

**Uniwersytet Przyrodniczy
w Poznaniu
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Specjalność: Biotechnologia Żywności**

Adrian Czaban
Nr albumu 106735

Kukurydza Transgeniczna MON 810

Praca inżynierska wykonana
na kierunku Technologia Żywności i Żywnienie Człowieka

Praca wykonana pod kierunkiem
dr hab. Grażyny Lewandowicz, prof. nadzw.
w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

Pracę recenzował
prof. dr hab. Wojciech Kaniewski
Zakład Biochemii,
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,
Wydział Biologii UAM

Poznań 2010

Streszczenie
Adrian Czaban
Transgeniczna kukurydza MON 810

W uprawie roślin ważnym czynnikiem jest ich ochrona przed szkodnikami, które powodują zmniejszenie ilości uzyskiwanych plonów oraz spadek ich jakości. Wraz ze wzrostem wiedzy i postępowaniem technicznym możliwe stają się nowe metody ochrony roślin. W pracy została przedstawiona transgeniczna kukurydza MON 810 nosząca nazwę handlową „YieldGard” uzyskana przez firmę Monsanto. Celem procesu transgenezy było nadanie jej zwiększonej odporności na Omacnicę Prosoviankę (*Ostrinia Nubilalis hbn.*) – szkodnika owadziego. Omówiony został proces transformacji, analiza uzyskanej rośliny, bezpieczeństwo toksykologiczne i środowiskowe a także aspekty społeczne i prawne związane z wprowadzeniem jej do komercyjnej hodowli.

Słowa kluczowe

Rośliny Transgeniczne, Kukurydza, Modyfikacja Genetyczna, Białko Bt

Summary
Adrian Czaban
Transgenic maize MON 810

Plant protection is an important factor in agricultural production. Pests may cause a substantial decrease in harvest and lower its quality. Along with the increase in knowledge and technological progress, new methods of plant protection become available. This paper presents the transgenic maize MON 810, known by its commercial name YieldGard, marketed by Monsanto Company. The aim of transgenesis was to increase maize's resistance to the insect pest – European corn borer (*Ostrinia nubilalis hbn.*). In this paper, the transformation process, along with the analysis of the plant, toxicological and environmental safety as well as social and legal aspects of introducing the plant onto the market have been discussed.

Keywords

Transgenic Plants, Corn, Genetic Modification, Bt Protein

Spis Treści

Spis treści

1. Wstęp.....	4
2. Charakterystyka kukurydzy jako rośliny uprawnej i surowca przemysłowego.	5
3. Modyfikacja genetyczna.....	8
3.1 Opis i cel modyfikacji.....	8
3.2 Białko Cry1A(b).....	10
4. Metoda transformacji.....	12
4.1. Opis użytych konstruktywów plazmidowych.....	14
4.1.1. PV-ZMBKO7.....	14
4.1.2. PV-ZMG10.....	15
4.2.1 Wyniki ilości wprowadzonych kopii genów.....	17
4.2.2 Analiza obecności sekwencji Cry1A(b), CP4 EPSPS, gox, oraz sekwencji wektorowych.	18
4.2.3. Stabilność wklonowanego materiału.....	20
4.2.4. Podsumowanie	21
4.3. Ekspresja białka Cry1A(b).....	21
4.4. Porównanie składu chemicznego z kukurydzą nietransgeniczną.....	23
4.5. Oszacowanie bezpieczeństwa.....	23
6. Stan upraw	28
7. Regulacje prawne dotyczące MON 810.....	29
8. Aspekty społeczne i ekonomiczne.....	30
9. Podsumowanie.....	32
10. Bibliografia.....	34

1. Wstęp

Gwałtowny rozwój nowych technologii i nowatorskich, naukowych rozwiązań, zapoczątkowany w drugiej połowie XX wieku jest kontynuowany w obecnym stuleciu i nabiera coraz szybszego tempa. Innowacje pojawiają się praktycznie w każdej dziedzinie życia, a jedną z najdynamiczniej rozwijających się nauk jest biotechnologia. Według konwencji ONZ biotechnologia jest to "zastosowanie technologiczne, które używa systemów biologicznych, organizmów żywych lub ich składników, żeby wytwarzać lub modyfikować produkty lub procesy w określonym zastosowaniu"⁽¹⁾. Obejmuje takie obszary jak: medycyna, farmacja, procesy przemysłowe, ochrona środowiska i inne. Zaliczyć tu należy też techniki inżynierii genetycznej – świadomej i ukierunkowanej ingerencji w genom organizmu. Za zasadne uznaje się podkreślić, że sama idea zmian na poziomie genetycznym jest znana i praktykowana przez ludzkość od tysięcy lat (nie wspominając już o tym, że nieustanne spontaniczne mutacje organizmów których nie jesteśmy w stanie przewidzieć są motorem napędowym ewolucji). Od początków hodowli zwierząt i roślin człowiek dążył do osiągnięcia pożądanych cech przez krzyżowanie osobników i odmian. Obejmowało to działania mające na celu uzyskanie większych plonów, lepszej odporności na zmienne warunki środowiska, większej mleczności lub mięsności, podwyższonej siły, odporności lub szybkości zwierząt gospodarskich. W efekcie tej działalności udało się uzyskać gatunki roślin odpornych na określone warunki czy szkodniki oraz wyspecjalizowane rasy, np.: kurczaki brojlery, bydło o zwiększonej mleczności. Zmiany te jednak w większości były mniej lub bardziej przypadkowe i nie można ich świadomie uznać za w pełni specyficzne. Dokonując przekrzyżowania dwóch osobników w organizmie potomnym uzyskuje się nieznaną mieszaninę dwóch genotypów. Nie możemy być zatem, co najistotniejsze, pewni uzyskania żądanej cechy bądź jej zmniejszenia w kolejnym pokoleniu potomnym. Aktualne osiągnięcia nauki pozwalają na sprawienie, że jest to w pełni możliwe. Biologia molekularna pozwala bowiem na dokładną identyfikację lokalizacji i struktury genu o żądanej funkcji, a techniki inżynierii genetycznej umożliwiają jego przeniesienie nie tylko między osobnikami spokrewnionymi ale także tak odległymi jak procaryota i eucaryota⁽²⁾. Te niewątpliwe osiągnięcia naukowe budzą jednak określone kontrowersje. Słusznie uznaje się, że istnieje konieczność wnikliwej analizy każdego przypadku na płaszczyźnie naukowej, potrzeba przebadania wszystkich aspektów i dokładnego przewidzenia skutków ingerencji. W kwestii społecznej istnieją obawy co do bezpieczeństwa organizmów transgenicznych. Strach przed uzyskaniem wpływów przez wielkie firmy, obawy przyspieszenia monopolizacji to kolejne

czynniki spowalniające rozwój biotechnologii, wykorzystywane przez jej przeciwników. Najbardziej istotny jest jednak niewystarczający poziom edukacji, szczególnie z zakresu biotechnologii, a także niespójne i niejasne uregulowania prawne, ustalane w zasadzie wraz z rozwojem sytuacji związanej z inżynierią genetyczną. Brak międzynarodowych regulacji w wielu przypadkach znacznie utrudnia realizację badań. Dotyczy to szczególnie niespójności lub braku przepisów narodowych. Niewątpliwym jest jednak rozwój i osiąganie coraz większych postępów w dziedzinie biotechnologii a jego głównymi czynnikami napędowymi są: skokowo rosnące potrzeby społeczne, (zapewnienie wyższego standardu życia zwiększającej się i coraz bardziej świadomej populacji ludzkiej), rosnące możliwości nauki, w szczególności inżynierii genetycznej, rosnące możliwości automatyzacji produkcji oraz, w mojej opinii, rosnące przyzwolenie społeczne na kontynuację badań. Za celowe uznaje się kontynuowanie procesu rozwoju biotechnologii w Polsce, w aspektach naukowym i praktycznym, aby nie pozostać za daleko w tyle za wiodącymi krajami na świecie i aby być prekursorem nowych metod w przyszłości. Wspomniane wyżej czynniki miały wpływ na wybór tematu pracy.

W pracy opisano proces modyfikacji genetycznej kukurydzy MON 810, jedynej rośliny transgenicznej legalnie uprawianej w Unii Europejskiej (jednak nie we wszystkich krajach UE), a przy tym także jedynej legalnie uprawianej w Polsce. Celem modyfikacji było uzyskanie przez kukurydzę odporności na szkodniki owadzie, w tym szczególnie omacnicę prosowiankę (*Ostrinia nubilalis hbn.*). W tym celu do jej informacji genetycznej włączony został gen kodujący białko Cry1Ab, pochodzący z bakterii *Bacillus Thuringensis ssp. Kurstaki*. Bakterie *B. thuringensis* produkują szereg toksyn o wysokiej specyficzności ukierunkowanych na konkretne organizmy owadzie. W procesie transformacji użyto sekwencję DNA kodującą białko wykazujące toksyczność względem owadów z gromady łuskoskrzydłych, co w efekcie umożliwiło komórkom kukurydzy produkcję tegoż białka⁽³⁾. W pracy zostały poruszone także aspekty ekonomiczne, społeczne oraz prawne związane z modyfikacją genetyczną.

2. Charakterystyka kukurydzy jako rośliny uprawnej i surowca przemysłowego.

Kukurydza (*Zea mays L. ssp. mays.*) jest rośliną typu C4 o wysokim potencjale fotosyntetycznym, zdolną do wydawania wysokich plonów. Jej uprawy są rozpowszechnione

praktycznie na całym świecie, ze względu na bardzo wysokie możliwości przystosowawcze. Jej klasyfikacji można dokonać na wiele sposobów, w tym ze względu na klimat w którym jest uprawiana, kształt ziarna czy zastosowanie. W roku 2008 kukurydza była uprawiana na 158.034.025 hektarach na całym świecie⁽⁴⁾. Plon jest przeznaczany głównie na cele paszowe, aczkolwiek w krajach tropikalnych roślina ta jest hodowana z myślą o przeznaczeniu głównie na cele żywieniowe. O jej wartości użytkowej przesądza głównie wysoka zawartość białka i innych substancji odżywczych w ziarnie (tabela 1 – 3). Ponadto kukurydza jest istotnym surowcem do produkcji bioetanolu oraz substratem dla przemysłów chemicznego oraz farmaceutycznego. Według prognoz FAO do roku 2030 zapotrzebowanie na plon tej rośliny wzrośnie o 60 Mt⁽⁵⁾.

Tabela 1. Skład chemiczny ziarna kukurydzy (8).

Typ:	Kukurydza Zwyczajna		Słodka kukurydza	Kukurydza typu "popcorn"	
	Zakres w odmianach roślin uprawnych ¹	Zakres Całkowity	Zakres Całkowity	Ilość w odmianie NEVO01 ^{1,2}	Ilość w odmianie USDA01 _{2,3}
Wilgotność [% masy całkowitej]	9,40 – 14,4	7,00 – 23,0	74,7 – 84,0	10,0	4,10
Białka [% suchej masy]	9,60– 12,7	6,00 – 12,7	11,3 – 15,6	12,2	12,5
Tłuszcze [% suchej masy]	3,60 – 5,30	3,10 – 5,80	4,90 – 8,80	4,40	4,40
Popiół [% suchej masy]	1,30 – 1,50	1,10 – 3,90	2,60 – 3,90	-	1,90
Błonnik całkowity [% suchej masy]	10,1 – 11,7	8,30 – 11,9	-	-	-
Celuloza [% suchej masy]	3,70	3,00 – 4,30	-	-	-
Węglowodany [% suchej masy]	82,2 – 82,9	82,2 – 82,9	72,5 – 79,2	79,0	81,2

1: ziarna suszone

2: prawdopodobna obecność odmian GM

3: ziarna „air popped”

4: dane uzyskane z analizy roślin nie – GM, powstałe przez kompilację danych pochodzących z badań AgrEvo (1998), Dow AgriSciences (2000), Monsanto (1997 – 2000) oraz Pioneer Hi – Bred (1998).

Oznaczenie „-” : brak danych.

Tabela 2. Zawartość składników mineralnych w ziarnie kukurydzy (podano w mg/100g s.m.)(8):

Typ:	Kukurydza zwyczajna		Kukurydza słodka	Kukurydza typu "popcorn"	
Pierwiastek:	Zakres w odmianach uprawnych ⁴	Zakres Całkowity	Zakres Całkowity	Zakres w odmianie NEVO01 ^{1,2}	Zakres w odmianie USDA01 ^{2,3}
Na	-	Brak – 150,0	0,590 – 62,00	5,60	4,20
K	360 - 370	320,0 – 720,0	900 - 1560	278	314
Ca	3,00 – 5,00	3,000 - 1000	8,300 – 69,00	22,0	10,0
P	290 - 320	234,0 – 750,0	320,0 – 625,0	278	313
Mg	120 - 130	82,00 - 1000	106,0 – 281,0		137
Fe	2,30 – 2,50	0,100 – 10,00	1,6 00– 3,100	3,30	2,77
Cu	0,19 – 0,21	0,090 – 1,000	0,080 – 0,250	-	0,44
Se	-	0,001 – 0,100	0,025 – 0,25	-	0,10
Zn	2,00 – 3,00	1,200 – 3,000	1,900 – 6,250	-	3,59

Tabela 3. Zawartość witamin w ziarnie kukurydzy (podano w mg/kg s.m.)(8):

Typ:	Kukurydza zwyczajna		Kukurydza słodka	Kukurydza typu "popcorn"	
Pierwiastek:	Ilość w odmianach uprawnych ⁴	Zakres Całkowity	Zakres Całkowity	Ilość w odmianie NEVO01 ^{1,2}	Ilość w odmianie USDA01 ^{2,3}
Wit. A	-	0,49 – 2,18	0,40 – 1,16	0,89	0,21
Wit. B1	3,5	2,30 – 8,60	5,90 – 8,30	3,30	2,10
Wit B2	5,6	0,25 – 5,60	2,50 – 4,70	0,89	3,00
Wit. B6	-	4,60 – 9,60	2,30 – 8,70	2,40	4,70
Wit. C	-	-	283 - 470	brak	brak
Wit. E	-	-	-	-	1,25
Kwas foliowy	-	-	-	0,12	2,40
Niacyna	-	9,30 – 70,0	-	11,0	20,3

Kukurydza posiada kilka związków o charakterze substancji antyodżywczych, jednakże nie występują one w ilościach wystarczających by uważać je za poważne zagrożenie.

W rolnictwie kukurydza najczęściej jest uprawiana w postaci odmian hybrydowych, dających wyższe zbiory. Powstają one poprzez zapylenie kukurydzy jej własnym pyłkiem lub kontrolowane krzyżowanie. Jednakże rośliny wyhodowane z nasion roślin hybrydowych mogą być niższej jakości i dawać gorszy plon – wobec czego na każdy siew kupuje się nowe nasiona. Innym ważnym aspektem hodowli jest zastosowanie uprawy bezorkowej – niesie to ze sobą korzyści w postaci zakwaszenia oraz wzbogacenia w próchnicę górnej części gleby, bogatszego rozwoju mikroflory a także oszczędności w czasie i kosztach pracy.

Genom kukurydzy zawiera się w liczbie ponad 32 tysięcy genów w 2,3 miliardów par zasad (dane dla zsekwencjonowanej odmiany B73)⁽⁶⁾. Jest to średnia wielkość, przy czym dużą część stanowią powtarzające się, niekodujące elementy. Co istotne genotyp tej rośliny wykazuje bardzo dużą zmienność w przekroju odmian. W skrajnych przypadkach różnice zostały porównane do tak rozbudowanych jak pomiędzy informacjami genetycznymi szympansa i człowieka. Tak duża dywersyfikacja pozwala na hodowlę roślin w bardzo różnych od siebie warunkach, a także przyciąga uwagę badaczy. Kukurydza dobrze znosi krzyżowanie wsobne co ułatwia pracę nad uzyskaniem jednorodnych linii. Istnieją mapy genetyczne dla wielu istotnych regionów kodujących genomu⁽⁵⁾. Prace nad transgenezą kukurydzy są bardzo rozwinięte i istnieje duża liczba roślin uzyskanych przy pomocy technik stosowanych w inżynierii genetycznej⁽⁷⁾.

3. Modyfikacja genetyczna

3.1 Opis i cel modyfikacji

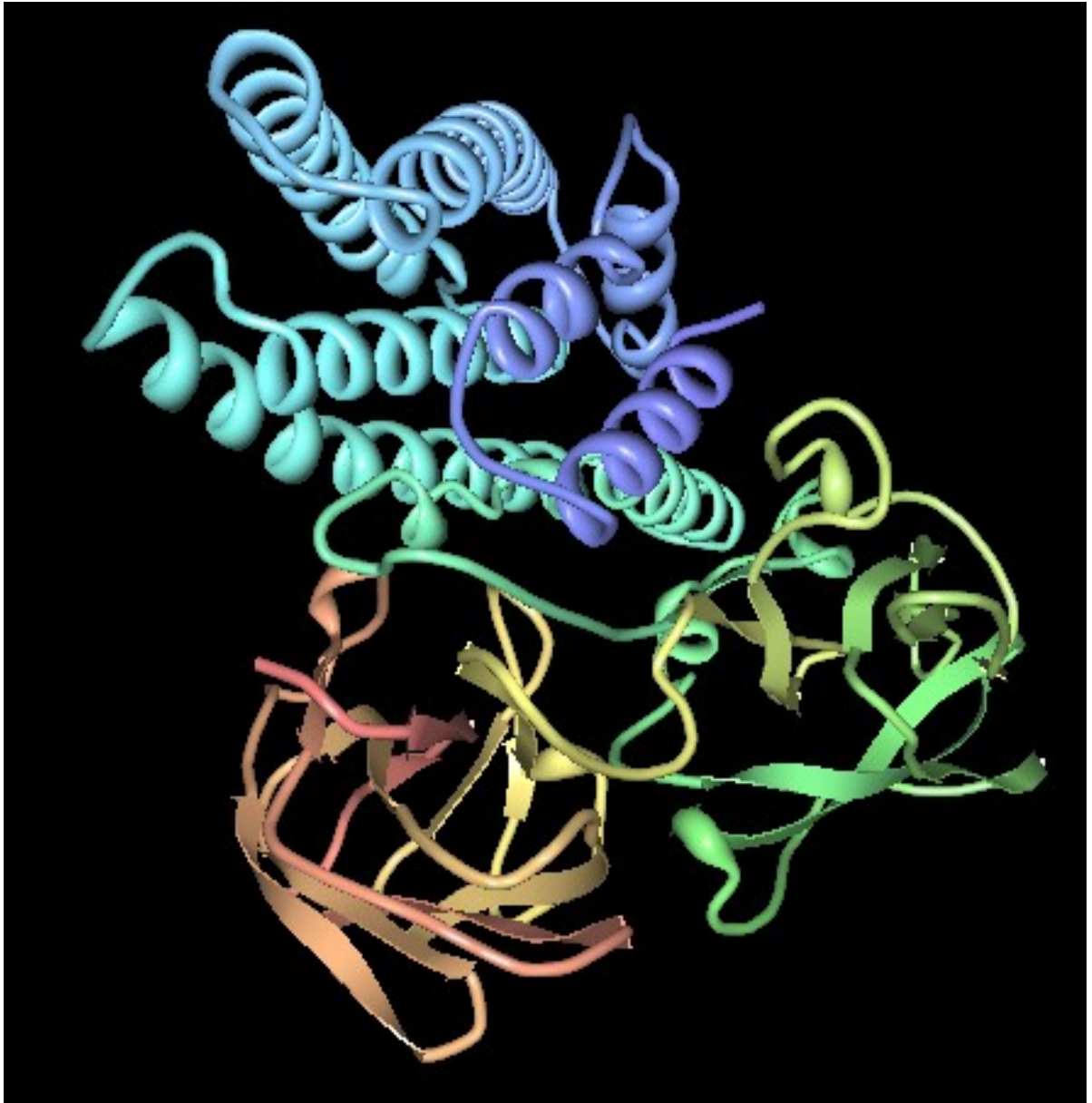
Celem modyfikacji było uzyskanie przez kukurydzę odporności na zniszczenia powodowane przez szkodniki owadzie z rzędu łuskoskrzydłych, w szczególności omacnicę prosowiankę. Jest to poważny czynnik wpływający ujemnie na ilość i jakość uzyskiwanych plonów. Omacnica prosowianka jest zdolna do zaatakowania nawet 80% roślin w uprawie⁽⁹⁾ i zmniejszenia plonów nawet o 40%⁽¹⁰⁾. W Polsce roczne straty z tego powodu szacowane są na 460 tys. ton, co finansowo przekłada się na około 300 mln złotych. Dotychczasowe doświadczenia udowadniają, iż walka ze szkodnikiem przy użyciu konwencjonalnych środków jest uciążliwa, kosztowna i mało skuteczna. Istnieją odpowiednie preparaty owadobójcze, jednak ich liczba jest stosunkowo niewielka. Ich substancjami aktywnymi bardzo często są związki zaliczane do syntetycznych pyretroidów, które najlepsze działanie osiągają przy temperaturze otoczenia nie przekraczającej 20° C. W Polskim klimacie, w okresie letnim warunki takie występują stosunkowo rzadko. Aby środek był skuteczny musi być stosowany w odpowiednim momencie, w krótkim czasie, gdy

gąsienice wylęgają się z jaj i żerują na powierzchni rośliny. Wymaga to od rolnika czujnej obserwacji i synchronizacji zabiegu. Występuje także problem natury technicznej. W okresie gdy powinien być wykonany zabieg wysokość kukurydzy wynosi do dwóch metrów. Do przeprowadzenia oprysku potrzebne są więc odpowiednie metody pozwalające na umieszczenie opryskiwacza ponad ten poziom. Skuteczność takich zabiegów zależy od wielu czynników, jest droga i nie zawsze satysfakcjonująca. Należy także pamiętać o skażeniu środowiska wywoływanym przez opryski oraz ich nierzadko mało specyficznym działaniu. Logicznym wyjściem wydaje się być zatem nadanie roślinie odporności, tak aby była ona zabezpieczona przed zniszczeniami wywoływanymi przez owady przez cały okres wegetacji, bez konieczności zewnętrznej ingerencji ze strony hodowcy. Dzięki temu można uzyskać znaczne oszczędności (nie ponosi się kosztów na środki do oprysku i kosztów ich użycia) oraz ograniczyć zatrucie środowiska przez środki ochrony roślin, a jednocześnie być pewnym uzyskania maksymalnych plonów⁽¹⁰⁾.

Jako czynnik zapewniający ochronę wybrane zostało białko Cry1A(b) pochodzące z bakterii *Bacillus Thuringensis* ssp. *Kurtsaki* (z tego też powodu potocznie nazywane jest białkiem Bt). Jest ono toksyczne dla Omacnicy Prosojanki. Spożycie tkanki roślinnej zawierającej to białko powoduje jej śmierć.

3.2 Białko Cry1A(b)

Bakterie *B. Thuringensis* są organizmami zdolnym do produkcji dużej ilości białek skierowanych przeciwko owadom. Białka te są cząsteczkami należącymi do jednej, wspólnej rodziny. Ich kompletna gama działa przeciwko szerokiemu spektrum owadów, jednakże pojedyncze toksyny są wysoce specyficzne ⁽¹¹⁾. Dzieje się tak ze względu na ich budowę. W każdym z białek możemy wyróżnić dwie domeny – pierwszą odpowiedzialną za wytworzenie porów kationowych w poprzek nabłonka komórek jelita owada oraz drugą, którym zadaniem jest łączenie się z odpowiednim receptorem na tymże nabłonku. Badania wykazały, że trzy struktury przypominające pętle które znajdują się na szczycie domeny drugiej mają kluczowe znaczenie w przyłączaniu się, a zarazem aktywności toksyny w konkretnym organizmie. W momencie kontaktu z receptorem domena pierwsza zaburza przepływ jonów co w dalszej konsekwencji prowadzi do śmierci zaatakowanego owada⁽¹²⁾. Gdy jednak nie istnieje miejsce rozpoznawane przez domenę drugą (np. w organizmie ludzkim) białko nie wykazuje aktywności ⁽¹³⁾. Jego część jest trawiona a rejony odporne na proteazy zostają wydalone. Należy zaznaczyć, że nie jest to nowy środek w ochronie roślin. Cry1Ab jest bezpiecznie stosowane w rolnictwie od ponad 40 lat jako składnik naturalnych pestycydów⁽³⁾, jednak jego bezpośrednia produkcja przez kukurydzę jest dużo efektywniejsza, z powodów opisanych w poprzednim rozdziale.



Rys. 1.1. Obraz struktury białek Cry na przykładzie białka Cry1A(a). Wyróżniono dwie domeny funkcjonalne. Domena wiążąca się z receptorem złożona jest ze struktur α helis , domena tworząca por kationowy złożona jest ze struktur β harmonijek . Źródło: Protein Data Bank - PDBDOI:10.2210/pdb1ciy/pdb. Obraz uzyskany dzięki programowi Simple Viewer

W celu modyfikacji kukurydzy użyto sekwencji DNA zmienionej w stosunku do naturalnej – tak zwanego „genu syntetycznego”. Powodem są różnice w ekspresji białka u organizmów prokariotycznych (bakteria) a eukariotycznych (kukurydza)⁽¹⁴⁾. Sekwencja aminokwasowa uzyskanego białka Cry1A(b) jest jednak identyczna z pierwotną i wygląda następująco⁽¹²⁾:

1	MDNNPNINEC	IPYNCLSNPE	VEVLGGERIE	TGYTPIDISL	SLTQFLLSEF
51	VPGAGFVLGL	VDIHWGIFGP	SQWDAFLVQI	EQLINQRIEE	FARNQAISRL
101	EGLSNLYQIY	AESFREWEAD	PTNPALREEM	RIQFNDMNSA	LTTAIPLEAV
151	QNYQVPLLSV	YVQAANLHLS	VLRDVSVFGQ	RWGFDAATIN	SRYNDLTRLI
201	GNYTDHAVRW	YNTGLERVWG	PDSRDWIRYN	QFRRELTTLV	LDIVSLFPNY
251	DSRTYPIRIV	SQLTREIYTN	PVLENFDGSF	RGSAQGIEGS	IRDPHLM DIL
301	NSITITYDAH	RGEYYWSGHQ	IMASPVGFSG	PFFTPLYGT	MGNAAPQQR
351	VAQLGQGVYR	TRSSTLYRRP	FNIGINNQQL	SVLDGTEFAY	GTSSNLPSAV
401	YRSGTVDSL	DEIPPQNNV	PPRQGFSHRL	SHVSMFRSGF	SNSSVSIIRA
451	PMFSWIHRSA	EFNNIIPSSQ	ITQIPLTKST	NLGSVTSVVK	GPGFTGGDIL
501	RRTSPGQIST	LRVNITAPLS	QRYRVIRIYA	STTNLQFHTS	IDGRPINQGN
551	FSATMSSGSN	LQSGSFLTVG	FTTFFNFSNG	SSVFTLSAHV	FNSGNEVYID
601	RIEFVPAEVT	FEAEYDLERA	QKVNELFTS	SNQIGLKTVD	TDYHIDQVSN
651	LVECLSDEFC	LDEKKELSEK	VKHAKRLSDE	RNLLQDPNFR	GINRQLDRGW
701	RGSTDITIQG	GDDVFKENYV	TLLGTFDECY	PTYLYQKIDE	SKLKAYTLYQ
751	LRGYIEDSQD	LEIYLIRYNA	KHETVNVPGT	GSLWPLSAPS	PIGKCAHSH
801	HFSLDIDVGC	TDLNEDLGVW	VIFIKTODG	HERLGNLEFL	EGRAPLVGEA
851	LARVKRAEKK	WRDKREKLEW	ETNIVYKEAK	ESVDALFVNS	QYDRLQANDN
901	IAMIHAADKR	VHSIREAYLP	ELSVIPGVNA	AIFEELEGRI	FTAFSLYDER
951	NVIKNGDFNN	GLSCWNVKGH	VDVEEQNNHR	SVLVVPEWEA	EVSQEVVCP
1001	GRGYILRVTA	YKEGYGEGCV	TIHEIENNTD	ELKFSNCVEE	EVYPNNTVTC
1051	NDYTATQEEY	EGTYTSRNRG	YDGAYESNSS	VPADYASAYE	EKAYTDGRRD
1101	NPCESNRGYG	DYTPLPAGYV	TKELEYFPET	DKVWIEIGET	EGTFIVDSVE
1151	LLLMEE	-	-	-	-

4. Metoda transformacji

Aby doszło do złączenia obcej cząsteczki DNA z materiałem genetycznym gospodarza należy zastosować metodę, która spełni szereg warunków. Przede wszystkim cząsteczka DNA musi zostać dostarczona bezpośrednio do jądra. Jest to wymagane, ponieważ błona jądrowa uniemożliwia spontaniczny transport kwasów nukleinowych do wewnątrz. Ponadto w obszarze cytoplazmatycznym każdej komórki znajdują się enzymy degradujące DNA i RNA, które stanowią część jej naturalnego systemu obronnego. Sama jednak obecność wprowadzonej informacji genetycznej w jądrze nie doprowadzi do jej ekspresji. Konieczna jest jej integracja, czyli połączenie z macierzystym DNA oraz zachowanie odpowiedniej struktury. Aby gen uległ transkrypcji

konieczna jest obecność promotora, który zareaguje na jądrowe sygnały decydujące o jego ekspresji. Z tego też względu transformację przeprowadza się nie za pomocą samego genu ale konstruktów genetycznych, którego bazą najczęściej jest plazmid bakteryjny.

Plazmidy są bakteryjnymi cząsteczkami DNA w większości przypadków o strukturze kolistej, które są umiejscowione poza jądrem komórkowym i posiadają charakter autonomiczny. Niektóre z nich są zdolne do połączenia się całkowicie lub w części z genomem jądrowym. Do struktury takich plazmidów za pomocą enzymów restrykcyjnych wprowadzamy fragmenty, które chcemy wprowadzić do materiału genetycznego gospodarza. Konieczne jest także wprowadzenie genów pomocniczych, które pomogą nam zidentyfikować komórki zmodyfikowane i oddzielić je od tych niezmienionych. Musimy także dobrać odpowiednią metodę pozwalającą na fizyczne wprowadzenie plazmidu do komórek innego organizmu. Obecnie używane metody możemy podzielić na wektorowe lub bezwektorowe. Metody wektorowe przewidują użycie dodatkowego nośnika związanego z cząsteczką DNA, który pozwoli na jego dostarczenie do jądra komórkowego. Mogą to być między innymi bakterie (np. najpowszechniej obecnie stosowana *Agrobacterium Tumefaciens*) lub nośniki chemiczne (użycie związków lipidowych – lipofekcja). Metody bezwektorowe przewidują bezpośrednie doprowadzenie indukowanego materiału genetycznego do materiału genetycznego gospodarza. Warto zaznaczyć, że obecnie transformacja przez *Agrobacterium* jest najwydajniejszym i najpewniejszym sposobem. Odkrycie *Agrobacterium* infekującego kukurydze przez Mike-a Fromma znacznie posunęło prace nad transgenezą tej rośliny⁽¹⁵⁾. Najbardziej rozpowszechnionym i szeroko stosowanym zabiegiem w czasie gdy dokonywano transformacji było zastosowanie tzw. „strzelby genowej”. Została ona użyta w przypadku modyfikacji kukurydzy MON 810^(3,16,17).

W metodzie tej wykorzystuje się mikroskopijnych wymiarów kuleczki odpowiednio dobranych metali (najczęściej jest to wolfram lub złoto). Zostają one opłaszczane wprowadzanym DNA (najczęściej przy pomocy chlorku wapnia i spermidyny), a następnie umieszczone na plastikowym nośniku i wystrzelone przy dużej prędkości za pomocą odpowiedniego urządzenia w kierunku modyfikowanej tkanki. Następnie identyfikuje się komórki w wypadku których transformacja zakończyła się powodzeniem, zależnie od zastosowanej metody poprzez posiew materiału na płytki zawierające w pożywce antybiotyki lub herbicyd. Jeśli doszło do transformacji komórki są w stanie produkować enzym zwalczający jego działanie i tylko one są zdolne do wzrostu. Następnie są one izolowane i namnażane, po czym poddawane analizie genomowej w celu uzyskania podstawowych informacji: gdzie została zintegrowana wprowadzona sekwencja oraz w jakiej ilości kopii.

Do modyfikacji rośliny MON 810 zostały użyte 2 konstrukty plazmidowe: PV-ZMBKO7 oraz PV-ZMGTIO. Jako materiał roślinny do transformacji wybrano linię kukurydzy Hi – II, pochodną linii A188 oraz B73 wyprowadzonych w Stanach Zjednoczonych przez odpowiednio: Uniwersytet Minnesoty i Uniwersytet Stanu Iowa. Plazmidy te opłaszczono na powierzchni mikrokuleczek wolframu i złota a następnie umieszczono na plastikowym nośniku i wystrzelono w kierunku komórek niedojrzałego zarodka linii Hi – II. Komórki te umieszczono na pożywce zawierającej kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy, który jest środkiem powszechnie stosowanym do poprawy szybkości wzrostu^(3,18). Kilkaset linii które wyrosły na pożywkach jest następnie hodowane i analizowane pod względem odporności na *Omacnicę prosowiankę*. Wybierane są najlepsze z nich, posiadające jedna kopię transgenu, z których to pojedyncza roślina daje początek nowej linii.

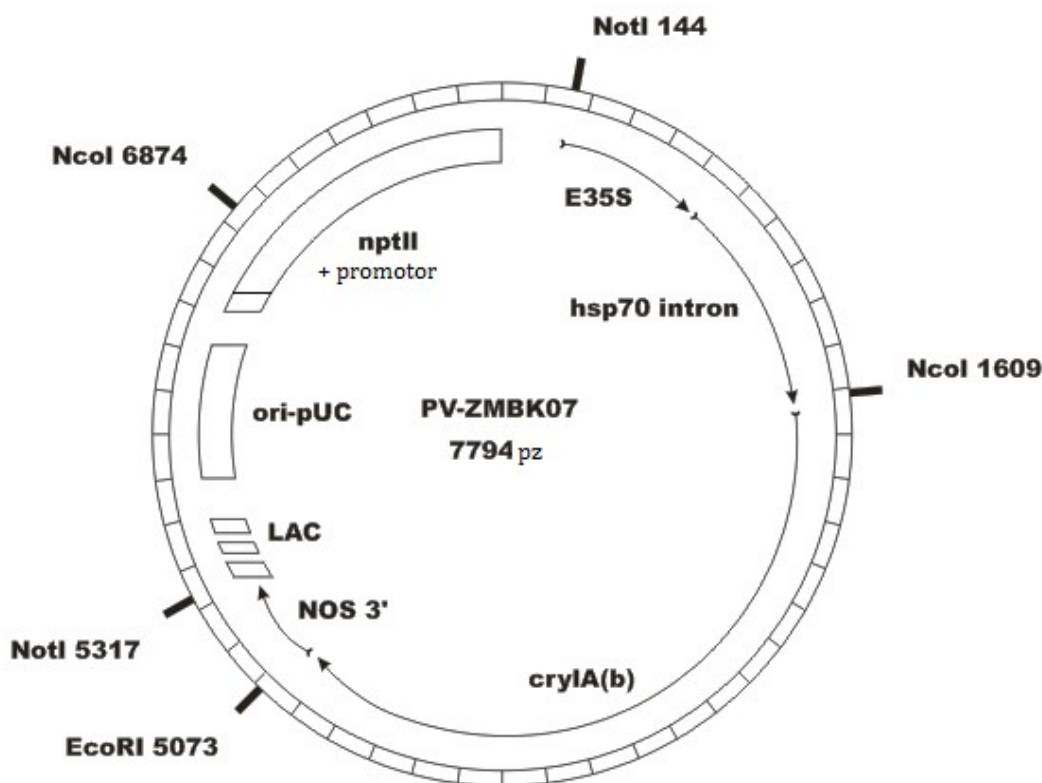
4.1. Opis użytych konstruktyw plazmidowych.

4.1.1. PV-ZMBKO7

Plazmid PV – ZMBKO7 został zaprojektowany w celu nadania komórkom docelowym możliwości syntezy białka Bt. Zawierał on w swojej strukturze następujące elementy:

- *cry1Ab* – gen kodujący białko Cry1Ab. Jego sekwencja została zmodyfikowana tak, aby uzyskać większą wydajność ekspresji białka niż w wypadku genu natywnego⁽¹⁴⁾. Uzyskane białko jest identyczne z białkiem naturalnym. Jego długość wynosi 3600 pz.
- *promotor E35S* – jest odmianą popularnego promotora wyizolowanego z wirusa mozaiki kalafiora wzbogaconego podwójną sekwencją enhancerową. Ma na celu konstytutywną indukcję ekspresji genu *cry1Ab* znajdującego się pod jego kontrolą. Jego długość jest równa 610 par zasad.
- *Intron hsp 70* – intron genu białka szoku cieplnego kukurydzy (heat shock protein), zlokalizowany pomiędzy genami E35S a *cry1Ab*. Jego obecność zwiększa poziom transkrypcji włączonego genu. Długość - 800 par zasad.
- *NOS 3'* – region 3' UTR genu syntazy nopaliny, odpowiada za terminację transkrypcji i poliadenylację mRNA, 260 par zasad.
- *lacZ - alfa* – region alfa genu *lacZ* z *E. Coli*, zawiera częściową sekwencją genu *lacZ*, promotor Plac oraz częściową sekwencją kodującą beta – D – galaktozydazę lub białko *lacZ* z pUC119. Region ten zawiera polilinker czyli liczne miejsca rozpoznawane przez restryktazy. Pozwala to na wprowadzenie odpowiednich sekwencji do struktury plazmidu. Długość – 240 par zasad.

- *ori* – *pUC* – miejsce inicjacji replikacji plazmidu, pozwalające na jego namnożenie w komórkach *E. Coli*. Długość – 650 par zasad.
- *npt II* – gen kodujący enzym fosfotransferazę neomycyny typu II pod kontrola własnego bakteryjnego promotora - PnptII. Gen ten niesie ze sobą odporność na antybiotyki aminoglikozydowe i umożliwia odróżnienie komórek które podległy modyfikacji od niezmodyfikowanych. Jego długość jest równa 790 parom zasad. ^(3,16,17,19)



Rys.1.2 Mapa plazmidu PV – ZMBK07 z zaznaczonymi miejscami cięć przez enzymy restrykcyjne. Na podstawie: (19).

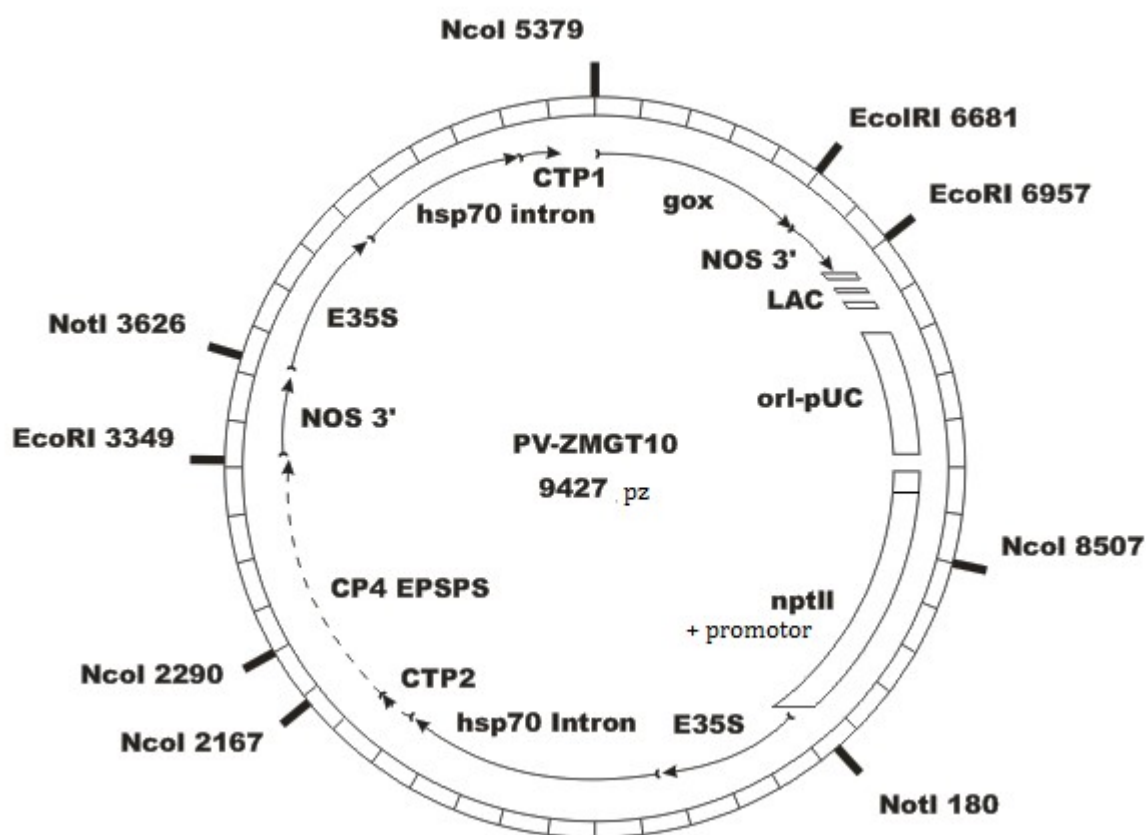
4.1.2. PV-ZMG10

Wektor ten miał w założeniu nadać transformowanej roślinie odporność na glifosat, substancję aktywną, stosowaną w wielu herbicydach. Jednak żaden jego fragment nie został zintegrowany z genomem kukurydzy MON 810. Prawdopodobnie podczas identyfikacji komórek na pożywcę komórka, która dała początek linii MON 810, rosła w pobliżu innych, odpornych na glifosat, które rozłożyły tą substancję znajdującą się w ich bezpośrednim pobliżu. W skład wektora wchodziły geny *nptII*, *lacZ* - *alfa*, oraz *ori* – *pUC* opisana powyżej, oraz:

- gen kodujący enzym CP4 EPSPS z *Agrobacterium* sp. związany z sekwencją kodującą

chloroplastowy peptyd transportowy z *Arabidopsis Thaliana* CTP2. Enzym ten umożliwia syntezę aminokwasów aromatycznych wykazując dużą tolerancję na glifosat. Jako, że synteza tych aminokwasów prowadzona jest w chloroplastach konieczne jest jego wprowadzenie do tejże organelli. Jest to możliwe dzięki połączeniu z sekwencją kodującą peptyd CTP2

- gen *gox* z *Ochromobactrum Antchropi*, kodujący enzym oksydoreduktazę glifosatu, odpowiedzialny za rozkład glifosatu do AMPA i glioksylanu. Podobnie jak gen CP4 EPSPS jest on połączony z genem kodującym białko umożliwiające transport do chloroplastu – w tym wypadku CTP1 (z *A. thaliana*).^(3,16,17,19).



Rys. 1.3. Mapa plazmidu PV-ZMG10 z zaznaczonymi miejscami cięć przez enzymy restrykcyjne. Widoczne dwukrotne użycie tego samego promotora. Na podstawie: (19).

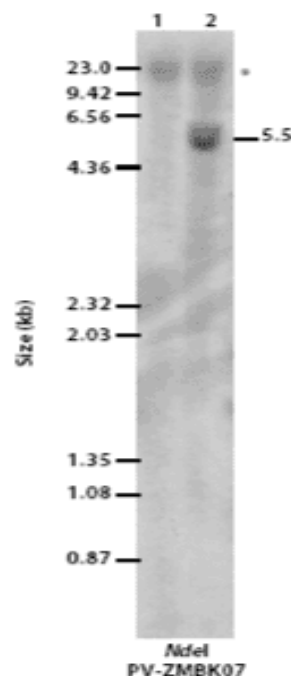
4.2 Analiza Rekombinantów

Po przeprowadzonej transformacji konieczna jest analiza uzyskanego materiału genetycznego. Obejmuje ona zidentyfikowanie ilości wprowadzonych kopii genu oraz miejsca ich

integracji. W tym celu konieczne jest wyizolowanie DNA ze zmodyfikowanych komórek, przeprowadzenie trawienia restrykcyjnego, oraz zlokalizowanie wklonowanych sekwencji. W wypadku kukurydzy MON 810 została ona wykonana za pomocą techniki Southern Blot z wykorzystaniem sond molekularnych. Sondy molekularne są to odcinki DNA, posiadające sekwencję homologiczną do szukanych przez nas w genomie. Łączą się z nimi i umożliwiają ich wizualizację przy pomocy odpowiednich metod detekcji. W opisywanym przypadku sekwencje *gox*, *nptII*, *cryIAb*, *CP4 EPSPS* oraz *ori-pUC* zostały wycięte z odpowiednich plazmidów bądź namnożone przy pomocy techniki PCR. Rozdzielono je przy wykorzystaniu elektroforezy a następnie oczyszczono. Tak przygotowane próbki poddano reakcji random – priming PCR, tworząc kopie zawierające radioaktywny izotop ^{32}P . Sondy takie zapewniają bardzo wysoką dokładność detekcji.

Izolacja DNA z komórek MON 810 była przeprowadzana równoległe z próbą kontrolną, rośliną nie genetycznie modyfikowaną MON 818. Materiałem wyjściowym były sadzonki wyhodowane w szklarni z nasion roślin pochodzących z testów polowych. Zastosowano standardową procedurę izolacji ⁽³⁾

4.2.1 Wyniki ilości wprowadzonych kopii genów

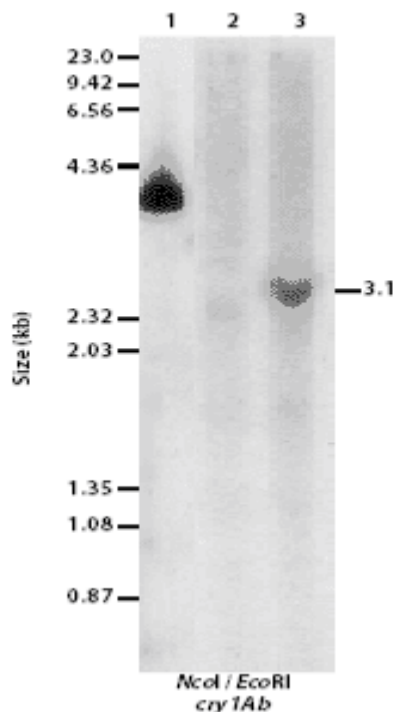


Rys. 1.4 Analiza ilości wprowadzanych genów. 1- kontrola: MON 818. 2 – MON 810. Źródło: (20)

W celu sprawdzenia ilości insertów dokonano cięcia za pomocą enzymu *NdeI*. Żaden z użytych w trakcie transformacji plazmidów nie zawierał odpowiedniego dla niego miejsca restrykcyjnego, w związku z czym enzym ten dokonał cięć na genomowym DNA kukurydzy po zewnętrznych stronach plazmidów. Jako, że miejsca tych cięć znajdują się na losowych fragmentach genomu, każda z ewentualnych wyciętych kopii charakteryzowałaby się inną długością a przez to inną pozycją na żelu. Analizy dokonano za pomocą DNA plazmidu PV-ZMBK07. Wyniki prezentuje zdjęcie, rys. nr 1.4. Na wysokości 23 kb widoczne są prążki tła, które występują w obu liniach. W wypadku MON 810 widoczny jest jeden prążek na wysokości 5,5 kb. Oznacza to, że mamy do czynienia z jedną kopią wprowadzonego DNA.

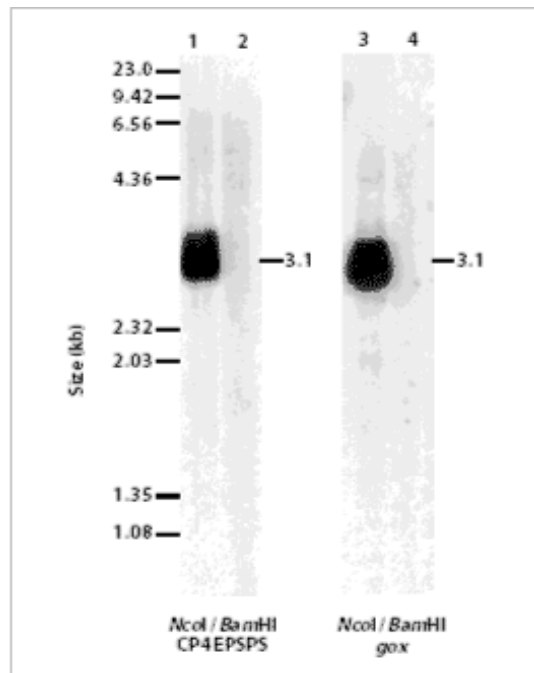
4.2.2 Analiza obecności sekwencji Cry1A(b), CP4 EPSPS, gox, oraz sekwencji wektorowych.

DNA plazmidu PV-ZMBK07, próby badanej i próby kontrolnej poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi *EcoRI* oraz *NcoI*. Wyniki przedstawia rysunek nr 1.5. Fragment 3.46 kb odpowiada wielkości szukanego genu. Prążek uwidoczniony na linii plazmidu wydaje się mieć większą wielkość, ponieważ jedno z jego miejsc restrykcyjnych znajdowało się w innym miejscu niż w wypadku genomowego DNA kukurydzy.



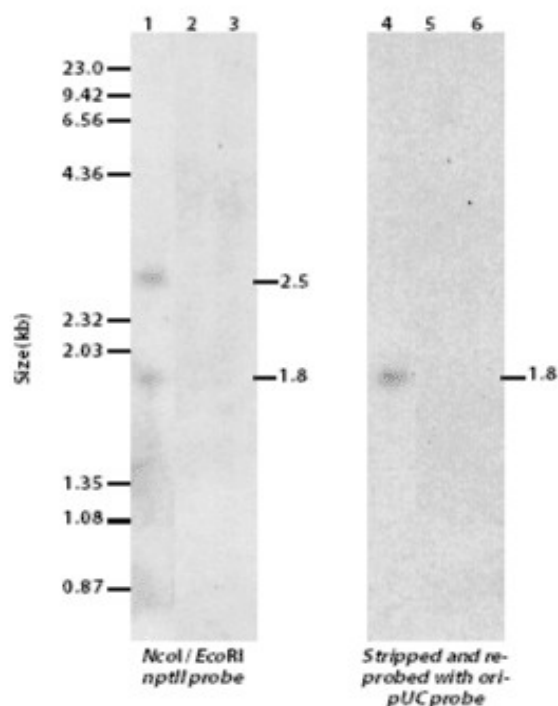
Rys. 1.5 Analiza na obecność genu *cry1Ab*. 1 – plazmid PV-ZMBK07, 2- kontrola: MON818, 3- MON810 Źródło: (19)

Geny CP4 EPSPS oraz gox znajdowały się na plazmidzie PV-ZMG10, wobec czego nie spodziewano się znalezienia ich w genomie kukurydzy. Wraz z plazmidem PV-ZMBKO7 (jako próbą kontrolną) oraz DNA MON 810 plazmid PV-ZMG10 poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi BamHI i NcoI. Wyniki obrazuje rysunek nr 1.6. Żaden z dwóch genów nie został wykryty w badanym materiale.



Rys. 1.6. Wynik analizy pod kątem obecności sekwencji CP4 EPSPS oraz gox. 1 i 3 – mix plazmidów PV-ZMG10 oraz PV-ZMBKO7. 2 i 4 – DNA MON810. Do próbek 1 i 2 zastosowano sondę CP4 EPSPS. Do próbek 3 i 4 zastosowano sondę gox. Źródło: (20)

Plazmid PV-ZMBK07, DNA kontrolne MON 818 oraz DNA MON 810 poddano cięciu restryktazami NcoI oraz EcoRI i zastosowano sondę na sekwencję nptII. Obecność nptII wykazano jedynie w próbce z plazmidem, co wskazuje, że linia MON 810 została wyprowadzona z komórki która wyrosła na pożywce selekcyjnej mimo nieobecności genu kodującego odporność na antybiotyki. Jest to bardzo istotne, ponieważ w takim wypadku nie ma ryzyka niekontrolowanego uwolnienia tego genu do środowiska. (rys. 1.7).



Rys. 1.7. Analiza na obecność sekwencji wektorów. 1, 4 – plazmid PV-ZMBK07. 2,5 – DNA MON 818. 3,6 – DNA MON810. Do prób 1-3 zastosowano sondę na gen nptII, do prób 4-6 zastosowano sondę ori – pUC. Źródło: (20).

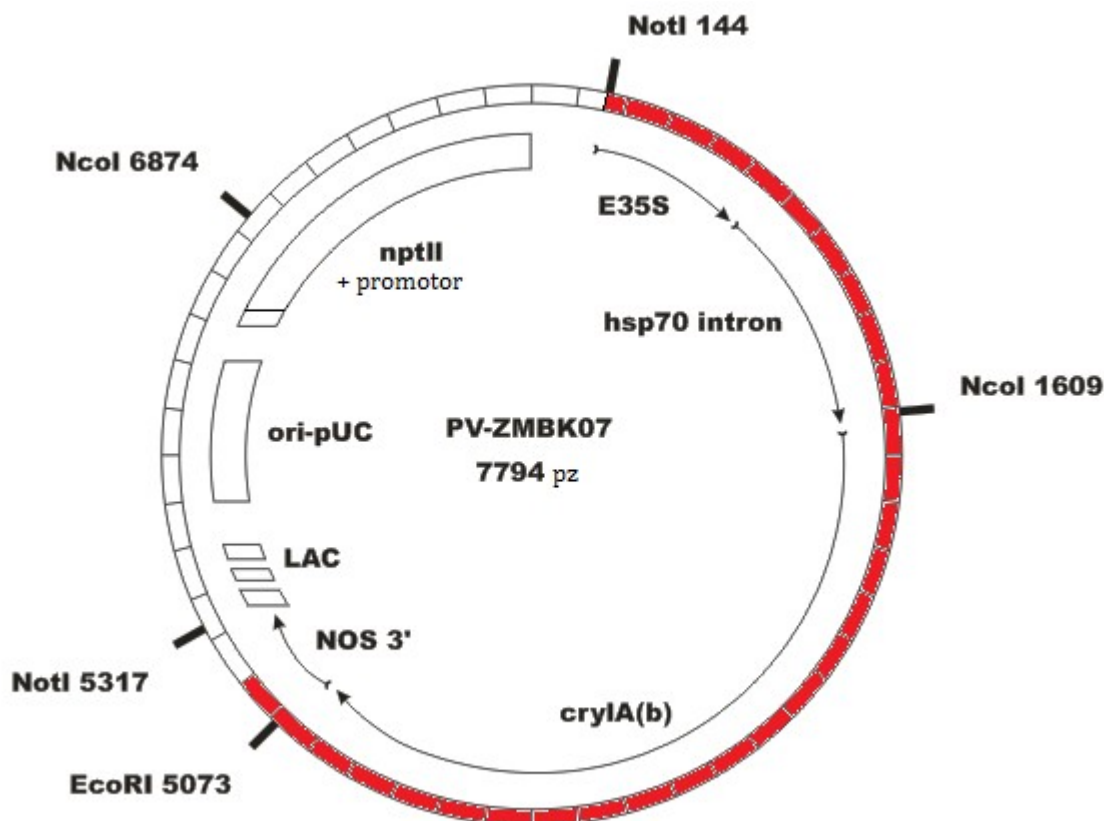
4.2.3. Stabilność wklonowanego materiału

Jedną z wcześniej wspomnianych wad transformacji przy użyciu strzelby genowej jest możliwa mała stabilność wprowadzonego materiału genetycznego. Oznacza to, że może on zostać łatwo utracony w kolejnym pokoleniu. W celu oszacowania ryzyka z tym związanego przeprowadzono badania polegające na analizie obecności wprowadzonych sekwencji w roślinach potomnych w liniach homozygotycznych.

Według danych Monsanto, wklonowana sekwencja jest stabilna przez 6 pokoleń w wypadku krzyżowania z niespokrewnioną linią Mo17 lub 7 pokoleń jeśli krzyżowanie zachodzi z blisko spokrewnioną linią B73⁽²¹⁾. Najistotniejsze są jednak badania stabilności hybryd wysiewanych na polach. Wykazują one niezmienną stabilność wprowadzonych sekwencji.⁽²²⁾

4.2.4. Podsumowanie

W genomie kukurydzy MON 810 znajduje się fragment kodujący promotor E35S, intron hsp 70 oraz białko Cry1Ab. Nie doszło natomiast do integracji sekwencji funkcjonalnych wektora ani sekwencji kodującej nptII.



Rys. 1.8. Mapa plazmidu PV-ZMBK07 z zaznaczonymi na czerwono obszarami wprowadzonymi do genomu kukurydzy. Na podstawie: (19).

4.3. Ekspresja białka Cry1A(b).

Badanie wyprodukowanego przez roślinę białka wykonano przy użyciu techniki immunoenzymatycznych ELISA oraz Western blot. Ich zasada opiera się na specyficznym oddziaływaniu badanego białka z przeciwciałem. W latach 1994 – 1996 na terenie Stanów Zjednoczonych oraz Unii Europejskiej przeprowadzone zostały badania polowe zlokalizowane w kilku odrębnych miejscach. 1994 USA – 6 miejsc, 1995 USA – 5 miejsc, 1995 UE – 4 miejsca, 1996 UE – 3 miejsca. Uzyskane rośliny zanalizowano pod względem ekspresji białka Bt. Wyniki zawarte

są w tabeli 4.

Tabela 4. Poziom zawartości białka Bt w kukurydzy (3):

Część rośliny	Typ danych:	Uzyskany zakres białka ($\mu\text{g/g}$ próby)			
		1994 USA	1995 USA	1995 UE	1996 UE
Liść	Zakres	7,93-10,3	5,21-10,6	5,21-10,6	7,77-15,1
	Wartość Średnia	9,35	8,95	8,60	12,15
	Odchylenie Standardowe	1,03	2,17	0,74	3,86
Tkanka paszowa/Cała roślina	Zakres	3,65-4,65	2,31-4,48	4,11-5,56	4,32-5,34
	Wartość Średnia	4,15	3,34	4,80	4,88
	Odchylenie Standardowe	0,71	1,09	0,75	0,52
Ziarno	Zakres	0,19-0,39	0,39-0,91	0,42-0,69	0,35-0,46
	Wartość Średnia	0,31	0,57	0,53	0,41
	Odchylenie Standardowe	0,09	0,21	0,12	0,06

Uwagę zwraca fakt wysokiego (w porównaniu do innych części) stężenia białka Bt w liściach, czyli miejscu zerowania Omacnicy Prosovianki, oraz jego niskiego stężenia w ziarnie, czyli części spożywanej przez ludzi.

Niedawne badania wykonane w Niemczech⁽²³⁾, na prowadzonych przez trzy lata w dwóch miejscach hodowlach wykazały mniejsze ilości wykrywanego białka Bt w liściach – od 2,4 do 6,4 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy w liściach górnych oraz od 3,8 do 5,7 $\mu\text{g/g}$ w liściach dolnych, poprzez cztery badane etapy rozwoju rośliny. Inne badania, wykonane przez Greenpeace⁽²⁴⁾ na roślinach pochodzących z Hiszpanii oraz Niemiec podają ilości białka Bt w liściach w zasięgu od niewykrywalnych do 15 $\mu\text{g/g}$. Różnice w każdym z raportów mogą wynikać z wielu czynników. Istotnym czynnikiem jest stosowanie różnych metod badawczych. Analiza wykonana przez Greenpeace⁽²⁵⁾ w zakresie wykrywania białka Bt udowodniła, że jakkolwiek wyniki uzyskane przy użyciu takich samych protokołów są ze sobą zgodne, tak w wypadku użycia różnych protokołów dla tej samej metody wyniki różnią się od 5 do nawet 100%. Do czynników środowiskowych wpływających na ekspresję białka Bt zalicza się intensywność fotosyntezy⁽²⁶⁾, użycie nawozów azotowych⁽²⁷⁾, jakość gleby, użycie pestycydów⁽²⁸⁾, szybkość wzrostu oraz różnice w warunkach polowych w różnych strefach klimatycznych⁽²³⁾. Część naukowców⁽²⁹⁾ uważa, że dostępne dane

mieszczą się w zakresie który można wyjaśnić biologiczną zmiennością oraz różnorodnością. Istotne jednak wydaje się przeprowadzenie badań w indywidualnych warunkach środowiskowych przy użyciu wystandaryzowanych, dających możliwe do porównania ze sobą dane protokołów.

Warto zauważyć, że mimo tych sporów odporność MON 810 na Omacnicę prosowiankę jest niemalże pełna i wynosi 99,6%. Jak wykazały badania we Francji, w rejonach o wysokim zagrożeniu tym szkodnikiem wzrost plonów wynosił ponad 30 kwintali z hektara⁽³⁰⁾.

4.4. Porównanie składu chemicznego z kukurydzą nietransgeniczną

Ponieważ wszystkie procesy zachodzące w komórce są ze sobą powiązane, włączenie nowego szlaku biosyntezy białka może mieć wpływ na do tej pory istniejące szlaki w roślinie. W celu wykazania tzw. „substantial equivalence”, czyli identyczności składu chemicznego rośliny transgenicznej z nietransgeniczną (za wyjątkiem wprowadzonej nowej cechy) przeprowadzone zostały badania składu chemicznego. Jako próba wykorzystana została nietransgeniczna roślina MON 818. Wszystkie uzyskane wyniki mieściły się w normach dla kukurydzy⁽³⁾.

4.5. Oszacowanie bezpieczeństwa

Żadna nowa odmiana rośliny kukurydzy, uzyskana zarówno przy pomocy metod inżynierii genetycznej jak i konwencjonalnego krzyżowania, w myśl obowiązujących przepisów, nie może zostać dopuszczona do hodowli i obrotu bez udowodnienia, że jest ona równie bezpieczna jak inne, tradycyjne odmiany. Choć białko, którego ekspresję wykorzystano w celu nadania kukurydzy odporności na szkodniki owadzie, było używane jako naturalny pestycyd od około 40 lat, koniecznym było oszacowanie jego bezpieczeństwa w transgenicznej roślinie, zarówno za pomocą metod teoretycznych jak i praktycznych. Poniżej opisano badania przeprowadzone przez Monsanto i zaakceptowane przez EPA (US Environmental Protection Agency).

Od tego czasu przeprowadzono jednak mnóstwo, dodatkowych, niezależnych analiz. Ilość białka Bt, produkowana przez komórki kukurydzy jest zbyt mała, a zarazem zbyt trudna do izolacji aby można ją było użyć do swobodnego prowadzenia analiz. W celu wyprodukowania większej ilości białka Cry1A(b) do badań użyto zmodyfikowanych genetycznie bakterii *E. Coli*. Komórki *E. Coli* zostały poddane transformacji z wykorzystaniem sekwencji identycznej z tą użytą do modyfikacji kukurydzy⁽³¹⁾. Gotowe pełne białko zostało poddane działaniu trypsyny w celu

uzyskania odpornego na proteazy rdzenia, który jest związany z toksycznym oddziaływaniem w organizmach insektów. Dokładną zgodność z białkiem produkowanym w kukurydzy MON 810 potwierdzono przy pomocy danych na temat masy cząsteczkowej, wpływu na insekty oraz immunoreaktywności.

Badania wpływu białka Cry1Ab na organizmy mysie.

Badania na myszach (organizmach ssaczych), miały na celu ukazanie efektu bezpośredniego podawania białka Cry1Ab tym zwierzętom. Dla każdej grupy dziesięciu myszy podawano odporny na trypsynę rdzeń toksyny w dawkach kolejno: 0, 400, 1000 i 4000 mg/kg masy ciała. Jako grupę kontrolną przyjęto myszy które otrzymywały dawki najwyższe, 4000 mg BSA (Bovine Albumine Serum – albumina z surowicy wołu) na kilogram masy ciała. Woda oraz pożywienie były dla każdej grupy dostępne bez ograniczeń. Po upływie 8 lub 9 dni zwierzęta usypiano a następnie poddawano analizie wycinki ich tkanek, w ilości około 40 próbek na każdego osobnika. W trakcie przeprowadzanie eksperymentu nie zauważono żadnych istotnych odchyleń pomiędzy grupami badanymi, nie otrzymującymi białka Bt, lub otrzymującymi je w nieistotnych ilościach a kontrolną w zakresie: masy ciała, śmiertelności oraz ilości spożywanego pokarmu. W każdej z grup były obecne osobniki z patogennymi zmianami wykrytymi podczas sekcji, jednak uznano, uwzględniając całościowe wyniki wielu poprzednich badań, że w żadnym wypadku nie były one związane z przeprowadzanymi, analizującymi wpływ podawania białka badaniami⁽³²⁾.

Porównanie struktury białka Cry1Ab ze strukturą danych toksyn

Sekwencja i skład aminokwasowy białka a także jego struktura są podstawowymi czynnikami które decydują o pełnionej przez niego funkcji. Wobec tego logicznym krokiem podczas oceny bezpieczeństwa było określenie ewentualnej homologii toksyny Cry1Ab z innymi toksynami białkowymi, w tym szczególnie ludzkimi, obecnymi w najważniejszych bazach danych: EMBL, GenBank, IR oraz Swiss Prot. Jedynymi strukturami wykazującymi podobieństwo były inne białka produkowane przez bakterię *Bacillus Thuringensis* ⁽³³⁾.

Rozkład białka Cry1Ab w symulowanym przewodzie pokarmowym.

Badania prowadzone na modelach płynów ludzkiego przewodu pokarmowego wykazały, że 90% podanej ilości rdzenia białka Cry1Ab zostało rozłożone w dwie minuty po podaniu (co ustalono za pomocą metody Western Blot). Ponadto aktywność białka po dwóch minutach inkubacji

w soku żołądkowym uległa redukcji od 74 do 90%⁽³⁴⁾.

Badanie alergenicności

Białko Cry1Ab zostało porównane ze znanymi alergenami przy pomocy technik analizy komputerowej. Nie znaleziono istotnej homologii do jakichkolwiek znanych substancji o alergennym działaniu. Ponadto substancje takie charakteryzują się szeregiem konkretnych właściwości (takich jak pochodzenie alergenne, stabilność w obróbce, powszechność w żywności), spośród których żadna nie została przypisana Cry1Ab^(35, 36).

Badania toksyczności niespecyficzej

Przeprowadzone zostały badania toksyczności na organizmach występujących na uprawach, lub w sąsiedztwie upraw kukurydzy w celu stwierdzenia czy białko Bt obecne w komórkach rośliny może stanowić dla nich jakiegokolwiek niebezpieczeństwo. Organizmy zostały dobrane tak, aby reprezentowały szeroki przekrój bioróżnorodności. Były to: pszczoły dorosłe (owad zapylający), larwy pszczoł, przepióry wirginijskie (ptaki polne), rozwielitki (jedne z modelowych bezkręgowców), dżdżownice kompostowe (skąposzczety; mają pozytywny wpływ na jakość gleby), skoczogonki (saprobionty) oraz złotooki zielone (owady drapieżne potencjalnie redukujące populacje szkodników). Każde z badań polegało na podawaniu określonej dawki białka Cry1Ab w przewidzianym czasie (w wypadku dżdżownic białko zmieszano wraz z ziemią w której bytowały), a następnie porównaniu śmiertelności z grupą kontrolną. W żadnym wypadku nie zauważono istotnych różnic, wobec czego wywnioskować można, że toksyna ma działanie specyficzne i nie zagraża innym gatunkom. Istotne wydaje się tutaj wspomnienie o badaniach z 2007 roku, (<http://www.gmo-safety.eu/en/maize/633.docu.html>) kiedy to, opierając się na 42 oddzielnych doświadczeniach, ekolodzy z USA wywnioskowali, że bioróżnorodność obserwowana na polach obsianych kukurydzą Bt jest większa niż na tych które były traktowane pestycydami.

Badanie rozkładu w glebie

W wypadku gdyby białko Cry1A(b) ulegało dłuższej akumulacji w glebie można by obawiać się jego koncentracji i przedostania się do środowiska wodnego. Badania wykazały szybki rozkład rdzenia białka w glebie. Czas po którym 50% zaaplikowanych białek w tkankach roślinnych zostało rozłożone wynosił 1,6 dnia, natomiast czas dla 90% białek – 15 dni. Dla białek w tkankach nie wprowadzonych do gleby czasy te wynosiły odpowiednio – 25,6 oraz 40,7 dnia⁽³⁷⁾. Ponadto analizy przeprowadzone na glebie z pola, na którym w trzech kolejnych latach było uprawiane

MON 810 nie wykazały obecności białka Cry1A(b).⁽³⁸⁾

Redukcja stężenia mykotoksyn obecnych w kukurydzy

Wtórny skutkiem zaatakowanie rośliny przez *Omacnicę prosowiankę* jest jej zwiększona podatność na grzyby, produkujące substancje zwane mykotoksynami. Są to jedne z najbardziej toksycznych związków znanych ludzkości, mające m.in. działanie kancerogenne. Wprowadzanie uprawy transgenicznej wpływa na znaczą redukcję ilości mykotoksyn w kukurydzy, co obrazuje tabela nr 4.

Tabela 4. Porównanie stężenia mykotoksyn na wybranych odmianach kukurydzy: hybrydach MON 810 oraz odmianach komercyjnych nietransgenicznych. 3-A-DON: 3-acetyldeoxynivalenol; 15-A-DON:15-acetyl-deoxynivalenol MON: moniliformina NIV: nivalenol Źródło: (39).

Hybryda kukurydzy	Stężenia mykotoksyn ($\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$)			
	3-A-DON	15-A-DON	MON	NIV
Novelis Bt (MON 810)	43	346	67	brak
Monumental Bt (MON 810)	20	104	85	8
Symphony	425	395	212	98
Clarica	92	424	84	45

Oprócz najważniejszego aspektu związanego z mykotoksynami jakim jest negatywny wpływ na zdrowie ludzkie istotne są także straty ekonomiczne. Spowodowane są one nieprzyjęciem kukurydzy do sprzedaży, bądź śmiercią zwierząt hodowlanych. Rocznie wynoszą one w USA średnio 202 mln. dolarów przy wzięciu pod uwagę jedynie dwóch toksyn: aflatoksyny i fuminozyny. Użycie upraw kukurydzy Bt redukuje te straty o średnio 22,8 mln. dolarów⁽⁴⁰⁾.

Krzyżowanie z innymi odmianami kukurydzy

Liczne badania (przeprowadzone także w Europie) na komercyjnych uprawach dowodzą, że odległość uprawy kukurydzy konwencjonalnej wynosząca 25 metrów od MON 810 jest zdecydowanie wystarczająca aby zapobiec dopuszczeniu ustanowionego limitu 0,9% zawartość GM w tradycyjnych plonach^(41,42,43,44).

Opinie międzynarodowych organizacji

Swoje opinie na temat bezpieczeństwa kukurydzy MON 810 wyraziły najważniejsze

światowe organizacje związane ze zdrowiem oraz żywnością. Wśród nich znajdują się: Australia New Zealand Food Authority ⁽⁴⁵⁾; Canadian Food Inspection Agency, Plant Biotechnology Office (46); Japanese Biosafety Clearing House, Ministry of Environment⁽⁴⁷⁾; Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CTNBio (48) oraz US Food and Drug Administration⁽⁴⁹⁾. Dla Polski, jako członka Unii Europejskiej najistotniejsza jest decyzja European Food Safety Authority (EFSA) z 1998 roku, która bazując na opiniach niezależnych ekspertów, uznała MON 810 za produkt bezpieczny i dopuściła go do hodowli na rynku europejskim ⁽⁵⁰⁾. Od tego czasu EFSA wielokrotnie podtrzymywała swoją decyzję, w związku z brakiem dowodów świadczących o negatywnych efektach uprawy i spożycia, ostatni raz 30 lipca 2009 roku.

5. Identyfikacja kukurydzy MON 810

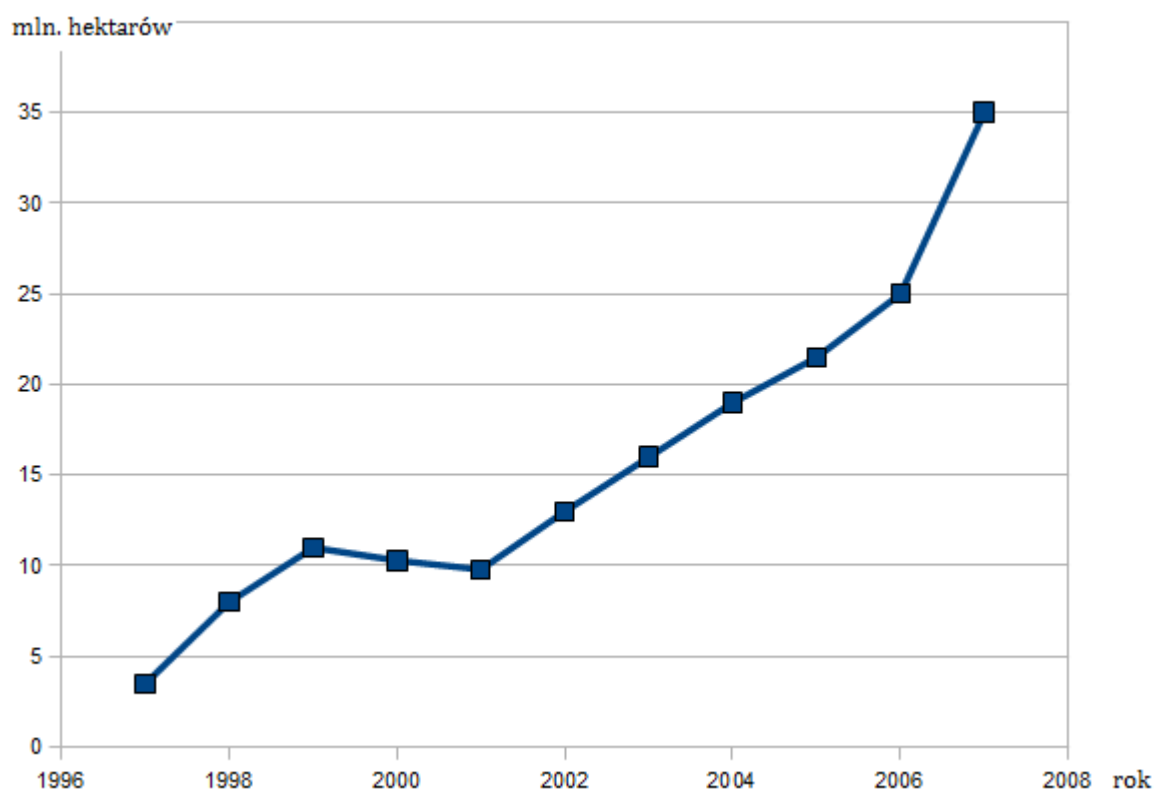
Główną metodą wykorzystywaną do identyfikacji kukurydzy MON 810 jest bardzo rozpowszechniona w biologii molekularnej technika PCR, ze szczególnym uwzględnieniem jej wariantu – Real Time PCR. Polega ona na amplifikacji specyficznego fragmentu genomu rośliny [najczęściej jest to sekwencja bądź fragment sekwencji kodującej białko Cry1A(b)] wybranego przy pomocy par starterów. Jeżeli wybrana sekwencja występuje w badanym materiale następuje jej powielenie, natomiast jeśli jest nieobecna – nie uzyskujemy produktu reakcji. Uzyskaną mieszaninę rozdziela się elektroforetycznie w obecności markera mas i odczytuje wynik na podstawie obecności prążka o odpowiedniej masie. Istnieje wiele protokołów ze szczegółowym opisem warunków reakcji, w tym także te, udostępnione przez Monsanto ^(51,52,53).

Innymi wykorzystywanymi technikami identyfikacji są metody immunoenzymatyczne. Ich zasada opiera się na połączeniu szukanego białka z selektywnym przeciwciałem i następującej po nim reakcji barwnej. Możemy tu wyróżnić testy na mikropłytkach z dołkami, na których opłaszczono są przeciwciała (ELISA), lub testy paskowe (bardzo podobne do popularnych testów ciążowych), gdzie przeciwciała są unieruchamiane na pasku nitrocelulozowym ^(54,55).

Warto zaznaczyć, że w związku ze wspomnianym limitem procentowym obecności GMO w żywności tradycyjnej od którego wedle prawodawstwa Unii Europejskiej konieczne jest jej odpowiednie znakowanie wynosi 0,9%. W związku z tym analizy laboratoryjne muszą charakteryzować się znaczną czułością, dającą wyniki poniżej tej wartości.

6. Stan upraw

Od czasu rejestracji MON 810 w 1995 roku, wielkość upraw tej odmiany na świecie ulegała nieustannie powiększeniu. Początkowo hodowla prowadzona była jedynie na terenie Stanów Zjednoczonych następnie, wraz z legalizacją, rozszerzona została na inne kraje, w tym: Japonię (1996), Kanadę i RPA (1997), Argentynę (1998) oraz kraje Unii Europejskiej. Wśród nich pierwsza była Hiszpania (1998). Do tej pory Hiszpania pozostaje głównym europejskim producentem MON 810 z 79269 hektarami upraw w 2008 roku, co stanowiło około 25% produkowanej w Europie kukurydzy. Do innych krajów UE posiadających uprawy tej rośliny należą: Czechy, Rumunia, Słowacja, Portugalia oraz Polska. Grupa krajów w składzie: Austrii, Francji, Węgier, Luksemburgu, Grecji oraz od niedawna Niemiec (które wraz z Francją posiadały uprawy MON 810) wprowadziła zakaz na prowadzenie upraw MON 810 mimo że EFSA przy każdym zakazie podkreśla, iż nie ma naukowych uzasadnień ich wprowadzenia ^(56,57,58). W chwili obecnej największe obszary upraw transgenicznych kukurydzy występuje w Stanach Zjednoczonych, Argentynie oraz Kanadzie. Warto zaznaczyć, że w roku 2008 ponad 80% kukurydzy wyprodukowanej w tych krajach należało do odmian uzyskanych metodami inżynierii genetycznej ⁽⁵⁹⁾.



Wykres 1. Wzrost ilości upraw transgenicznej kukurydzy (w tym MON 810) na przestrzeni lat na świecie. Dane w mln. hektarów. Źródło: (59)

7. Regulacje prawne dotyczące MON 810

MON 810 jest jedyną rośliną transgeniczną, dopuszczoną do uprawy na terytorium UE. Polskie uregulowania (normy), prawne w zakresie żywności genetycznie modyfikowanej zawarte w dokumentach krajowych opierają się zarówno na własnych analizach jak i regulacjach przyjętych w Unii Europejskiej oraz w dokumentach międzynarodowych. Najistotniejszymi aktami prawa międzynarodowego w tym zakresie są: Konwencja z Rio de Janeiro ⁽¹⁾ oraz dołączony do niej w późniejszym okresie Protokół z Kartegeny ⁽⁶⁰⁾, na których to bazie było rozwijane prawodawstwo UE. Zapisy zawarte w tych dokumentach mają na celu zapewnienie ochrony środowiska przyrodniczego oraz określenie warunków bezpiecznego użycia organizmów transgenicznych.

Prawodawstwo Unijne precyzyjnie reguluje takie kwestie jak:

- szczegółowe badanie i analizy ryzyka związane z niekontrolowanym uwolnieniem do środowiska organizmów transgenicznych;
- odpowiednie oznakowanie produktów będących organizmami transgenicznymi, bądź zawierających elementy organizmów transgenicznych, lub produkty wyprodukowane lub uzyskane przy ich użyciu;
- monitorowanie organizmów transgenicznych po ich wprowadzeniu do użycia;
- obowiązek wypracowania przez kraje członkowskie zasad współistnienia upraw konwencjonalnych i transgenicznych.

Podstawowymi aktami prawnymi UE w tym zakresie są rozporządzenia 1829/2003/WE, 1830/2003/WE oraz 1946/2003/WE. W polskim prawodawstwie, w przedmiotowej sprawie najistotniejsze dokumenty to:

- Ustawa z dnia 22 czerwca 2001 r. o organizmach zmodyfikowanych genetycznie (Dz.U. 2001 r. nr 76, poz. 811 ze zmianami);
- dyrektywa 2001/18/WE z dnia 12 marca 2001 r. w sprawie zamierzonego uwalniania do środowiska organizmów zmodyfikowanych genetycznie i uchylenia dyrektywy 90/220/EWG (Dz.Urz. WE L 106 z 17.04.2001);
- Ustawa z dnia 11 maja 2001 r. o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia (Dz.U. 2001 r. nr 63, poz. 634 ze zmianami);
- dyrektywa 98/81/WE z dnia 26 października 1998 r. zmieniająca dyrektywę 90/219/EWG w sprawie ograniczonego stosowania mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie (Dz.Urz. WE L 330 z 05.12.1998)

18 listopada 2008 Rada Ministrów RP przyjęła nową wersję dokumentu (pierwotnie zaakceptowanego 3 kwietnia 2006 roku), w którym określiła ramowe stanowisko względem organizmów zmodyfikowanych genetycznie. Jego najważniejsze punkty to:

- poparcie prowadzenia prac zamkniętych nad organizmami transgenicznymi zgodnie z obowiązującym w tym zakresie prawem;
- dążenie do stworzenia z Polski kraju wolnego od GMO, przy przestrzeganiu przepisów Unii w kwestii uwalniania tych organizmów do środowiska w celach doświadczalnych;
- dążenie do niewprowadzania na terenie UE nowych odmian GMO jako żywność, pasze, lub inne produkty.

Ponadto Rada Ministrów dopuszcza możliwość importu żywności wyprodukowanej ze zmodyfikowanych organizmów, także spoza UE, jednak pod warunkiem jej znakowania i braku dalszej obróbki. Urząd Rady Ministrów jest przeciwny produktom paszowym uzyskanym z udziałem tychże organizmów. W chwili obecnej możliwa jest więc legalna uprawa MON 810 na terytorium Polski z przeznaczeniem na cele paszowe, po rejestracji, jednak zabroniony jest na terenie kraju handel nasionami roślin transgenicznych ⁽⁶¹⁾.

8. Aspekty społeczne i ekonomiczne

Jakkolwiek użycie produktów inżynierii genetycznej w przemyśle, medycynie bądź farmacji nie budzi sprzeciwu, tak wprowadzenie ich do żywności wywołuje liczne kontrowersje. Inżynieria genetyczna jest nową, zaawansowaną dziedziną nauki, o której wiedza nie jest powszechnie dostępna ⁽⁶²⁾. TNS, OBOP, PBS, DGA oraz Eurobarometr przeprowadziły w latach 1999, 2000, 2003, 2005, 2006 oraz 2008 ankiety na temat żywności genetycznie modyfikowanej wśród konsumentów na terytorium Polskich ⁽⁶³⁾. Z badań tych wynikało, że ponad 75% Polaków słyszało o organizmach genetycznie zmodyfikowanych, lecz 58% z nich w ogóle nie interesuje ta kwestia, 24% społeczeństwa deklaruje zupełną nieznajomość zagadnienia. Należy zaznaczyć, iż głównym źródłem informacji dla mieszkańców Polski jest telewizja (84%), prasa codzienna (32%) oraz radio (24%). Można więc łatwo zauważyć, że informacje są czerpane ze źródeł masowych, które nie zawsze są w pełni kompetentne w kwestii zaawansowanych naukowo zagadnień. Społeczeństwa nie przekonują też argumenty środowisk naukowych. Główne obawy dotyczą potencjalnego, szkodliwego wpływu na zdrowie człowieka oraz środowisko naturalne ⁽⁵¹⁾. W raporcie PBS DGA wykonanym dla Gazety Wyborczej na pytanie: „Czy w Polsce uprawa roślin modyfikowanych genetycznie powinna być dozwolona, czy też zakazana?” 26% respondentów

uznało, że powinna być „zdecydowanie zakazana”, 29% że „raczej zakazana”, 24% że „raczej dozwolona” 6% że „zdecydowanie dozwolona”, natomiast 16% nie miało zdania ⁽⁶⁴⁾. Interesujące jest zjawisko nagłaśniania i akceptowania doniesień związanych z potencjalną szkodliwością organizmów transgenicznych, natomiast ignorowanie informacji je dementujących i świadczących o bezpieczeństwie. Jako przykład może służyć głośna kwestia motyla Monarch. Wykonano badania które zasugerowały szkodliwość pyłku kukurydzy z białkiem Bt na larwy motyla Monarch. Mimo wielokrotnie powtórzonych badań obalających tę tezę ^(65, 66) do tej pory argument szkodliwości jest przedstawiany jako jeden z głównych argumentów przeciwko MON 810, przez przeciwników modyfikacji genetycznej, co świadczy, że ich głównym celem jest negowanie badań, bez względu na wyniki. Przeciwnicy ci, w tym szczególnie koalicja „Polska Wolna od GMO”, w skład której wchodzi między innymi Greenpeace organizują liczne szkolenia oraz realizują inne przedsięwzięcia zachęcające społeczeństwo do popierania ich stanowiska (np. marsze 14 grudnia 2009, tuż przed rozpoczęciem debaty sejmowej nad nową ustawą o organizmach genetycznie zmodyfikowanych), posuwając się kontrowersyjnym akcją (happening na prywatnym polu kukurydzy, akcja protestacyjna na dachu Ministerstwa Rolnictwa). Zdarzenia takie są bardzo medialne, a biorąc pod uwagę przytoczone wcześniej dane na temat źródeł i poziomu wiedzy konsumentów są one dla przeciętnego mieszkańca dodatkowym, czasami głównym źródłem dezinformacji. Tymczasem wyniki badań i doniesienia naukowe, jak na przykład opisane w tej pracy badania bezpieczeństwa nie są zauważane na dostatecznym poziomie, czasami ignorowane lub nie przyjmowane do analiz. Niejednokrotnie, kompetentne w dziedzinie badań naukowych instytucje takie jak: EFSA (European Food Science Authority), USDA (United States Department of Agriculture) podkreślały, że nie istnieją żadne, wiarygodne dane przemawiające za szkodliwością MON 810 i nie ma przeciwwskazań do jej uprawy i spożycia. Faktem bezspornym jest, że kukurydza ta jest uprawiana w Stanach Zjednoczonych od roku 1996 – i nigdy nie wykazano jej szkodliwości dla innych roślin, zwierząt czy ludzi. Pojawiają się pytania, czy kontrowersje wokół żywności genetycznie modyfikowanej są natury naukowej czy też politycznej ⁽⁶⁷⁾. W sytuacji Polski należy spojrzeć na kwestie uprawy MON 810 również z ekonomicznego punktu widzenia. Polskie rolnictwo nie jest w żaden sposób konkurencyjne względem zachodnioeuropejskiego czy amerykańskiego. Uprawy transgeniczne są w stanie znacznie polepszyć jego sytuację przez zwiększenie plonów i redukcję używanych pestycydów (co miałyby bardzo pozytywne oddziaływanie na środowisko). W 2006 roku, na zlecenie Polskiej Federacji Biotechnologii, wykonane zostały badania ankietowe na temat roślin transgenicznych wśród polskich rolników. Prawie 83% z nich deklarowało znajomość zagadnienia, przy czym w regionie występowania Omacnicy prosowianki liczba ta sięgała 90%. Aż

85% badanych uważało, że powinno się mieć możliwość wyboru pomiędzy uprawą tradycyjną a transgeniczną. Ponad 42% badanych chciałoby mieć możliwość kupna nasion w kraju, a 55% uważa, że ich gospodarstwo mogłoby być z ich użyciem bardziej opłacalne. W regionie występowania szkodnika owadziego 69% rolników wysiałoby MON 810 na swoich polach, w roku 2007 liczba ta wyniosła 70% (51). W świetle powyższego nasuwa się wniosek, iż jesteśmy świadkami niezrozumiałej sytuacji prawno-społecznej. Rolnik ma co prawda prawo wysiać kukurydzę transgeniczną na swoim polu, jeśli zarejestruje ją i zużyje na cele paszowe, nie może on jednak w świetle obowiązujących przepisów legalnie kupić nasion w kraju. Zmuszony jest zatem przywozić nasiona z innych rejonów Unii Europejskiej, co generuje dodatkowe wydatki (nie tylko zakupu ale i transportu, straty czasu), i czyni wysiłki naszego rolnika mało konkurencyjnymi, co w efekcie końcowym generuje straty dla kraju. Jednocześnie Rada Ministrów dąży do całkowitego zakazu upraw roślin zmienionych genetycznie, przy utrzymaniu pozwolenia na ich import z innych krajów. Taka polityka skazuje zatem naszą gospodarkę na kolejne straty. Kupno żywności przy uniemożliwieniu produkcji wewnątrz Polski nie sprzyja utrzymaniu dobrych wskaźników w relacji import-eksport. Ponadto co wykazano we wstępie i co warte jest przypomnienia, straty spowodowane przez Omacnicę prosowiankę w uprawie kukurydzy wynoszą ok. 300 mln. złotych rocznie.

9. Podsumowanie

Pozyskana została, potwierdzona wielokrotnymi, niezależnymi badaniami szczegółowa wiedza na temat procesu modyfikacji kukurydzy MON 810, wraz ze szczegółową analizą bezpieczeństwa jej uprawy i wykorzystania do różnych celów. Wszystkie z wykonanych procesów i technik są dobrze znane i naukowo wytłumaczalne. Istnieje ogromna ilość danych wynikających z badań na temat transgenezy, produkowanego białka oraz upraw. Wszystkie te czynniki, oraz przytoczone wcześniej w pracy dane na temat braku szkodliwości kukurydzy modyfikowanej genetycznie dla ludzi i zwierząt przemawiają za potrzebą intensyfikacji jej produkcji. Byłoby to korzystne dla rolnictwa i gospodarki naszego kraju i niewątpliwie przynosiło by znaczne zyski, pozwalając nie tylko zmniejszyć import, ale też stać się potencjalnym eksporterem. Tak się jednak nie dzieje, czego głównych powodów tego jest kilka, co zostało wcześniej opisane. Nie ulega jednak wątpliwości, że badań i rozwoju i w tej dziedzinie nie da się zahamować. Podobnie jak trudno sobie dzisiaj wyobrazić funkcjonowanie rozwiniętego społeczeństwa bez systemu kompleksowych usług komputerowych, czy coraz nowocześniejszego systemu transportu tak i w systemie żywienia

populacji ludzkiej muszą nastąpić radykalne zmiany. Zostały one zapoczątkowane, co pokazano w pracy, możliwością produkcji i wykorzystania modyfikowanej genetycznie, bezpiecznej dla środowiska, zwierząt i ludzi kukurydzy MON 810. Podobne zmiany, zdaniem autora, następować będą dalej, w coraz szerszym zakresie w zależności od potrzeb społeczeństwa, przy jego rosnącym przyzwoleniu. Bez wątpienia wymaga to jednak dużo pracy naukowej i co najważniejsze prowadzenia świadomej, opartej na wynikach badań naukowych, konsekwentnej polityki informacyjnej. Według prognoz WHO populacja ludzka osiągnie w roku 2050 poziom 9 miliardów. Spowoduje to wzrost zapotrzebowania na żywność o 2 do 3 razy, bez zwiększenia powierzchni upraw. Już dzisiaj 800 milionów ludzi na świecie cierpi z powodu głodu, a 40 tysięcy z nich umiera codziennie ⁽⁶⁷⁾. Rośliny transgeniczne, takie jak MON 810 mogą stanowić odpowiedź na problemy rosnącego głodu jeśli ich zagadnienie zostanie rozpatrzone z wyważonym podejściem.

10. Bibliografia

1. Convention on Biological Diversity (with annexes). Concluded at Rio De Janeiro on 5 June 1992. United Nations Treaty.
2. Brown T.A. 2009. *Genomy*. Wydawnictwo Naukowe PWN.
3. Monsanto. 2002. Safety assessment of Yield Gard insect-protected event MON810. Published by agbios.com as Product Safety Description. <http://agbios.com/docroot/decdocs/02-269-010.pdf>
4. Dane FAOSTAT, FAO Data. <http://data.un.org/Data.aspx?q=World&d=FAO&f=itemCode%3A56%3BcountryCode%3A5001>
5. Yunbi X., Skinner D.J., Wu H., Palacios-Rojas N., Araus J.L, Jianbing Y., Shibin G., Warburton M.L., Crouch J.H. 2009. *Advances in Maize Genomics and Their Value for Enhancing Genetic Gains from Breeding*. International Journal of Plant Genomics Volume, Article ID 957602
6. Schnable P.S. i inni. (2009) *The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics*. *Science* 326, 1112 - 1115
7. GMO – Compass: Information on genetically modified organisms. www.gmo-compass.org
8. Organisation for Economic Co – operation and Development. *Consensus Document on Compositional Considerations For New Varieties Of Maize (Zea Mays): Key Food and Feed Nutrients, Anti – Nutrients, and Secondary Plant Metabolites*. 20 Aug 2002.
9. Bereś P.K. (2007) *Szkodliwość Omacnicy Proszowianki (Ostrinia Nubilalis hbn.) dla kukurydzy uprawianej w zmianowaniu i monokulturze*. *Progress in Plant Protection / Postępy w Ochronie Roślin*, 47 (1) 184 – 187.
10. Bereś. P.K. (2007) *Odmiany kukurydzy GM z genami Bacillus Thuringensis i ich wpływ na Omacnicę Proszowiankę (Ostrinia Nubilalis hbn.) w świetle badań prowadzonych w Polsce*. *Kosmos*, Tom 56 Numer 3–4 (276–277) Strony 293–300
11. Bravo A, Gill SS, Soberón M. *Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control*. *Toxicon*. 2007 Mar 15;49(4):423-35. Epub 2006 Nov 30.
12. Fischhoff i inni. (1987) *Biotechnology* 5: 807-813.
13. Shimada, N., Miyamoto, K., Kanda, K., Murata, H., 2006. *Bacillus thuringiensis insecticidal CryIAb toxin does not affect the membrane integrity of the mammalian intestinal epithelial cells: an in vitro study*. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Animal*, 42: 45-49.

14. Perlak, F.J., Fuchs, R.L., Dean, D.A., McPherson, S.L., Fischhoff, D.A. (1991). *Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 3324-3328
15. Rout, J. R.; Hironaka, C. M.; Conner, T. W.; DeBoer, D. L.; Duncan, D. R.; Fromm, M. E.; Armstrong, C. L. *Agrobacterium-mediated stable genetic transformation of suspension cells of corn (Zea mays L.)*. 38th Annual Maize Genetics Conf., St. Charles, IL, March 14–17, 1996
16. EFSA Scientific Opinion. Applications (EFSA-GMO-RX-MON810) for renewal of authorisation for the continued marketing of (1) existing food and food ingredients produced from genetically modified insect resistant maize MON810; (2) feed consisting of and/or containing maize MON810, including the use of seed for cultivation; and of (3) food and feed additives, and feed materials produced from maize MON810, all under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. Scientific Opinion of the Panel on Genetically Modified Organisms (Question No EFSA-Q-2007-150, EFSA-Q-2007-153, EFSA-Q-2007-164) Adopted on 15 June 2009.
17. US Food and Drug Administration. Memorandum to file concerning insect-protected maize lines MON810, 809. September 18, 1996.
18. Jankiewicz L.S. (red.) 1997. *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin, Tom 1. Właściwości i działanie*, PWN, Warszawa.
19. U.S.Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. *Monsanto Co. Petition for Determination of Non-regulated Status of Additional Yieldgard Corn Lines MON 809 and 810*. Federal Register, Vol. 61 no. 52. Friday, March 15, 1996.
20. Agbios. www.agbios.com. MON 810 molecular characterization of the inserted DNA. <http://www.agbios.com/cstudies.php?book=ESA&ev=MON810&chapter=Molecular&lang=>
21. Kania, J., Keck, P.J. , Levine, E. & Sanders, P.R. (1995). Molecular analysis of insect-protected corn line MON 810. Report Number MSL-14382, an unpublished technical report by Monsanto Company.
22. Aguilera, M., Querci, M., Balla, B., Prospero, A., Ermolli, M., Van den Eede, G. *A Qualitative Approach for the Assessment of the Genetic Stability of the MON 810 Trait in Commercial Seed Maize Varieties*. Food Anal. Methods (2008) 1:252–258.
23. Nguyen, H. T. & J. A. Jehle 2007. *Quantitative analysis of the seasonal and tissue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize MON810*. Journal of Plant Diseases and Protection 114(2): 820-87.

24. Lorch, A., Then, C. (2007) *How much Bt toxin do GM MON810 maize plants actually produce?* Greenpeace-Report. www.greenpeace.de/fileadmin/gpd/user_upload/themen/gentechnik/greenpeace_bt_maize_engl.pdf.
25. Greenpeace (2007) *Wieviel Gift ist im Gen-Mais, wie wirkt es und wie wird es gemessen?* www.greenpeace.de/fileadmin/gpd/user_upload/themen/gentechnik/Untersuchungen_zum_Giftgehalt_in_Genmais__Nov._2007_.pdf
26. Abel, C. A., Adamczyk, J. J. (2004) *Expression of CryIA in maize leaves and cotton bolls with diverse chlorophyll content and corresponding larval development of fall armyworm (Lepidoptera: Noctulidae) and southwestern corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on maize whorle leaf profiles.* Journal of Economic Entomology 97: 1737-1744.
27. Bruns, H. A., Abel, C. A. (2007) *Effects of nitrogen fertility on Bt endotoxin levels in maize.* Journal of Entomological Science, 42: 35-43.
28. Griffiths, B. S., Caul, S., Thompson, J., Birch, A. N., Scrimgeour, C., Cortet, J., Foggo, A., Hackett, C. A., Krogh, P. H. (2006) *Soil microbial and faunal community responses to Bt maize and insecticide in two soils.* Journal of Environmental Quality, 35: 734-741.
29. biosicherheit.de (2007) *The variations are within a biologically explainable range.* www.gmo-safety.eu/en/news/568.docu.html.
30. ORAMA France, (2006): *GM Maize in the Field: Conclusive Results* www.agpm.com/en/iso_album/technical_results_btmaize_2006.pdf
31. Lee, T.C., Bailey, M.R., Sims, S.R., Zeng, J., Smith, C.E., Shariff, A., Holden, L.R. & Sanders, P.R. (1995). *Assessment of the equivalence of the Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-1 protein produced in Escherichia coli and European corn borer resistant corn.* Monsanto Technical Report MSL-13864, St. Louis. Study Number 94-01-39-09.
32. Naylor, M. (1992). *Acute Oral Toxicity Study of Btk HD-1 Tryptic Core Protein in Albino Mice.* Study Number 92069, an unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MRID no. 43468001.
33. Astwood, J. (1995). *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-1 insecticidal protein (B.t.k.HD-1 protein) is homologous to proteins of Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein gene family, but not to protein toxins found in public domain sequence databases.* Report Number MSL-14283, an unpublished technical report by Monsanto Company.
34. Ream, J.E. (1994). *Assessment of the In Vitro Digestive Fate of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-1 Protein.* Study Number 93-01-39-04, an unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MRID no. 43439201.

35. FAO/WHO (2001). *Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology.* 22-25 January 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
36. Hefle, S. L., Nordlee, J. A. & Taylor, S. L. (1996): *Allergenic foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36, S69-S89.
37. Ream, J. E., Sims, S.R. & Leach, J.N. (1994). *Aerobic soil degradation of Bacillus thuringiensis var. kurstaki HD-73 protein bioactivity.* Monsanto Technical Report, St. Louis, MSL-13267. EPA MRID # 43145215.
38. Dubelman, S., Ayden, B., Bader, B., Brown, C., Jiang, C. and Vlachos, D. (2005). *CryIAb protein does not persist in soil after 3 years of sustained Bt corn use. Environmental Entomology* 34(4): 915-921
39. C. Papst, H. F. Utz, A. E. Melchinger, J. Eder, T. Magg, D. Klein, and M. Bohn (2005). *Mycotoxins Produced by Fusarium spp. in Isogenic Bt vs. non-Bt Maize Hybrids. under European Corn Borer Pressure.* Agron. J. 97:219-224
40. F. Wu. (2006). *Mycotoxin reduction in Bt corn : potential economic, health, and regulatory impacts.* Transgenic Research vol. 15, no3, pp. 277-289
41. Husken, A., Ammann, K., Messeguer, J., Papa, R., Robson, P., Schiemann, J., Squire, G., Stamp, P., Sweet, J., Wilhelm, R. (2007) *A major European synthesis of data on pollen and seed-mediated gene flow in maize in the SIGMEA project.* In Third International Conference on Coexistence between Genetically Modified (GM) and non-GM based Agricultural Supply Chains, Vol. Book of Abstracts, pp 53-56. Seville (Spain)
42. Leprince-Benetrix F. 2008. *Mais Bt. Les premier resultats de l'observatoire 2007 de la coexistence.* Yvoir, 14 Janvier 2008.
43. Weber, W. E., T. Bringezu, I. Broer, J. Eder, F. Holz (2007). *Coexistence Between GM and Non-GM Maize Crops - Tested in 2004 at the Field Scale Level (Erprobungsanbau 2004).* Journal of Agronomy and Crop Science 193(2): 79-92.
44. Della Porta, G., D. Ederle, Bucchinic, R., Prandic, M., Verderio, A., Pozz, C. (2008). *Maize pollen mediated gene flow in the Po valley (Italy): Sourced recipient distance and effect of flowering time.* European Journal of Agronomy 28(3): 255-265.
45. Australia New Zealand Food Authority *Final Risk Analysis Report A346: Food produced from insect-protected corn line MON810*
46. Canadian Food Inspection Agency, Plant Biotechnology Office *Decision Document 97-19: Determination of the Safety of Monsanto Canada Inc.'s Yieldgard™ Insect Resistant Corn*

(*Zea mays* L.) Line MON810

47. Japanese Biosafety Clearing House, Ministry of Environment *Outline of the biological diversity risk assessment report: Type 1 use approval for MON810*
48. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio *Parecer Técnico nº 1.100/2007: Liberação comercial de milho geneticamente modificado MON810*
49. US Food and Drug Administration *Memorandum to file concerning insect-protected maize lines MON810, 809.*
50. EU Commission (1998) *Commission Decision 98/294/EC. and Community register of genetically modified food and feed: MON810.*
[ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/gm_register_auth.cfm?pr_id=11.](http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/gm_register_auth.cfm?pr_id=11)
51. Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences. *Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan PCR for YieldGard® Corn Borer Corn, MON 810*
52. Gašparič. M.B., Cankar. K., Žel, J., Gruden, K. *Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms.* BMC Biotechnol. 2008; 8: 26. Published online 2008 March 6. doi: 10.1186/1472-6750-8-26.
53. Huang H.Y., Pan. T.Z. *Detection of Genetically Modified Maize MON810 and NK603 by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction Methods.* J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 3264-3268.
54. Duliński R. *Metody identyfikacji genetycznie zmodyfikowanych organizmów w żywności.* Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2007, 4 (53), 5 – 16
55. Bonwick G.A., Smith C.J.: *Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology.* Int. J. Food Sci. Technol., 2004, **39**, 817-827
56. EFSA. *Request from the European Commission related to the safeguard clause invoked by Hungary on maize MON810 according to Article 23 of Directive 2001/18/EC1 Scientific Opinion of the Panel on Genetically Modified Organisms (Question No EFSA-Q-2008-316) Adopted on 2 July 2008* The EFSA Journal (2008) 756, 1-18
57. EFSA *Request from the European Commission related to the safeguard clause invoked by Greece on maize MON810 according to Article 23 of Directive 2001/18/EC1 Scientific Opinion of the Panel on Genetically Modified Organisms (Question No EFSA-Q-2008-313) Adopted on 3 July 2008* The EFSA Journal (2008) 757, 1-12
58. Gmo – Safety <http://www.gmo-safety.eu/en/news/611.docu.html>
59. GMO – Compass. <http://www.gmo->

compass.org/eng/agri_biotechnology/gmo_planting/341.genetically_modified_maize_global_area_under_cultivation.html

60. Protokół Kartageński o bezpieczeństwie biologicznym, Dz.U. 2004 nr 216 poz. 2201 (http://msp.money.pl/akty_prawne/dzienniki_ustaw/protokol;kartagenski;o;bezpieczenstwo;biologicznym,dziennik,ustaw,2004,216,2201.html dostęp 10. listopada 2009r.)
61. Stankiewicz D. *GMO – korzyści i zagrożenia*. Biuro Analiz Społecznych. Infos, nr 19 22 sierpnia 2007. ISSN 1896-6659
62. Lubiawska-Krysiak E., Twardowski T., 2008. *Agrobiotechnologia i przemysł rolnospożywczy: perspektywy i ograniczenia w świetle opinii publicznej*, Biotechnologia Monografie (4).
63. Lubiawska-Krysiak E., Twardowski T. *Ekonomiczne i społeczne aspekty biotechnologii w Unii Europejskiej i Polsce*. DrukTur Warszawa, 2009. ISBN 978-83-60197-83-7.
64. PBS DGA – ankieta na temat żywności modyfikowanej genetycznie.
<http://www.pbsdga.pl/x.php?x=627/GMO.html>
65. Stanley-Horn, D.E., G.P. Dively, R.L. Hellmich, H.R. Mattila, M.K. Sears, R. Rose, L.C.H. Jesse, J.E. Losey, J.J. Obrycki, L. Lewis. 2001. *Assessing the impact of Cry1Ab-expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies. Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 11931-11936.
66. Mark K. Sears, Richard L. Hellmich, Diane E. Stanley-Horn, Karen S. Oberhauser, John M. Pleasants, Heather R. Mattila, Blair D. Siegfried, Galen P. Dively. *Impact of Bt corn pollen on monarch butterfly populations: A risk assessment*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 2001 October 9; 98(21): 11937–11942. Published online 2001 September 14. doi: 10.1073/pnas.211329998.
67. Trewavas A. J., Leaver. C. J. *Is opposition to GM crops science or politics? An investigation into the arguments that GM crops pose a particular threat to the environment*. EMBO Rep. 2001 June 6; 2(6): 455–459. doi: 10.1093/embo-reports/kve123. PMID: PMC10839