

СУЧАНИЙ СТАН ТА МЕТОДИ ДЕТЕКТУВАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ РОСЛИН

Б. В. Сорочинський, кандидат біологічних наук,
О.М. Гончар, кандидат сільськогосподарських наук
Український інститут експертизи сортів рослин,
О.О. Данильченко, молодший науковий співробітник
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН
України

Вступ. Біотехнологічні (генетично модифіковані) сорти рослин поступово стають реаліями нашого життя. Біотехнологічні рослини вперше були комерціалізовані в 1996 р. і відтоді спостерігається чітка тенденція до зростання площі їхніх насаджень. Протягом дев'яти років, з 1996 по 2004 рр., загальносвітова площа вирощування біотехнологічних сільгоспкультур виросла в 47 разів: з 1,7 млн га в 1996 р. до 81 млн га в 2004 р. [1].

Найбільших темпів приросту загальної площі вирощування ГМ (генетично модифікованих) сільськогосподарських культур було досягнуто в 2004 р. (рис. 1).

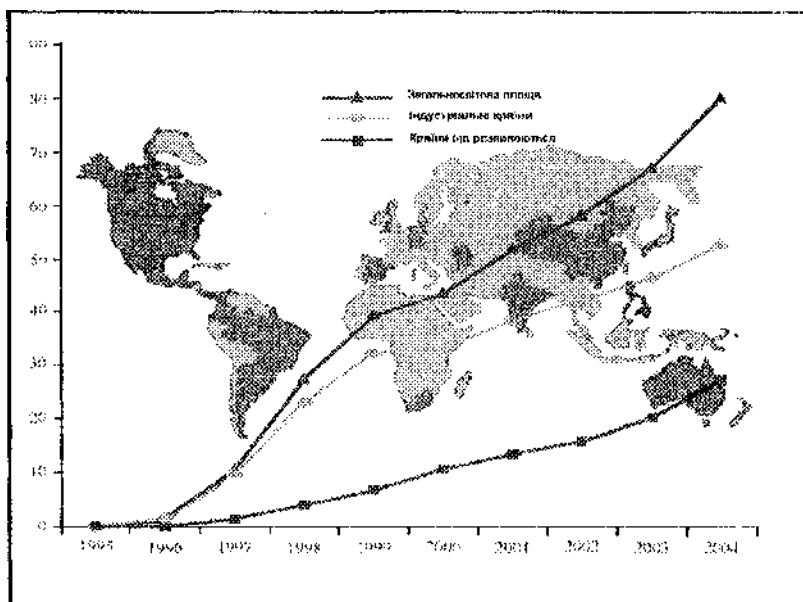


Рис. 1 Площі вирощування біотехнологічних культур

Зростання площі становило 20% до 2003 р., коли біотехрослини (б/т рослини) культивувалися на площі 67,7 млн га. У 2004 р. біотехнологічні сільгоспкультури вирощували 8,25 млн фермерів у 17 країнах світу (для порівняння - у 2003 році ці показники становили 7 млн фермерських господарств та 18 країн). За період з 1996 по 2004 рр. загальна площа, на якій вирощувались ГМ сільгоспкультури, сягнула 385 млн га у 22 країнах світу [1].

Попри те, що вітчизняна наука має певний доробок і традиції в галузі рослинної біотехнології, Україна не належить до розвинутих біотехнологічних країн і офіційно не культивує генетично модифіковані сорти рослин для потреб народного господарства. В кінці 90-х років в Україні проводились випробування деяких генетично модифікованих сільгоспкультур, які були призупинені через супротив громадськості, і з того часу офіційним шляхом біотехрослини в Україну не завозились. Однак, відсутність врегульованого законодавства і оформленої системи біобезпеки стосовно використання генетично модифікованих організмів, зростаючий масштаб їхнього використання, лібералізація позиції щодо них у найближчих країнах-сусідах (країни ЄС та Російська Федерація) створюють багато передумов для можливого несанкціонованого використання трансгенних сортів рослин у різноманітних галузях народного господарства. Враховуючи ці обставини, питання впровадження сучасних і інформативних методів детекції генетично модифікованих організмів є надзвичайно актуальним.

Сучасний стан та тенденції світового ринку біотехнологічних сільгоспкультур. Якщо країни, в яких вирощувалися ГМ сільгоспкультури, розташувати в порядку зменшення площі вирощування, то буде такий список: США, Аргентина, Канада, Бразилія, Китай, Парагвай, Індія, ПАР, Уругвай, Австралія, Румунія, Мексика, Іспанія та Філіппіни. Біля однієї третини (34%) загальносвітової площі біотехнологічних сільгоспкультур (27 з 81 млн га) приходить на країни, що розвиваються, і в цих країнах вони продовжують прискорено наростати.

Країни, що вирощують на 50 000 га та більше біотехнологічних сільгоспкультур, класифікують як біотехнологічні мегакраїни. У 2003 р. їх нараховували 10, у 2004 р. до них приєднались Парагвай, Іспанія, Мексика та Філіппіни. Список 14 мега-країн виглядає таким чином: США - 47,6 млн га (59% загальносвітової площі ГМ сільгоспкультур), вирощували кукурудзу, бавовник, олійний ріпак та сою), Аргентина - 16,2 млн га (20%; соя, кукурудза, бавовник), Канада - 5,4 млн га (6% олійний ріпак, кукурудза, соя), Бразилія - 5 млн га (6%; соя), Китай - 3,7 млн га (5%; бавовник), Парагвай - 1,2 млн га (2%; соя), Індія - 0,9 млн га (1%; бавовник), ПАР - 0,5 млн га (1%; кукурудза, соя,

бавовник), Уругвай - 0,3 млн га (<1%; соя, кукурудза), Австралія - 0,2 млн га (< 1%; бавовник), Румунія - 0,1 млн га (< 1%; соя), Мексика - 0, 1 млн га (< 1%; бавовник, соя), Іспанія - 0,1 млн га (< 1%; кукурудза), Філіппіни - 0,1 млн га (< 1%; кукурудза) [1] (мал. 2). У 2004 р. біотехнологічні сільгоспкультури вирощували також Колумбія (бавовник), Гондурас (кукурудза) та Німеччина (кукурудза) (Рис. 2).

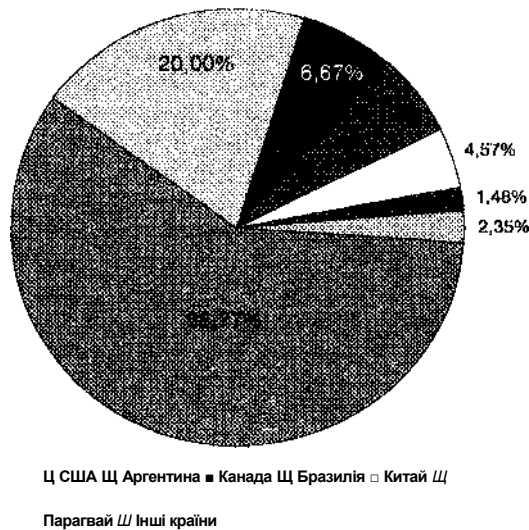


Рис. 2 Обсяги вирощування біотехнологічних культур

У 2004 р. продовжувалось зростання площ вирощування основних чотирьох комерційних біотехнологічних сільгоспкультур. Біотехнологічна соя займала 48,4 млн га (60% загальносвітової площі під біотехнологічними сільгоспкультурами) порівняно з 41,4 млн га в 2003 р. Біотехнологічна кукурудза вирощувалась на 19,3 млн га (23% площі під біотехкультурами), у 2003 р. цей показник становив 15,5 млн га. Це найбільший приріст площі (25%) і очікується, що в найближчому майбутньому рівень приросту біотехнологічної кукурудзи залишиться самим високим, оскільки попит на неї постійно зростає. Біотехнологічний бавовник вирощувався на 9 млн га (11% площі під біотехкультурами) порівняно з 7,2 млн га в 2003 р. Біотехнологічний ріпак займав 4,3 млн га (6% загальносвітової площі) порівняно з 3,6 млн га в 2003 р. В цілому, в 2004 р. біотехсільгоспкультури займали 5% від 1,5 млрд га загальносвітової посівної площі.

В окремих біотехнологічних країнах, згаданих вище, ГМ рослини складають значну частину посівів відповідної сільгоспкультури, Зокрема, в Китаї площа посіву ГМ бавовнику у 2004 р. становила 3,7 мли га або 66% від загальної площі посівів (5,6 млн га) цієї культури. Для Індії цей показник (площа під біотехнологічним бавовником) дорівнював 6 % (від загальної площі в 9 000 млн га). Аргентина в 2004 р. вирощувала соєю на площі 14,750 млн га, з них -14,5 млн га (98%)-площі під ГМ соєю, посіви трансгенної кукурудзи займали 55% від усієї площі посівів у 3,0 млн га цієї культури, ГМ бавовник вирощували на 25% всієї площі посівів. На площі в 22 млн га (22% загальної площі посівів) біотехнологічна соя вирощувалась в Бразилії. В ПАР під б/т кукурудзу відводилась площа в 400 млн га (15% всієї площі), під б/т соєю 70 млн га (50% всієї площі), під бавовник - 30 млн га (85% всієї площі). У світових масштабах за показниками 2004 р площа посівів б/т сої складала 56% від загальної площі в 86 млн га, б/т бавовник займав 21% площі від загальних 32 млн га, площа посівів біотехнологічного ріпаку становила 19% загальносвітової площі в 23 млн га і б/т кукурудзу вирощували на 14% від загальної площі посівів в 140 млн га (Рис. 3). Загальна площа вирощування цих традиційних сільгоспкультур у 2004 р. становила в світових масштабах 284 млн га, з яких 29% були відведені під біотехнологічні культури [1].

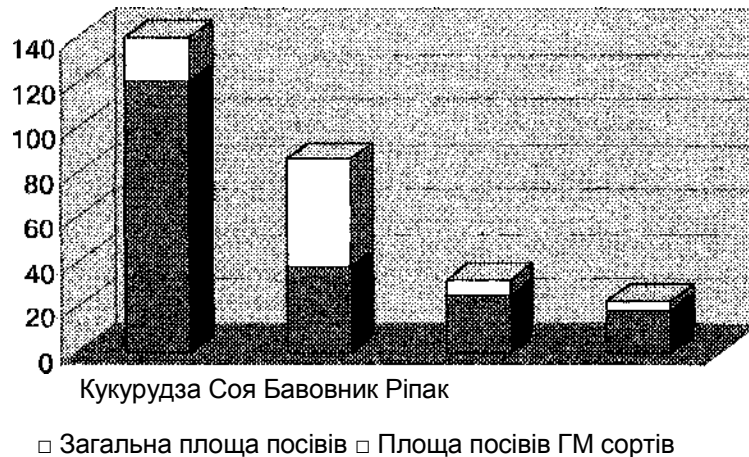


Рис. 3 Співвідношення площ, відведених під ГМ та традиційні сорт

Найбільші площі (72% або 58,6 млн га) в 2004 р. були відведені під біотехнологічні культури (соя, кукурудза, олійний ріпак та бавовник) зі стійкістю до гербіцидів. Культури, стійкі до комах-шкідників (Bt культури) вирощувались на території в 15,6 млн га (19%). Водночас, зросли також площі посівів біотехнологічних бавовнику та кукурудзи з комбінованими ознаками стійкості до гербіцидів та шкідників (9% або 6,8 млн га порівняно з 5,8 млн га в 2003 р.).

Ринкова вартість біотехнологічних сільгоспкультур складається з цін за продаж насіння та ліцензійних відрахувань за технології в цій галузі. Загальна вартість світового ринку біотехнологічних сільгоспкультур складала в 2004 р. 4,7 млрд доларів. Для порівняння, - світовий ринок засобів захисту рослин складав у 2003 р. 32,5 млрд доларів, а світовий ринок насіння - 30 млрд доларів. Загальна вартість ринку б/т культур, починаючи з 1996 р., коли вони вперше почали вирощуватись, становила 24 млрд доларів. Очікується, що вартість цього ринку в 2005 р. буде біля 5 млрд доларів. Загальна вартість усієї біотехнологічної продукції (продукти харчування для людини, корми для тварин, волокна) в 2003 р. була оцінена в 44 млрд доларів [1].

Прогнозується, що загальні площі посівів б/т сільгоспкультур і кількість фермерських господарств, що їх використовують, у подальшому будуть зростати. Передумовою таких прогнозів для розвинутих країн, таких як США чи Канада, є поява на ринку б/т культур з новими властивостями, наприклад стійкості кукурудзи до кореневих шкідників, що дозволяє забезпечити більш широкий контроль над перетинчастокрилими шкідниками. Передумовою поширення ГМ культур у слаборозвинених країнах є зростаючий попит на продовольство. У свою чергу, Європейська Комісія дозволила в 2004 р. імпорт 2 сортів біотехнологічної кукурудзи (лінії Bt 11 та NK 603) для застосування її в їжу та як корм для тварин, а 17 сортів кукурудзи MON 810, яка стійка до шкідників, дозволено для вирощування в 25 членах ЄС, що теж прогнозує подальший ріст площі насаджень ГМ культур у світових масштабах. Очікується, що основний вплив на глобальне поширення б/т сільгоспкультур будуть мати 5 провідних країн, що розвиваються (Китай та Індія в Азії, Бразилія та Аргентина в Латинській Америці, Південна Африка в Латинській Америці), оскільки вони є лідерами в своїх регіонах і придбали вже певний досвід та знання в цій галузі. Найближчим часом також очікується подія, що може суттєво вплинути на розвиток біотехнології. Це - дозвіл і впровадження на території Китаю Bt рису, що може мати місце уже в цьому році. Така подія може стати стимулом до поширення біотехнологічного рису у всій Азії, а в більш широкому аспекті - до поширення б/т продовольчих, кормових та луб'яних культур у всьому світі.

Методи детектування генетично модифікованих рослин

Сучасні методи молекулярної біології дозволяють проводити детектування ГМО за декількома критеріями: детекція інтегрованих генетичних елементів на молекулярному рівні, визначення специфічної мРНК, аналіз нових білків, що синтезуються в модифікованих рослинах, пошук нових метаболітів або аналіз ГМ рослин за фенотиповими ознаками [2].

Методи оцінки за фенотиповими ознаками відносяться до "низькотехнічних" засобів детекції і вони дають змогу проаналізувати наявність чи відсутність специфічної ознаки в ГМ рослинах (у більшості випадків це стійкість до гербіцидів). Проведення таких тестів включає в себе оцінку проростання насіння на середовищі, що містить певний гербіцид та аналіз виживаності насіння на такому середовищі, або ж аналіз стійкості дорослих рослин до специфічного гербіциду за умови що рослина трансформована геном стійкості.

Імунодіагностика - напевно, найбільш поширений метод детекції нових білків, які утворюються внаслідок генетичних модифікацій рослин, основою методу є ідентифікація комплексу антиген-антитіло. Цей метод є високоспецифічним, однак потребує відносно простого підготовчого етапу для зразків, які мають бути проаналізовані. Для ефективного оцінки молекули - мішені (в даному випадку - білка ГМ організму) необхідно забезпечити умовами, за яких блокування або маскування сайту зв'язування з антитілом виключено. Ефективність проведення аналізу також залежить від характеристик антигену (розміру, гідрофобності та третичної структури).

Найпоширенішим серед імунохімічних методів є метод імуносорбентного аналізу (ELISA), який включає в себе декілька етапів [3]. Зразок, в якому потрібно визначити маркерну молекулу, фіксують на тверду підложку (наприклад на пластикову плашку, яка зазвичай має 96 лунок). До фіксованого зразка додають антитіло, що є специфічним до маркерної молекули (перше антитіло), потім промивають лунку для вимивання молекул першого антитіла, які не зв'язались. Після цього проводять інкубацію з другим антитілом, яке специфічно зв'язується з першим і не взаємодіє з маркерною молекулою. Як правило, до другого антитіла приєднаний фермент (лужна фосфатаза, уреаза або пероксидаза), що каталізує перетворення незабарвленого субстрату в забарвлений продукт. На подальшому етапі промивають лунку від других антитіл, що не зв'язались, після чого додають незабарвлений субстрат та проводять] кількісну або якісну оцінку забарвленого продукту.

Одним з різновидів тесту ELISA є детекція генетичних модифікацій в рослинах за допомогою індикаторних смужок, що нагадують вживані у медицині тести на вігтність. Принцип методу полягає в

тому, що на мембрану смужки нанесені антитіла з високим ступенем спорідненості до відповідного епітопу молекули антигена. Мембрана містить дві зони зв'язування: одна для чужорідного білка, інша - для кольорового реагенту. Після занурення смужки у розчин з екстрактом зразка, що містить чужорідний білок, відбувається зв'язування більшої частини антитіл з антигеном; частина антитіл залишається зв'язаною виключно з кольоровим реагентом. Присутність однієї лінії після проведення аналізу, свідчить про негативний результат, а присутність двох - про позитивний. Цей метод є високоефективним та дає 90% достовірності при наявності менш ніж 0,15% ГМ інгредієнтів у зразках, що аналізуються.

Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) відноситься до найбільш поширених та високоінформативних методів детекції ГМО [3]. За допомогою ПЛР можна детектувати будь-яку частину впроваджені генетичної конструкції: промотор, структурний ген, термінатор або репортерний ген. ПЛР може бути використана для загального скринінга ГМО: так наприклад відомо, що у більшості конструкцій, які використовуються в процесі генетичної модифікації рослинного організму, використовується або ЗБв-промотор вірусу мозаїки цвітної капусти або елементи регуляції транскрипції гена непалінсинтетази *A.tumefaciens* (pNOS і tNOS). Більш детальна детекція ГМ рослин потребує повної інформації про структуру впроваджені генетичної конструкції. Загальна схема ідентифікації ГМО за допомогою методу ПЛР включає в себе декілька етапів:

1. Скринінг зразків, що аналізуються, на якість ДНК (використовується один з генів "домашнього господарства").
2. Загальне детектування зразків на присутність ГМО (генетичні елементи загальні для більшості генетичних конструкцій).
3. При наявності позитивного результату попереднього етапу - скринінг специфічних генів або конструкцій, що були використанні для отримання певного виду ГМО.

Для проведення ПЛР необхідні:

- 1) два синтетичні олігонуклеотидні праймери, комплементарні ділянкам з протилежних ланцюгів, які фланкують послідовність - мішень; їх 3-гідроксильні кінці після процедури відпалювання з ДНК мають бути орієнтовані назустріч один одному;
- 2) ДНК-мішень (в даному випадку це стосується послідовності інтегрованого генетичного елемента);
- 3) термостабільна ДНК полімераза;
- 4) чотири дезоксирибонуклеотиди.

Проведення ПЛР складається з багатократного повторення наступних реакцій:

1. Денатурація. Перший етап ПЛР складається з теплової

денатурації зразка ДНК при 95 °С протягом не менше 1 хвилини. Крім матриці ДНК реакційна суміш містить у надлишку два праймери, Таq-полімерази та чотири дезоксирибонуклеотиди.

2. Ренатурація. Температуру суміші повільно знижують до ~ 55 °С: відбувається зв'язування праймерів з комплементарними послідовностями ДНК.

3. Синтез. Температуру суміші підвищують до ~ 75 °С - величини, оптимальної для Таq-полімерази. Починається синтез комплементарного ланцюга ДНК, що ініціюється 3'-гідроксильною групою праймера.

Внаслідок багаторазового повторення цих трьох етапів відбувається синтез конкретного сегмента ДНК. Коли кількість копій ділянки ДНК, що аналізується, складає мільйон та більше - їх можна аналізувати із застосуванням фізичних методів з УФ або флуоресцентним детектуванням. Інформація про наявність ГМО у зразках отримується визначенням присутності або відсутності конкретного амплікону після проведення гель-електрофорезу продуктів ПЛР.

Кількісне визначення ГМО в зразках проводять за допомогою декількох варіантів ПЛР [3]:

1. Конкурентна ПЛР: один з методів кількісної оцінки, який дає можливість у присутності конкурента (конкурента) в ПЛР отримувати дві смуги фрагменту ДНК. Один з цих фрагментів є контрольним, з відомою вихідною кількістю матриці, по якому відраховується кількість ДНК у зразку, що аналізується.

2. Подвійна конкурентна ПЛР: вищезазначений принцип використовується для гена "домашнього господарства", гена, специфічного для ГМО та їх конкурентів. Сприяє кількісному оцінюванню відсотку ГМ матеріалу в експериментальних зразках.

Real-time ПЛР - це система, що базується на постійному моніторингу продуктів ампліфікації. Цей варіант ПЛР дає можливість проводити коректну оцінку вихідного нуклеотидного матеріалу (кількість копій, геномних еквівалентів вихідної матриці) в будь-який момент часу протягом усього процесу проведення ПЛР аналізу.

Один із сучасних методів детектування ПЛР продуктів базується на використанні зонда - "молекулярного маяка" [4]. Такий зонд складається з послідовності нуклеотидів, що є комплементарною для ДНК - мішені, а 5 кінцевих нуклеотидів взаємно комплементарні та утворюють своєрідну "шпильку". До 5'кінця приєднаний флуоресцентний хромофор, а до 3'кінця - нефлуоресцентний хромофор (інгібітор). У розчині при кімнатній температурі "маяк" має конфігурацію за якої флуорофор та інгібітор знаходяться в тісному контакті, і флуоресценція флуорофора гаситься. При гібридизації

зонда з комплементарною послідовністю ДНК - мішені, відбувається просторове розділення флуорофора і відбувається флуоресценція, рівень якої реєструється.

Метод мікроматриці (Microarray) широко застосовується останнім часом для автоматичного швидкого скринінгу рівня генної експресії та оцінки різних послідовностей великої кількості зразків [3,4]. Суть цього методу складається в множинних гібридаційних процесах, які відбуваються одночасно у варіанті dot blot (точка), при цьому таких точок може бути декілька тисяч на одиницю площі невеликих розмірів. Різні варіації цього методу включають у себе: метод макроматриці (ПЛР продукти, що кореспондують з геномною ДНК або кДНК фіксуються на нейлонових мембранах), ДНК мікročіпи та метод мікроелектронної матриці.

На даний момент ДНК чипи для ГМО дозволяють проводити одночасно процедури скринінгу та ідентифікації різних типів ГМО одночасно. Так, за допомогою вищезазначених чипів можна проводити аналіз видоспецифічної ДНК рослин та вірусів, генетичних конструкцій, що є загальними для більшості ГМО та специфічних впроваджених генетичних елементів. Також специфічні ДНК чипи дозволяють проводити аналіз всіх ГМО, генетичний матеріал яких містить CaMV 35S промотор, Nos-термінатор, bar-ген та pat-ген.

Метод мікроелектронної матриці (розробка "Gene-Scan Europe" у співпраці з "Clinical Micro Sensors"), покладений в основу функціонування приладу e-Sensor, на пластинці розміщує 36 золотих електродів, які зв'язані з великою кількістю односторонніх молекул ДНК, кожна з яких приєднана до молекули провідника. Молекули ДНК на електродах частково кореспондують з фрагментами ДНК ГМ зразків. При контакті нитки ДНК, комплементарної до мішені, відбувається їх зв'язування. Ця реакція утримує молекулу провідника близько до поверхні електроду, що змінює потік струму через його поверхню. За допомогою спеціального пристрою цей потік реєструється, після чого відбувається якісний та кількісний аналіз зразків.

Крім згаданих вище методів, для детектування ГМ рослин використовують також методи, що дозволяють визначати кінцевий продукт, який синтезує трансгенна рослина, наприклад, білок або специфічну жирну кислоту. До таких методів належить, насамперед, інфрачервона спектроскопія та високоефективна рідинна хроматографія.

Порівнюючи ефективності різних методів детекції ГМО, варто зауважити, що фенотипові методи оцінки є недорогим і досить чітким засобом ідентифікації ГМ рослин у зразках насіння. Точність визначення залежить, насамперед, від якості самого насіння і його здатності до проростання. Недолік даного методу в тому, що для кожного виду ГМ рослин потрібно розробляти окремі тести. ELISA

більш швидкий та менш дорогий метод, ніж ПЛР. Різновиди цього методу (ДНК кіти та індикаторні смужки) дають напівкількісні результати присутності ГМО в зразках, проте мають невисокий поріг детекції. Недоліком імуносорбентного аналізу є наявність певних проблем кількісного підрахунку, тому що ступінь експресії впроваджених білків у ГМО варіює залежно від типу тканин, що може впливати на визначення частки ГМ матеріалу в аналізованих зразках. ПЛР методи дають змогу проводити найкоректнішу ідентифікацію ГМО та мають найвищу чутливість детектування. Якщо межа чутливості для визначення ГМ сої методом ELISA становить 0,1% у соєвому борошні, то для ПЛР цей показник дорівнює 0,01% [3]. Переваги методу мікроматриць у тому, що скринінг та ідентифікація ГМ складає єдиний етап, на відміну від ПЛР. Цей метод дозволяє детектувати, ідентифікувати та кількісно визначати великий об'єм зразків одночасно. Більше того, метод є найбільш гнучким, оскільки нові типи генетичних конструкцій можуть бути включені в процес скринінгу внесенням додаткових послідовностей.

Висновки.

Правильний вибір методу є ключовим етапом у детектуванні генетичних модифікацій в зразках насіння сільгоспрослин. Водночас, на кінцевий результат можуть впливати також процедура відбору зразків [5] та методи підготовки їх до аналізу [3,6], тому валідація (порівняння) методик, що використовуються в різних лабораторіях, є обов'язковою передумовою для проведення таких досліджень.

Використана література:

1. James C. Preview: Global status of Commercialized Transgenic Crops: 2004. ISAAA Briefs, N32, ISAAA, Ithaca, NY
2. Pan T.-Z. Current status and detection of genetically modified organism // J. Food and Drug Anal.- 2002. - V. 10, N 4.- P. 229-241.
3. Ankhani E., Gadani F., Heinze P., Pijnenburg H., Van den Eede G. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products // Eur. Food Res. Technol.- 2003., V. 214.- P. 3-26.
4. Miraglia M., Berdal K.G., Brera C., Corbisier P. et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain // Food and Chemical Toxicology.- 2004.- V. 42. - P. 1157-1180.
5. Paoletti C., Dinatelly M., Kay S., Van den Eede G. Simulating kernel lot sampling the effect of heterogeneity on the detection of GMO contaminations // Seed Sci. and Technology. - 2002. - V. 30.- P. 756-764.
6. Di Bernardo G., Galderisi U., Cipollaro M., Cascino F. Methods to

improve the yield and quality of DNA from dried and processed figs // Biotechnol. Prog.- 2005.-V. 21. - P. 546-549.

УДК 631.527:636.082.22; 631.523:636.082.12

Сорочинський Б.В., Гончар О. М., Данильченко О.О. Сучасний стан та методи детектування біотехнологічних рослин Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. - 2005. - № 2. - С. 15-125.

Наведена інформація про поширення та використання в 2004 році комерційних генетично модифікованих рослин та проаналізовані методи їх детектування.

Ключові слова: біотехнологічні рослини, генетичні модифікації, методи детектування.

УДК 631.527:636.082.22; 631.523:636.082.12

Сорочинський Б.В., Гончар А.Н., Данильченко О.О.

Современное состояние и методы детектирования биотехнологических растений / Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. - 2005. - № 2. - С. 115-125.

Приведена інформація о распространении и использовании в 2004 году коммерческих генетически модифицированных растений и проанализированы методы их детекции.

УДК 631.527:636.082.22; 631.523:636.082.12

Sorochinsky B., Gonchar O., Danilchenko O. Current state and detection methods for the biotechnological plants / Сортовивчення та Охорона прав на сорти рослин. - 2005. - № 2. - С. 115-125/

Information about the use and distribution of the commercial biotechnological plants in 2004 have been presented and methods for their detection were analyzed.