Nowatorskie metody wykrywania obecności modyfikacji genetycznych w materiale siewnym w działalności kontrolnej PIORiN

RAPORT Z FAZY BADAWCZEJ ZADANIE NR 4

Sławomir Sowa

Laboratorium Kontroli GMO

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin –Państwowy Instytut Badawczy

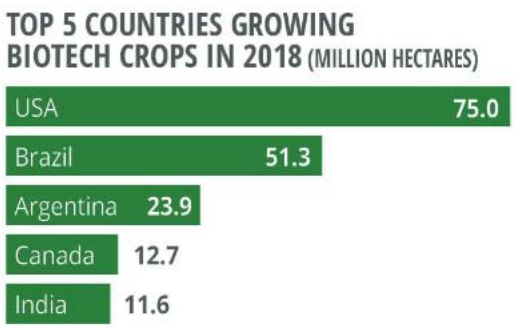
18.12.2020

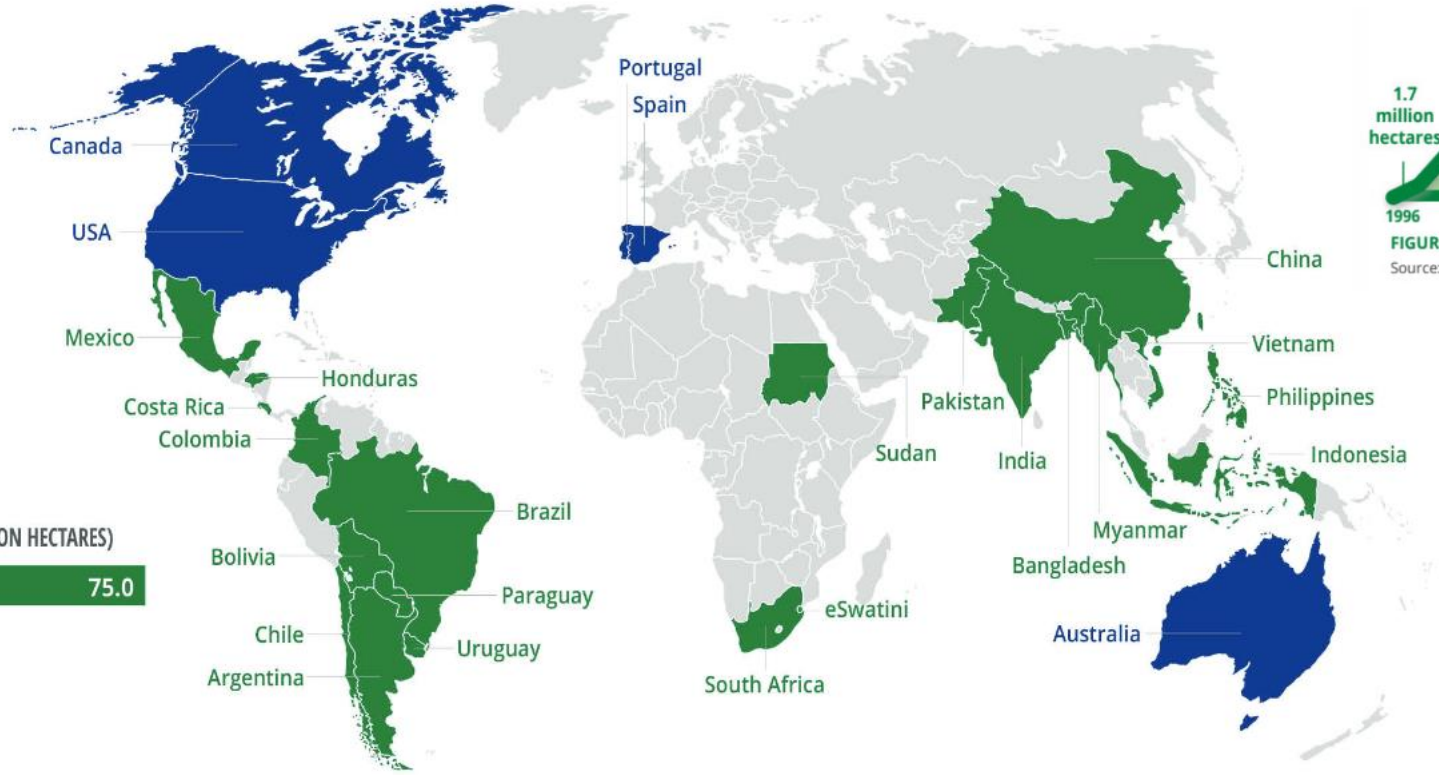
Układ prezentacji

1. GMO – wprowadzeni (GMO w UE i na Świecie, wykrywanie)
2. Cele zadania
3. Rozwiązania dla kontroli GMO w kukurydzy
4. Rozwiązania dla kontroli GMO w rzepaku
5. Wyzwania dla urzędowej kontroli PIORIN na przyszłość
6. Podsumowanie

Gdzie uprawiane są rośliny GM ?

2019 r.





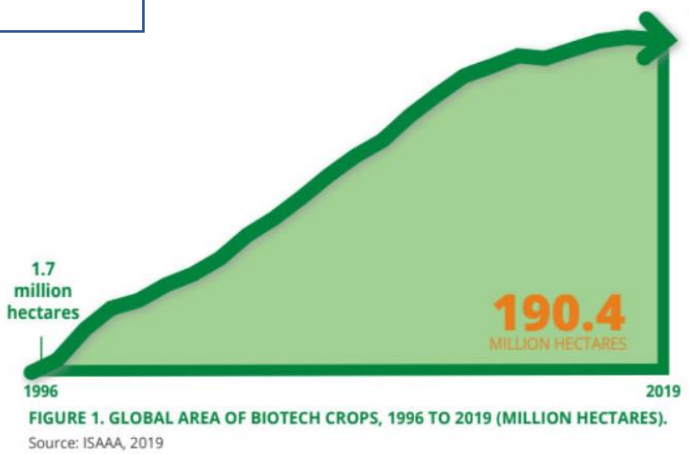
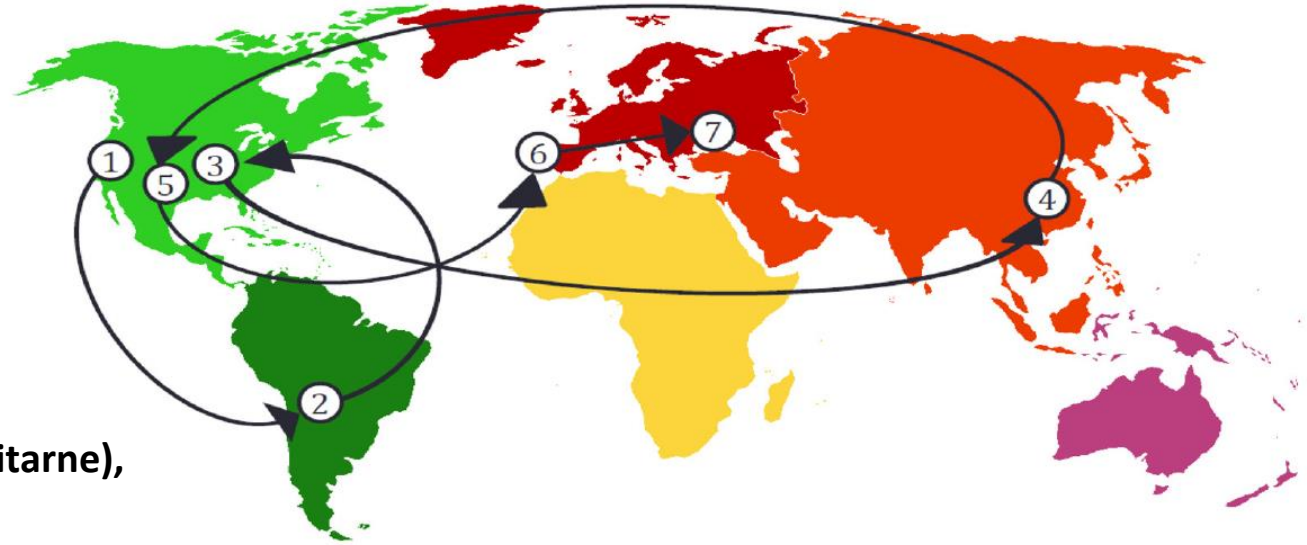


FIGURE 1. GLOBAL AREA OF BIOTECH CROPS, 1996 TO 2019 (MILLION HECTARES).
Source: ISAAA, 2019

http://www.isaaa.org

Globalizacja hodowli roślin i produkcji nasion



Schemat produkcji nasion pomidora:

1. **Produkcja nasion w stopniu pre-basic (przed-elitarne),**
2. **Produkcja nasion w stopniu basic (elitarne),**
3. **Magazyn nasion,**
4. **Produkcja nasion kwalifikowanych,**
5. **Oczyszczanie, uszlachetnianie, pakowanie,**
6. **Dostawa nasion do głównego magazynu,**
7. **Dostawa do kraju finalnego przeznaczenia**

Podlaski. S, Chomontowski Ch. 2021 Biuletyn IHAR Nr 294 / 2021 : 13–26
(za Dunkle, 2015)

Polskie regulacje prawne dot. upraw GMO

2013 - Rozporządzenia Rady Ministrów

1. Zakaz stosowania materiału siewnego odmian kukurydzy MON 810
2. Zakaz stosowania materiału siewnego ziemniaka odmiany Amflora

2018 - Ustawa o GMM i GMO

1. Zakaz uprawy GMO siewie czystym lub w mieszaninie

Kontrola urzędowa materiału siewnego i upraw realizowana przez PIORIN

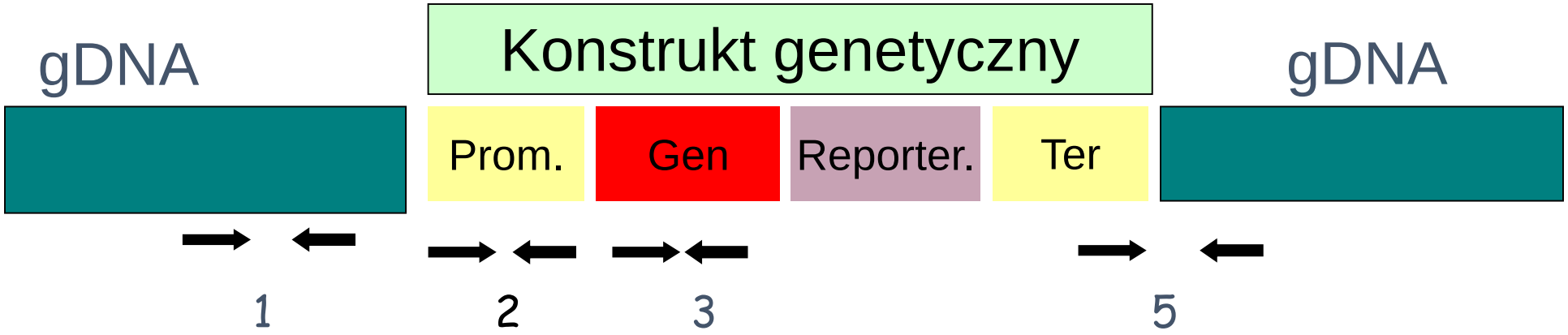
Umożliwienie państwom członkowskim ograniczenia lub zakazu uprawy GMO na swoim terytorium
Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/412

Kontrola urzędowa upraw genetycznie zmodyfikowanych realizowana przez PIORIN

Od 28 lipca 2018 r.

- kontrola upraw GMO wskazanych w rejestrze GMO trzech gatunków: **kukurydza, soja, rzepak**
- kontrola – sprawdzenie czy nie są prowadzone uprawy GMO nie wpisane do rejestru upraw GMO
    - z urzędu – plan kontroli, na 2021 rok obejmuje **34 modyfikacje kukurydzy, 21 modyfikacji soi i 5 modyfikacji rzepaku**
    - na wniosek Ministra Środowiska
    - na wniosek osoby fizycznej, osoby prawnej lub jednostki organizacyjnej nieposiadającej osobowości prawnej

Urzędowa kontrola GMO w UE
Wykrywanie i identyfikacja GMO metodą PCR (Reakcja łańcuchowa polimerazy



1.Gatunkowo-specyficzny

Czy zachodzi reakcja PCR ?

2.Screening

Czy jest GMO?

4

3. Specyficzny dla genu

Identyfikacja genu GMO

4. Specyficzny dla konstruktu

Identyfikacja konstruktu GMO

5. Specyficzny dla zdarzenia

Identyfikacja konkretnego GMO

Elementy regulatorowe/geny/konstrukty stosowane w analizach przesiewowych w PIORIN

- promotor 35S z wirusa mozaiki kalafiora (CaMV P35S)
- promotor 35S z wirusa mozaiki trędownika (FMV P35S)
- promotor nos z *Agrobacterium tumefaciens* (Pnos)
- terminator nos z *Agrobacterium tumefaciens* (Tnos)
- gen *bar* ze *Streptomyces hygroscopicus*
- gen *barnase* z *Bacillus amyloliquefaciens*
- gen *epsps* z *Agrobacterium tumefaciens*, szczep CP4
- gen *gox* z *Ochrobactrum anthropi*
- gen *pat* ze *Streptomyces viridochromogenes*
- gen *nptII* z *Escherichia coli*
- gen Cry1Ab/Ac
- konstrukt promotor 35S z wirusa mozaiki kalafiora/gen *pat* ze *Streptomyces viridochromogenes* (CaMV P35S/pat)
- konstrukt CTP2-CP4 *epsps*
- konstrukt Pnos/*nptII*
- CaMV

Cel zadania
„Efektywne wykrywanie GMO w materiale siewnym przy użyciu multipleksowego qPCR”

Wprowadzenie

1. Rosnąca liczba modyfikacji genetycznych i różnorodność stosowanych w konstruktach elementów genetycznych (DNA) powoduje konieczność zastosowania efektywnych strategii analiz przesiewowych (skriningowych).
2. Jednorazowo wykrywanych jest kilka sekwencji występujących w różnych GMO. obniżenie kosztów analiz GMO i jednoczesne skrócenie czasu kontroli prowadzonej w laboratoriach inspekcji państwowych.
3. Do dziś nie opracowano żadnych urzędowych progów domieszek nasion GMO w partiach nasion konwencjonalnych dlatego analizy skriningowe są podstawową strategią kontroli nasion w UE.
4. Analizy skriningowe pozwalają na wykrycie autoryzowanych i nieautoryzowanych w UE GMO.
5. Identyfikacja konkretnej modyfikacji genetycznej podobnie jak ilościowe oznaczenie zawartości GMO w analizach nasion nie jest tak istotne jak w przypadku produktów żywnościowych czy paszy.

Cel zasadniczy zadania
„Efektywne wykrywanie GMO w materiale siewnym przy użyciu multipleksowego qPCR”

Opracowane metody multipleksowych analiz skriningowych RealTime PCR po ich wdrożeniu do laboratoriów inspekcji zwiększą efektywność prowadzonej prze PIORIN kontroli materiału siewnego w zakresie obecności GMO poprzez zwiększenie zakresu analiz i skrócenie ich czasu a tym samym przyczynią się do zwiększenia konkurencyjności polskich towarów roślinnych na rynkach międzynarodowych.

1. Analiza sekwencji charakterystycznych dla modyfikacji genetycznych rzepaku i kukurydzy.

- zebrano i przeanalizowano sekwencje DNA elementów genetycznych występujących w konstruktach genetycznych stosowanych do wytworzenia autoryzowanych i nieautoryzowanych w UE GMO rzepaku i kukurydzy.
- przeanalizowano dane znajdujące się w dostępnych bazach danych, w tym NCBI, EUgenius, CERA, Biosafety Clearing House
- wytypowano 55 modyfikacji genetycznych kukurydzy i 29 modyfikacji genetycznych rzepaku, do dalszej analizy bioinformatycznej.

2. Projektowanie multipleksowych układów skriningowych

- W analizie wzięto pod uwagę układ sekwencji regulatorowych i genów zawartych w konstruktach genetycznych.

- Analizy baz danych pozwoliły na wybranie elementów genetycznych, które występują w wielu GMO oraz wstępne zaproponowanie optymalnych układów skriningowych obejmujących trzy do czterech elementów skriningowych dla każdego gatunku.

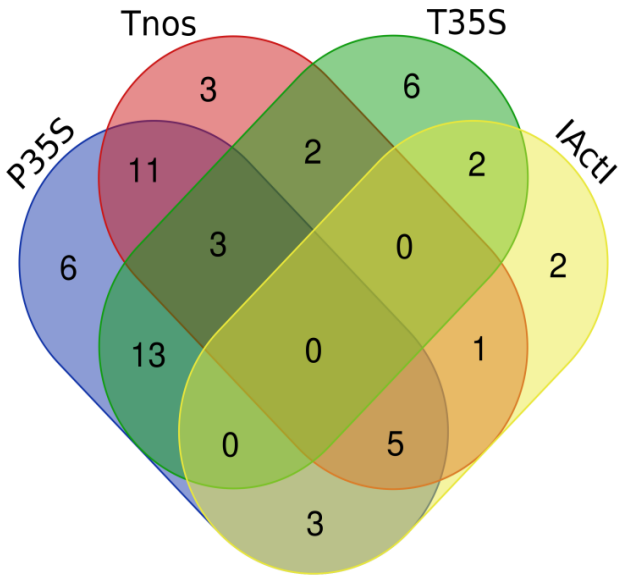
Wybór optymalnego układu screeningowego dla kukurydzy obejmującego maksymalną liczbę modyfikacji.

- Do wykrywania GMO w materiale siewnym kukurydzy przy użyciu multipleksowych strategii skriningowych wytypowano 4 elementy genetyczne najczęściej występujące w modyfikacjach genetycznych kukurydzy.

Strategie oparto o:

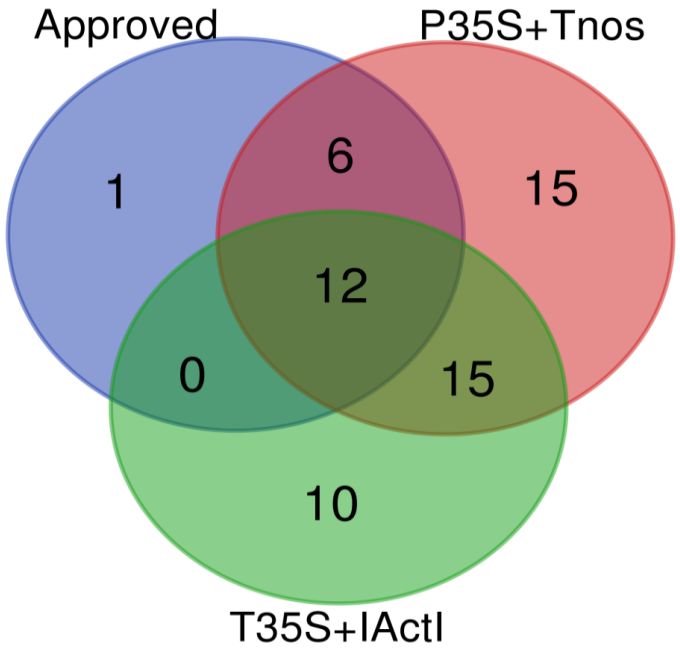
- a) wykrywanie promotora P35S i terminatora tNos,
- b) wykrywanie terminatora t35S i genu aktyny lAct1 oraz wykrywanie genu referencyjnego kukurydzy *hmg*.

Kukurydze GMO zawierające elementy P35S, Tnos,T35S, lAct-1



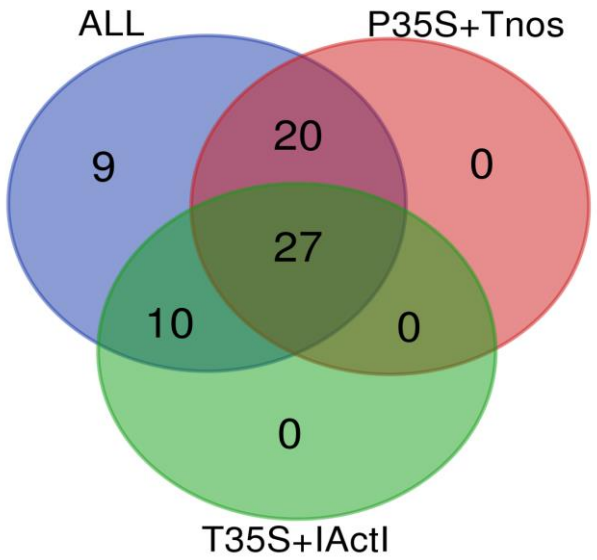
Element	Liczba GMO	Modyfikacje genetyczne
P35S i T35S i Tnos	3	DBN9936 CBH351 IE034
IActI i P35S i Tnos	5	MON863 MON88017 NK603 MON87460 MON89034
P35S+Tnos	11	Bt11 MON809 MZIR098 MON87427 Ms3 MON80100 MON802 Ms6 MZHG0JG MON832 Bt10 maize
P35S+T35S	13	680 40416 43A47 DAS59122 DAS59132 Bt176 4114 676 32316 678 T25 DAS1507 12-5
IActI+P35S	3	MON87429 MON87411 MON87403
T35S+Tnos	2	3272 MIR162
IActI+Tnos	1	GA21
IActI+T35S	2	DP23211 DP62151
P35S	6	DBT418 B16 (DLL25) 98140 32138 MON810 TC6275
Tnos	3	MIR604 PY203 5307
T35S	6	VCO1981 VCO1936 VCO1853 VCO1902 VCO1896 T14
IActI	2	LY038 MON87419

Autoryzowane i nieautoryzowane GMO kukurydzy zawierające elementy P35S, Tnos,T35S, lAct-1



Element	Liczba GMO	Modyfikacje genetyczne
Autoryzowane P35S+Tnos T35S+IActI	12	DAS59122 4114 T25 DAS1507 MON88017 MON87411 NK603 MON87403 MON87460 GA21 MON89034 MIR162
Autoryzowane P35S+Tnos	6	Bt11 MIR604 MON87427 MON810 5307 MZHG0JG
Nieautoryzowane P35S+Tnos T35S+IActI	15	680 40416 DBN9936 43A47 DAS59132 Bt176 MON87429 MON863 676 32316 678 CBH351 12-5 3272 IE034
Autoryzowane brak elementów	1	DAS40278
Nieautoryzowane P35S+Tnos	15	DBT418 B16 (DLL25) MON809 MZIR098 98140 maize Bt10 32138 PY203 Ms3 MON80100 TC6275 MON802 Ms6 MON832
Nieautoryzowane T35S+IActI	10	DP23211 VCO1981 DP62151 LY038 VCO1936 VCO1853 VCO1902 MON87419 VCO1896 T14

Opracowane metody multipleks PCR – Kukurydza. Jednoczesne wykrywanie 57 różnych GMO!!



Element	Liczba GMO	Modyfikacje genetyczne
P35S+Tnos i T35S+IActI	27	680 40416 DBN9936 43A47 4114 MON863 676 T25 DAS1507 12-5 NK603 MON87403 MON87460 3272 GA21 MIR162 DAS59122 DAS59132 Bt176 MON87429 32316 678 CBH351 MON88017 MON87411 IE034 MON89034
Tylko P35S+Tnos	20	Bt11 DBT418 B16 (DLL25) MZIR098 98140 MIR604 PY203 MON810 MON80100 MZHG0JG MON832 MON809 MON87427 32138 Ms3 TC6275 5307 MON802 Ms6 Bt10 maize
Tylko T35S+IActI	10	VCO1853 VCO1902 DP23211 VCO1981 DP62151 LY038 VCO1936 MON87419 VCO1896 T14
Brak elementu	9	ZmCCT9, BVLA430101 ZFN-12 maize DAS40278 DP202216 33121 CRISPR-Cas Waxy Corn BHB Hi-Yield Maize 32218

Kukurydza GMO – nie wykrywana

Na podstawie analizy najnowszych danych zamieszczonych w bazie EUginius wytypowano 9 znanych modyfikacji genetycznych, które nie są wykrywane przez opracowane strategie multipleksowe.

Do wytworzenia tych GMO wykorzystano:

- inne sekwencji DNA (BVLA430101 – phyA, DAS40278 – aad1, DP202216 – TpinII, 33121 – TpinII, 32218 – TpinII)
- lub modyfikacje te zostały uzyskane na drodze technik edytowania genów. (ZmCCT9, ZFN-12, CRISPR-Cas Waxy Corn, BHB Hi-Yield Maize).

1. Zastosowanie metod skriningowych do wykrywania tych modyfikacji będzie opłacalne jeśli te same elementy DNA będą wykorzystywane w innych modyfikacjach kukurydzy.
2. Ponieważ zastosowanie metod edytowania genów powoduje najczęściej miejscowo specyficzne mutacje charakterystyczne dla konkretnego GMO to zastosowanie metod skriningowych do ich wykrywania nie będzie możliwe.

1. Multipleksowa metoda typu dupleks – wykrywanie promotora P35S i terminatora tNos

Sekwencje i długości amplikonów
- ustalone sekwencje, stężenia starterów i sond oraz barwniki fluorescencyjne i wygaszacze.
- Długość amplifikowanych fragmentów: P35S -132 pz, tNos -97 pz.

Warunki reakcji PCR
- objętość reakcji 25 µl
- ilość DNA w reakcji 200 ng (użyto 5 µl DNA o stężeniu 40ng/µl)
- warunki reakcji – standardowe dla maszyny do Real Time PCR typu ABI 7500 lub QuantStudio5 (wstępne 50°C/2 min, 95°C/10 min) denaturacja 95°C/15s, hybrydyzacja 60°C/1min), liczba cykli – 45
- metodę sprawdzono na 16 materiałach referencyjnych

Parametry walidacji metody
- LOD metody – 18 kopii,
- czułość metody – 3 kopie,
- poprawność metody – wykryto docelową sekwencję
- powtarzalność dla 1% i 0,1% – potwierdzono
- odtwarzalność metody – otrzymano powtarzalne wyniki przez dwóch analityków
- specyficzność/selektywność – przetestowano na 16 materiałach referencyjnych.

2. Multipleksowa metoda typu dupleks – wykrywanie terminatora t35S i genu aktyny lAct1

Sekwencje i długości amplikonów
- ustalone sekwencje, stężenia starterów i sond oraz barwniki fluorescencyjne i wygaszacze.
- Długość amplifikowanych fragmentów: t35S -142 pz, IAct1-132 pz.

Warunki reakcji PCR
- objętość reakcji 25 µl
- ilość DNA w reakcji 200 ng (użyto 5 µl DNA o stężeniu 40ng/µl)
- warunki reakcji – standardowe dla maszyny do Real Time PCR typu ABI 7500 lub QuantStudio5 (wstępne 50°C/2 min, 95°C/10 min) denaturacja 95°C/15s, hybrydyzacja 60°C/1min), liczba cykli – 45
- metodę sprawdzono na 16 materiałach referencyjnych

Parametry walidacji metody
- LOD metody – 18 kopii walidowane na kukurydzy MON89034 i 4114
- czułość metody – 5 kopii walidowane na kukurydzy MON89034 i 4114
- poprawność metody – wykryto docelową sekwencję
- powtarzalność dla 1% i 0,1% – potwierdzono
- odtwarzalność metody – otrzymano powtarzalne wyniki przez dwóch analityków
- specyficzność/selektywność – przetestowano na 11 materiałach referencyjnych

3. Multipleksowa metoda typu triplex – wykrywanie promotora P35S, terminatora tNos i genu referencyjnego hmg (system ZM1)

Sekwencje i długości amplikonów
ustalone sekwencje, stężenia starterów i sond oraz barwniki fluorescencyjne i wygaszacze.
- Długość amplifikowanych fragmentów: P35S -132 pz, tNos -97 pz, hmg – 79 pz.

Warunki reakcji PCR
- objętość reakcji 25 µl
- ilość DNA w reakcji 200 ng (użyto 5 µl DNA o stężeniu 40ng/µl)
- warunki reakcji – standardowe dla maszyny do Real Time PCR typu ABI 7500 lub QuantStudio5 (wstępne 50°C/2 min, 95°C/10 min) denaturacja 95°C/15s, hybrydyzacja 60°C/1min), liczba cykli – 45
- metodę sprawdzono na 16 materiałach referencyjnych

Parametry walidacji metody:
- LOD metody – 18 kopii dla P35S/tNos, LOD dla genu referencyjnego hmg (system detekcji ZM)– 10 kopii
- czułość metody – 3 kopie dla dla P35S/tNos, 5 kopii dla genu referencyjnego hmg,
- poprawność metody – wykryto docelową sekwencję
- powtarzalność dla 1% i 0,1% – potwierdzono
- odtwarzalność metody – otrzymano powtarzalne wyniki przez dwóch analityków
- specyficzność/selektywność dla genu referencyjnego hmg

Podsumowanie metody multipleks PCR – Kukurydza

- Opracowane metody skriningowe: pozwalają wykryć 57 autoryzowanych i nieautoryzowanych w UE GMO oraz gen referencyjny kukurydzy hmg.
- Laboratoryjnie potwierdzono wykrycie na 16 certyfikowanych materiałach referencyjnych

1. Multipleksowa metoda typu dupleks – wykrywanie promotora P35S i terminatora tNos
2. Multipleksowa metoda typu dupleks – wykrywanie terminatora t35S i genu lAct1
3. Multipleksowa metoda typu triplex – wykrywanie promotora P35S, terminatora tNos i genu referencyjnego hmg (system ZM1).

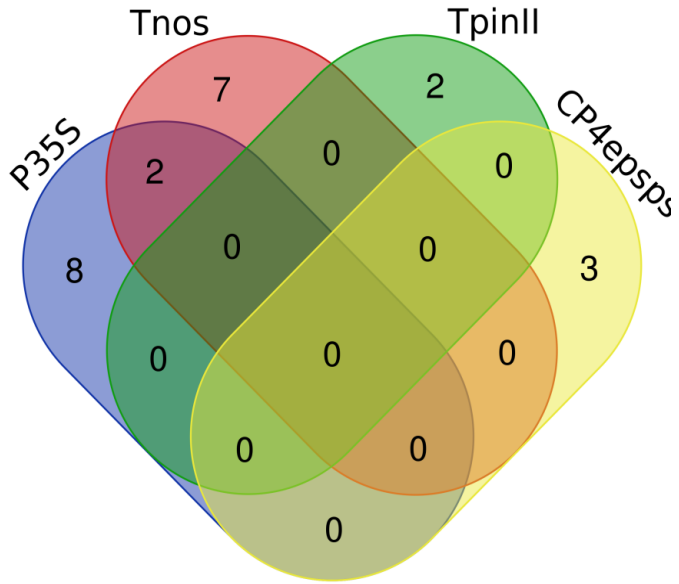
Wybór optymalnego układu screeningowego dla rzepaku pokrywającego maksymalną liczbę modyfikacji.

- Do wykrywania GMO w materiale siewnym kukurydzy przy użyciu multipleksowych strategii skriningowych wytypowano 4 elementy genetyczne najczęściej występujące w modyfikacjach genetycznych kukurydzy.

Strategie oparto o:

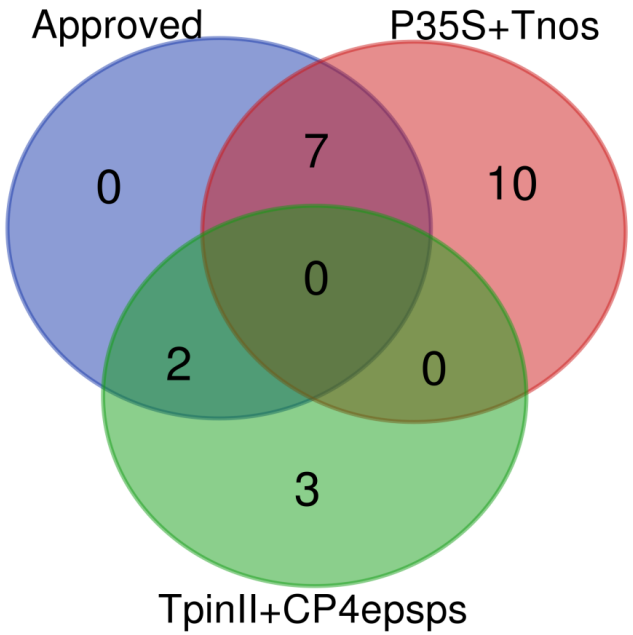
- a) wykrywanie promotora P35S i terminatora tNos,
- b) wykrywanie terminatora TpinII i genu CP4-epsps oraz wykrywanie genu referencyjnego rzepaku *cru*.

Rzepaki genetycznie zmodyfikowane zawierające elementy P35S, Tnos, TpinII i CP4-epsps.



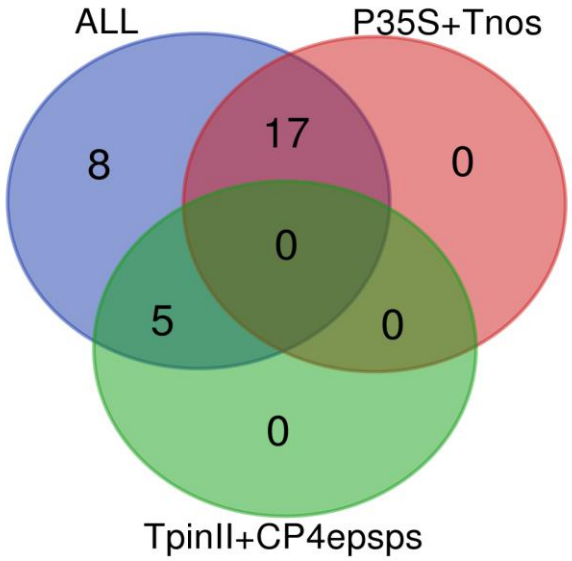
Element	Liczba GMO	Modyfikacje genetyczne
P35S Tnos	2	OXY-235 DHA
P35S	8	Falcon GS 40/90 23-198 HCR-1 Liberator 23-18-17 Topas 19/2 T45 HCN10
Tnos	7	Ms8 Rf2 MPS965 Rf3 Rf1 Ms11 Ms1
TpinII	2	73496 61061
CP4epsps	3	GT73 MON88302 GT200

Autoryzowane i nieautoryzowane GMO rzepak zawierające elementy P35S, Tnos, TpinII i CP4-epsps.



Element	Liczba GMO	Modyfikacje genetyczne
AutoryzowaneP35S +Tnos	7	Ms8 Rf2 Rf3 Rf1 Topas 19/2 T45 Ms1
Autoryzowane TpinII+CP4epsps	2	GT73 MON88302
Nieautoryzowane P35S+Tnos	10	Falcon GS 40/90 MPS965 23-198 HCR-1 OXY-235 Liberator 23-18-17 Ms11 DHA HCN10
Nieautoryzowane TpinII+CP4epsps	3	73496 GT200 61061

Opracowane metody multipleks PCR – Rzepak
Jednoczesne wykrywanie 22 różnych GMO!!



Element	Liczba GMO	Modyfikacje genetyczne
P35S+Tnos	17	Falcon GS 40/90 Ms8 Rf2 23-198 MPS965 HCR-1 OXY-235 Liberator 23-18-17 Rf3 T45 Topas 19/2 Rf1 DHA Ms11 HCN10 Ms1
TpinII+CP4epsps	5	GT73 73496 MON88302 GT200 61061
Brak elementów	8	MPS963 MPS962 LBFLFK MPS961 5715 MPS964 CP1 CLB1

GMO rzepak – nie wykrywane

- Na podstawie analizy najnowszych danych zamieszczonych w bazie EUginius wytypowano 8 znanych modyfikacji genetycznych, które nie są wykrywane przez opracowane strategie multipleksowe.

Do wytworzenia tych GMO wykorzystano:

- inne sekwencji DNA (MPS961 – phyA, MPS962 – phyA, MPS963 – phyA, MPS964 - phyA , LBFLFK - T35S)
- lub modyfikacje te zostały uzyskane na drodze technik edytowania genów. (5715, CP1, CLB1).

1. Zastosowanie metod skriningowych do wykrywania tych modyfikacji będzie opłacalne jeśli te same elementy DNA będą wykorzystywane w innych GMO.

2. Ponieważ zastosowanie metod edytowania genów powoduje najczęściej miejscowo specyficzne mutacje charakterystyczne dla konkretnego GMO to zastosowanie metod skriningowych do ich wykrywania nie będzie możliwe.

1. Multipleksowa metoda typu dupleks – wykrywanie promotora P35S i terminatora tNos

Sekwencje i długości amplikonów

- wirusa mozaiki kalafiora CaMV (FAM). ustalone sekwencje, stężenia starterów i sond oraz barwniki fluorescencyjne i wygaszacze
- Długość amplifikowanych fragmentów: P35S -132 pz, tNos -97 pz.

Warunki reakcji PCR

- objętość reakcji 25 µl
- ilość DNA w reakcji 200 ng (użyto 5 µl DNA o stężeniu 40ng/µl)
- warunki reakcji – standardowe dla maszyny do Real Time PCR typu ABI 7500 lub QuantStudio5 (wstępne 50°C/2 min, 95°C/10 min) denaturacja 95°C/15s, hybrydyzacja temp. 60°C/1min), liczba cykli – 45

P
arametry walidacji metody

- LOD metody – 16 kopii, (0,01%)
- czułość metody – 3 kopie,
- poprawność metody – wykryto docelową sekwencję
- powtarzalność dla 1% i 0,1% – potwierdzono
- odtwarzalność metody – otrzymano powtarzalne wyniki przez dwóch analityków
- specyficzność/selektywność – przetestowano na 10 CRM

2. Multipleksowa Metoda typu dupleks – wykrywanie terminatora TpinII i genu Cp4 Epsps

Sekwencje i długości amplikonów

- ustalone sekwencje, stężenia starterów i sond oraz barwniki fluorescencyjne i wygaszacze
- Długość amplifikowanych fragmentów: TpinII –115 pz, Cp4 Epsps -147 pz

Warunki reakcji PCR

- objętość reakcji 25 µl
- ilość DNA w reakcji 200 ng (użyto 5 µl DNA o stężeniu 40ng/µl)
- warunki reakcji – standardowe dla maszyny do Real Time PCR typu ABI 7500 lub QuantStudio5 (wstępne 50°C/2 min, 95°C/10 min) denaturacja 95°C/15s, hybrydyzacja temp. 63°C/1min), liczba cykli – 45
- metodę sprawdzono na materiałach referencyjnych (CRM).

Parametry walidacji metody

- LOD metody – 32 kopie (0,02%),
- czułość metody – 3 kopie,
- poprawność metody – wykryto docelową sekwencję
- powtarzalność dla 1% i 0,1% – potwierdzono
- odtwarzalność metody – otrzymano powtarzalne wyniki przez dwóch analityków
- specyficzność/selektywność – przetestowano na 10 CRM

3. Multipleksowa metoda typu tripleks – wykrywanie promotora P35s, terminatora tNos i genu referencyjnego *Cru*.

Sekwencje i długości amplikonów

- ustalone sekwencje, stężenia starterów i sond oraz barwniki fluorescencyjne i wygaszacze
- Długość amplifikowanych fragmentów: P35S -132 pz, tNos -97 pz, cru – 101 pz

Warunki reakcji PCR

- objętość reakcji 25 µl
- ilość DNA w reakcji 200 ng (użyto 5 µl DNA o stężeniu 40ng/µl)
- warunki reakcji – standardowe dla maszyny do Real Time PCR typu ABI 7500 lub QuantStudio5 (wstępne 50°C/2 min, 95°C/10 min) denaturacja 95°C/15s, hybrydyzacja temp. 63°C/1min), liczba cykli – 45
- metodę sprawdzono na 16 materiałach referencyjnych (CRM).

Parametry walidacji metody

- LOD metody – 32 kopie (0,02%),
- czułość metody – 3 kopie,
- poprawność metody – wykryto docelową sekwencję
- powtarzalność dla 1% i 0,1% – potwierdzono
- odtwarzalność metody – otrzymano powtarzalne wyniki przez dwóch analityków
- specyficzność/selektywność – przetestowano na 10 CRM Tab.1
- Fig 4. Autoryzowane i nieautoryzowane w UE GMO wykrywane przez dwie opracowane multipleksowe strategie skriningowe: P35S + Tnos, TpinII + CP4-epsps

4. Metoda wykrywania natywnej sekwencji wirusa mozaiki kalafiora CaMV (FAM)

- ustalone sekwencje, stężenia starterów i sond oraz barwniki fluorescencyjne i wygaszacze

Warunki reakcji PCR
- objętość reakcji 25 µl
- ilość DNA w reakcji 200 ng (użyto 5 µl DNA o stężeniu 40ng/µl)
- warunki reakcji – standardowe dla maszyny do Real Time PCR typu ABI 7500 lub QuantStudio5 (wstępne 50°C/2 min, 95°C/10 min) denaturacja 95°C/15s, hybrydyzacja. 60°C/1min), liczba cykli – 45

Parametry walidacji metody
- LOD metody – 10 kopii
- czułość metody – 2 kopie
- poprawność metody – wykryto docelową sekwencję
- powtarzalność – uzyskano powtarzalność dla rozcieńczonego plazmidu
- odtwarzalność metody – otrzymano powtarzalne wyniki przez dwóch analityków
- specyficzność/selektywność – przetestowano na CRM rzepak MS8, GT73, RF3, kukurydza Bt11, MON87427

Podsumowanie metody multipleks PCR – Rzepak.

- Opracowane metody skriningowe: pozwalają wykryć 22 autoryzowane i nieautoryzowane w UE GMO oraz gen referencyjny rzepaku Cru.
- Laboratoryjnie potwierdzono wykrycie na wszystkich 10 materiałach referencyjnych.
- Zwalidowano metodę pozwalająca na wyeliminowanie fałszywie pozytywnych wyników związanych z zakażeniem roślin przez wirusa mozaiki kalafiora CaMV (FAM).

1. Multipleksowa metoda typu dupleks – wykrywanie promotora P35S i terminatora tNos
2. Multipleksowa Metoda typu dupleks – wykrywanie terminatora TpinII i genu Cp4 Epsps
3. Multipleksowa metoda typu tripleks – wykrywanie promotora P35s, terminatora tNos i genu referencyjnego *Cru*.
4. metoda – wykrywanie wirusa mozaiki kalafiora CaMV (FAM).

Podsumowanie

- Wszystkie założone kamienie milowe zostały osiągnięte:

1. Wyselekcjonowano działające metody singlepleks dla genetycznie zmodyfikowanego rzepaku i kukurydzy na aparacie qPCR

2. Wyselekcjonowano działające metody multipleks dla genetycznie zmodyfikowanego rzepaku i kukurydzy na aparacie qPCR

Uzyskane efekty przeprowadzonych badań są lepsze od założonych w projekcie

- Liczba modyfikacji genetycznych objętych multipleksowym testem skriningowym qPCR dla kukurydzy wynosi 57 (w projekcie min. 15)
- Liczba modyfikacji genetycznych objętych multipleksowym testem skriningowym qPCR dla rzepaku wynosi 22 (w projekcie min. 8)
- Osiągnięte granice wykrywalności dla wszystkich elementów we wszystkich metodach były niższe niż założenia w projekcie (0,1% nasion czyli 82 kopie dla rzepaku i 39 kopii dla kukurydzy).
- Metody spełniają wymagania niezbędne do ich przekazania do fazy przygotowania do zastosowania oraz stosowania w praktyce.

Faza przygotowania wyników badań naukowych do zastosowania w praktyce:

1. Optymalizacja opracowanych metod na aparcie Roche LightCycler 480
2. Przekazanie opracowanych metod i odpowiednie szkolenia.
3. Przeprowadzenie miedzylaboratoryjnego badania porównawczego.
4. Ewaluacja wyników

Przeprowadzenie serii szkoleń koniecznych do wdrożenia metod RT-PCR do rutynowych analiz GMO w laboratoriach PIORIN

Badania pod kątem modyfikacji genetycznych wykonane przez PIORiN w 2020 roku

Lp.	gatunek/rodzaj materiału	liczba próbek	liczba analiz	liczba analiz jednostkowych
badania próbek materiału roślinnego				
1	kukurydza nasiona	271	5923	13250
2	rzepak nasiona	171	1365	3176
3	soja nasiona	28	629	1530
4	kukurydza liście (zbiorcze)	1728	9685	22836
5	rzepak liście (zbiorcze)	594	7287	15820
6	soja liście (zbiorcze)	223	2050	4908
7	rzepak nasiona zlecenie	1	16	44
8	kukurydza liście zlecenie	1	24	52
	razem	**3017**	**26979**	**61616**

Cel zasadniczy zadania
„Efektywne wykrywanie GMO w materiale siewnym przy użyciu multipleksowego qPCR”

Opracowane metody multipleksowych analiz skriningowych RealTime PCR po ich wdrożeniu do laboratoriów inspekcji zwiększą efektywność prowadzonej prze PIORIN kontroli materiału siewnego w zakresie obecności GMO poprzez zwiększenie zakresu analiz i skrócenie ich czasu a tym samym przyczynią się do zwiększenia konkurencyjności polskich towarów roślinnych na rynkach międzynarodowych.

Overview
New Update, Version 1.9.1 is now live!
Genetic Elements Thesaurus in open access publication!

EUginius views
- 855 GMOs (incl. stacks)
- 259 methods
- 396 reference materials
- Genetic elements

GMO-related websites

Suggest new GMO
Give feedback

The European GMO database

EUginius (EUropean GMO INItiative for a Unified Database System) is an initiative of BVL - the Federal Office of Consumer Protection and Food Safety (Berlin, DE) and WFSR - Wageningen Food Safety Research (formerly RIKILT) of Wageningen UR (Wageningen, NL). EUginius´ intention is to support competent authorities and private users who seek accurate information on GMOs.

EUginius provides detailed information of major and relevant issues regarding the presence, detection and identification of GMOs:

- with a focus on the situation in the European Union
- as well as world-wide coverage

855 GMO !

About the partners

WAGENINGEN UNIVERSITY & RESEARCH

Federal Office of Consumer Protection and Food Safety

AGES

Zapisz

IHAR

izs Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Zespół projektu

dr Sławomir Sowa – e mail:s.sowa@ihar.edu.pl

mgr Magdalena Żurawska-Zajfert
mgr Katarzyna Grelewska-Nowotko
dr Anna Linkiewicz
dr Ewelina Żmijewska
dr Joanna Chojak-Koźniewska
mgr Jarosław Nowosielski
mgr Krzysztof Michalski
mgr Barbara Janik-Janiec

Aktualny zakres kontroli urzędowej PIORIN obejmuje wykonywanie analiz sin glpleks GMO rzepaku niedopuszczone do uprawy a dopuszczone do obrotu w UE jako żywność i pasza

Lp.	Nazwa odmiany	Unikatowy identyfikator
1.	GT73	MON-ØØØ73-7
2.	MS8, RF3, MS8xRF3	ACS-BNØØ5-8, ACS-BNØØ3-6, ACS-BNØØ5-8xACS-BNØØ3-6
3.	T45	ACS-BNØØ8-2
4.	MON88302	MON-883Ø2-9
5.	MON88302xMs8xRf3, MON88302xMs8, MON88302 x Rf3	MON-883Ø2-9xACSBNØØ5-8xACS-BNØØ3-6, MON-883Ø2-9 x ACSBNØØ5-8, MON-883Ø2-9xACS-BNØØ3-6