykułach spożywczych.

Obecność modyfikowanej soi w próbkach kukurydzy można wytłumaczyć jako zanieczyszczenie materiału podczas przechowywania lub transportu. Probki zawierające kukurydzę genetycznie zmodyfikowaną MON810 i T25 zostały najprawdopodobniej również zanieczyszczone GMO. Z przeprowadzonych badań wynika, że kukurydza genetycznie zmodyfikowana nie jest powszechnie wykorzystywana w zakładach wytwarzających środki żywienia zwierząt. Problem zanieczyszczenia ziarna tradycyjnych odmian roślin przez ich genetycznie zmodyfikowane odpowiedniki jest powszechny i związany z globalizacją handlu oraz coraz powszechniejszym stosowaniem GMO w produkcji rolnej na świecie.

Piśmiennictwo

1. Anon.: Collection of official methods under article 35 of the German federal Foods Act; Methods of sampling and analysis of foods, tobacco products, cosmetics and commodity goods/Federal Health Office, Loose leaf edition as of November 1999, Berlin, Koln, Beuth Verlag GmbH.
2. Bonfini L., Heinze P., Kay S., Van den Eede G.: Review of GMO Detection and Quantification Techniques. European Communities, Bruksela 2002.
3. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady Europy 2001/18/EC z dnia 12 marca 2001 roku uchylająca Dyrektywę Rady 90/220/EWG w sprawie zamierzonego uwalniania do środowiska organizmów genetycznie zmodyfikowanych.

4. Hupfer C., Hotzel H., Sachse K., Engel K. H.: Detection of the genetic modification in heat treated of Bt maize by polymerase chain reaction. *Lebensm. Unters. Forsch. A*/1998, 206, 203-207.
5. Konicka M.: Sytuacja na polskim rynku – wyniki kontroli artykułów rolnospożywczych pod kątem zawartości składników genetycznie zmodyfikowanych. *Mat. Konf. Czy chcemy żyć z GMO?* Warszawa 2004.
6. Kwiatek K., Weiner A., Przeniosło-Siwczyńska M.: Występowanie przetworzonego białka zwierzęcego w paszach. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 684-686.
7. Lipp M., Bluth A., Eyquem F., Kruse L., Schimmel H., Van den Eede G., Anklam E.: Validation of method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *Eur. Food Res. Technol.* 2001, 212, 497-504.
8. Meyer R., Jaccoud E.: Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of Glyphosate-Tolerant Soybeans. *Proc. euro food chem IX Conference, Interlaken, Switzerland 1997, Event No. 220, 1, 23-28.*
9. Meyer R., Chardonens F., Hubner P., Luthy J.: Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1996, 203, 339-344.
10. Pietsch K., Waiblinger H. U.: Quantification of genetically modified soybeans in food with the LightCycler™ System, [w:] Meuer/Wittwer/Nakagawara (wyd.): *Rapid Cycle Real Time PCR – Methods and Applications.* Springer Verlag, Heidelberg 2000.
11. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady Nr 1829/2003 z dnia 22 września 2003 roku w sprawie genetycznie zmodyfikowanej żywności i pasz.
12. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady Nr 1830/2003 z dnia 22 września 2003 roku w sprawie identyfikacji i oznakowania organizmów genetycznie zmodyfikowanych oraz identyfikacji produktów żywnościowych i paszowych wytworzonych z organizmów genetycznie zmodyfikowanych, zmieniającym Dyrektywę 2001/18/WE.
13. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady Nr 1946/2003 z dnia 15 lipca 2003 roku w sprawie transgranicznego przemieszczania organizmów genetycznie zmodyfikowanych.
14. Studer E., Dahinden I., Luthy J., Hubner P.: Nachweis des gentechnisch veränderten „Maximizer“-Mais mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). *Mitteilung aus dem Gebiet der Lebensmittel und Hygiene* 1997, 88, 515-524.
15. Zduńczyk Z.: Genetyczna modyfikacja surowców paszowych i spożywczych: zakres, potencjalne zagrożenia i możliwości przeciwdziałania. *Mat. Konf. Czy chcemy żyć z GMO?* Warszawa 2004.
16. Zimmermann A., Luthy J., Pauli U.: Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 2000, 33, 210-216.

Adres autora: doc. dr hab. Krzysztof Kwiatek, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: kkwiatek@piwet.pulawy.pl