

## STRATEGIJE U OTKRIVANJU GENETIČKI MODIFICIRANIH ORGANIZAMA U SJEMENU NA PODRUČJU RH: PRIMJENA METODE PROBIRA

KSENIJA DUKA, RENATA HANZER

Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu,  
Centar za sjemenarstvo i rasadničarstvo, Osijek  
*Croatian Agency for Agriculture and Food, Center for Seed and Seedlings, Osijek*

### SAŽETAK

Stavljanjem na tržište prvih genetički modificiranih organizama devedesetih godina prošloga stoljeća javlja se potreba za odgovarajućim analitičkim metodama njihova praćenja. Moderna biotehnologija spada među najbrže rastuće tehnologije današnjice, zbog čega iz godine u godinu dolazi do porasta novih modifikacija na tržištu, a posljedično raste i broj metoda za njihovo otkrivanje. U početnim godinama praćenja genetički modificiranih organizama analiza je podrazumijevala utvrđivanje prisustva tek 2-3 probirna elementa, dok danas laboratoriji moraju analitičkim metodama pokriti preko sto različitih modifikacija. Sve veći broj metoda predstavlja izazov laboratorijima zbog porasta broja analitičkih koraka koje je potrebno provesti po jednome uzorku, analize postaju vremenski i financijski sve zahtjevnije, te je nužna uspješna strategija u analitici. U Hrvatskoj se genetički modificirane kulture sustavno prate nacionalnim monitorinzima. Monitoring obuhvaća analize sjemena, zelene mase, hrane i hrane za životinje. Uzimajući u obzir stalan porast modifikacija na tržištu, svake godine se na istome broju uzoraka odrađuje sve veći broj analiza.

U ovome radu istražiti će se primjena matrice za izbor metoda probira u skladu s planom monitoringa. Metode probira prethode potvrdnim *Real Time PCR* analizama i služe izuzimanju negativnih uzoraka. S obzirom na to da se analitičkim postupcima moraju obuhvatiti sve trenutačno odobrene modifikacije, s pomoću matrice probira nastojalo se sa što manje analitičkih koraka postići maksimalnu pokrivenost svih modifikacija i osigurati svrhovitu analizu. Rezultati istraživanja ukazuju da matrica probira omogućuje optimalan odabir strategije u analizi uzoraka i daje zadovoljavajući rezultat, a istovremeno su vrijeme analize i financijski trošak unutar prihvatljivih okvira.

Ključne riječi: metode probira, GMO, matrica, monitoring, PCR u stvarnome vremenu

### UVOD

Od pojave prvih komercijaliziranih genetički modificiranih poljoprivrednih kultura koncem prošloga stoljeća do danas, površine zasijane genetički modificiranim organizmima (GMO), kao i broj modifikacija, u stalnome su porastu. Primjena tehnika genetičkoga inženjerstva dovela je do svojevrzne revolucije u poljoprivredi, omogućujući brz razvoj kultivara otpornih na herbicide, štetnike i bolesti ili kultivara poboljšanoga nutritivnog

sadržaja. Porastom broja modifikacija posljedično dolazi i do porasta broja metoda za praćenje takvih proizvoda na tržištu, te uobičajene strategije otkrivanja prisutnosti genetički modificiranih organizama u poljoprivrednim proizvodima zahtijevaju nov pristup i strategiju koja će smanjiti broj analitičkih koraka, a istovremeno jamčiti uspješnost monitoriranja (Querci i sur., 2010).

Europsko zakonodavstvo koje regulira pitanje genetički modificiranih proizvoda zasniva se na dva osnovna zahtjeva: prije stavljanja na tržište svaki GMO mora proći procjenu rizika utjecaja na ljude, životinje i okoliš te za njega mora biti osigurana metoda detekcije. Prema Uredbi (EU) 2017/625, Referentni laboratorij Zajednice validira metode i objavljuje ih u važećim registrima, a nacionalno zakonodavstvo propisuje obveznu uporabu ovih metoda za službene kontrole, odnosno monitoring (EU Register of authorized GMOs, 2024). Monitoring ima za cilj utvrditi sadrži li proizvod genetički modificirane organizme te je li utvrđena modifikacija odobrena za stavljanje na tržište, odnosno je li prošla procjenu rizika. U uzorcima kod kojih je potvrđena prisutnost nekoga GMO-a potrebno je utvrditi koliki je njegov kvantitativni sadržaj (Hilbeck, 2020). Metoda izbora jest metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnome vremenu (Real Time PCR, qPCR). Ova metoda dokazano je najtočnija i najpouzdanija za detekciju GMO-a, visoko je specifična i primjenjiva na širok raspon uzoraka, od sjemena do visoko prerađene hrane i hrane za životinje (Angers – Loustau i sur., 2014; Holst – Jelsen i sur., 2012).

Trenutačno na europskome tržištu postoji velik broj odobrenih modifikacija, ali i onih kojima je isteklo odobrenje ili su odobrene izvan Europske unije. Kontinuirano povećanje broja modifikacija na europskome i globalnom tržištu predstavlja izazov u kontroli i praćenju GMO-a. Povećavanjem broja modifikacija raste i broj metoda njihova otkrivanja, analize su sve složenije, broj analitičkih koraka koje je potrebno provesti po jednome uzorku sve je veći, a analize su financijski i vremenski sve zahtjevnije. Zbog svega navedenoga nužan je optimalan odabir strategije u analizi uzoraka koji će pružiti zadovoljavajući rezultat, a istovremeno omogućiti optimizaciju troškova analize i potrebnoga vremena (Rosa i sur., 2016; Rostoks i sur., 2019).

## MATERIJALI I METODE

U radu su korišteni uzorci sjemena soje, kukuruza i uljane repice zaprimljeni u Odjelu za biotehnoške analize, mikotoksine i rezidue pesticida Centra za sjemenarstvo i rasadničarstvo Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu (CSR, HAPIH) u sklopu službenih kontrola. Uz uzorke sjemena kao pozitivne kontrole korišteni su certificirani referentni materijali za GMO JRC (Joint Research Centre) i AOCS (American Oil Chemists' Society) normalizirani na 0,1 % sadržaja GMO-a.

Genomska DNK izolirana je iz uzoraka sjemena i certificiranoga referentnog materijala metodom s 2 % CTAB pufera (Hanzer, 2019), a provjera kakvoće i prinosa DNK provjerena je UV spektrofotometrijom (*BioPhotometer*, Eppendorf). Otopina DNK i standardi normalizirani su na 50 µg/ml. Utvrđivanje prisutnosti karakterističnih DNK slijedova za GMO odrađeno je qPCR metodom s pomoću TaqMan kemije (Navarro i sur., 2015). Korištene početnice i fluorescirajuće probe prikazane su u Tablici 1. (Vanden Eede, 2011.). Svaki uzorak analiziran je u dvama ponavljanjima.

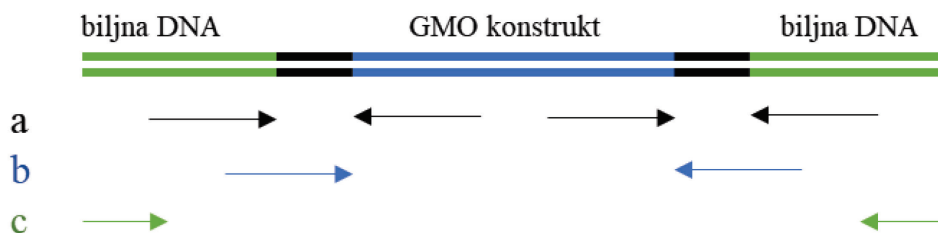
**Tablica 1. Popis početnica (3'-5' i 5'-3') i TaqMan proba korištenih u analizi.**  
*Table 1 A list of primers (3'-5' and 5'-3') and the TaqMan probes used in the analyses.*

	Biljno specifični gen <i>Plant-specific gene</i>
lektin <i>lectin</i>	CCA GCT TCG CCG CTT CCT TC
	GAA GGC AAG CCC ATC TGC AAG CC
	FAM - CTT CAC CTT CTA TGC CCC TGA CAC - TAMRA
alkohol dehidrogenaza <i>alcohol dehydrogenase</i>	CGTCGTTTCCCATCTCTTCCTCC
	CCA CTC CGA GAC CCT CAG TC
	VIC - AAT CAG GGC TCA TTT TCT CGC TCC TCA - TAMRA
kruciferin A <i>Cruciferin A</i>	GGC CAG GGT TTC CGT GAT
	CCG TCG TTG TAG AAC CAT TGG
	VIC - AGT CCT TAT GTG CTC CAC TTT CTG GTG CA - TAMRA
	Probirni element <i>Screening element</i>
p-35S	CGTCTTCAAAGCAAGTGGATTG
	TCTTGCGAAGGATAGTGGGATT
	FAM - TCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCA - TAMRA
t-NOS	CATGTAATGCATGACGTTATTTATG
	TTGTTTTCTATCGCGTATTAATGT
	FAM - ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA - TAMRA
CryIAb/Ac	GAGGAAATGCGTATTCAATTCAAC
	TTCTGGACTGCGAACAATGG
	FAM - ACATGAACAGCGCCTTGACCACAGC - MGB
Pat	TTGAGGGTGTGTGGCTGGTA
	TGTCCAATCGTAAGCGTTCCT
	FAM - CTT CCA GGG CCC AGC GTA AGC A - TAMRA
t-E9	TTTTTATTCGGTTTTTCGCTATCG
	TGAGAATGAACAAAAGGACCATATCA
	FAM-TCATTAACCTTCTCCATCCATTTCATTTCACAGT-TAMRA

## REZULTATI I RASPRAVA

Više autora donosi različite strategije za otkrivanje prisutnosti genetički modifi-ciranih organizama u sjemenu. Sve za cilj imaju utvrditi kako s minimalnim brojem analiza za svaku biljnu vrstu osigurati potpunu (ili što veću) pokrivenost u skladu sa zakonski propisanim uvjetima (Bofini, 2021.). Gledano kroz povijest, u prvim godinama provedbe monitoringa

umnažanje svega dvaju probirnih elemenata, promotora 35S i terminatora NOS, omogućivalo je preko 90 % pokrivenosti genetički modificiranih organizama na tržištu (Hardegger i sur., 1999.). Danas bi takav pristup mogao biti primijenjen jedino na kukuruz, dok je za druge biljne vrste potreban složeniji pristup, koji kombinira tri tipa metoda različite specifičnosti umnažanja (Slika 1.). Probirne metode podrazumijevaju umnažanje dijela konstrukta unesenoga u genom biljke domaćina bilo da se radi o promotorskim i terminatorskim regijama bilo o samome konstrukt, nositelju novoga svojstva. Takve metode omogućuju identifikaciju neovisnu o biljnoj vrsti i pokrivanje velikoga broja različitih GMO-a, koji u svojem genomu sadrže neke od navedenih sekvenca. S druge strane, GMO specifične metode umnažaju samo mjesto umetanja konstrukta u genom biljke domaćina i omogućuju identifikaciju GMO-a (Hanzer i sur., 2012; Gerdes i sur., 2012.).



**Slika 1. Prikaz različitih tipova metoda za detekciju genetičkih modifikacija (a: detekcija promotorske i terminatorske regije; b: detekcija GMO konstrukta, c: GMO specifična detekcija).**

*Figure 1 A presentation of different methods for the detection of genetic modifications (a: detection of promoter and terminator regions; b: detection of GMO constructs, c: GMO-specific detection).*

Trenutačno na svjetskome tržištu postoje stotine različitih modifikacija. Uporaba PCR analiza za svaku od modifikacija nerealna je s obzirom na potrebno vrijeme za takav pristup, kao i trošak. Kontinuirani porast GMO-a traži razvoj strategija koje će omogućiti donošenje zaključka o prisutnosti/odsutnosti što većega broja modifikacija u uzorku s razumnim brojem qPCR analiza (Broeders i sur., 2012.). Uzimajući u obzir trenutačno stanje na europskome tržištu i zahtjeve nacionalnoga zakonodavstva, implementirana je strategija koja kombinacijom svih triju tipova metoda za detekciju omogućuje potpunu pokrivenost trenutačno odobrenih modifikacija, uvažavajući „nultu toleranciju“ na prisutnost GMO-a u sjemenu na području Republike Hrvatske (Rostoks i sur., 2019.). Tablica 2. prikazuje postotak pokrivenosti modifikacija s pomoću dostupnih probirnih elemenata, koji se kreće od 83,33 % za soju do 92,31 % za kukuruz. Kombinacijom elemenata probira i GMO specifičnih metoda moguće je postići 100%-tnu pokrivenost za ukupno 25 genetički modificiranih soja, 43 kukuruza i 17 genetički modificiranih uljanih repica zastupljenih u registru metoda (Bofini i sur., 2012.).

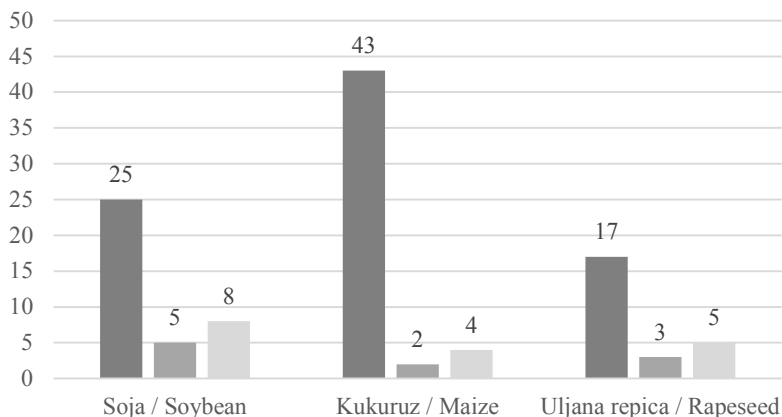
**Tablica 2. Postotak pokrivenosti modifikacija navedenih u GMO registru EU-a uporabom elemenata probira i kombinacijom elemenata probira i GMO specifičnih metoda.**

*Table 2 The coverage percentage of modifications listed in the EU GMO register using the screening elements and a combination of the screening elements and the GMO-specific methods.*

Strategija za detekciju GMO <i>Strategy for GMO detection</i>	Soja <i>Soybean</i>	Kukuruz <i>Maize</i>	Uljana repica <i>Rapeseed</i>
Probirni elementi <i>Screening elements</i>	p-35S t-NOS PAT Cry1Ab/Ac t-E9	p-35S t-NOS	p-35S t-NOS t-E9
Pokrivenost <i>Coverage</i>	83,33%	92,31%	85,71%
Kombinacija probirnih elemenata i GMO specifičnih metoda <i>Combination of screening elements and GMO-specific methods</i>	p-35S t-NOS PAT Cry1Ab/Ac t-E9 DP-305423-1 BPS-CV127-9 GMB151	p-35S t-NOS DAS-40278-9 MON-95379-3	p-35S t-NOS t-E9 DP-073496-4 MON-94100-2
Pokrivenost <i>Coverage</i>	100%	100%	100%

Pristup detekciji genetički modificiranih organizama koji uključuju probirne elemente u svrhu pokrivanja širokoga raspona modifikacija postao je uobičajen za sve laboratorije koji provode službene kontrole. Uzimajući u obzir specifičnosti na nacionalnoj razini, kao i dostupnost metoda, opreme, visokokvalificiranoga kadra te zahtjeve akreditacijskih tijela, svaki laboratorij u okviru svega navedenoga razvija svoju metodologiju, koja u konačnici mora jamčiti uspješnu provedbu nacionalnoga i europskog zakonodavstva. Temelj svega jest zajednička strategija koju je razvila Europska mreža GMO laboratorija ENGL, takozvani princip matrice, koji je temeljni princip implementiran u rad ovlaštenih laboratorija na području RH (Block i sur., 2013.). Republika Hrvatska ističe se kao zemlja članica EU-a s izrazito strogim nacionalnim zakonodavstvom te je trenutačno na snazi za područje cijele države takozvana nulta toleranca na sijanje svih GMO-a (Davison i Ammann, 2017.; Commission Implementing Decision (EU) 2016/321, 2016.).

Strategija matrice koja uključuje kombinaciju probirnih elemenata i GMO specifičnih metoda daje jednaku pokrivenost kao i analiza svakoga modificiranog organizma pojedinačno, uz značajno manji broj qPCR analiza, što u konačnici štedi vrijeme i novac. Najznačajnije smanjenje broja analitičkih koraka vidljivo je kod kukuruza, gdje se 43 modifikacije uporabom ove strategije mogu pokriti dvjema qPCR analizama za 92,31 % pokrivenosti, odnosno s četirima za 100 % pokrivenosti. Značajno smanjenje analitičkih koraka je i kod analize uljane repice, gdje je za 100%-tnu pokrivenost dovoljno pet qPCR analiza, dok je kod soje potrebno osam. Iako smanjenje broja analitičkih koraka kod soje nije toliko značajno kao kod drugih kultura, ono još uvijek nudi rješenje koje će jamčiti potpunu pokrivenost u skladu sa zakonski propisanim zahtjevima, a analiza će ostati u razumnim vremenskim i financijskim okvirima (Slika 2.).



**Slika 2. Broj PCR analiza potreban za detekciju modifikacija navedenih u GMO registru EU-a za najzastupljenije kulture (slijeva nadesno za svaku biljnu vrstu: GMO specifične metode, probirni elementi, kombinacija probirnih elemenata i GMO specifičnih metoda).**

*Figure 2 The number of PCR analyses required for the detection of modifications listed in the EU GMO register for the most represented crops (from the left to the right for each plant species: GMO-specific methods, screening elements, combination of screening elements, and GMO-specific methods).*

## ZAKLJUČAK

Primjena matrice za izbor metoda probira nudi sveobuhvatnu analizu prisutnosti genetički modificiranih organizama u sjemenu soje, kukuruza i uljane repice. Kako bi što učinkovitije pokrili modifikacije za koje su metode detekcije dostupne, u skladu s dostupnim resursima implementirana je gore opisana strategija za najzastupljenije poljoprivredne kulture u Republici Hrvatskoj. Uzimajući u obzir nultu tolerancu na bilo kakav sadržaj GMO-a u sjemenu, sama analiza usmjerena je isključivo na detekciju s ciljem maksimalne pokrivenosti, uz razuman utrošak resursa i vremena potrebnoga od zaprimanja uzorka do izdavanja analitičkoga izvješća. Rezultati istraživanja ukazuju da matrica probira omogućuje optimalan odabir strategije u analizi uzoraka i daje zadovoljavajući rezultat, a istovremeno su vrijeme analize i financijski trošak unutar prihvatljivih okvira.

## LITERATURA

1. Angers-Loustau, A., Petrillo, M., Bonfini, L., Gatto, F., Rosa, S., Patak, A., & Kreysa, J. (2014). JRC GMO-Matrix: a web application to support Genetically Modified Organisms detection strategies. *BMC bioinformatics*, 15(1), 1-9.
2. Block, A., Debode, F., Grohmann, L., Hulin, J., Taverniers, I., Kluga, L., ... & Morisset, D. (2013). The GMOseek matrix: a decision support tool for optimizing the detection of genetically modified plants. *BMC bioinformatics*, 14(1), 1-14.

- Bonfini, L. (2021). In silico proposal of screening strategies for detecting EU authorised GMOs. Publications Office of the European Union.
- Bonfini, L., Van den Bulcke, M. H., Mazzara, M., Ben, E., & Patak, A. (2012). GMOMETHODS: The European Union database of reference methods for GMO analysis. *Journal of AOAC International*, 95(6), 1713-1719.
- Broeders, S. R., De Keersmaecker, S. C., & Roosens, N. H. (2012). How to deal with the upcoming challenges in GMO detection in food and feed. *BioMed Research International*, 2012.
- Commission Implementing Decision (EU) 2016/321 of 3 March 2016 adjusting the geographical scope of the authorization for cultivation of genetically modified maize *Zea mays* L.) MON 810 (MON ØØ81Ø- 6). [https://eur-lex.europa.eu/eli/dec\\_impl/2016/321/oj](https://eur-lex.europa.eu/eli/dec_impl/2016/321/oj).
- Davison, J., & Ammann, K. (2017). New GMO regulations for old: Determining a new future for EU crop biotechnology. *GM crops & food*, 8(1), 13-34.
- EC (2024) EU Register of authorized GMOs. <https://webgate.ec.europa.eu/dyna2/gm-register/>.
- Gerdes, L., Busch, U., & Pecoraro, S. (2012). GMO finder—A GMO Screening Database. *Food Analytical Methods*, 5, 1368-1376.
- Hanzer, R. Prikupljanje i obrada biljnog materijala i metode izolacije DNA. *Molekularno oplemenjivanje bilja*, 2019.
- Hanzer, R., Ocvirk, D., Špoljarić Marković, S., & Fulgosi, H. (2012). Monitoring of GM soybean in high categories of seed on the Croatian seed market. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 77(3), 127-130.
- Hardegger, M., Brodmann, P., & Herrmann, A. (1999). Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR. *European Food Research and Technology*, 209, 83-87.
- Hilbeck, A., Meyer, H., Wynne, B., & Millstone, E. (2020). GMO regulations and their interpretation: how EFSA's guidance on risk assessments of GMOs is bound to fail. *Environmental Sciences Europe*, 32, 1-15.
- Holst-Jensen, A., Bertheau, Y., De Loose, M., Grohmann, L., Hamels, S., Hougs, L., ... & Wulff, D. (2012). Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials. *Biotechnology advances*, 30(6), 1318-1335.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. J. C. C. A. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta*, 439, 231-250.
- Querci, M., Van den Bulcke, M., Žel, J., Van den Eede, G., & Broll, H. (2010). New approaches in GMO detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 1991-2002.
- Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council of 15 March 2017 on official controls and other official activities performed to ensure the application of food and feed law, rules on animal health and welfare, plant health and plant protection products. (OJ L 95, 7.4.2017, pp. 1–142).
- Rosa, S. F., Gatto, F., Angers-Loustau, A., Petrillo, M., Kreysa, J., & Querci, M. (2016). Development and applicability of a ready-to-use PCR system for GMO screening. *Food chemistry*, 201, 110-119.
- Rostoks, N., Grantiņa-Ieviņa, L., Ieviņa, B., Evelone, V., Valciņa, O., & Aleksejeva, I. (2019). Genetically modified seeds and plant propagating material in Europe: potential routes of entrance and current status. *Heliyon*, 5(2).

20. Van den Eede, G. (2011) Compendium of Reference Methods for GMO Analysis, JRC Reference Report EUR 24526 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg

## **THE STRATEGIES IN THE DETECTION OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS IN THE SEED ON THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF CROATIA: THE APPLICATION OF THE SCREENING METHOD**

### SUMMARY

With the market placement of the first genetically modified organisms in the 1990s, there was a necessity for appropriate analytical methods of their monitoring. Modern biotechnology is among the most rapidly developed present-day technologies, which is why every year there is an increase in new modifications on the market, and, as a result, a number of methods for their detection also increases. In the initial years of monitoring the genetically modified organisms, the analysis involved determining the presence of only 2-3 screening elements, while today the laboratories have to cover over a hundred different modifications. An increasing number of methods presents a challenge to the laboratories due to an increase in the number of analytical steps that are necessary to be performed per sample, analyses are becoming more time-consuming and financially demanding, and a successful strategy in analytics is necessary. In Croatia, the genetically modified crops are systematically monitored through national monitoring. The monitoring involves the analyses of seeds, green leaves, food, and animal feed. Considering a constant increase in market modifications, an increasing number of analyses are annually performed on the same number of samples.

This paper investigates the application of matrices for the selection of screening methods in accordance with the monitoring plan. The screening methods precede the confirmatory Real Time PCR analyses and serve to exclude the negative samples. Given that the analytical procedures must include all currently approved modifications, a screening matrix was used to achieve a maximum coverage of all modifications with as few analytical steps as possible and ensure a purposeful analysis. The research results demonstrate that the screening matrix enables an optimal selection of strategy in the sample analysis, produces a satisfactory result, and, simultaneously, the analyses and the financial cost are within acceptable limits.

Keywords: screening methods, GMO, matrix, monitoring, Real Time PCR

#### **Adresa autora - Authors' address**

Ksenija Duka, univ. spec. techn. aliment.  
Dr. sc. Renata Hanzer  
e-mail: renata.hanzer@hapih.hr  
Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu  
Centar za sjemenarstvo i rasadničarstvo  
Usorska 19 Brijest, Osijek, Hrvatska

#### **Primljeno - Received**

19.02.2024.

#### **Revidirano - Revised**

13.03.2024.

#### **Prihvaćeno – Accepted**

19.03.2024.