

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

Przemysław Łukasz Kowalczewski
Nr albumu: 104315

Transgeniczna soja Roundup Ready[®]

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 rok 2010

Streszczenie

Przemysław Łukasz Kowalczewski Transgeniczna soja Roundup Ready®

Rozwój biologii molekularnej pozwolił modyfikować genomy roślin i zwierząt poprzez wprowadzanie sekwencji z innych organizmów, dzięki którym możliwe jest nadawanie nowych, korzystnych cech. W pracy została przedstawiona soja Roundup Ready® uzyskana na drodze transgenezy przez firmę Monsanto Company. Modyfikacja ta ma na celu nadać soi odporność na glifosat, składnik aktywny herbicydu Roundup®. Omówiono metodę użytą do transformacji, analizę skuteczności transgenezy oraz bezpieczeństwo alergologiczne i toksykologiczne. Uwagę zwrócono również na ważniejsze akty prawne regulujące wprowadzanie do upraw.

Słowa kluczowe

Soja transgeniczna, Roundup Ready, soja odporna na glifosat

Summary

Przemysław Łukasz Kowalczewski Transgenic soybeans Roundup Ready®

The development of molecular biology has allowed modifications of plant and animal genomes in order to obtain new beneficial features by introducing sequences from other organisms. The paper presents Roundup Ready® soybeans obtained through transgenesis by Monsanto Company. The modification is intended to make soybeans resistant to glyphosate, the active ingredient of the Roundup® herbicide. The method used for the transformation as well as the effectiveness and safety of transgenesis have been discussed. Also, allergenic and toxicological issues have been addressed. Furthermore, attention was paid to the main legal instruments governing placing the plant on the market.

Key words

Transgenic soybeans, Roundup Ready, glyphosate-tolerant soybean

Spis treści

1. Wstęp.....	4
1.1. Opis modyfikowanej rośliny	8
1.2. Opis składnika aktywnego herbicydu Roundup® (glifosat)	9
1.2.1. Charakterystyka substancji.....	9
1.2.2. Opis działania.....	10
1.2.3. Toksyczność dla zwierząt i ludzi.....	10
2. Modyfikacja genetyczna soi	11
2.1. Opis modyfikacji.....	11
2.2. Sposób otrzymywania soi Roundup Ready®	13
2.3. Analiza skuteczności wprowadzonej modyfikacji	16
2.3.1. Wyniki ilości wprowadzonych sekwencji CP4 EPSPS	16
2.3.2. P-E35S.....	16
2.3.3. NOS 3'	17
2.3.4. GUS.....	17
2.3.5. <i>nptII</i>	18
2.4. Ekspresja białka.....	18
2.5. Stabilność genetyczna	19
2.6. Analiza alergenicności	21
2.7. Analiza toksykologiczna	22
2.8. Transfer genów do organizmu konsumentów.	24
2.9. Identyfikowanie roślin transgenicznych.....	24
3. Regulacje prawne wprowadzania transgenicznych organizmów	25
4. Podsumowanie.....	29
5. Literatura	31

1. Wstęp

Organizmy genetycznie zmodyfikowane, czyli w skrócie GMO (z ang. *Genetically Modified Organism*) według art. 3 ustawy z dnia 22 czerwca 2001 roku o organizmach genetycznie zmodyfikowanych jest to „organizm inny niż ludzki, w którym materiał genetyczny został zmieniony w sposób nie zachodzący w warunkach naturalnych, wskutek krzyżowania lub naturalnej rekombinacji, w szczególności przy zastosowaniu:

- a) technik rekombinacji DNA z użyciem wektorów, w tym tworzenia materiału genetycznego poprzez włączenie do wirusa, plazmidu lub każdego innego wektora cząsteczek DNA wytworzonych poza organizmem i włączenie ich do organizmu biorcy, w którym w warunkach naturalnych nie występują, ale w którym są zdolne do ciągłego powielania,
- b) technik stosujących bezpośrednio włączenie materiału dziedzicznego przygotowanego poza organizmem, a w szczególności: mikroiniekcji, makroiniekcji i mikrokapsułkowania,
- c) metod niewystępujących w przyrodzie dla połączenia materiału genetycznego co najmniej dwóch różnych komórek, gdzie w wyniku zastosowanej procedury powstaje nowa komórka zdolna do przekazywania swego materiału genetycznego odmiennego od materiału wyjściowego komórkom potomnym” [Dz.U. 2001 nr 76 poz. 811].

Prace nad wykorzystaniem organizmów uzyskanych metodami inżynierii genetycznej w produkcji rolniczej zapoczątkowano na przełomie lat 80. i 90. ubiegłego wieku, kiedy to po raz pierwszy udało się otrzymać transgeniczny tytoń oraz petunię. Na rynek światowy w 1994r. wprowadzono transgenicznego pomidora FlavrSavr[®], który dzięki wprowadzeniu do jego genomu antysensowego genu hamującego produkcję enzymu poligalakturonazy, zachowywał dłużej świeżość, a także wykazywał większą odporność na działanie czynników zewnętrznych podczas transportu. Zaowocowało to coraz szybszym postępowaniem biotechnologii w zakresie transformacji roślin, a także zwierząt, które z założenia miały być wprowadzone na rynek jako żywność. Pod pojęciem żywność genetycznie zmodyfikowana (GMF, z ang. *Genetically Modified Foods*) należy rozumieć taką żywność, która zawiera organizmy GM lub została wyprodukowana z ich użyciem, tj.:

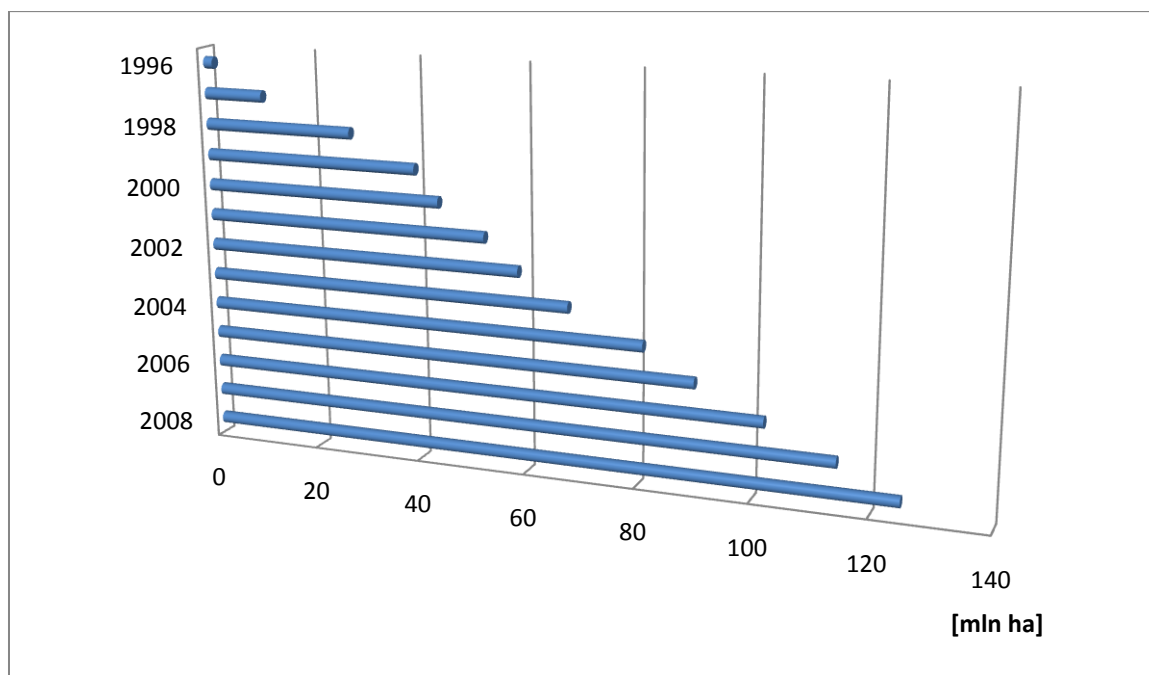
- żywność będącą roślinami uzyskanymi za pomocą inżynierii genetycznej (świeże owoce, warzywa i inne rośliny, np. pomidory, soja),
- żywność zawierającą przetworzone organizmy transgeniczne (koncentraty pomidorowe wyprodukowane z roślin transgenicznych),
- żywność produkowana z zastosowaniem GMO (np. piwo i inne produkty fermentacji alkoholowej produkowane z zastosowaniem drożdży transgenicznych),
- produkty żywnościowe pochodne GMO, które w swoim składzie nie zawierają komponentów GM (np. olej rzepakowy otrzymywany z rzepaku transgenicznego) [1829/2003/WE].

Żywność GM przed wprowadzeniem na rynek przechodzi bardzo szczegółowe badania bezpieczeństwa, zarówno żywieniowego, jak i zdrowotnego. Badania przeprowadzane przez naukowców oraz niezależne jednostki badawcze na całym świecie potwierdzają, że żywność ta, zgodnie z aktualną wiedzą naukową, jest tak bezpieczna, jak tradycyjna.

Modyfikacje genetyczne wprowadza się w celu poprawienia cech żywieniowych i sensorycznych żywności, obniżenia kosztów produkcji żywności. Wśród nich prym wiodą modyfikacje nadania odporności na herbicydy stosowane w rolnictwie, odporność na owady łuskoskrzydłe lub też odpornością na herbicydy i owady jednocześnie [James, 2008; Lubiatowska-Krysiak i Twardowski, 2008]. Rośliny transgeniczne mogą wykazywać również większą odporność na niekorzystne warunki środowiskowe, w tym: zasolenie, suszę lub mróz. Transgeniczne zwierzęta modyfikowane są pod kątem szybszego przyrostu masy, odporności na choroby lub produkcji specyficznych białek. Prace nad zwierzętami transgenicznymi zostały skomercjalizowane w zastosowaniach medycznych. W rolnictwie najczęściej wykorzystywane są modyfikacje nadające odporność roślinom na herbicydy i szkodniki, ale są dostępne również inne m.in. transgeniczny ryż „Golden rice” wzbogacony w prekursor witaminy A - β -karoten, czy też soja o zwiększonej zawartości białka i oleju.

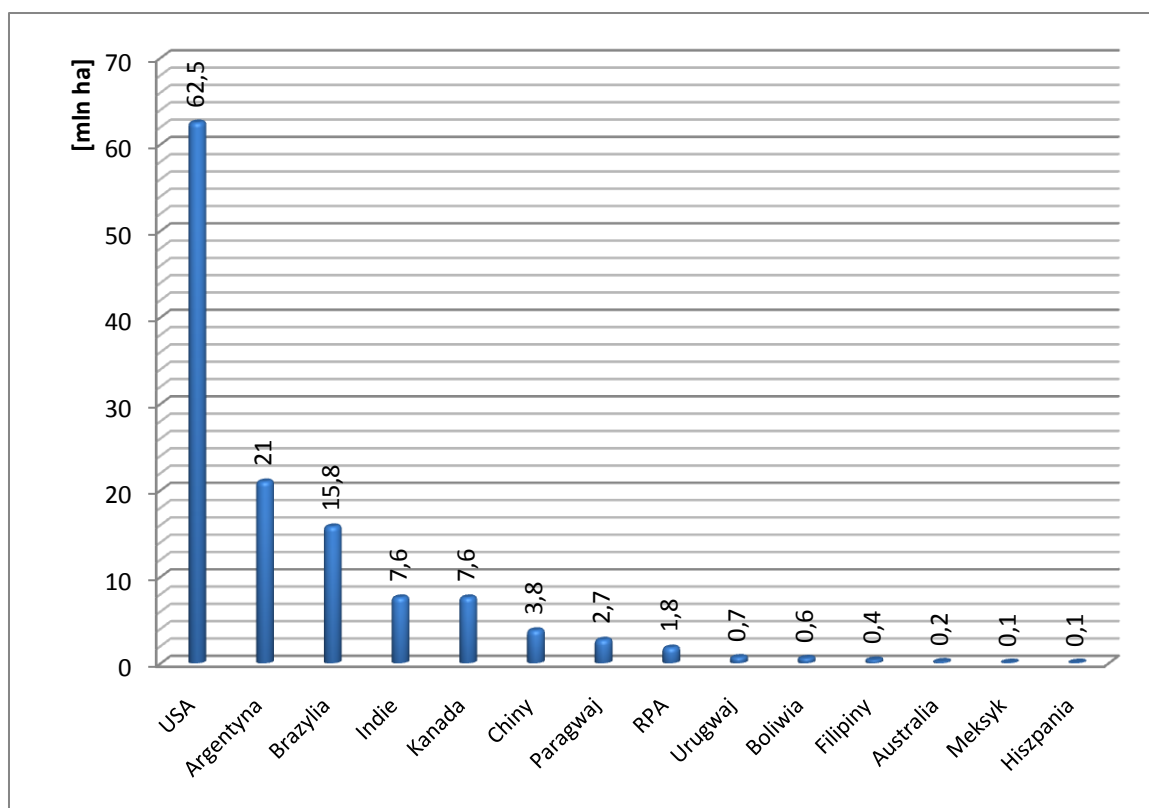
Płody rolne pochodzące z transgenicznych roślin wytwarzane są na całym świecie już od ponad dziesięciu lat, gdy to w roku 1994 kraje rozwinięte jako pierwsze wprowadziły do uprawy rośliny transgeniczne. Obszar upraw był wówczas jednak bardzo mały, jednak każdego roku obserwujemy wzrost arealów upraw od 10 do nawet 20%. W 2008 roku transgeniczne rośliny uprawiano w 25 krajach, których liczba wzrosła o 3. Wielkość upraw

wyniosła 125 mln hektarów, co daje wzrost o 10,7 mln w stosunku do roku 2007 [James, 2008].



Rys. 1 Wzrost areалу upraw biotechnologicznych w latach 1996-2008 [źródło: James, 2008].

Wśród czołowych producentów roślin GM są Stany Zjednoczone, Argentyna, Brazylia, Indie oraz Kanada. Coraz większy udział w światowej produkcji roślin GM obserwuje się również wśród krajów rozwijających się. Do najczęściej uprawianych roślin transgenicznych zaliczamy kukurydzę, bawełnę, rzepak, a także soję, która dominuje na świecie pod względem wielkości areалу upraw. Stanowi około 70% całości upraw roślin transgenicznych. W pozostałych państwach (nie wymienionych na rys. 2, tj. Chile, Kolumbia, Honduras, Burkina Faso, Czechy, Rumunia, Portugalia, Niemcy, Polska, Słowacja i Egipt) wielkość upraw nie przekracza 0,1 mln ha [James, 2008].



Rys. 2 Wielkość upraw transgenicznych w roku 2008 [źródło: James, 2008].

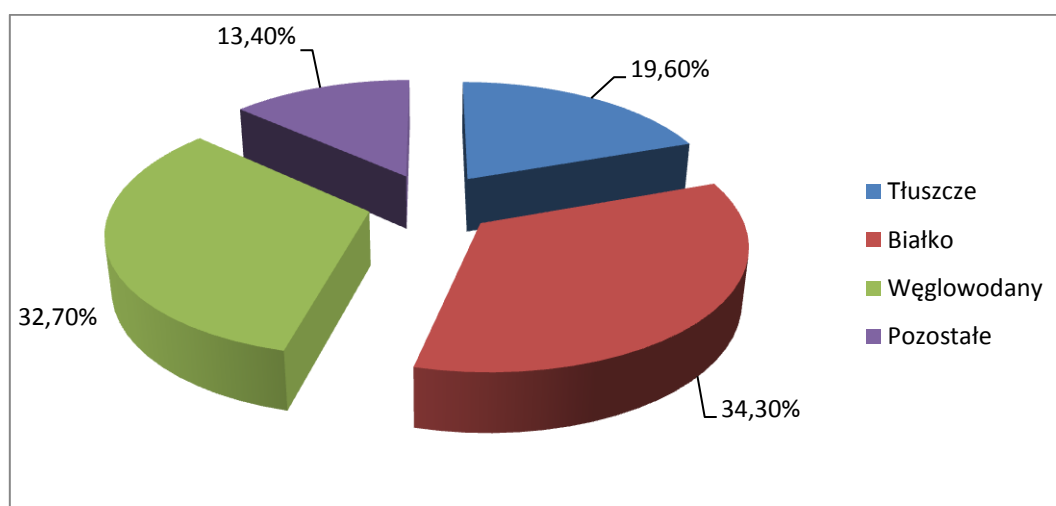
Aspekt ekonomiczny jest głównym czynnikiem w podejmowaniu przez rolników decyzji o uprawie roślin zmodyfikowanych genetycznie. Składają się na niego wzrost plonów w porównaniu z uprawą konwencjonalnych odmian roślin, a także zmniejszenie ilości używanych pestycydów. Możliwe staje się również prowadzenie uprawy zerowej, tzn. bezorkowej (ang. *no-tillage*), która wykazuje podwójnie korzystny wpływ: korzyści ekologiczna oraz ekonomiczne. Polega ona na przygotowaniu pola pod uprawę wykorzystując, zamiast tradycyjnej metody ornej, oprysk herbicydem. Dzięki eliminacji użycia pługa nie następuje odwracanie gleby, tworzenie się kolein oraz ogranicza to erozję gleby i jej wysuszenie, następuje natomiast akumulacja materiału organicznego w wierzchniej warstwie gleby, co powoduje poprawę jej właściwości chemicznych, fizycznych oraz biologicznych. Stosowanie tej metody upraw powoduje redukcję zużycia paliw do pojazdów rolniczych, co w konsekwencji przekłada się bezpośrednio na wzrost dochodów rolników uprawiających rośliny GM [Gómez-Barbero i in., 2008; Gianessi, 2005; Bleharczyk i Małecka, 2008; Lubiatońska-Krysiak i Twardowski, 2008]. W Polsce największe znaczenie ekonomiczne mogłyby odegrać uprawy transgenicznego rzepaku i buraka cukrowego odpornych na herbicyd, a także kukurydzy odpornej na szkodniki

owadzie oraz herbicyd. Zastosowanie uzyskanych przy pomocy inżynierii genetycznej roślin pozwoliłoby uzyskać większe plony dzięki lepszej efektywności zwalczania chwastów, zmniejszenia kosztów produkcji, a nawet polepszenia jakości produktu rolnego [Brookes i Anioła, 2005].

W pracy opisano soję odporną na glifosat. Jest to najpowszechniej występująca roślina GM wykorzystywana zarówno do celów paszowych jak i żywienia ludzi. Transgeniczna soja uodporniona na działanie glifosatu uznana jest za bezpieczną i przeznaczoną do spożycia nie tylko w USA, ale również w wielu innych krajach oraz na terenie Unii Europejskiej.

1.1. Opis modyfikowanej rośliny

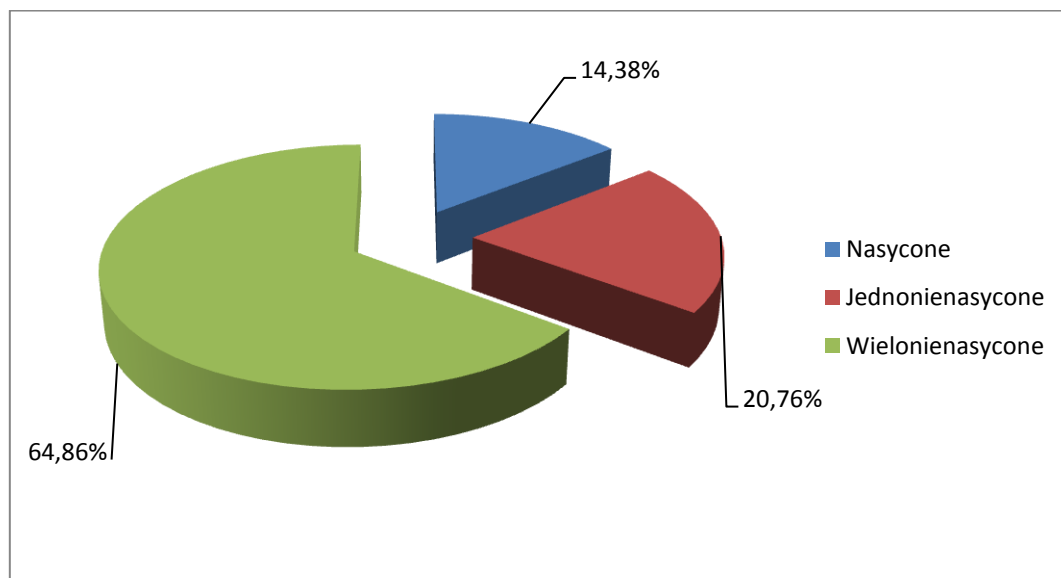
Soja (*Glycine max* L.) jest rośliną jednoroczną z rodziny bobowatych (*Fabaceae Lindl.*), pochodzącą z południowo-wschodniej Azji. Uprawiana jest w około 80 krajach na całym świecie, w Polsce jednak jest mało powszechna. Roczne zbiory przekraczają 160 mln ton, a głównymi producentami są Stany Zjednoczone, Brazylia, Chiny, Argentyna, Indie, Kanada i Paragwaj. Wykorzystywaną częścią rośliny są nasiona, które zawierają duże ilości białka i tłuszczu, są zatem dobrym surowcem do produkcji pasz dla zwierząt oraz żywności dla ludzi. Z nasion soi wytwarzane są m.in.: oleje sojowe, mączki, kasze, mleczko sojowe, tofu, tempeh i wiele innych, w tym substytuty wyrobów mięsnych dla wegetarian.



Rys. 3 Zawartość składników odżywczych w nasionach soi. Opracowanie własne na podstawie [Kunachowicz i in., 2009]

Soja jest ważnym, o ile nie najważniejszym na świecie, surowcem tłuszczowym. W swoich ziarnach zawiera około 20% tłuszczu, z którego produkuje się nie tylko oleje

i margaryny, ale także smary, mydło czy farbę. Ponad 50% stanowią kwasy wielonienasycone, szczególnie cenne w prawidłowej diecie człowieka, w tym również wiele niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT) wykorzystywanych do wytwarzania związków niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu.



Rys. 4 Skład frakcji tłuszczowych ziaren soi. Opracowanie własne na podstawie [Kunachowicz i in., 2009]

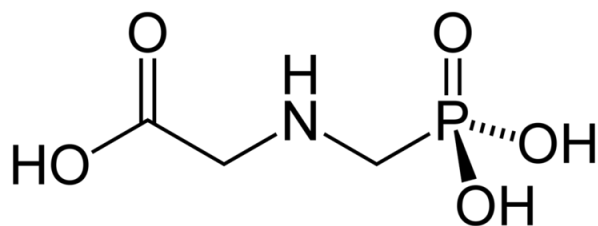
Ziarna soi w porównaniu z innymi roślinami wykazują bardzo dużą zawartość białka, sięgającą nawet powyżej 40%, o składzie aminokwasowym szczególnie korzystnym w żywieniu ludzi. Niestety powszechna jest również alergia na białka soi [Lisowski, 1996].

1.2. Opis składnika aktywnego herbicydu Roundup® (glifosat)

Glifosat jest jednym z najczęściej stosowanych herbicydów w Stanach Zjednoczonych, jest również bardzo popularny w innych rejonach świata. Opatentowany został w roku 1970 przez firmę Monsanto Company i sprzedawany jest pod nazwą handlową Roundup®.

1.2.1. Charakterystyka substancji

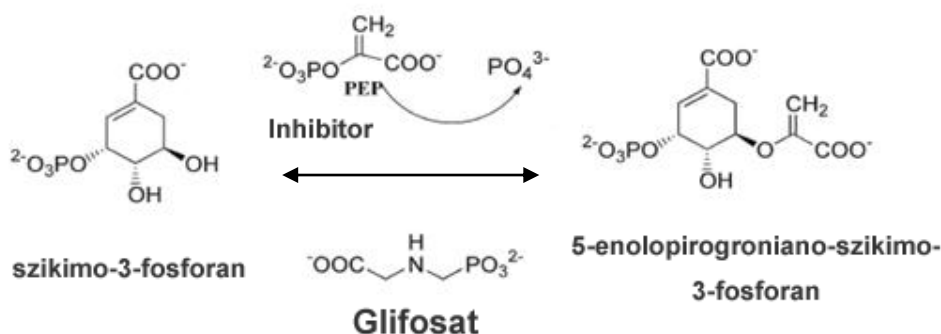
Glifosat ($C_3H_8NO_5P$) - związek chemiczny z grupy aminofosfonianów, jest białym, krystalicznym proszkiem rozpuszczalnym w wodzie na poziomie 1,01g/100 ml w temperaturze 20°C. Cząsteczki glifosatu często występują w formie jonów obojętnych [Glyphosate, 1994].



Rys. 5 Struktura cząsteczki glifosatu.

1.2.2. Opis działania

Glifosat przeznaczony jest do zwalczania chwastów. Stosowany jest w formie oprysków, gdyż rośliny mogą wchłaniać go przez liście. Ma za zadanie zahamować szlak metaboliczny kwasu szikimowego, w wyniku którego u roślin, grzybów i bakterii powstają aminokwasy aromatyczne (takie jak tryptofan, tyrozyna i fenyloalanina) oraz ligniny. Dzieje się to poprzez hamowanie transferu grupy enolopirogronianowej z fosfoenolopirogronianu (PEP) na grupę 5-hydroksylową z 3-fosforanu kwasu szikimowego (S3P) w wyniku czego powstaje 5-enolopirogroniano-szikimo-3-fosforan (EPSPS), a także wolna grupa fosforanowa [Reis, 2006].



Rys. 6 Reakcja powstawania 5-enolopirogroniano-szikimo-3-fosforanu

Rośliny podczas traktowania ich glifosatem nie są zdolne do wytwarzania aminokwasów aromatycznych, które są niezbędne do ich prawidłowego wzrostu. Rośliny transgeniczne z odporną na glifosat syntazą EPSPS wykazują prawidłowy wzrost nawet w czasie stosowania oprysków z herbicydem, co umożliwia selektywne usuwanie zbędnych roślin (chwastów) z upraw.

1.2.3. Toksyczność dla zwierząt i ludzi

Badania toksykologiczne sugerują, że glifosat w postaci czystej jest mało toksyczny. Zwierzęta, w tym również ludzie, nie syntetyzują aminokwasów aromatycznych i muszą

przyjmować je z pożywieniem (aminokwasy egzogenne). Podczas kontaktu zwierząt z substancją aktywną herbicydu nie wykazano istotnego wpływu toksycznego ani kancerogennego dla ich organizmów [De Roos, 2005; Mensink i Janssen, 1994]. Glifosat nie jest zbyt dobrze wchłaniany w przewodzie pokarmowym. Nie wykazuje również zdolności kumulowania się w tkankach zwierzęcych [Exttoxnet Pip – Glyphosate].

Preparaty handlowe charakteryzują się bardzo złożonym składem chemicznym. Stosowane środki pomocnicze, zwłaszcza z grupy środków powierzchniowo czynnych (np. POEA), wykazują działanie synergistyczne, czyli nasilające działania toksyczne glifosatu [Bradberry i in., 2004].

2. Modyfikacja genetyczna soi

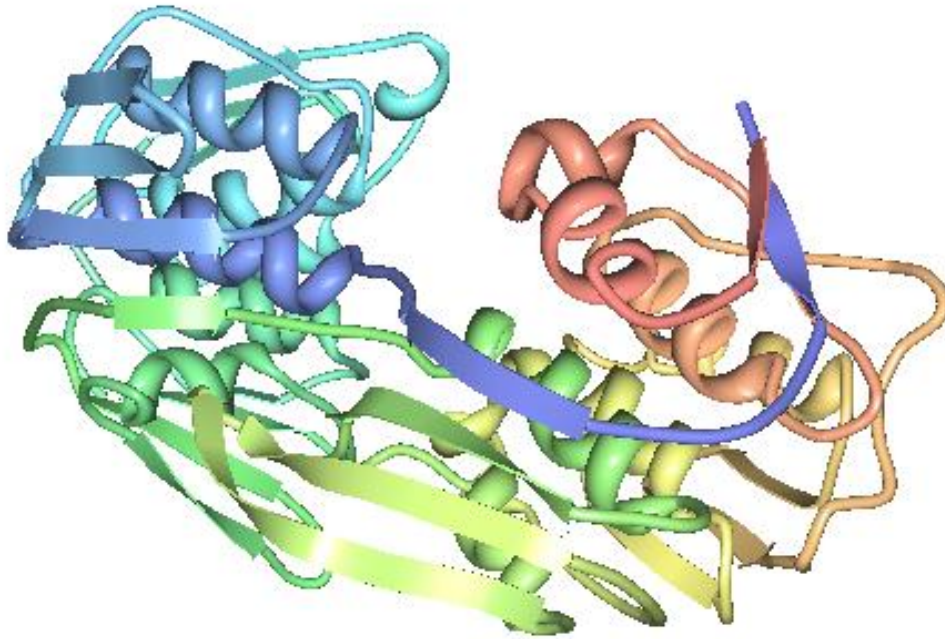
2.1. Opis modyfikacji

Soja Roundup Ready[®] została stworzona w celu umożliwienia sterowania rozwojem chwastów poprzez stosowanie herbicydu zawierającego składnik aktywny glifosat. Za pomocą inżynierii genetycznej do soi linii A5403 wprowadzono gen kodujący syntazę EPSPS (syntaza 5-enolopirogroniano-szikimowo-3-fosforanowa) odporną na glifosat – składnik aktywny herbicydu, dzięki czemu podczas traktowania roślin preparatem Roundup[®] zmodyfikowana soja rozwija się prawidłowo, a niezmodyfikowane rośliny usychają. Gen kodujący odporną na glifosat syntazę EPSPS wyizolowany został z bakterii *Agrobacterium tumefaciens* CP4.

Syntaza CP4 EPSPS składa się z 455 aminokwasów i ma masę 47,6kD. Sekwencja aminokwasów kodowana przez gen z *A. tumefaciens* wygląda następująco:

1	MSHGASSRPA	TARKSSGLSG	TVRIPGDKSI	SHRSFMFGGL	ASGETRITGL
51	LEGEDVINTG	KAMQAMGART	RKEGDTWIID	GVGNGLLAP	EAPLDFGNAA
101	TGCRLTMGLV	GVYDFDSTFI	GDASLTKRPM	GRVLNPLREM	GVQVKSEDDG
151	RLPVTLRGPK	TPTPITYRVP	MASAQVKS AV	LLAGLNTPGI	TTVIEPIMTR
201	DHTEKMLQGF	GANLTVETDA	DGVRTIRLEG	RGKLTGQVID	VPGDPSSTAF
251	PLVAALLVPG	SDVTILNVLM	NPTRTGLILT	LQEMGADIEV	INPRLAGGED
301	VADLRVRSST	LKGVTVPEDR	APSMIDEYPI	LAVAAAF AEG	ATVMNGLEEL
351	RVKESDRLSA	VANGLKLVGV	DCDEGETSLV	VRGRPDGKGL	GNASGA AVAT
401	HLDHRIAMSF	LVMGLVSENP	VTVDDATMIA	TSPPEFMDLM	AGLGAKIELS
451	DTKAA				

[Padgette i in., 1993]



Rys. 7 Struktura białka CP4 EPSPS (źródło: RCSB Protein Data Bank)

Włączenie nowego materiału genetycznego do organizmu jest bardzo trudne. DNA należy przeprowadzić przez ściany i błony komórkowe do jądra w taki sposób, by komórka nie uległa zniszczeniu. Sam fakt wprowadzenia DNA również nie oznacza, że nowa sekwencja będzie ulegała stabilnej i wysokowydajnej ekspresji. Aby to mogło nastąpić konieczne jest włączenie materiału genetycznego do genomowego DNA gospodarza w miejscu aktywnym transkrypcyjnie. Gospodarz może również rozłożyć wprowadzony przez nas materiał za pomocą nukleaz, czyli enzymów, które mają za zadanie przeciąć wiązanie fosfodiesterowe w kwasach nukleinowych. Powoduje to rozpad łańcucha DNA (przy udziale enzymu deoksyrybonukleazy) do krótszych łańcuchów lub nawet pojedynczych nukleotydów.

Wprowadzenie DNA może odbywać się dwiema metodami: wektorowymi lub bezwektorowymi. Metody wektorowe wykorzystują bakterie zawierające plazmid z interesującym nas transgenem. Plazmid jest to pozachromosomalna cząsteczka DNA, która wykazuje zdolność autonomicznej replikacji. Najczęściej do transformowania roślin wykorzystywane są bakterie glebowe, gram ujemne z rodzaju *Agrobacterium*, konkretnie *A. tumefaciens* oraz *A. rhizogenes*. Mają one zdolność do infekowania roślin i przekazywania im materiału genetycznego zawartego w ich plazmidach. Przekazany materiał genetyczny następnie zostaje włączony do DNA gospodarza. Proces ten nazywa się agroiniekcją i polega na przekazaniu roślinie fragmentu T-DNA, będącego częścią plazmidu, który replikuje się niezależnie. Plazmid pochodzący od *A. tumefaciens* nazwano Ti (z ang.

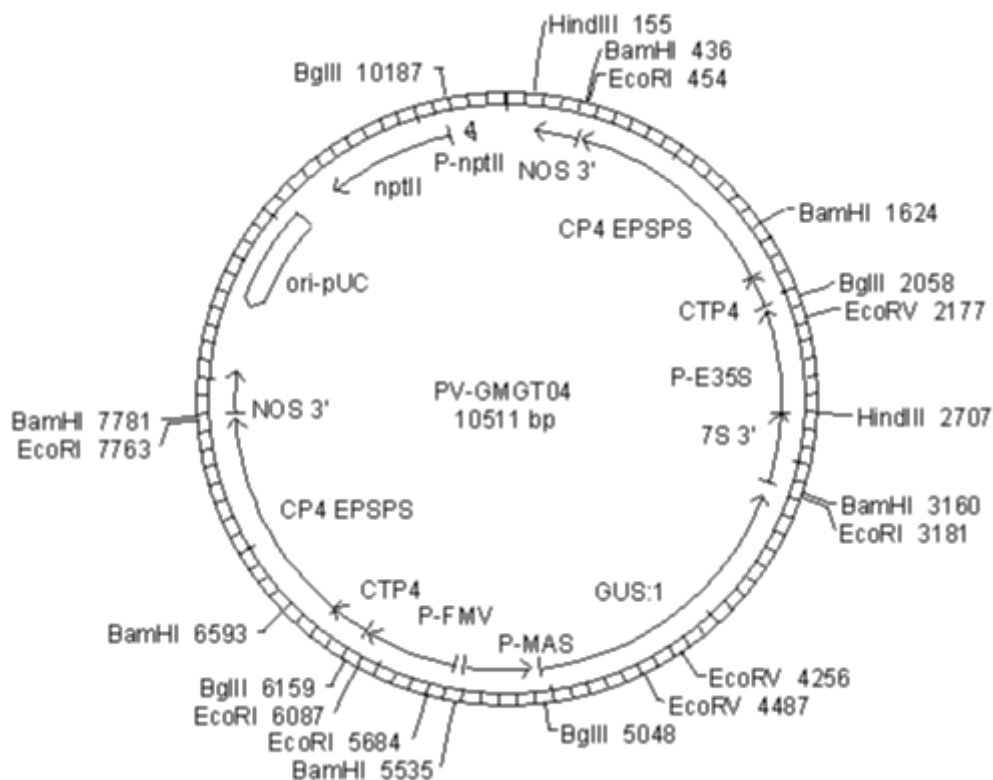
tumor inducing), natomiast pochodzący od *A. rhizogenes* nazywa się Ri (z ang. *root inducing*). Do metod bezwektorowych zaliczamy m.in. elektroporację, transformację protoplastów z użyciem PEGu, mikroiniekcję oraz mikrowstrzeliwanie [Rakoczy-Trojanowska, 2007]. Na etapie opracowywania nowej rośliny transgenicznej otrzymuje się tysiące zmodyfikowanych z których odtwarza się całe rośliny i ocena je pod względem morfologicznym i agronomicznym. Po wstępnej ocenie selekcjonuje się kilkadziesiąt linii, które poddaje się dalszym badaniom i selekcji.

2.2. Sposób otrzymywania soi Roundup Ready®

Soję transgeniczną odporną na glifosat (soję RR) otrzymano metodą mikrowstrzeliwania (particle gun). W czasie tworzenia transgenicznej soi była to najczęściej stosowana metoda wykorzystywana do transformowania roślin, mimo iż stosowanie jej nie daje pewności prawidłowego przeprowadzenia modyfikacji, gdyż materiał wprowadzany jest w sposób przypadkowy. Materiał genetyczny został osadzony na mikrokulce (\varnothing 0,6-1 μ m) złota przy pomocy fosforanu wapnia. Kulki wysuszone w strumieniu azotu, dzięki czemu DNA zostało unieruchomione i zapewniało to jego obecność na każdej mikrokulce. Powleczone materiałem genetycznym kuleczki zawieszono w alkoholu, po czym zostały umieszczone na nośniku poliestrowym. Następnie wystrzelono je w specjalnym urządzeniu w kierunku komórek soi z linii A5403. Kulki naruszyły integralność ścian i błon komórek roślinnych, a materiał genetyczny opłaszczony na kulkach uległ integracji z genomowym DNA soi. Zmodyfikowane komórki inkubowane były na pożywce do hodowli komórek roślinnych zawierającej cytokininę i auksynę. Substancje te wpływają na wzrost komórek. Auksyny pobudzają rozwój korzeni, a cytokiny powstawanie pędów rośliny. Potencjalnie z każdej komórki roślinnej, która zawiera nienaruszony materiał genetyczny, możemy odtworzyć dojrzałą formę rośliny, gdyż wykazują one zdolność do różnicowania się do odpowiednich, funkcyjnych komórek. Komórki soi RR po transformacji hodowano do osiągnięcia dojrzałości. Stosując opryski herbicydem analizowano rośliny pod kątem tolerancji na glifosat. Z kilkuset wyhodowanych linii wybrano najlepiej plonujące, posiadające jedną kopię transgenu, które dały początek nowej linii – soi RR [McCabe i in., 1988, Christou i in., 1988; Padgette i in., 1995; Kolacz i Padgette, 1994].

Do stworzenia soi RR wykorzystano plazmid PV-GMGT04, który został skonstruowany poprzez połączenie fragmentu 1,3 kbp FspI-DraI plazmidu pUC119 z 1,3 kbp SmaI-HindIII z

plazmidu pKC7. Fragment SmaI-HindIII zawiera gen *nptII* nadający odporność na kanamycynę, który dzięki temu, że posiada odpowiedni, bakteryjny promotor, nie podlega ekspresji w komórkach roślinnych. [Vieira i Messing, 1987; Fraley i in., 1983]. W czasach tworzenia soi RR nie znano jeszcze możliwości regeneracji roślin na pożywece z glifosatem, którą odkryto w roku 1991, dlatego też z braku wiedzy o innych możliwych metodach zastosowano *nptII*. Do tak skonstruowanego plazmidu wklonowano dwa kluczowe geny: dwie kopie genu EPSPS CP4, a także gen *uidA* (potocznie nazywanym GUS) z *E. coli*. Sekwencja ta koduje enzym β -glukuronidazę pierwotnie wykorzystywany do odróżniania komórek, które uległy transformacji od nietransformowanych, poprzez przekształcanie rozpuszczalnego w wodzie, bezbarwnego 5-bromo-4-chloro-3-indołylo- β -D-glukuronid w niebieski osad. Komórki bez wprowadzonej sekwencji GUS nie wykazują takiej zdolności. W łatwy zatem sposób przy minimalnych nakładach pracy odróżniono rośliny transformowane poprzez zalanie roślin odpowiednią mieszaniną. Plazmid PV-GMGT04 przedstawiono na rys. 8 [Eichholtz i in., 1993], a w tab. 1 przedstawiono ważniejsze elementy struktury plazmidu PV-GMGT04 oraz ich funkcje i źródło pochodzenia. W opisanym powyżej konstrukcie zastosowanym do transformacji soi RR (GTS 40-3-2) po raz ostatni sekwencję kodującą GUS. Technologia ta została w przyszłości przez bardziej efektywne rozwiązania.



Rys. 8 Plazmid PV-GMGT04

Tab. 1 Elementy plazmidu PV-GMGT04 [Eichholtz i in., 1993].

Element	Wielkość (kbp)	Źródło	Funkcja
P-E35S	0,61	Wirus mozaiki kalafiora (CaMV)	promotor E35S, wywołuje ekspresję genu CP4 EPSPS
CTP4	0,22	<i>Petunia hybrida</i>	sekwencja odpowiedzialna za transport białka CP4 EPSPS do chloroplastów, czyli właściwego miejsca działania
CP4 EPSPS	1,36	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> szczepu C4	odcinek kodujący gen syntazy EPSPS
NOS 3'	0,26	Plazmid Ti <i>A. tumefaciens</i>	terminator, stanowi sygnał do poliadenylacji, czyli dołączenia kilkudziesięciu nukleotydów adeninowych do końca 3' mRNA, zabezpieczających mRNA przed przedwczesną degradacją
KAN	1,32	Transpozon bakteryjny Tn5 z plazmidu pKC7 <i>E. coli</i>	koduje fosfotransferazę neomycyny II (<i>nptII</i>) nadając odporność na kanamycynę z promotorem bakteryjnym P- <i>nptII</i>
ori-pUC	0,65	Plazmid pUC119 <i>E. coli</i>	początek replikacji
GUS	1,81	<i>E. coli</i>	gen reporterowy z promotorem P-MAS wykorzystywany przy podwójnej selekcji do odróżniania komórek, które uległy transformacji, koduje β-glukoronidazę
CMoVb	0,57	Wirus mozaiki trędownika bulwiastego	promotor genu syntazy EPSPS

2.3. Analiza skuteczności wprowadzonej modyfikacji

Analizę skuteczności modyfikacji przeprowadza się tylko dla wyselekcjonowanych linii, które w praktyce wykazują zamierzone cechy fizjologiczne, morfologiczne i uprawowe. Analiza skuteczności modyfikacji ma na celu udzielenie odpowiedzi w ilu miejscach transgen uległ integracji z genomowym DNA gospodarza oraz jakie sekwencje konstrukcji genowej są obecne w transgenicznej soi, a które nie zostały włączone do jej genomu. Do analizy rekombinantów wykorzystano hybrydizacyjną metodę Southerna (ang. *Southern blot*), po wyizolowaniu i oczyszczeniu DNA z próby. Hybrydizacja Southerna jest metodą często stosowaną w biologii molekularnej, polega na łączeniu się sondy molekularnej z DNA rozdzielonym elektroforetycznie po działaniu enzymów restrykcyjnych. Dzięki temu możliwe jest wykrycie obecności konkretnych sekwencji w DNA. Do genomu soi RR włączone zostały sekwencje P-E35S, EPSPS CP4, CTP4 oraz NOS 3'. W plazmidzie znajdowały się również inne, ale nie zostały włączone do DNA soi. Były to: P-MAS, *nptII* (KAN), *lacZ*, 7S 3', CMoVb, a także GUS [Windels, Taverniers, Depicker, Van Bockstaele, De Loose, 2001; Re i in., 1993; Kolacz i Padgette, 1994; Padgette i in., 1996]. W nie mogą występować dodane sekwencje kodujące odporność na antybiotyki oraz β -glukuronidazy, gdyż jej podwyższona aktywność może wpływać na podwyższenie ryzyka kancerogenności [Żółtaszek, Hanausek, Kiliańska, Walaszek, 2008].

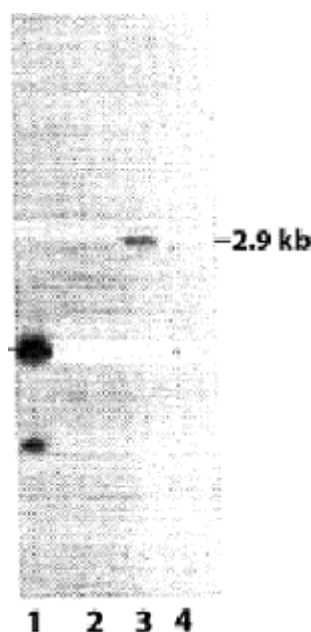
2.3.1. Ilość wprowadzonych sekwencji CP4 EPSPS

W celu ustalenia w ilu miejscach występuje wkolonowana sekwencja porównano soję transgeniczną z linią A5403, z której modyfikowana soja się wywodzi. DNA genomowe po wyizolowaniu poddaniu działaniu endonukleazy restrykcyjnej (*SpeI*), po czym poddano analizie metodą hybrydizacji Southerna z sondą wyznakowaną ^{32}P , która nie zawierała miejsca restrykcyjnego dla *SpeI*. Wyniki wykazały, że transgen uległ wbudowaniu w jednym miejscu w obrębie genomowego DNA soi RR. W celu ustalenia, która z dwóch kaset CP4 EPSPS znajdujących się w plazmidzie PV-GMGT04 przeprowadzono trawienie genomowego DNA z obu soi (soi RR oraz A5403) przy użyciu enzymów *BamHI*, *HindIII* i *EcoRI*. Otrzymane fragmenty poddano hybrydizacji z odpowiednią sondą. Analiza potwierdziła obecność jednej sekwencji o wielkości mniejszej niż 6kb [Windels i in., 2001; Rogan i in., 1999; Re i in., 1993; Kolacz i Padgette, 1994; Padgette i in., 1996].

2.3.2. P-E35S

Sekwencja kodująca CP4 EPSPS poprzedzona jest sekwencją promotora P-E35S. Badania miały wykazać, czy promotor ten występuje w DNA transformowanej soi. Aby to

sprawdzić próbę z soi RR porównano z materiałem genetycznym linii macierzystej. Próby poddano cięciu enzymem *Bam*HI. Próbą kontrolną był promotor P-E35S oznakowany za pomocą radioaktywnego izotopu fosforu ³²P. Analiza wykazała, że w genomie soi RR znajduje się sekwencja o wielkości 2,9 kb, która odpowiada sekwencji kodującej P-E35S [Windels i in., 2001; Rogan i in., 1999; Re i in., 1993; Kolacz i Padgette, 1994; Padgette i in., 1996].



Rys. 9 Analiza na obecność P-E35S. 1 – Plazmid PV-GMGT04, 2 – Linia macierzysta soi, 3 – Soja RR, 4 – kontrolna próba negatywna (źródło: agbios.com)

2.3.3. NOS 3'

Oznaczenie obecności sekwencji NOS 3' wykonane było analogicznie do oznaczenia promotora P-E35S, czyli na próbach z soi RR oraz A5403. Użyto wyznakowanej ³²P sekwencji terminatora 3'. Próby poddano trawieniu enzymem *Hind*III, a następnie *Eco*RI/*Bg*III i *Eco*RI/*Hind*III. Analiza Southern blot wykazała, że w soi RR znajduje się sekwencja oddzielona za pomocą *Eco*RI/*Hind*III o wielkości odpowiadająca NOS 3' [Windels i in., 2001; Rogan i in., 1999; Re i in., 1993; Kolacz i Padgette, 1994; Padgette i in., 1996].

2.3.4. GUS

Do badania obecności sekwencji kodującej GUS wykorzystano jako wskaźnik soję GTS 61-67-1. Jest to laboratoryjna linia soi zmodyfikowana w sposób zapewniający obecność w jej genomie sekwencji GUS. Następnie porównano jej DNA z wyizolowanymi z konwencjonalnej (A5403) i transgenicznej soi RR szukając sekwencji o długości 7999 par

zasad, wykorzystując do trawienia DNA enzym restrykcyjny *HindIII*. Wyniki analizy przedstawione na rys. 8 pokazują, że sekwencja GUS nie występuje w DNA poza plazmidowym i soją GTS 61-67-1 [Windels i in., 2001; Rogan i in., 1999; Re i in., 1993; Kolacz i Padgette, 1994; Padgette i in., 1996].



Rys. 10 Wynik analizy na obecności sekwencji GUS. 1 - Plazmid PV-GMG04, 2 - A5403, 3 - soja RR, 4 - GTS 61-67-1 (źródło: agbios.com)

2.3.5. *nptII*

Analizując próby szukano również odpowiedzi, czy w transgenicznej soi obecny jest gen kodujący enzym fosfotransferazę II neomycyny. Enzym ten odpowiedzialny jest za odporność bakterii na antybiotyki aminoglikozydowe, które są ważnymi substancjami przy zwalczaniu zakażeń bakteryjnych, zwłaszcza bakteriami Gram ujemnymi. Badania z wykorzystaniem markerów wskaźnikowych, a także soi z linii A5403 nie wykazały obecności sekwencji *nptII* w zmodyfikowanej soi [Windels i in., 2001; Rogan i in., 1999; Re i in., 1993; Kolacz i Padgette, 1994; Padgette i in., 1996]. Aktualnie nie stosuje się *nptII*, gdyż znane są metody regeneracji roślin na pożywkach zawierających glifosat.

2.4. Ekspresja białka

Badania ekspresji białek dokonano przy użyciu metod ELISA oraz western blot na materiale biologicznym pochodzącym z upraw polowych w Portoryko oraz Stanach

Zjednoczonych (10 miejsc, 1992r.; 4 miejsca, 1993r.). Analizie podano liście i nasiona soi, w których szukano zarówno białka CP4 EPSPS jak również ekspresji sekwencji GUS. Wyniki analiz przedstawiono w tab. 2 [Monsanto, 1993].

Tab. 2 Wyniki oznaczeń zawartości białek CP4 EPSPS oraz GUS w soi

Białko	Część rośliny	Rok	µg białka / mg pobranej próby	
			Zakres	Średnio
CP4 EPSPS	Liść	1992	0,25 – 0,79	0,44
		1993	0,30 – 0,60	0,41
	Nasiona	1992	0,19 – 0,39	0,29
		1993	0,13 – 0,28	0,20
GUS	Liść	1992	-	-
	Nasiona	1992	-	-

Glifosat jako składnik herbicydów stosowany jest w formie oprysków, dlatego też ważne jest, by efekt ekspresji genu syntazy EPSPS, czyli białko CP4 EPSPS w większej ilości znajdował się w liściach, a w nasionach soi znajdował się w mniejszym stopniu. Analizy przeprowadzone z prób polowych wykazały, że zależność ta została w roślinach zachowana. Nie zaobserwowano również zarówno w liściach i jak nasionach białka powstającego z sekwencji GUS.

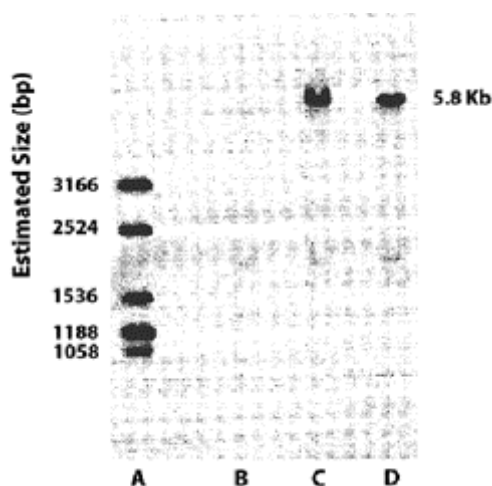
2.5. Stabilność genetyczna

Po przeprowadzeniu transformacji należy również sprawdzić, czy nadana metodami inżynierii genetycznej cecha jest stabilna i będzie przekazywana dalej na kolejne pokolenia. Analizy takie można wykonać fenotypowo lub wykorzystując analizę na poziomie molekularnym.

Badania molekularne oparte były na genomowym DNA, które zostało wyizolowane w całości z liści roślin generacji R3 i R6 z linii homozygotycznych (czystych), które uzyskano z roślin transformowanych z użyciem oznakowanego radioaktywnie ³²P plazmidu PV-GMGMT04. Jako materiał źródłowy do badań użyte było DNA pochodzące z liści z siewek soi RR, hodowanych w warunkach cieplarnianych. Po ekstrakcji w układzie fenol/chloroform odpady usunięto za pomocą etanolu. Ilość wyizolowanego materiału

genetycznego została oznaczona spektrofotometrycznie, a następnie strawiona przy użyciu *Hind*III. Próbkę z każdej rośliny oraz materiał wyizolowany z linii macierzystej, tj. A5403, pociętej tym samym enzymem, a także jako kontrolę pozytywną, czyli DNA pochodzącego z plazmidu PV-GMGT04 strawionego enzymem *Eco*RI, rozdzielono elektroforetycznie. Rozdzielone fragmenty oddzielono i przeniesiono na membranę wykonaną z nylonu. Zastosowanie wyznakowanego plazmidu pozwoliło na przeprowadzenie porównania za pomocą autoradiografii [Monsanto, 2002].

Badania wykazały, że w obu pokoleniach, zarówno w R3 jak i R6, jest obecny fragment o wielkości 5,8kb, co świadczy o tym, że wstawiony fragment jest stabilny przez cały okres wzrostu rośliny i przekazywany dalej na kolejne pokolenia. Bardziej dokładna analiza za pomocą Southern blot wykazała również obecność drugiej wstawionej sekwencji o długości 72bp [Monsanto, 2002].

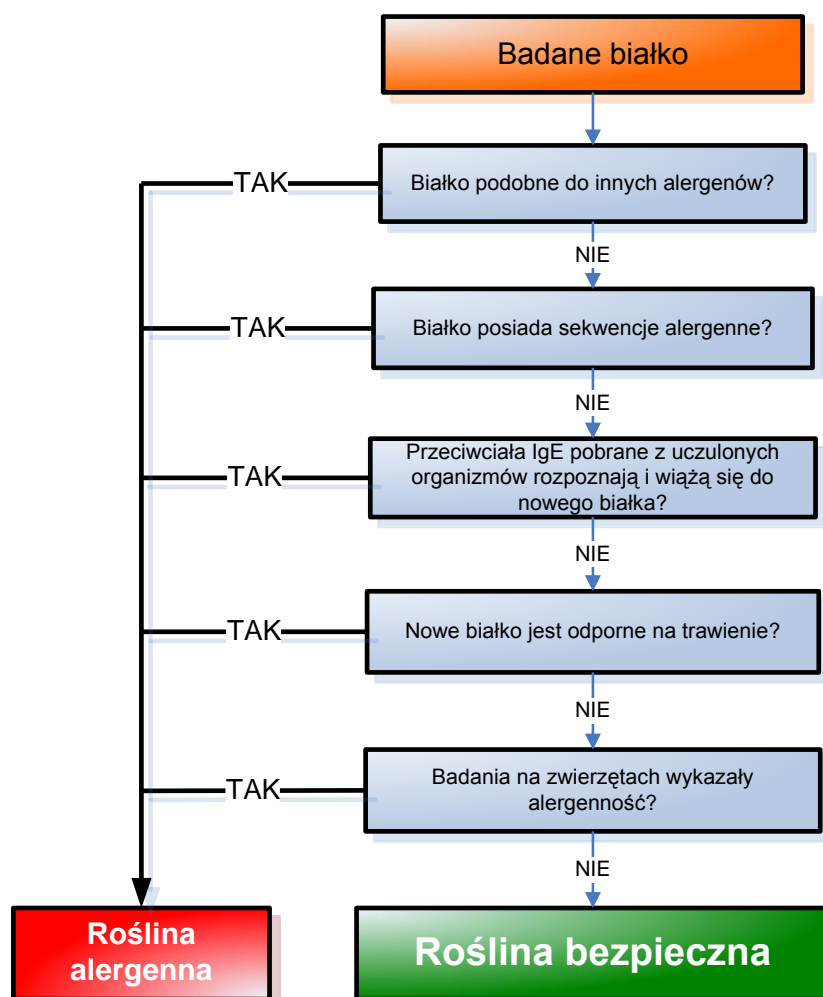


Rys. 11 Wynik analizy Southern blot. A – plazmid PV-GMGT04, B – próba kontrolna (linia A5403), C – soja RR pokolenia R3, D – soja RR pokolenia R6 [źródło: agbios.com]

Potwierdzenie dziedziczenia zgodne z prawami Mendla wykonano krzyżując potomstwo roślin odpornych na glifosat (F2, czyli drugie pokolenie) z nietransgenicznymi odmianami. Wykazano, że cecha odporności na glifosat kodowana jest przez jeden gen dominujący. Cecha ta jest stabilna i przekazywana na kolejne pokolenia, również w standardowych warunkach hodowlanych [Monsanto, 2002].

2.6. Analiza alergenicności

Soja jest zaliczona przez Komisję Kodeksu Żywnościowego (ang. Codex Alimentarius Commission) do jednego z ośmiu najczęściej uczulających produktów żywnościowych. Wraz z soją na liście znajdują się również: mleko, jaja, ryby, skorupiaki, orzechy, orzeszki ziemne i pszenica. Właściwości alergenne soi transgenicznej, jak również innych produktów żywnościowych wytworzonych przy pomocy inżynierii genetycznej bada się zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Rady Biotechnologii Żywności (IFBC - International Food Biotechnology Council) oraz Międzynarodowego Instytutu Nauk Przyrodniczych (International Life Sciences Institute) z roku 1996. W 2001 roku Światowa Organizacja Zdrowia FAO/WHO zmodyfikowała, po konsultacjach, zaproponowany przez IFBC schemat postępowania przy badaniach alergenicności. Schemat badań nowej żywności przedstawiony został na rys. 12.



Rys. 12 Schemat oceny analizy alergenicności

Transformacja soi zwiększyła zawartość białka CP4 EPSPS, które występuje w niej naturalnie, ale w niewielkich ilościach. W takim przypadku badaniom poddać należy jedynie to białko, którego ilość zwiększyła się poprzez ekspresję wprowadzonego transgenu. Sekwencję białka CP4 EPSPS porównano (wykorzystując do tego program komputerowy FASTA) ze znaczną ilością znanych alergenów, bo z aż 121 sekwencjami. Badania nie wykazały istotnego podobieństwa z białkami, mogącymi wywoływać alergię. Pochodzenie CP4 EPSPS również nie zalicza się do alergicznych, co przemawia na jego korzyść. Masa cząsteczkowa badanego białka wynosi 47,5kDa, oznacza to, że mieści się w przyjętych granicach dla białek potencjalnie alergizujących, jednak brak ciepłostabilności powoduje szybką degradację przy obróbce cieplnej żywności. Jak już wspomniano, badania wykazały, że białko CP4 EPSPS łatwo ulega trawieniu *in vitro* zarówno w układach symulujących żołądek, jak i jelito [Pearson i Lipman, 1988; Padgette i in., 1993; Sten i in., 2004; Batista i in., 2005; Kim i in., 2006]

Tab. 3 Porównanie właściwości białka EPSPS CP4 i znanych alergenów (na podstawie: Taylor 1992, 1987)

Właściwości	Alergeny	Białko EPSPS CP4
Pochodzenie alergenne	+	-
Masa cząsteczkowa 10-70kDa	+	+
Sekwencje podobne do alergenów	+	-
Odporność na trawienie	+	-
Stabilność w obróbce	+	-
Powszechność w żywności	+	-

Wyniki badań zestawione w tab. 3 pozwalają stwierdzić, że białko wprowadzone do soi nie wykazuje właściwości alergicznych, nie wykazało również podobieństwa do toksyn białkowych, ulega szybkiemu trawieniu oraz nie wykazało właściwości toksycznych w karmieniu zwierząt. Można zatem przyjąć, że białko to nie powinno stanowić żadnego zagrożenia zarówno toksykologicznego jak i alergennego [Chang i in., 2005].

2.7. Analiza toksykologiczna

Soja transgeniczna pod względem składu i wartości odżywczych nie różni się od odmian konwencjonalnych. Zgodnie z zasadą faktycznej równoważności (ang. *Substantial Equivalence*) opracowanej przez Organizację Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD - ang. *Organization for Economic Co-operation and Development*) w 1991 roku, jeżeli żywność udoskonalona metodami inżynierii genetycznej wykazuje właściwości

i skład takie jak żywność konwencjonalna o udokumentowanym historycznie bezpieczeństwie, powinna być traktowana na równi z tymi odmianami, których spożywanie przez lata nie wywołało skutków negatywnych. Jediną różnicą jest obecność białka CP4 EPSPS w większej ilości w porównaniu do roślin konwencjonalnych, które powstało w wyniku ekspresji wprowadzonego metodami inżynierii genetycznej genu i tylko to białko poddaje się badaniu.

Ocenę szkodliwości i toksyczności substancji zawartych w żywności wykonuje się przeprowadzając badania na zwierzętach. Są to wieloetapowe i długotrwałe oznaczenia, do których należy wykorzystywać materiał dobrze oczyszczony. Ponieważ w soi RR powstaje niewielka ilość białka CP4 EPSPS i ilość ta nie jest wystarczająca do przeprowadzenia badań żywnościowych uznano, że analizy wykonane będą na białku pochodzącym z kultur bakteryjnych, które łatwo można namnożyć do odpowiedniej ilości i wyizolować z nich CP4 EPSPS, odpowiedzialne za nadanie odporności soi na glifosat. Podstawowym badaniem jest określenie toksyczności ostrej, czyli tego, jak działa na organizm badana substancja po podaniu jej jednorazowo lub w krótkim okresie czasu. Badane białka były podawane doustnie dwa razy dziennie myszom w dawkach 572mg/kg masy ciała. Pokarm i woda dostarczane były zwierzętom *ad libitum*, co oznacza, że nie były limitowane. Po 8 dniach zwierzęta uśmiercono i poddano analizie organów, w których nie wykazano negatywnego wpływu na ich organizmy białka CP4 EPSPS [Naylor, 1993; Harrison, 1996].

Strawność białka badano w układach *in vitro* przygotowanych zgodnie z opisem zawartym w US Pharmacopeia i stale monitorowano wykorzystując analizy western immunblotting oraz pomiar aktywności enzymatycznej. Wyniki pokazały, że białko było szybko trawione zarówno w symulowanej treści żołądka (SGF - *simulated gastric fluid*) oraz w treści jelitowej (SIF - *simulated intestinal fluid*) z okresem półtrwania odpowiednio 15 sekund i 10 minut [Sleisenger i Fordtran, 1989; Harrison, 1996].

Sekwencję aminokwasów, którą kodują wprowadzone geny, porównano z sekwencjami znanych toksyn białkowych szukając fragmentów homologicznych. Wśród przeszukanych 1935 toksyn nie wykazano podobieństwa z sekwencją aminokwasów CP4 EPSPS [Doolittle, 1990].

2.8. Transfer genów do organizmu konsumentów.

Osobnym zagadnieniem, które należy wyjaśnić, jest możliwość (lub jej brak) transferu wprowadzonych genów do mikroflory jelitowej ludzi po spożyciu transformowanej rośliny, a dalej przekazaniu ich poprzez jelito do organizmu ludzkiego i zintegrowaniu z genomem ludzkim. Po spożyciu żywności, zarówno konwencjonalnej, jak i tej z nowym materiałem genetycznym, żywność ulega trawieniu. Białka, tłuszcze i węglowodany, jak również DNA i RNA zostają rozłożone przez odpowiednie enzymy do form prostych, łatwo metabolizowanych przez komórki. Rozkład kwasów nukleinowych do cukru (pentozy), kwasu ortofosforowego, a także zasad purynowych i pirydynowych zabezpiecza przed wprowadzaniem materiału genetycznego z inną sekwencją, niż ta, występująca w organizmie ludzkim. Dziennie człowiek wraz z żywnością zjada od 0,1 do 1 grama różnych DNA i RNA zarówno zwierzęcych, jak i roślinnych. Aby możliwy był transfer genów do mikroorganizmów bytujących w jelitach materiał genetyczny musiałby uniknąć trawienia, po czym bakterie musiałyby włączyć go do swojego genomu. Sam fakt włączenia nie gwarantuje jeszcze ekspresji ani dziedziczności danej cechy. Kolejnym etapem byłoby przekazanie transgenu poprzez jelito do organizmu człowieka. Proces ten jest znacznie bardziej skomplikowany, niż przekazanie DNA z bakterii na bakterie, gdzie materiał genetyczny może zostać przekazany przez plazmidy na drodze koniugacji. Prawdopodobieństwo tego, że materiał genetyczny z nowej żywności przeniesiony zostanie na bakterie jelitowe, a dalej do organizmu ludzkiego jest znikome [Kuiper i Kleter, 2003].

2.9. Identyfikowanie roślin transgenicznych

Transformowane organizmy po wprowadzeniu odpowiedniego genu, który ulega ekspresji nabywają odpowiednią cechę. W soi RR cechą tą jest odporność na składnik aktywny herbicydu Roundup. Zmodyfikowana roślina jest praktycznie nierozróżnialna „gołym okiem” od roślin, w których nie wprowadzono modyfikacji. Nie można zatem wizualnie oszacować, czy ziarna soi pochodzą z upraw transgenicznych, czy konwencjonalnych. Aby wykazać to, musimy przeprowadzić badania laboratoryjne. Analiza wykazująca obecność transformowanych roślin odbywa się na poziomie badania DNA i/lub pod kątem obecności specyficznych białek.

Metody stosowane przy detekcji zmienionych sekwencji DNA oparte są na reakcji łańcuchowej polimerazy, czyli testach PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*). Szczególnie przydatnym wariantem identyfikującym jest Real Time PCR, czyli PCR w czasie rzeczywistym. W zależności od zastosowanych starterów testy PCR możemy podzielić na kategorie, z których każda odnosić się będzie do odpowiedniego fragmentu kwasu nukleinowego. Jeżeli w próbie występuje sekwencja dla zastosowanych starterów następuje jej amplifikacja. Dzięki temu w czasie trwania reakcji możemy na bieżąco oceniać ilość powstającego produktu amplifikacji, a tym samym oznaczyć ilościowo zawartość zmodyfikowanej soi w próbie [Duluński, 2007; Pedgette, 1995; Klein i Madej, 2005; Lequin, 2005].

Obecność białek, które na skutek manipulacji w genomie rośliny uległy ekspresji, wykryć można za pomocą testów immunoenzymatycznych (ELISA). Test jest bardzo efektywny, niestety wiele prób nie zawiera wystarczającej ilości białek do badania bowiem warunkiem koniecznym jest jednak obecność niezdenaturowanych białek w odpowiedniej ilości. ELISA może być metodą do oznaczeń ilościowych, jest bowiem możliwe stworzenie krzywych standardowych zawartości transgenicznych roślin w badanych próbach [Duluński, 2007; Pedgette, 1995; Klein i Madej, 2005; Lequin, 2005].

Wykorzystywane mogą być również metody oparte na mikromacierzach DNA, spektrometria masowa, chromatografia czy spektroskopia w podczerwieni [Duluński, 2007; Pedgette, 1995; Klein i Madej, 2005; Lequin, 2005].

3. Regulacje prawne wprowadzania transgenicznych organizmów

Polskie przepisy regulujące stosowanie, uprawianie oraz obrót organizmami genetycznie zmodyfikowanymi regulowane są przez ustawodawstwo polskie, a także, w związku z obowiązującymi Polskę umowami, przepisy Unii Europejskiej i umowy międzynarodowe. Prawo UE ma charakter dyrektyw lub rozporządzeń. Rozporządzenia są obowiązujące w całej swej rozciągłości na terytorium wszystkich krajów członkowskich. Dyrektywy natomiast wyznaczają cele, do których kraje powinny dążyć i osiągnąć w swojej legislacji.

Podstawowymi aktami prawa międzynarodowego, przyjętymi przez Polskę są Konwencja z Rio de Janeiro o różnorodności biologicznej oraz Protokół z Kartageny.

Konwencja o różnorodności biologicznej z Rio de Janeiro z dnia 5 czerwca 1992 roku ratyfikowana została przez Polskę w 2002 roku. Zgodnie z Konwencją musimy zachować całe środowisko przyrodnicze na wszystkich jego poziomach organizacji w ekosystemach wodnych i lądowych. Kraje podpisujące się pod Konwencją zobowiązują się do poszerzania wiedzy społeczeństwa z zakresu ochrony przyrody, do współpracy w celu ochrony, a także zapewniają, że ich działania nie będą wyrządzały szkód na terytoriach innych krajów [Dz.U. 2002 nr 184 poz. 1532].

Protokół z Kartageny o bezpieczeństwie biologicznym do Konwencji o różnorodności biologicznej sporządzony w Montrealu w roku 2000, w Polsce obowiązuje od roku 2004. Protokół głosi, że „celem niniejszego Protokołu jest przyczynienie się do zapewnienia odpowiedniego poziomu ochrony w dziedzinie bezpiecznego transferu, sposobu postępowania i użytkowania zmodyfikowanych żywych organizmów powstałych w wyniku zastosowania nowoczesnej biotechnologii, które mogą mieć negatywny wpływ na zachowanie i zrównoważone użytkowanie różnorodności biologicznej, przy uwzględnieniu zagrożeń dla zdrowia człowieka i ze specjalnym ukierunkowaniem na przewóz transgraniczny.” Protokół z Kartageny powołuje do istnienia system wymiany informacji naukowych i technicznych, a także prawnych związanych z żywymi organizmami zmodyfikowanymi genetycznie nazwany Systemem Wymiany Informacji o Bezpieczeństwie Biologicznym [Dz.U. 2004 nr 216 poz. 2201].

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie genetycznie zmodyfikowanej żywności i paszy głosi, że ważne jest zapewnienie bezpieczeństwa zdrowia i życia obywateli, jednocześnie stwierdza, że bezpieczeństwo to jest zależne od swobodnego przepływu zdrowej i bezpiecznej żywności o raz pasz na rynku wewnętrznym. Wprowadzenie na rynek UE żywności lub pasz zawierającej lub produkowanej z użyciem organizmów GM regulowane jest przepisami wspólnotowymi, by nie stwarzać warunków nieuczciwej konkurencji. Definicja Rozporządzenia nie obejmuje środków pomocniczych stosowanych w procesie produkcji żywności lub paszy. Produkty takie nie podlegają procedurom zatwierdzania ani etykietowania zawartych w niniejszym Rozporządzeniu [1829/2003/WE].

W celu dostosowania ustawodawstwa polskiego do wymogów prawa międzynarodowego powstał w roku 2007 projekt ustawy „Prawo o GMO”, który został odrzucony przez Komisję Europejską. Kolejnym projektem ustawy „Prawo o organizmach genetycznie zmodyfikowanych” został przygotowany w roku 2008 w Ministerstwie Środowiska.

Uwzględnia on dostosowanie prawodawstwa polskiego do wymogów UE [1829/2003/WE, 1830/2003/WE, 1946/2003/WE] oraz podtrzymuje założenia zawarte w „Ramowe stanowisko Rządu RP dotyczące organizmów zmodyfikowanych genetycznie (GMO)”.

Dnia 18 listopada 2008 roku Rada Ministrów Rządu Polski przyjęła dokument, w którym określono stanowisko dotyczące organizmów genetycznie zmodyfikowanych (pierwsza wersja przyjęta została 3. kwietnia 2006r.). Stanowisko Rządu Polski zawarte jest w głównych punktach:

- zgoda na prace prowadzone w ramach zamkniętego użycia GMO zgodnie z warunkami określonymi w przepisach prawa,
- dążenie do uznania terytorium Rzeczypospolitej Polskiej za „kraj wolny od GMO” przy jednoczesnym zobowiązaniu do przestrzegania prawa Unii Europejskiej regulującego uwalnianie organizmów GM do środowiska w celach doświadczalnych,
- dążenie do niewprowadzania do obrotu na terenie Unii Europejskiej nowych produktów GMO jako żywność, pasze lub inne produkty [Ramowe stanowisko Rządu RP dotyczące organizmów genetycznie zmodyfikowanych (GMO), Lubiawska-Krysiak i Twardowski, 2008].

„Ramowe stanowisko Rządu RP” stworzone zostało, jako odpowiedź na obawy społeczne związane z organizmami transgenicznymi. Społeczeństwu polskiemu brakuje dostępu do rzetelnych źródeł naukowych, a ich opinie w głównej mierze opiera się na pogłoskach i niesprawdzonych informacjach. Często zdarza się również, że środowisko ekologów poddaje w wątpliwości osiągnięcia nauki dowodzące nieszkodliwości organizmów zmodyfikowanych genetycznie. Ilustracją tego problemu jest poniższy fragment:

„Biorąc pod uwagę z jednej strony konieczność realizacji zobowiązań wynikających z przepisów wspólnotowych dotyczących organizmów genetycznie zmodyfikowanych oraz z drugiej strony uwzględniając wyraźną niechęć społeczeństwa przeciwko organizmom genetycznie zmodyfikowanym, Rząd Polski będzie starał się pozyskać przychylność innych Państw członkowskich Unii Europejskiej w celu zmiany prawa Unii Europejskiej w tym zakresie. Jednocześnie w celu zastosowania przesłanek zawartych w niniejszym stanowisku Rząd RP deklaruje, że w obowiązujących przepisach prawnych, jak też w przepisach tworzonych, w dostępnych do tego granicach prawa, dokona zmian

umożliwiających ograniczenie stosowania organizmów genetycznie zmodyfikowanych na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej. Równolegle podczas procedury dopuszczania do obrotu na terytorium Unii Europejskiej nowych produktów genetycznie zmodyfikowanych, Polska będzie każdorazowo głosowała przeciw wprowadzeniu do obrotu takich produktów.”

Wprowadzanie roślin uzyskanych na drodze trans genezy do upraw w Europie zapoczątkowane zostało od kukurydzy MON 810. W chwili obecnej trwają prace nad uzyskaniem kolejnych pozwoleń na uprawę transgenicznych roślin. W dokumencie tym w rozdziale „V. UPRAWA GATUNKÓW ROŚLIN GM” możemy przeczytać:

„Bardzo ważnym aspektem, który bezwzględnie powinien zostać wzięty pod uwagę podczas rozpatrywania skutków wynikających z wprowadzenia tej technologii, jest dostępność rynków zbytu dla takich produktów. W chwili obecnej jedynie kukurydza MON 810 charakteryzująca się odpornością na omacnicę prosowiankę została dopuszczona do uprawy na terenie Unii Europejskiej. Jednak na podstawie Rozporządzenia 1829/2003/WE zostały już złożone wnioski na wprowadzenie do uprawy następujących produktów:

- kukurydza 1507 x NK603 (odporność na szkodniki Lepidoptera i na herbicyd (glifosat)),
- kukurydza NK603 (odporność na herbicyd (glifosat)),
- kukurydza 59122 (odporność na szkodniki Coleoptera i na herbicyd (glufosynat amonowy)),
- soja 40-3-2 (odporność na herbicyd (glufosynat amonowy)),
- kukurydza NK603 x MON810 (odporność na szkodniki Lepidoptera i na herbicyd (glifosat)),
- kukurydza 1507 x 59122 (odporność na szkodniki Lepidoptera, Coleoptera i na herbicyd (glufosynat amonowy)),
- kukurydza 59122 x 1507 x NK603 (odporność na szkodniki Lepidoptera, Coleoptera i na herbicyd glifosat),
- kukurydza T25 (odporność na herbicyd (glufosynat amonowy)).”

Zgodnie z decyzją Komisji Europejskiej dotyczącą wprowadzania do obrotu genetycznie zmodyfikowanej soi *Glycine max. L.* [96/281/WE] roślina ta, odporna jest na aktywny składnik herbicydu Roundup[®], czyli glifosat, a transformacji dokonała firma Monsanto Company. Zastanawiającym faktem jest opisanie w „Ramowym stanowisku Rządu RP” soi RR (40-3-2) jako transgenicznej rośliny zmodyfikowanej pod kątem nabycia odporności na glufosynat amonowy.

W grudniu 2009 roku po trzyletnim okresie przygotowywania w Sejmie RP odbyło się czytanie ustawy "Prawo o organizmach genetycznie zmodyfikowanych". Ma ona dostosować polskie prawodawstwo do wymogów Unii Europejskiej. Organizacje zrzeszone w koalicję „Polska wolna od GMO” oraz Greenpeace po licznych akcjach protestacyjnych doprowadziły do skierowania projektu ustawy do Komisji Sejmowej ds. środowiska oraz ds. rolnictwa. Dążenie do ustanowienia w Polsce „Strefy wolnej od GMO” może w przyszłości doprowadzić do zmniejszenia konkurencyjności polskiego rolnictwa, które już i tak w porównaniu z innymi krajami europejskimi jest mało rentowne. Zakazy prawne upraw roślin GM wydają się jednak nie mieć sensu, przy jednoczesnym zezwoleniu na obrót i import roślin uzyskanych na drodze transgenezy i żywności z nich wytworzonej.

4. Podsumowanie

Rolnictwo na świecie zmuszone jest do produkcji rolniczej najwyższej jakości, satysfakcjonującej konsumentów, a za razem przynoszących odpowiednie zyski dla rolnika i plony na odpowiednim poziomie. Krzyżowanie różnych odmian roślin, selekcionowanie osobników o najwyższej plenności od lat towarzyszy praktyce rolniczej. Rozwój nauki, w szczególności biologii molekularnej oraz technologii budowy urządzeń laboratoryjnych sprawiło, że możliwe stało się ulepszanie roślin w kontrolowanym, ściśle określonym kierunku. Od kilkunastu lat obserwujemy intensyfikację badań nad roślinami uzyskanymi na drodze transgenezy. Kraje rozwinięte, takie jak Stany Zjednoczone, Kanada, corocznie zwiększają obszary upraw transgenicznych. W Europie narosło wiele obaw związanych z ich uprawą oraz spożyciem, skutecznie podsycanych przez środowiska „zielonych” oraz producentów tzw. ekologicznej żywności. Niestety, niski stan wiedzy wśród społeczeństwa, nie tylko polskiego, ale również innych krajów, sprawia, że ogranicza się wprowadzanie do upraw polowych nowych roślin otrzymanych metodami inżynierii genetycznej. Ważne jest zatem dostarczanie rzetelnych, neutralnych informacji, popartych naukowymi badaniami, a nie opartych na potocznych poglądach. Stworzy to możliwość doksztalcenia i pojęcia dojrzałej decyzji każdego konsumenta, czy chce korzystać z dóbr biotechnologii, czy też nie. EFSA (European Food Safety Authority) w swoim oficjalnym stanowisku jednoznacznie stwierdza, że nie widzi zagrożenia popartego naukowymi doniesieniami w uprawie i spożywaniu zmodyfikowanej żywności, a zakazy wprowadzane w poszczególnych krajach członkowskich Unii Europejskiej uznaje za bezzasadne.

Uprawy transgenicznych roślin mogą obniżyć koszty produkcji żywności oraz zabezpieczyć uprawy przed zniszczeniami przez szkodniki. Soja RR pozwala na prowadzenie łatwiejszej produkcji roślinnej w gospodarstwie rolnym. Istnieje bowiem możliwość nadzorowania wzrostu innych, niepożądanych roślin. Obniżone koszty uprawy przekładają się na ceny żywności. Kraje rozwinięte nie mają większych problemów z głodem. Wytwarzają one żywność w ilościach zaspakajających ich potrzeby. Problem niedożywienia doskwiera zwłaszcza mieszkańcom krajów Trzeciego Świata. W krajach tych rozwijająca się gospodarka nie jest w stanie przejąć zachodnich, wydajnych technologii, uprawy roślin transgenicznych znacząco może poprawić sytuację żywnościową w tych krajach.

5. Literatura

- Barry G., Kishore G., Padgett S., Kolacz K., Weldon M., Re D., Eichholtz D., Fincher K., Hallas L., 1992. *Inhibitors of amino acid biosynthesis: strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants*. Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists. Pp. 139–145.
- Batista R., Nunes B., Carmo M., Cardoso C., São José H., de Almeida A., Manique A., Bento L., Ricardo C., Oliveira M., 2005. *Lack of detectable allergenicity of transgenic maize and soya samples*. Journal of Allergy Clinical Immunology (116), 403 - 410.
- Blecharczyk A., Małecka I., 2008. *Uprawa bezorkowa*. Farmer (06).
- Bradberry S., Proudfoot A., Vale J., 2004. *Glyphosate poisoning*, Toxicol Rev., 23 (3) : 159-67, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15862083> dostęp: 16. listopada 2009r.)
- Brookes G., Anioła A., 2005. *Wpływ użytkowania roślin genetycznie zmodyfikowanych na produkcję roślinną w gospodarstwach rolnych w Polsce*. Brookes West, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin. ([http://www.ukie.gov.pl/www/serce.nsf/0/24F364EE89993046C12571C70032A0B9?](http://www.ukie.gov.pl/www/serce.nsf/0/24F364EE89993046C12571C70032A0B9?Open) Open dostęp 5. stycznia 2010r.)
- Chang H., Kim N., Park M., Lim S., Kim S., Kim J., Kim J., Oh H., Lee C., Huh K., Jeong T., Nam D., 2005. *The 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of glyphosate-tolerant soybean expressed in Escherichia coli shows no severe allergenicity*. Molecules and Cells 15 (1) : 20 – 26.
- Christou P., McCabe D., Swain W., 1988. *Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles*. Plant Physiology 87, 671-674.
- De Roos A., Blair A., Rusiecki J., Hoppin J., Svec M., Dosemeci M. i in., 2005. *Cancer Incidence among Glyphosate-Exposed Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study*, Environ Health Perspect, 113 (1) : 49–54.
- Decyzja Komisji z dnia 3 kwietnia 1996 r. dotycząca wprowadzania do obrotu genetycznie zmodyfikowanej soi (*Glycine max. L.*) o zwiększonej odporności na herbicyd oparty na glifosacie, na mocy dyrektywy Rady 90/220/EWG (http://www.ekoportal.pl/sep/cms/export/sites/default/GMO/dokumenty/96_281_WE.pdf dostęp 10. listopada 2009r.)
- Decyzje EFSA: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/850.htm>,
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/756.htm>,
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/757.htm>,
<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/891.htm>.
- Dellaporta S., Wood J., Hicks J., 1983. *A plant DNA miniprep: Version II*. Plant Mol. Biol. Reporter (1), 19 - 21.
- Doolittle R., 1990. *Searching through sequence databases*. Molecular Evolution: Computer Analysis of Protein and Nucleic Acid Sequences, Academic Press, San Diego, 99-110.
- Duliński R., 2007. *Metody identyfikacji genetycznie zmodyfikowanych organizmów w żywności*. ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 4 (53), 5 – 16.

Eichholtz D., Barry G., Taylor C., Padgett S., 1993. *Construction of DNA vectors for the production of glyphosate-tolerant soybeans*. Monsanto Technical Report MSL-12905, St. Louis.

Fraley R., Rogers S., Horsch R., Sanders P., Flick J., Adams S., Bittner M., Brand L., Fink C., Fry J., Galluppi G., Goldberg S., Hoffman N., Woo S., 1983. *Expression of bacterial genes in plant cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4803-4807.

Gianessi L., 2005. *Economic and Herbicide Use Impacts of Glyphosate-resistant Crops*. Pest Management Science. 61 (3) : 241 - 245.

Glyphosate - Exttoxnet Pip, (<http://exttoxnet.orst.edu/pips/glyphosa.htm> dostęp 16. listopada 2009r.)

Glyphosate, Environmental Health Criteria monograph (159), World Health Organization, Geneva 1994.

Gómez-Barbero M., Berel J., Rodriguez-Cerezo E., 2008. *Adoption and performance of the first GM crop introduced in UE agriculture: Bt maize in Spain*, JRC European Commission.

Harrison L., Bailey M., Naylor M., Ream J., Hammond B., Nida D., Burnette B., Nickson T., Mitsky T., Taylor M., Fucsh R., Padgett S., 1996. *The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from Agrobacterium sp. Strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice*. Journal of Nutrition 126 (3) , 728 - 740.

James C., 2008. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2008*, ISAAA Briefs (39).

Jefferson R., Burgess S., Hirsch D., 1986. *Beta-glucuronidase from Escherichia coli as a gene-fusion marker*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8447-8451.

Kay R., Chan A., Daly M., McPherson J., 1987. *Duplication of the CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes*. Science 236, 1299-1302.

Kim S., Kim H., Ye Y., Nahm D., Park H., Ryu S., Lee B., 2006. *Evaluating the allergic risk of genetically modified soybean*. Yonsei Medical Journal (47), 505-512.

Klein M., Madej M., 2005. *Rośliny i żywność genetycznie modyfikowane*. Środowisko a Zdrowie, 8.

Konwencja o różnorodności biologicznej, Dz.U. 2002 nr 184 poz. 1532 (http://msp.money.pl/akty_prawne/dzienniki_ustaw/konwencja;o;roznorodnosci;biologicznej;sporządzona,dziennik,ustaw,2002,184,1532.html dostęp 10. listopada 2009r.)

Kunachowicz H., Nadolna I., Iwanow K., Przygoda B., 2009. *Wartość odżywcza wybranych produktów spożywczych i typowych potraw*, Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa.

Lequin R., 2005. *Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Clin. Chem. 51 (12) : 2415–8.

Lisowski S., 1996. *Świat roślinny tropików*. Wydawnictwo Sorus, Poznań.

Lubiatowska-Krysiak E., Twardowski T., 2008. *Agrobiotechnologia i przemysł rolno-spożywczy: perspektywy i ograniczenia w świetle opinii publicznej*, Biotechnologia Monografie (4).

- McCabe D., Swain W., Martinell B., Christou P., 1988. *Stable transformation of soybean (Glycine max) by particle acceleration*. Bio/Technology 6, 923-926.
- Mensink H., Janssen P. (prep. by), 1994. *Glyphosate*, International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva.
- Monsanto, 1993. *Petition for Determination of Nonregulated Status: Soybeans with Roundup Ready™ Gene*.
- Monsanto, 2002. *Safety Assessment of Roundup Ready Soybean Event 40-3-2*.
- Naylor M., 1993. *Acute oral toxicity study of CP4 EPSPS in albino mice*. Monsanto Report MSL92542, St. Louis.
- Odell J., Nagy F., Chua N., 1985. *Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter*. Nature 313, 810-812.
- Padgett S., Barry G., Re D., Weldon M., Eichholtz D., Kolacz K., Kishore G., 1993. *Purification, cloning, and characterization of a highly glyphosate tolerant EPSP synthase from Agrobacterium sp. strain CP4*. Monsanto Technical Report MSL-12738, St. Louis.
- Padgett S., Kolacz K., Delannay X., Re D., LaVallee B., Tinius C., Rhodes W., Otero Y., Barry G., Eichholtz D., Peschke V., Nida D., Taylor N., Kishore G., 1995. *Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line*. Crop Science 35, 1451-1461.
- Padgett S., Nida D., Biest N., Bailey M., Zobel J., 1993. *Glyphosate tolerant soybeans in the U.S. in 1992: Field test, processing studies, and analytical evaluation*. Monsanto Study 92-01-30-02, Technical Report MSL-12906, St. Louis.
- Padgett S., Re D., Gasser C., Eichholtz D., Frazier R., Hironaka C., Levine E., Shah D., Fraley R., Kishore G., 1993. *Purification, cloning, and characterization of a highly glyphosate-tolerant EPSP synthase from Agrobacterium sp. strain CP4*. Monsanto Technical Report MSL-12738, St. Louis.
- Pearson W., Lipman D., 1988. *Improved tools for biological sequence comparison*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-2448.
- Powlowski W., Somers D., 1996. *Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment*. Molecular Biotechnology 6, 17-30.
- Protokół Kartageński o bezpieczeństwie biologicznym, Dz.U. 2004 nr 216 poz. 2201 (http://msp.money.pl/akty_prawne/dzienniki_ustaw/protokol;kartagenski;o;bezpieczenstwie;biologicznym,dziennik,ustaw,2004,216,2201.html dostęp 10. listopada 2009r.)
- Querci M., Maretta M., Mazzara M., *Wykrywanie jakościowe kukurydzy Bt-176 i soi Roundup Ready® metodą PCR*, WHO.
- Rakoczy-Trojanowska M., 2007. *Wprowadzanie genów do roślin*, Biotechnologia roślin, WNT, 233-245.
- Ramowe stanowisko Rządu RP dotyczące organizmów genetycznie zmodyfikowanych (GMO), http://gmo.mos.gov.pl/pobierz/GMO_RAMOWE_STANOWISKO_POLSKI.pdf, 2008 (dostęp 21. października 2009r.)
- Rao R., Rogers S., 1979. *Plasmid PKC7: A vector containing ten restriction endonuclease sites suitable for cloning DNA segments*. Gene 7, 79.

- Reis L., Van Sluys M., Garratt R., Pereira H., Teixeira M., 2006. *GMOs: building the future on the basis of past experience*, Anais da Academia Brasileira de Ciencias, 78 (4) : 667-86.
- Rogan G., Dudin Y., Lee T., Magin K., Astwood J., Bhakta N., Leach J., Sanders P., Fuchs R., 1999. *Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready soybeans*. Food Control (10), 407-414.
- Rozporządzenie (WE) nr 1829/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z 22 września 2003r. w sprawie genetycznie zmodyfikowanej żywności i paszy.
(http://www.mos.gov.pl:1096/akty/1829_2003.pdf, dostęp: 1. listopada 2009r.)
- Shah D., Horsch R., Klee H., Kishore G., Winter J., Tumer N., Hironaka C., Sanders P., Gasser C., Aykent S., Siegel N., Rogers S., Fraley R., 1986. *Engineering herbicide tolerance in transgenic plants*. Science 233, 478-481.
- Sleisenger M., Fordtran J., 1989. *Gastrointestinal Disease*. Volume 1, Pathophysiology Diagnosis Management. W.B. Saunders Co., Toronto, 685-689.
- Sten E., Skov P., Andersen S., Torp A., Olesen A., Bindslev-Jensen U., Poulsen L., Bindslev-Jensen C., 2004. *A comparative study of the allergenic potency of wild-type and glyphosate-tolerant gene-modified soybean cultivars*. APMIS 112(1): 21-28.
- Taylor S., 1992. *Chemistry and detection of food allergens*. Food Technology 39, 146-152.
- Taylor S., Lemanske R., Bush R., Busse W., 1987. *Food allergens: Structure and immunologic properties*. Ann. Allergy 59, 93-99.
- Ustawa z dnia 22 czerwca 2001 r. o organizmach genetycznie zmodyfikowanych, Dz.U. 2001 nr 76 poz. 811
(<http://isip.sejm.gov.pl/servlet/Search?todo=file&id=WDU20010760811&type=3&name=D20010811Lj.pdf> dostęp 1. listopada 2009r.)
- Van Weemen B., Schuurs A., 1971. *Immunoassay using antigen-enzyme conjugates*. FEBS Letters 15 (3) : 232-6.
- Vieira J., Messing J., 1987. *Production of single-stranded plasmid DNA*. Methods in Enzymology 153, 3-11.
- Windels P., Taverniers I., Depicker A., Van Bockstaele E., De Loose M., 2001. *Characterisation of the Roundup Ready soybean insert*. Eur Food Res Technol 213 : 107 – 112.
- Żółtaszek R., Hanausek M., Kiliańska Z., Walaszek Z., 2008. *Biologiczna rola kwasu D-glukarowego i jego pochodnych; potencjalne zastosowanie w medycynie*. Postepy Hig Med Dosw (62) 451 – 462.