

INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN  
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY W RADZIKOWIE  
ZAKŁAD BIOTECHNOLOGII I CYTOGENETYKI ROŚLIN

**Analiza zawartości białka Cry1Ab w kukurydzy MON810 i jego rozpadu w środowisku,  
jako element badań nad bezpieczeństwem GMO**

**Ewelina Żmijewska**

Autoreferat rozprawy doktorskiej wykonanej pod kierunkiem:

**Prof. dr hab. Janusza Zimnego**

**Dr inż. Anny Linkiewicz**

Recenzenci:

**Prof. dr hab. Stanisław Gawroński**

**Dr hab. Paweł Bereś, prof. nadzwyczajny**

Radzików, 2016 rok

## Spis treści

Wstęp i cel pracy .....	1
Materiały i metody .....	3
Materiały .....	3
Metody .....	3
Wyniki i dyskusja .....	6
Standaryzacja testu ELISA i transformacja wyników .....	6
Analiza zawartości białka Cry1Ab w kukurydzy MON810 i azotu ogólnego w liściach kukurydzy. ....	7
Walidacja metody oznaczania białka Cry1Ab w glebie .....	8
Określenie tempa rozpadu białka Cry1Ab w glebie w warunkach kontrolowanych.....	9
Analiza tempa rozpadu roślinnego białka Cry1Ab w glebie A .....	10
Analiza tempa rozpadu bakteryjnego białka Cry1Ab z preparatu DiPel w glebie A .....	10
Analiza tempa rozpadu roślinnego białka Cry1Ab w glebie B: wyjąłowanej i niewyjąłowanej w warunkach kontrolowanych.....	11
Zastosowanie modelu Shift log do przedstawienia tempa rozpadu białka Cry1Ab w glebie.....	11
Określenie czasu trwania białka w glebie, gdzie uprawiano kukurydzę MON810 .....	12
Wnioski .....	14
Literatura .....	15

## Wstęp i cel pracy

Kukurydza (*Zea mays* L.) jest jednym z najważniejszych i najstarszych gatunków roślin uprawnych. Powierzchnia uprawy kukurydzy w 2015 roku w Polsce wynosiła 1,2 mln ha (GUS, 2016), w krajach UE kukurydza jest uprawiana na powierzchni ok 15,6 mln ha (Eurostat, 2015).

Wielkość i jakość plonu mogą być znacznie ograniczone na skutek występowania szkodników, z których najgroźniejszym w Polsce jest omacnica prosowianka (*Ostrinia nubilalis* Hübner), rząd motyle (Lepidoptera), rodzina *Crambidae* (wachlarzykowate). Od 2009 r. omacnica prosowianka występuje w całym kraju a uszkodzenia w wyniku żerowania jej gąsienic obejmują nawet do 100% roślin. Ochrona chemiczna jest skuteczna tylko zanim larwy zdążą wgryźć się w roślinę. Ponadto z powodu znacznej wysokości roślin w czasie stosowania insektycydów ich aplikacja wymaga specjalistycznego sprzętu. Czynniki te powodują, że omacnica prosowianka jest bardzo trudna do zwalczania, a stosowane pestycydy muszą mieć działanie systemiczne, zaś wykonywane zabiegi są uciążliwe, kosztowne i mało skuteczne.

Jedną z alternatywnych, skutecznych metod w zwalczaniu omacnicy prosowianki jest wykorzystanie zmodyfikowanych genetycznie (GM ang. Genetically Modified) roślin odpornych. Jedną z nich jest kukurydza MON 810, dopuszczona do uprawy w Stanach Zjednoczonych od 1996 roku, a od 1998 w Unii Europejskiej. W 2015 roku kukurydza GM była uprawiana na powierzchni 53,6 milionów hektarów, co stanowiło 29 % powierzchni światowej wszystkich upraw GM (ISAA, 2016). Kukurydza MON810 była uprawiana także w Polsce, w latach 2007-2012, powierzchnia zasiewów zwiększyła się w tym okresie z 300 ha do 4000 ha (<http://www.gmo-compass.org>).

Każda modyfikacja genetyczna przed dopuszczeniem do uprawy musi przejść kompleksową ocenę ryzyka dla środowiska (ERA ang. Environmental Risk Assessment). Dopuszczone będą tylko te rośliny GM, które spełniają wymagania przeprowadzonej oceny ryzyka. Potencjalne zagrożenia zdefiniowane w ERA wymagają po dopuszczeniu do uprawy prowadzenia monitorowania konkretnego przypadku (CSM ang. Case Specific Monitoring), określanego także jako indywidualne i szczegółowe monitorowanie (Dyrektywa 2001/18/WE). Ponadto wymagane jest prowadzenie ogólnego nadzoru środowiska (GS ang. General Surveillance), w celu wychwycenia niezdefiniowanych w ERA, potencjalnie negatywnych skutków dla środowiska. Konkretny system monitorowania musi odpowiadać celom ochrony środowiska, uwzględniając dobór odpowiednich metod, oddziaływanie

z innymi elementami monitorowania, wystandaryzowane dane i ich porównanie. Zgodnie z wytycznymi Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności EFSA (ang. The European Food Safety Authority) istotne jest poznanie oraz ocena skutków uprawy roślin GM w różnych środowiskach i w wieloletniej uprawie.

Transgeniczne białko z kukurydzy MON810 dostaje się do gleby podczas uprawy roślin i wraz z resztkami poźniwnymi, gdzie może wiązać się z kwasami humusowymi i minerałami ilastymi, stając się niedostępnym dla działania mikroorganizmów rozkładających materię organiczną, zachowując przy tym właściwości insektycydu (Saxena i Stotzky, 2001). Kukurydza często uprawiana jest w monokulturze, istnieje więc ryzyko akumulacji białka Cry1Ab w glebie w wyniku wieloletniej uprawy.

Niniejsza praca doktorska jest pierwszym i jedynym opracowaniem, jakie powstało w Polsce, którego celem była analiza zawartości Cry1Ab w różnych tkankach i stadiach rozwojowych kukurydzy, uprawianej w 3 lokalizacjach na terenie Polski, w dwóch kolejnych latach badań, co umożliwiło zbadanie zakresu poziomu zmienności białka Cry1Ab w warunkach Polski. Ocenie poddano standardowo używane metody oznaczania białka Cry1Ab w roślinach i zwalidowano metodę jego oznaczania w glebie. Wykorzystując uprawy kukurydzy zmodyfikowanej genetycznie, prowadzone w ramach zamawianego projektu badawczego PBZ-MNiSW-06/1/2007, który dotyczył środowiskowych i ekonomicznych aspektów dopuszczania uprawy roślin genetycznie zmodyfikowanych w Polsce, określono stężenie białka Cry1Ab w glebie, w której miała miejsce wieloletnia uprawa kukurydzy MON810. Dodatkowo analizie poddano czas i dynamikę rozpadu transgenicznego białka w glebie oraz czynniki je determinujące.

W pracy sformułowano 2 hipotezy badawcze:

- Warunki środowiskowe wpływają na zawartość białka Cry1Ab w kukurydzy MON810 uprawianej w Polsce.
- Białko Cry1Ab akumuluje się w glebie w wyniku wieloletniej uprawy kukurydzy MON810.

## **Materiały i metody**

### **Materiały**

**Materiał roślinny.** Do badań użyto odmiany GM kukurydzy DKC 3421 YieldGard (MON810), jako kontrola służyła odmiana izogeniczna DKC 3420. Badania prowadzono w latach 2009 i 2010. Materiał pochodził z pól z 3 lokalizacji w różnych rejonach Polski-środkowej (Dębówka), południowo-zachodniej (Budziszów) i południowo-wschodniej (Głuchów). Stężenie Cry1Ab oznaczono w korzeniach, łodydze, liściach - górnym i dolnym, pyłku i ziarnie dla 3 stadiów rozwojowych (według skali BBCH): wykształcania się i rozwoju organów wegetatywnych (BBCH 39), kwitnienia (BBCH 65) oraz rozwoju ziarniaków (BBCH 79). W trakcie kwitnienia stężenie białka Cry1Ab oznaczano także w pyłku, a w fazie rozwoju ziarniaków w ziarnie.

**Gleba.** Materiałem wykorzystanym do wykonania walidacji metody oznaczania Cry1Ab w glebie oraz doświadczeń prowadzonych w warunkach kontrolowanych była gleba zebrana z głębokości: 0-30 i 30-60 cm z dwóch różnych lokalizacji.

Do określenia pozostałości Cry1Ab w glebie wykorzystano próby zebrane z Budziszowa i Głuchowa rok po zakończeniu 3-letniej uprawy kukurydzy oraz próby z Głuchowa zebrane w trakcie trwania doświadczenia.

### **Metody**

**Test ELISA.** Do standaryzacji testu ELISA wykorzystano zestawy do oznaczeń jakościowych Envirologix oraz Agdia, w połączeniu z białkami Cry1Ab z 2 firm: Fitzgerald International Industries i Agdia. Do przeprowadzenia analiz ilościowych Cry1Ab w roślinach i glebie wykorzystano Envirologix i Cry1Ab z firmy Fitzgerald International Industries, jako standard białkowy.

**Standaryzacja testu ELISA.** Przetestowano działanie 2 zestawów jakościowych z 2 dostępnymi białkami, przeznaczonymi do użycia w teście ELISA. Porównano 4 kombinacje, gdzie każde z białek zostało nałożone na obie płytki testowe. Na podstawie wyników wykreślono krzywe przedstawiające zależność pomiędzy absorbancją, a stężeniem białek z 2 źródeł na 2 rodzajach płytek testowych.

**Analizy ilościowe stężenia białka Cry1Ab w tkankach roślinnych.** Analizy ilościowe przeprowadzono przy użyciu testu do oznaczeń jakościowych Envirologix, zgodnie

z protokołem producenta, i standardu białkowego Cry1Ab z Fitzgerald Industries. Jako kontrolę negatywną zastosowano liście kukurydzy odmiany izogenicznej (DKC 3420).

**Określenie stężenia azotu ogólnego w liściach kukurydzy.** Oznaczenia poziomu białka w liściach kukurydzy przeprowadzono z użyciem metody Kjeldahla. Do badań zostały użyte liście kukurydzy odmiany izogenicznej DKC 3420 oraz odmiany DKC 3421 YG (3 liść od dołu), zebrane w Głuchowie w 2009 i 2010 roku w fazach BBCH 39, BBCH 65 i BBCH 79.

**Oznaczanie stężenia białka Cry1Ab w glebie.** Poziom białka Cry1Ab w glebie mierzono przy użyciu jakościowego testu Envirologix, zaadaptowanego do analiz ilościowych z użyciem standardu białkowego Fitzgerald Industries. Stężenie białka Cry1Ab w glebie jest podawane w ng/g gleby.

**Walidacja metody oznaczania białka Cry1Ab w glebie.** Parametry walidacyjne określono dla gleby zebranej z głębokości 0-30 i 30-60 cm, z wykorzystaniem bakteryjnego Cry1Ab (Fitzgerald International Industries) i roślinnego (liście MON810). Decyzyjną wartość graniczną ( $CC\alpha$ ) i zdolność wykrywania ( $CC\beta$ ) ustalono zgodnie z Decyzją KE 2002/657/WE. Odzysk białka został wyliczony jako stosunek wykrytego białka Cry1Ab do ilości dodanej, a wartość wyrażono w procentach. Poziom białka Cry1Ab zmierzono testem ELISA.

**Analiza tempa rozpadu bakteryjnego i roślinnego białka Cry1Ab w wyjałowionej glebie A.** Wyjałowioną glebę z warstwy ornej zmieszano z rozdrobnionym materiałem roślinnym (DKC 3421 YG) lub z bioinsektycydem Dipel. Badania prowadzono w warunkach zmiennej temperatury (4 i 15°C) i pH (5 i 7). Poziom białka Cry1Ab zmierzono testem ELISA.

**Analiza tempa rozpadu roślinnego białka Cry1Ab w glebie B niewyjałowionej i wyjałowionej.** Niewyjałowioną i wyjałowioną glebę zebraną z warstwy ornej zmieszano z rozdrobnionym materiałem roślinnym (MON810). W przypadku próbek gleby niewyjałowionej zastosowano wyłącznie czynnik zmiennej temperatury (4 i 15°C), natomiast próbki gleby jałowej inkubowano w temperaturach o wartościach 4 i 15°C oraz pH 5 i 7. Poziom białka Cry1Ab zmierzono testem ELISA.

**Zastosowanie modelu typu shift-log do przedstawienia tempa rozpadu białka.** Do estymacji rozpadu białka Cry1Ab w glebie użyto modelu typu shift-log (Herman i in., 2002). Czas półtrwania ( $DT_{50}$ ) białka Cry1Ab w glebie został wyliczony za pomocą metody

najmniejszych kwadratów w oparciu o wyznaczone parametry funkcji regresji.

**Określenie stężenia białka Cry1Ab w glebie, gdzie uprawiano kukurydzę MON810.**

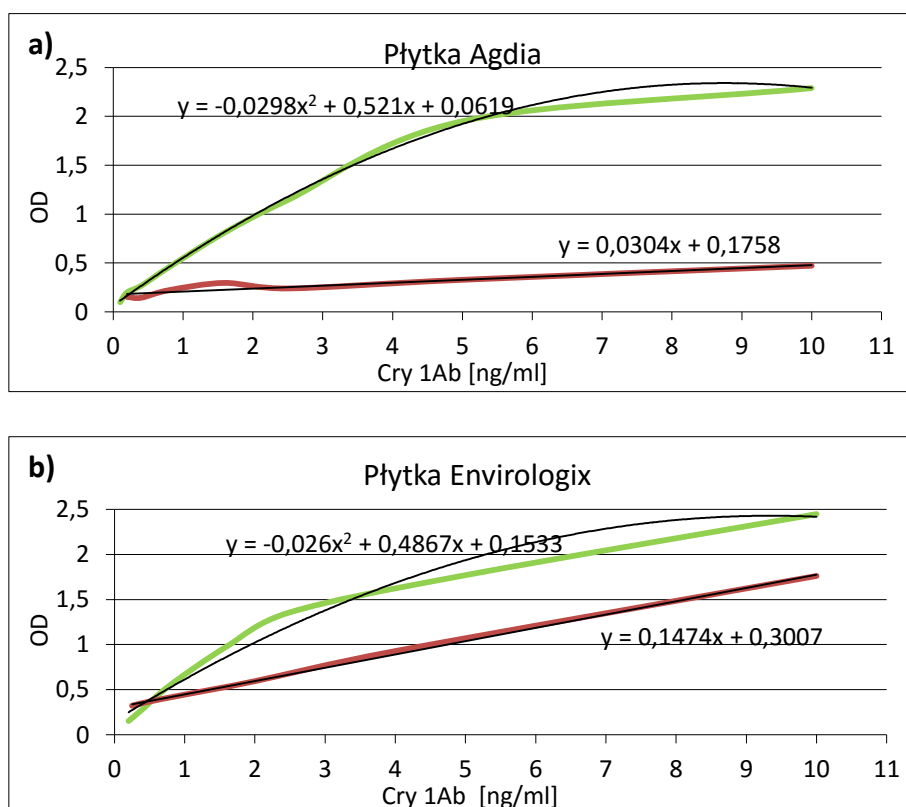
Zawartość białka Cry1Ab w próbie zbiorczej, utworzonej z podpróbek pobranych w sposób reprezentatywny dla danego poletka, oznaczono przy zastosowaniu testu ELISA.

**Analizy statystyczne.** W celu analizy zróżnicowania stężenia białka Cry1Ab w roślinach kukurydzy GM przeprowadzono test F analizy wariancji. Istotność różnic pomiędzy średnimi potwierdzono analizą kontrastów Tukeya. Analizy statystyczne wykonano w programie Statistica (StatSoft, Inc., 2014) oraz w pakiecie R (<http://www.r-cran.org/>). Dla porównania przeciętnych wartości oznaczanych parametrów walidacyjnych użyto testu t-Studenta przeprowadzonego w programie Statistica (StatSoft, Inc., 2014). Porównanie średnich dla wariantów kombinacji zostało przeprowadzone z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji, według modelu stałego. Różnice pomiędzy średnimi obiektowymi analizowano z wykorzystaniem procedury porównań wielokrotnych Tukeya. Wartość wyniku  $p \leq 0,05$  była istotna statystycznie. Analizy przeprowadzono w programie Statistica (StatSoft, Inc., 2014).

## Wyniki i dyskusja

### Standaryzacja testu ELISA i transformacja wyników

Po przeanalizowaniu odczytów absorbancji standardów białkowych na płytkach testowych wykazano, że zależność dla standardów firmy Fitzgerald ma charakter liniowy, o wzorach  $y = 0,0304x + 0,1758$  na płycie Agdii oraz  $y = 0,1474x + 0,3007$  na płycie Envirologix (Rys. 1 a, b). Krzywe ilustrujące wartości standardów Agdii przyjmują funkcję wielomianu o wzorach:  $y = -0,0298x^2 + 0,521x + 0,0619$  na płycie Agdii, a na płycie Envirologix  $y = -0,026x^2 + 0,4867x + 0,1533$  (Rys. 1 a, b). Na obu płytkach testowych odczyty absorbancji były wyższe dla standardów Agdia niż Fitzgerald International Industries. Standardy z firmy Fitzgerald osiągały wyższe OD na płycie Envirologix niż na płycie Agdii dla każdej z wartości standardu. Również standardy Agdia osiągały wyższe OD na płycie z firmy Envirologix, jednak różnica ta była nieduża i zmniejszała się wraz ze wzrostem stężenia białka. Standard Agdia okazał się być bardziej uniwersalnym – zaobserwowano mniejsze różnice w wartości OD pomiędzy zastosowanymi testami w porównaniu do standardu Fitzgerald.



Rys. 1 a-b. Zależności pomiędzy stężeniem białka Cry1Ab i absorbancją dla białek Fitzgerald (linia czerwona) i Agdia (linia zielona) na płytce ELISA firm: a) Agdia i b) Envirologix.



## **Analiza zawartości białka Cry1Ab w kukurydzy MON810 i azotu ogólnego w liściach kukurydzy.**

Uzyskane wyniki dotyczące stężenia białka Cry1Ab w tkankach kukurydzy MON810 potwierdziły wcześniejsze obserwacje (Monsanto, 2002; Nguyen i Jehle, 2007, Szekacs i in., 2010, Habustova i in., 2012), wskazujące że występuje zależność pomiędzy rodzajem analizowanej tkanki, a stężeniem transgenicznego białka. Najwyższe stężenie białka Cry1Ab występuje w liściach: górnym (13,23–29,43  $\mu\text{g/g}$ ) i dolnym (8,94–35,90  $\mu\text{g/g}$ ). Istotnie mniej Cry1Ab oznaczono w: korzeniu (1,52–4,14  $\mu\text{g/g}$ ), łodydze (1,22–3,84  $\mu\text{g/g}$ ), pyłku (1,27–2,59  $\mu\text{g/g}$ ) i ziarnie (0,72–2,58  $\mu\text{g/g}$ ).

Nie wykazano zależności pomiędzy lokalizacją eksperymentu a stężeniem Cry1Ab w badanym materiale. Różnice pomiędzy stężeniem Cry1Ab w różnych fazach rozwojowych odnotowano tylko dla roślin zebranych w Głuchowie, gdzie oznaczono w 2009 w BBCH 39 i BBCH 65 istotnie więcej Cry1Ab w korzeniu, łodydze i liściu dolnym niż w fazie BBCH 79. W 2010 roku różnice były zdecydowanie mniejsze i istotnie więcej Cry1Ab odnotowano tylko w liściu dolnym zebranych w fazach BBCH 39 i BBCH 79, niż w fazie BBCH 65. Przeprowadzone analizy zawartości azotu ogólnego w 2009 roku w liściu dolnym wskazały na obniżenie jego zawartości w fazie BBCH 79, ponad 2-krotne w stosunku do fazy BBCH 65 i blisko 4,8-krotne w stosunku do fazy BBCH 39. Zaobserwowana zależność pozwala na stwierdzenie, że obniżenie zawartości Cry1Ab w roślinach zebranych w fazie dojrzałości mleczej może być związane z obniżoną zawartością azotu ogólnego i wszystkich białek rozpuszczalnych.

Wyniki badań wykazały, że sezon wegetacyjny, w którym przeprowadzane były badania ma wpływ na stężenie Cry1Ab. Istotnie więcej oznaczono Cry1Ab w 2009 niż 2010 roku, zależność ta występowała także dla stężenia azotu ogólnego w liściach, co wskazuje na korelację pomiędzy stężeniem azotu ogólnego, a zawartością białka Cry1Ab w liściach kukurydzy MON810, potwierdza to wyniki uzyskane przez Coviella i in. (2000), oraz Subedi i Ma (2007). Różnice pomiędzy latami badań można tłumaczyć warunkami meteorologicznymi, w roku 2010 była wyższa wilgotność powietrza, co przekłada się na zawartość suchej masy w tkankach roślinnych.

## Walidacja metody oznaczania białka Cry1Ab w glebie

W celu określenia stężenia białka, które może zostać oznaczone w glebie przeprowadzono walidację metody. Decyzyjna wartość graniczna ( $CC\alpha$ ) została ustalona na poziomie 1–2 ng Cry1Ab/g gleby, a zdolność wykrywania ( $CC\beta$ ) jako 1,88–5,23 ng Cry1Ab/g gleby, w zależności od źródła białka i rodzaju gleby. Uzyskane wyniki są zgodne z uzyskanymi przez Gruber i in. (2011), którzy wyznaczyli wartość graniczną na poziomie 2 ng Cry1Ab/g gleby oraz zdolność wykrywania na poziomie 3,1 ng/g gleby (Tab. 1). Jak dotąd powyższe opracowanie było jedynym, zawierającym walidację metody oznaczania Cry1Ab w glebie, przeprowadzonym zgodnie z decyzją Komisji Europejskiej 2002/657/WE.

Odzysk bakteryjnego białka Cry1Ab był wyższy w warstwie ornej (63,19-66,03%) niż podornej (40,46-42,31%), podobnie dla białka roślinnego wyższą wartość odnotowano w glebie pobranej z warstwy ornej (46,85%-59,21%) niż podornej (28,66%-41,07) (Tab. 1). Opisywane różnice nie były istotne statystycznie. Na odzysk białka Cry1Ab nie wpływały znacząco ani rodzaj gleby, ani źródło i stężenie białka Cry1Ab. Wang i in. (2006), uzyskali odzysk białka bakteryjnego z gleby w przedziale 46,2-81,7%, a roślinnego 47,7-82,3%. Podobnie w badaniach Palm i in. (1994), odzysk białka bakteryjnego wahał się w przedziale 27-60%, natomiast dla białka roślinnego 17-70%.

Tab. 1. Decyzyjna wartość graniczna ( $CC\alpha$ ) i zdolność wykrywania ( $CC\beta$ ) [ng Cry1Ab/g<sup>-1</sup>gleby] oraz odzysk [%] bakteryjnego i roślinnego białka Cry1Ab w glebie.

Parametr walidacyjny	Gleba A		Gleba B	
	0-30 cm	30-60 cm	0-30 cm	30-60 cm
$CC\alpha$	2	1	2	1,5
$CC\beta$ (białko bakteryjne)	3,78	2,11	5,23	3,29
$CC\beta$ (białko roślinne)	4,05	1,88	4,41	3,07
Odzysk bakteryjnego Cry1Ab	66,03	40,46	63,19	42,31
Odzysk roślinnego Cry1Ab	46,85	41,07	59,21	28,66

## **Określenie tempa rozpadu białka Cry1Ab w glebie w warunkach kontrolowanych**

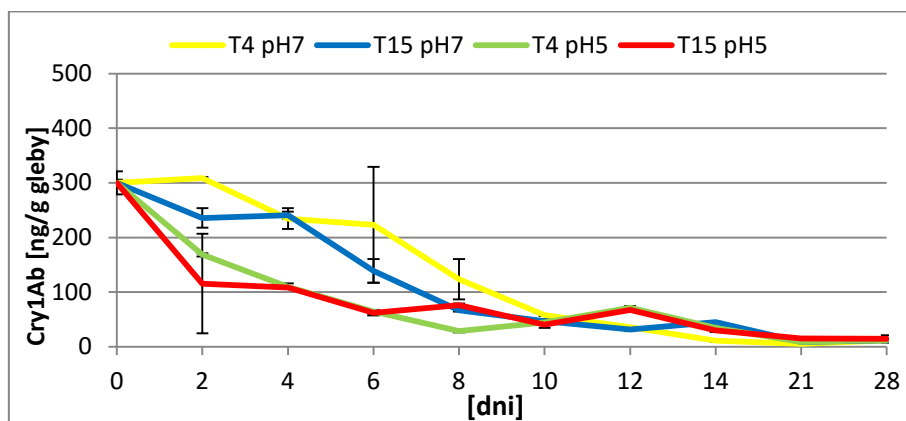
Wykazano, że czas i dynamika rozpadu Cry1Ab były zbliżone w glebie niewyjałowionej i wyjałowionej o odczynie obojętnym przez pierwsze 2 tygodnie trwania eksperymentu. Podobieństwa te sugerują, że działalność mikroorganizmów glebowych nie jest głównym czynnikiem, odpowiedzialnym za rozpad białka Cry1Ab w glebie. Potwierdza to wyniki Helassy i in. (2011), sugerujące, że zahamowanie działania mikroorganizmów nie wpływa na tempo rozpadu Cry1Aa w glebie, wskazując, że czynniki abiotyczne mają nie mniejszy udział w tempie rozpadu białka w glebie niż mikroorganizmy glebowe.

Większe różnice niż pomiędzy glebą niewyjałowioną i wyjałowioną zauważono analizując wpływ czynników abiotycznych. Białko Cry1Ab, zarówno pochodzenia roślinnego, jak i bakteryjnego rozpadało się szybciej w temperaturze 15°C niż 4°C w obu typach gleb. W przypadku gleby niewyjałowionej istotnie więcej roślinnego białka Cry1Ab oznaczono w próbach inkubowanych w 4°C niż w 15°C. Rozbieżności wystąpiły także w trakcie trwania eksperymentu. W próbach inkubowanych w 15°C rozpad białka był bardziej gwałtowny. Analizując tempo rozpadu Cry1Ab w glebie niewyjałowionej za przyczynę szybszego tempa rozpadu w wyższej temperaturze przyjmuje się wzmożoną działalność mikroorganizmów, która jest skorelowana z temperaturą. Jednak w przypadku gleby wyjałowionej przyjmuje się, że powodem różnic w przebiegu procesów fizykochemicznych zależnych od temperatury jest to, że jej wzrost indukuje ekspozycję miejsc hydrofobowych białka. Przy niskiej temperaturze oddziaływanie hydrofobowe jest ograniczone, co przekłada się na brak zmiany struktury białka (Chen i in., 2003, Helassa i in., 2011).

Wpływ pH był obserwowany w obu typach gleby, w których została zahamowana działalność mikroorganizmów, bez względu na stosowaną temperaturę inkubacji. W literaturze są bardzo duże rozbieżności dotyczące wpływu odczynu gleby na procesy związane ze znajdującym się w niej białkiem. Począwszy od stwierdzonego braku istotnego wpływu pH na tempo rozpadu białka Cry1Ab przez Feng i in. (2011), poprzez wyniki Bai i in. (2007), gdzie rozpad białka był wolniejszy w glebie o odczynie kwaśnym ( $\text{pH} < 6,5$ ) niż w neutralnym ( $6,5 < \text{pH} < 7,5$ ) lub alkalicznym ( $6,5 < \text{pH}$ ). Wyniki uzyskane w tej pracy wskazują, że obniżenie odczynu gleby skutkuje wykrywaniem niższych wartości Cry1Ab. Ma to miejsce już 2-go dnia trwania eksperymentu, co może wskazywać na to, że albo mamy do czynienia z bardzo gwałtownym rozpadem białka, albo na skutek zmian fizykochemicznych białka nie jest wychwytywane w teście ELISA.

## Analiza tempa rozpadu roślinnego białka Cry1Ab w glebie A

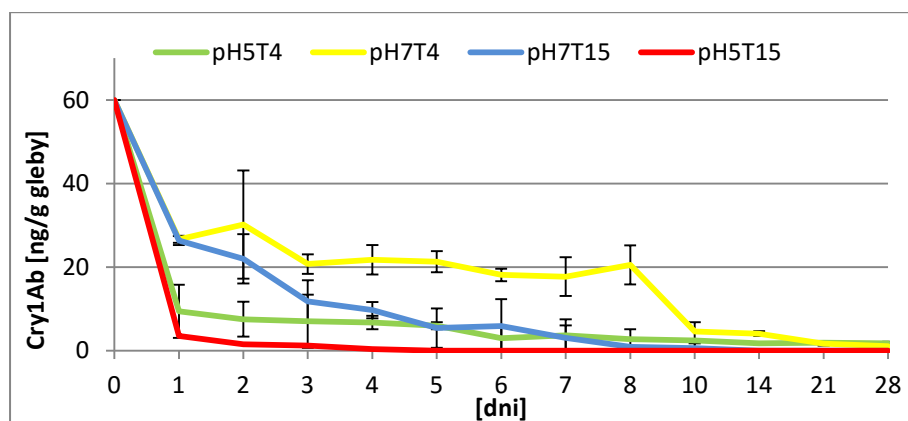
Po 28 dniach trwania eksperymentu nie wykazano istotnych różnic w stężeniu Cry1Ab w glebie. W analizowanych kombinacjach wykryto Cry1Ab w stężeniu od 11,4 ng/g gleby w materiale o odczynie obojętnym, inkubowanym w temperaturze 4°C, do 14,69 ng/g gleby w próbach o odczynie kwaśnym, inkubowanych w temperaturze 15°C (Rys. 2).



Rys. 2. Rozpad roślinnego białka Cry1Ab ( $\pm$  odchylenie standardowe) w wyjałowionej glebie A, inkubowanej w temperaturze 4°C i 15°C oraz pH 5 i 7.

## Analiza tempa rozpadu bakteryjnego białka Cry1Ab z preparatu DiPel w glebie A

Wartości Cry1Ab na poziomie wyższym niż  $CC\beta = 3,78$  ng Cry1Ab/g gleby oznaczono w próbach o pH kwaśnym w temperaturze 4°C Cry1Ab, gdzie wykrywano do 6 dnia. W próbach inkubowanych w 15°C nie wykryto białka 2 dnia. W glebie o pH 5, inkubowanej w 15°C Cry1Ab wykrywano do 6 dnia, a w 4°C oznaczenie było możliwe do 21 dnia (Rys. 3).

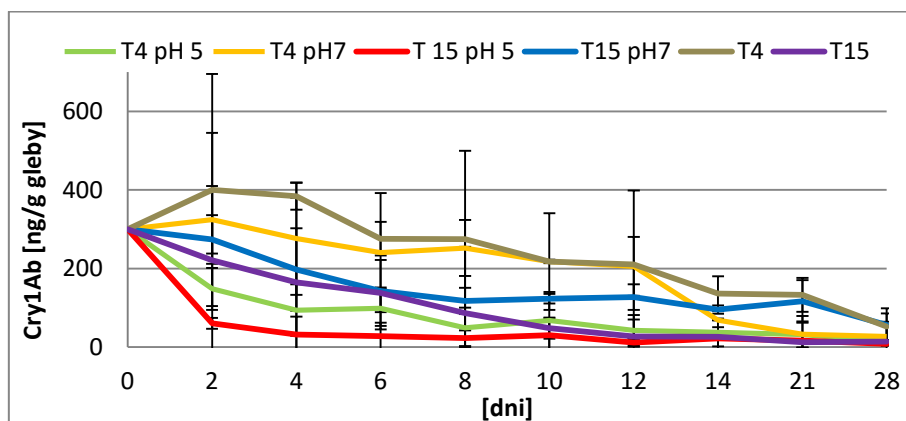


Rys. 3. Rozpad bakteryjnego białka Cry1Ab ( $\pm$  odchylenie standardowe) w wyjałowionej glebie A, inkubowanej w temperaturze 4°C i 15°C oraz pH 5 i 7.

## Analiza tempa rozpadu roślinnego białka Cry1Ab w glebie B: wyjałowionej i niewyjałowionej w warunkach kontrolowanych

Po 28 dniach trwania eksperymentu w glebie niewyjałowionej inkubowanej w 4°C oznaczono blisko 7-krotnie więcej (59,87 ng/g gleby) Cry1Ab niż w próbach inkubowanych w 15°C (8,44 ng/g gleby) (Rys. 4).

Po 28 dniach trwania eksperymentu w glebie wyjałowionej o pH 7, inkubowanej w temperaturze 15°C oznaczono 2-krotnie więcej Cry1Ab (56,43 ng/g gleby), niż w materiale inkubowanym w temperaturze 4°C (26,85 ng/g gleby). W glebie o pH 5, inkubowanej w 4°C oznaczono 3,56 ng/g gleby, a w materiale inkubowanym w temperaturze 15°C oznaczono 8,44 ng/g gleby (Rys. 4).

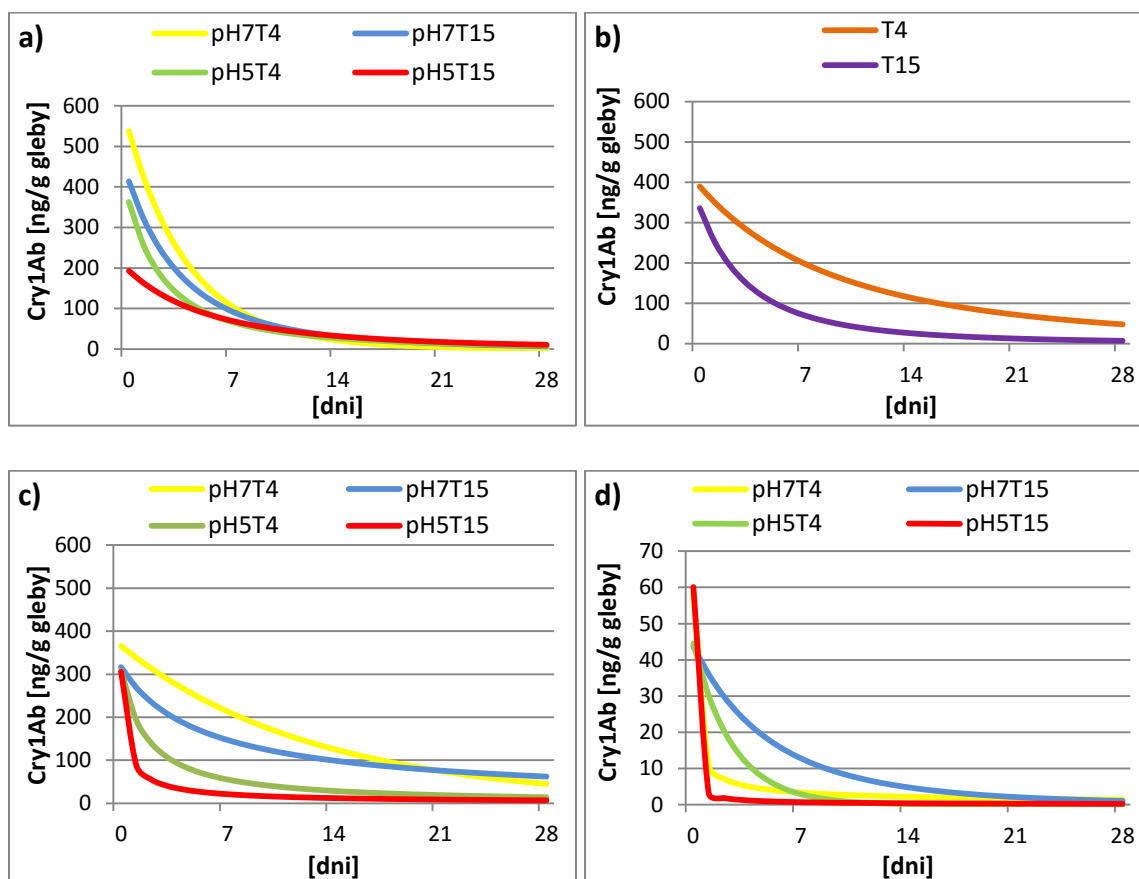


Rys. 4. Rozpad roślinnego białka Cry1Ab w glebie niewyjałowionej (T4 i T15) inkubowanej w temperaturze 4°C i 15°C oraz w glebie wyjałowionej inkubowanej w temperaturze 4°C i 15°C oraz pH 5 i 7 ± odchylenie standardowe.

## Zastosowanie modelu Shift log do przedstawienia tempa rozpadu białka Cry1Ab w glebie

Zastosowany do oceny dynamiki rozpadu Cry1Ab w glebie model typu shift-log pokazał, że rozpad białka ma charakter nieliniowy i jest dwufazowy (Rys. 5). Uzyskany obraz jest zgodny z opisanym przez Herman i in. (2002); Palm i in. (1994); Tapp i Stotzky (1998). Ten 3-parametryczny model cechował się wartością  $R^2$  powyżej 90%. Z jego wykorzystaniem wyznaczono wartości  $DT_{50}$ , czyli okresu półtrwania, który wskazał, że białko degradowało szybciej w glebie niewyjałowionej B w temperaturze 15°C (2,58 dnia) niż 4°C (7,15 dnia). W przypadku białka bakteryjnego najniższą wartość  $DT_{50}$  odnotowano dla materiału

inkubowanego w pH kwaśnym i temperaturze 15°C (0,03 dnia), a najwyższą dla prób inkubowanych w 4°C i pH obojętnym (3,74 dnia). Wartości  $DT_{50}$  wskazują, że roślinne białko Cry1Ab degradowało najszybciej w warunkach kwaśnego pH, w glebie B w temperaturze 15°C (0,38 dnia), najwolniej w temperaturze 4°C i pH obojętnym (9,05 dnia).



Rys. 5. Funkcje rozpadu: a) roślinnego Cry1Ab w wyjąłowionej glebie A, w zależności od temperatury i pH, b) roślinnego Cry1Ab w niewyjąłowionej glebie A w zależności od temperatury c) roślinnego Cry1Ab w wyjąłowionej glebie B, w zależności od temperatury i pH, d) bakteryjnego Cry1Ab w wyjąłowionej glebie A, w zależności od temperatury i pH.

### Określenie czasu trwania białka w glebie, gdzie uprawiano kukurydzę MON810

Wyznaczenie parametrów walidacyjnych zastosowanego systemu pozwoliło na określenie, czy białko Cry1Ab jest obecne w glebie. W wyniku analiz gleby zebranej z głębokości 0-30 i 30-60 cm, z pól doświadczalnych w Głuchowie i Budziszowie w żadnej z zebranych próbek, niezależnie od lokalizacji, terminu zbioru i głębokości pobieranego materiału nie oznaczono białka Cry1Ab w glebie na poziomie powyżej decyzyjnej wartości granicznej  $CCa$ . Wyniki przeprowadzonych badań są zbieżne z uzyskanymi przez Dubelman i in. (2005), którzy nie stwierdzili akumulacji Cry1Ab w wyniku 3-letniej uprawy genetycznie

zmodyfikowanej kukurydzy. Również Gruber i in. (2011) nie stwierdzili akumulacji transgenicznego białka w glebie, w wyniku 9-letniej uprawy kukurydzy MON810. Podobnie w doświadczeniach prowadzonych przez Badea i in. (2010) po 12 tygodniach poziom Cry1Ab był niższy niż limit detekcji (0,1 ng/g gleby). Kontrastujące wyniki przedstawili Hopkins (2005) i Zwahlen i in. (2003), którzy wskazali na obecność białka Cry1Ab w glebie wiosną, w kilka miesięcy po zakończeniu uprawy roślin GM.

Bez wyznaczenia parametrów walidacyjnych danej metody nie można uznać, czy uzyskiwane wartości dla białka Cry1Ab wynikają z błędu zastosowanej metody analitycznej i poniżej jakiej wartości uzyskiwane wyniki są niemiernodajne.

## Wnioski

- 1) Stężenie białka Cry1Ab w kukurydzy MON810 zależy od warunków meteorologicznych w poszczególnych latach uprawy i jest skorelowane z zawartością azotu ogólnego w roślinie.
- 2) Na trwałość białka Cry1Ab w glebie wpływ mają zarówno czynniki biotyczne, jak i abiotyczne. Czas półtrwania białka Cry1Ab ( $DT_{50}$ ) w badanych typach gleb wskazywał, że działalność mikroorganizmów, zakwaszenie gleb i inkubacja w wyższej temperaturze skutkują szybszą degradacją białka pochodzenia roślinnego, jak również bakteryjnego.
- 3) Dla zobrazowania wyników dynamiki rozpadu białka Cry1Ab w glebie w warunkach kontrolowanych zasadne jest zastosowanie trójparametrycznego modelu typu shift-log, na co wskazuje współczynnik determinacji ( $R^2 > 90\%$ ).
- 4) Wyznaczenie parametrów walidacyjnych (decyzyjnej wartości granicznej i zdolności wykrywania) oraz określenie odzysku białka z badanej matrycy jest konieczne do określenia, jakie najniższe stężenia białka w glebie można wykryć z użyciem danej metody i jaka część białka nie jest odzyskiwana ze 100% wydajnością- nie jest wykrywana w teście ELISA.
- 5) Nie stwierdzono obecności białka Cry1Ab w glebie, w której uprawiano kukurydzę MON810 przez 3 i 4 lata, co dowodzi braku akumulacji białka Cry1Ab w warunkach uprawy w Polsce, w badanych typach gleb.
- 6) Zastosowanie określonego zestawu do oznaczania białka Cry1Ab w połączeniu z konkretnym standardem białkowym wpływa na wynik oznaczanego białka w materiale. Zestaw Envirologix QualiPlate Cry1Ab/Cry1Ac w połączeniu ze standardem białkowym z firmy Agdia może być polecany do oznaczeń ilościowych Cry1Ab po uprzedniej standaryzacji metody.

Uzyskane wyniki potwierdzają hipotezę, że warunki środowiskowe wpływają na zawartość białka Cry1Ab w kukurydzy MON810 uprawianej w Polsce i pozwalają na odrzucenie hipotezy, że białko Cry1Ab akumuluje się w glebie w wyniku wieloletniej uprawy kukurydzy MON810.



## Literatura

- Badea E. M., Chelu F., Lacatusu A. 2010. Results regarding the levels of Cry1Ab protein in transgenic corn tissue (MON810) and the fate of Bt protein in three soil types. *Romanian Biotechnological Letters* 15 (1): 55–62.
- Bai Y., Ming-xing J., Jia-an Ch. 2007. Impacts of Environmental Factors on Degradation of Cry 1 Ab Insecticidal Protein in Leaf-Blade Powders of Transgenic Bt Rice. *Agricultural Sciences in China* 6 (2): 167–74.
- Chen W. Y., Huang H. M., Lin C. C., Lin F., Yi Chan Y. C. 2003. Effect of temperature on hydrophobic interaction between proteins and hydrophobic adsorbents: studies by isothermal titration calorimetry and the van't Hoff equation. *Langmuir* 19 (22): 9395-9403.
- Coviella C. E., Morgan D. J. W., Trumble J. T. 2000. Interactions of Elevated CO<sub>2</sub> and Nitrogen Fertilization: Effects on Production of *Bacillus thuringiensis* Toxins in Transgenic Plants. *Environmental Entomology* 29 (4): 781–87.
- Dubelman S., Ayden B. R., Bader B. M., Brown C. R., Jiang C., Vlachos D. 2005. Cry1Ab protein does not persist in soil after 3 years of sustained Bt corn use. *Environmental Entomology* 34 (4): 915–921.
- Feng Y., Ling L., Fan H., Liu Y., Tan F., Shu Y., Wang J. 2011. Effects of temperature, water content and pH on degradation of Cry1Ab protein released from Bt corn straw in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 43 (7): 1600–1606.
- Gruber H., Paul V., Meyer H. H. D., Müller M. 2011. Determination of Insecticidal Cry1Ab Protein in Soil Collected in the Final Growing Seasons of a Nine-Year Field Trial of Bt-Maize MON810. *Transgenic Research* 21 (1): 77–88.
- Habuřtová O., Doležal P., Spitzer L., Svobodová Z., Hussein H., Sehnal F. 2012. Impact of Cry1Ab Toxin Expression on the Non-Target Insects Dwelling on Maize Plants. *Journal of Applied Entomology* 138 (3): 164–172.
- Helassa N., M'Charek A., Quiquampoix H., Noinville S., Déjardin P., Frutos R., Staunton S. 2011. Effects of physicochemical interactions and microbial activity on the persistence of Cry1Aa Bt (*Bacillus thuringiensis*) toxin in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 43 (5): 1089–1097.

- Herman R. A., Wolt J. D., Halliday W. R. 2002. Rapid Degradation of the Cry1F Insecticidal Crystal Protein in Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (24): 7076–78.
- Hopkins D. W. 2005. Decomposition of residues and loss of the  $\delta$ -endotoxin from transgenic (Bt) corn (*Zea mays* L.) in soil. *Canadian Journal of Soil Science* 85 (1): 19–26.
- Palm C. J., Donegan K., Harris D., Seidler R. J. 1994. Quantification in Soil of *Bacillus Thuringiensis* Var. *Kurstaki*  $\delta$ -Endotoxin from Transgenic Plants. *Molecular Ecology* 3 (2): 145–51.
- Subedi, K. D., Ma. B. L. 2007. Dry Matter and Nitrogen Partitioning Patterns in Bt and Non-Bt Near-Isoline Maize Hybrids. *Crop Science* 47 (3): 1186.
- Székács A., Lauber E., Juracsek J., Darvas B. 2010 a. Cry1Ab toxin production of MON 810 transgenic maize. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29 (1): 182–190.
- Tapp H., G. Stotzky. 1998. Persistence of the insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 30: 471–476.
- Wang H., Ye Q., Wang W., Wu L., Wu W. 2006. Cry1Ab Protein from Bt Transgenic Rice Does Not Residue in Rhizosphere Soil. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 143 (3): 449–455.
- Zwahlen C., Hilbeck A., Gugerli P., Nentwig W. 2003. Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Molecular Ecology* 12 (3): 765–775.

### Wykorzystane akty prawne

- Decyzja Komisji 2002/657/WE z dnia 14 sierpnia 2002 r. wykonująca dyrektywę Rady 96/23/WE dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji (Dz. U. L 221,17/08/2002P. 0008-0036).
- Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady nr 2001/18 z dnia 12 marca 2001 r. w sprawie zamierzonego uwalniania do środowiska naturalnego organizmów zmodyfikowanych genetycznie (Dz. Urz. UE L 106 z 17 kwietnia 2001, s.1; ze zm.).

### Wykorzystane źródła internetowe:

Eurostat. 2015.

[http://ec.europa.eu/eurostat/web/products-datasets/-/apro\\_acs\\_a](http://ec.europa.eu/eurostat/web/products-datasets/-/apro_acs_a)

FAOstat.2014.

<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

<http://www.gmo-compass.org>

ISAAA. 2016.

<http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/16/>).

Monsanto. 2002. Safety assessment of YieldGard insect-protected event MON810.  
[agbios.com/docroot/decdocs/02-269-010.pdf](http://agbios.com/docroot/decdocs/02-269-010.pdf).

Pakiet R

<http://www.r-cran.org/>

StatSoft, Inc., 2014

<http://www.statsoft.com>