

ANALIZA PRISUTNOSTI GENETIČKI MODIFICIRANIH SEKVENCI U SJEMENSKOM MATERIJALU SOJE TIJEKOM ŠESTOGODIŠNJEG RAZDOBLJA (2019.–2024.)

Katarina PANDŽIĆ¹, Vesna GANTNER², Ksenija DUKA¹, G. JUKIĆ¹,
Z. STEINER²

¹Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu
Croatian Agency for Agriculture and Food,

²Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je analizirati trend ispitivanja sjemena soje u razdoblju od 2019. do 2024. godine, s posebnim naglaskom na detekciju genetički modificiranih organizama (GMO). Monitoring je proveden u skladu s nacionalnim zakonodavstvom koje propisuje nultu toleranciju na GMO u sjemenskom materijalu. Uzorci sjemena analizirani su metodom lančane reakcije polimerazom (PCR), kojom je omogućena detekcija karakterističnih genetički modificiranih sekvenci: P-35S, t-NOS, CTP2-CP4-EPSPS, Cry1Ab/Ac, PAT. Izolacija DNA provedena je CTAB metodom, a kvaliteta DNA potvrđena je spektrofotometrijski. Rezultati ukazuju na stalan porast broja analiziranih uzoraka u šestogodišnjem razdoblju. Broj uzoraka rastao je s 519 u 2019. godini (12,72 % ukupnog broja) na 1.327 u 2024. godini (32,52 %). Kumulativna frekvencija ukazuje na postepenu akumulaciju uzoraka tijekom godina, s ukupno 4.081 analiziranih uzoraka do kraja 2024. godine. Ovaj rast pokazuje povećani opseg analize i konzistentnost u provedbi monitoringa. Dobiveni rezultati nisu pokazali prisutnost genetički modificiranih sekvenci ni u jednom uzorku. Ovi nalazi potvrđuju učinkovitost sustava nadzora u sprječavanju prisutnosti GMO-a u sjemenskom materijalu te pridonose očuvanju genetske čistoće i sigurnosti poljoprivredne proizvodnje u Republici Hrvatskoj.

Ključne riječi: GMO, soja, PCR, sjemenski materijal, screening elementi, CTAB, monitoring

UVOD

Samo genetički modificirane linije soje koje su prošle postupak odobravanja od strane nadležnih tijela te im je potvrđena njihova neškodljivost mogu se staviti na tržište (Direktiva 2001/18/EZ). Prema trenutno važećim propisima hrana i hrana za životinje koja sadrži više od 0,9 % GMO-a mora biti propisno označena (Uredba (EZ) 1829/2003) za stavljanje na tržište (Turnbull i sur. 2021.) dok za proizvode koji su dobiveni od životinja hranjenih genetički modificiranom hranom trenutno ne postoji zakonska obveza označavanja. Praćenje i kontrola GMO-a u sjemenu, hrani i hrani za životinje sukladno zakonskim propisima (Zakona o službenim kontrolama koje se provode sukladno propisima o hrani, hrani za životinje, zdravlju i dobrobiti životinja NN 52/21 i Zakonu o genetski modificiranim organizmima NN broj 126/19) sustavno se provodi kroz nacionalni program praćenja ili monitoringa GMO-a na tržištu, a obuhvaća provjeru odobrenja za stavljanje GMO-a na tržište te ispravnost njihova označavanja. Republika Hrvatska uskladila je nacionalno zakonodavstvo sa zakonodavstvom Europske unije i svi odobreni genetički modificirani organizmi na razini EU odobreni su i na tržištu Republike Hrvatske. Najprimjenjivija metoda detekcije GMO je RT-PCR metoda koja omogućuju ne samo kvalitativni odgovor o prisutnosti ili odsutnosti transgenskih linija, već i precizno određivanje sadržaja GMO-a (Salisu i sur. 2017.).

Cilj ovog rada je analizirati trendove u ispitivanju sjemena soje u razdoblju od 2019. do 2024. godine, prikazati ukupan broj provedenih analiza (kumulativnu frekvenciju uzoraka) te utvrditi eventualnu prisutnost genetički modificiranih linija kroz detekciju definiranih probirnih ili „screening“ elemenata.

MATERIJAL I METODE

Monitoring sjemena provodi se kontinuirano svake godine te obuhvaća kontrolu kukuruza, soje i uljane repice. Od 2015. godine, u Republici Hrvatskoj uspostavljen je sustav monitoringa proizvodnje navedenih kultura kroz kontrolu zelene mase tijekom vegetacije. Sukladno nacionalnim propisima, uzgoj genetički modificiranih (GM) kultura u sektoru proizvodnje sjemena nije dopušten, a u sjemenu namijenjenom za stavljanja na tržište kontrolira se kroz postupak certificiranja te sjeme ne smije sadržavati GMO-e (nulta toleranca).

Za detekciju i potvrdu prisutnosti genetički modificiranih organizama (GMO) u hrani i sjemenu primjenjuju se različite metode, pri čemu se najčešće koristi lančana reakcija polimerazom (PCR). Ova metoda omogućuje specifičnu identifikaciju transgenih DNA sekvenci, a u slučaju kvantitativnog pristupa, i određivanje udjela genetički modificirane linije u uzorku (Dong i sur., 2008.).

Uzorci sjemena soje za analizu prikupljeni su u razdoblju od početka 2019. do kraja 2024. godine. Izolacija DNA provedena je prema CTAB protokolu (Lipp i sur., 1999.; Querci i sur., 2004.). Nakon homogenizacije uzoraka, odmjereno je 200 mg radnog uzorka, kojem je dodano 1000 µL CTAB ekstrakcijskog pufera, prethodno zagrijanog

na 65 °C. Nakon postupka liziranja, DNA je pročišćena s 500 µL kloroforma, a nakon centrifugiranja i razdvajanja faza, supernatantu su dodana dva volumena CTAB otopine za precipitaciju. Nakon prvog taloženja, DNA je otopljena u 350 µL otopine NaCl (1,2 M) te dodatno pročišćena s 350 µL kloroforma. U skladu s metodom, provedene su dvije precipitacije, pri čemu je za drugu precipitaciju korišten izopropanol u volumenu od 0,6–1x volumena uzorka. Konačno, pročišćena DNA je isprana sa 70 % etanolom i otopljena u 100 µL sterilne deionizirane vode. Koncentracija i čistoća izolirane DNA određena je pomoću spektrofotometra (BioPhotometer, Eppendorf), mjerenjem apsorbancije pri 260 nm i 280 nm (A260/A280). Svi uzorci DNA korišteni za PCR analizu normalizirani su na koncentraciju od 50 ng/µL.

REZULTATI I RASPRAVA

U Tablici 1. prikazani su podatci o frekvenciji i postotku analiziranih uzoraka sjemenskog materijala soje tijekom šestogodišnjeg razdoblja od 2019. do 2024. godine. Nadalje, tablica uključuje godišnju frekvenciju analiziranih uzoraka, njihov odgovarajući postotak u ukupnom broju analiziranih uzoraka svake godine, kao i kumulativnu frekvenciju i kumulativni postotak.

Tablica 1. Frekvencija i postotak analiziranih uzoraka sjemenskog materijala (soje) u ovisnosti o godini

Table 1 Frequency and percentage of analysed seed material samples (soybeans) depending on the year

Godina uzorkovanja <i>Year of sampling</i>	Frekvencija <i>Frequency</i>	Postotak <i>Percentage</i>	Kumulativna frekvencija <i>Cumulative frequency</i>	Kumulativni postotak <i>Cumulative percentage</i>
2019	519	12.72	519	12.72
2020	539	13.21	1058	25.93
2021	559	13.70	1617	39.62
2022	579	14.19	2196	53.81
2023	558	13.67	2754	67.48
2024	1327	32.52	4081	100.00

Podaci pokazuju rastući trend u broju analiziranih uzoraka od 2019. do 2024. godine. U 2019. godini broj uzoraka bio je 519, što je činilo 12,72 % od ukupno analiziranih uzoraka. Sljedeće godine bilježe konstantan porast broja uzoraka, s postotkom od 13,21 % u 2020., 13,70 % u 2021. i 14,19 % u 2022. godini. Posebno velik porast dogodio se 2024. godine kada je broj uzoraka skočio na 1.327, što predstavlja 32,52 % od ukupnog broja analiziranih uzoraka.

Kumulativna frekvencija prikazuje ukupni broj uzoraka analiziranih do svake godine. Na kraju 2024. godine ukupan broj analiziranih uzoraka iznosio je 4.081, što čini 100 % ukupnih analiziranih uzoraka. Kumulativni postotak raste postupno tijekom godina, a svaka godina doprinosi ukupnoj količini podataka. Porast broja uzoraka od 2019. do 2023. godine ujednačen je, s manjim godišnjim porastima. Ovaj trend sugerira da je proces uzorkovanja bio konzistentan, uz stabilan rast broja prikupljenih i analiziranih uzoraka.

Podaci ukazuju na postupan rast frekvencije i postotka analiziranih uzoraka sjemenskog materijala soje tijekom šestogodišnjeg razdoblja. Prema poslovnim podacima HAPIH-a primijećen je rast broja analiza od 2019. do 2023. godine, uz značajan porast u 2024. godini, što svjedoči o širenju opsega analize. Ovaj postupni porast podataka osigurava čvrstu osnovu za daljnje istraživanje i omogućuje detaljnije razumijevanje trendova i obrazaca u sjemenskom materijalu soje kroz vrijeme. Kumulativni postotci dodatno naglašavaju progresivnu prirodu istraživanja.

Tablica 2. Početnice korištene za detekciju specifičnih dijelova genetskog konstrukta
Table 2 Primers used for the detection of specific parts of the genetic construct

Ciljevi detekcije <i>Detection Objectives</i>	Početnice <i>Primers</i>	Identifikacijska oznaka <i>Identification Code</i>	Referenca <i>Reference</i>
Promotor <i>Promoter</i>	Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter	CaMV P-35S	Online Publication 2010, BVL L 00.00-31, 1998
Terminator <i>Terminator</i>	Nopaline synthase terminator from <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	T-nos	Reiting i sur., 2007
Dijelovi genetskog konstrukta <i>Elements of the genetic construct</i>	CP4 epsps gene from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> type I and II	CTP2-CP4-EPSPS	Grohmann, 2009
Dijelovi genetskog konstrukta <i>Elements of the genetic construct</i>	Cry1Ab/Ac modified genes derived from <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i>	Cry1Ab/Ac	Grohmann i sur, 2015
Dijelovi genetskog konstrukta <i>Elements of the genetic construct</i>	E9 terminator from <i>Pisum sativum</i>	T-E9	Debode i sur, 2017
Dijelovi genetskog konstrukta <i>Elements of the genetic construct</i>	Phosphinothricin N-acetyltransferase gene from bacterium <i>Streptomyces</i> <i>Viridochromogenes</i>	PAT	Debode i sur, 2017

U prvom koraku analize provedena je kvalitativna analiza metodom Real Time PCR („screening“, probir) odnosno detekcija na najčešće elemente koji su karakteristični za većinu modifikacija. Sve reakcije odrađene su na uređaju Applied Biosystems 7300 RealTime PCR. Analiza je provedena pomoću najčešće korištenih početnica P35s i T-nos za umnažanje regulatornih elemenata promotora i terminatora, te početnicama Cry1Ab/Ac, CTP2-CP4-EPSPS, T-E9 i PAT za umnažanje dijelova i mjesta vezivanja unesenog gena za biljnu DNA (Tablica 2.).

Nadalje, tijekom analiziranja uzoraka sjemenskog materijala soje, specifično su tražene genetički modificirane sekvence, uključujući P-35S, t-NOS, CTP2-CP4-EPSPS, Cry1Ab/Ac, PAT. Ove sekvence su karakteristične za genetički modificirane organizme (GMO), a potvrđivanje njihove prisutnosti može ukazivati na to da je soja uzgojena iz genetički modificiranog sjemena ili moguće kontaminacije sa GM sojom u sjemenskom materijalu. Kada bi uzorak bio pozitivan u kvalitativnoj analizi na sekvenci P-35S, t-NOS, CTP2-CP4-EPSPS, Cry1Ab/Ac, PAT daljnja GMO analiza obuhvatila bi dodatne korake identifikacije GM linija i njihovu kvantifikaciju. Najčešće korišteni geni za modificirane biljke su Cry1Ab/Ac (gen iz *Bacillus thuringiensis*) koji detektira Cry toksine koji se koriste za zaštitu biljaka od štetnika i CTP2-CP4-EPSPS gen (gen iz *Agrobacterium tumefaciens*, tip I i II) kojima se postiže otpornost na herbicid glifosat (Grahmann, 2009.).

U cijelom analiziranom šestogodišnjem razdoblju, od 2019. do 2024. godine, genetički modificirane sekvence nisu pronađene niti u jednom uzorku. Ovo također može ukazivati na uspješno praćenje i regulaciju tržišta sjemenskog materijala u Hrvatskoj, s naglaskom na sprječavanje moguće pojave GMO-a na tržištu ili okolišu. Do sad u Hrvatskoj nije izdana niti jedna suglasnost za sijanje ili sadnju genetički modificiranih biljaka za komercijalnu proizvodnju.

ZAKLJUČAK

Provedena analiza uzoraka sjemenskog materijala soje u razdoblju od 2019. do 2024. godine pokazala je konzistentan rast broja analiziranih uzoraka, što ukazuje na sustavno provođenje monitoringa i povećanje obuhvata kontrole. Tijekom šestogodišnjeg razdoblja analizirano je ukupno 4.081 uzoraka, pri čemu je zabilježen značajan porast u 2024. godini, kada je analizirano više od 30 % ukupnih uzoraka. Dobiveni rezultati potvrđuju da je sustav kontrole genetički modificiranih organizama u sjemenskoj proizvodnji učinkovit i da se u ispitivanom razdoblju poštuju propisi o zabrani prisutnosti GMO-a u sjemenskom materijalu. Kontinuirano praćenje i provedba laboratorijskih analiza ključni su za očuvanje sigurnosti i sljedivosti u proizvodnji i distribuciji sjemena, kao i za pravovremeno otkrivanje mogućih nepravilnosti. Ovi podaci snažno upućuju na učinkovitu provedbu zakonodavnog okvira kojim se regulira upotreba i distribucija sjemena, te na odgovoran pristup zaštiti okoliša i potrošača. Nadalje, korištenje pouzdanih molekularnih metoda kao što je Real-Time PCR osigurava visoku razinu osjetljivosti i specifičnosti u detekciji, što ovaj sustav čini

primjerom dobre prakse u kontroli GMO prisutnosti. Ovim istraživanjem potvrđujemo da je hrvatsko tržište slobodno od GM soje.

ANALYSIS OF THE PRESENCE OF GENETICALLY MODIFIED SEQUENCES IN SOYBEAN SEED MATERIAL OVER A SIX-YEAR PERIOD (2019–2024)

SUMMARY

The aim of this study was to analyze the trend in soybean seed testing between 2019 and 2024, with a specific focus on the detection of genetically modified organisms (GMOs). Monitoring was carried out in accordance with national legislation, which mandates zero tolerance for GMOs in seed material. Seed samples were analyzed using polymerase chain reaction (PCR), enabling the detection of characteristic genetically modified sequences: P-35S, t-NOS, CTP2-CP4-EPSPS, Cry1Ab/Ac, and PAT. DNA extraction was performed using the CTAB method, and DNA quality was confirmed spectrophotometrically. The results indicate a steady increase in the number of samples analyzed over the six-year period, from 519 samples in 2019 (12.72% of the total) to 1,327 samples in 2024 (32.52%). The cumulative frequency shows a gradual accumulation of samples over the years, with a total of 4,081 samples analyzed by the end of 2024. This growth reflects an expanded scope of analysis and consistent implementation of the monitoring program. No genetically modified sequences were detected in any of the samples. These findings confirm the effectiveness of the monitoring system in preventing the presence of GMOs in seed material and contribute to the preservation of genetic purity and the safety of agricultural production in the Republic of Croatia.

Keywords: GMO, soybean, PCR, seed material, screening elements, CTAB, monitoring,

LITERATURA-REFERENCES

1. Collection of Official Methods under Article 35 of the German Federal Foods Act. (1998). Screening procedure for the detection of genetically modified DNA sequences in foods by identification of DNA sequences that frequently occur in genetically modified organisms. Food Analysis, L 00.00-31, Beuth, Berlin Koln.

2. Debode, F., Huber, I., Macarthur, R., Rischitor, P.E., Mazzara, M., Herau, V., Sebah, D., Dobnik, D., Broeders, S., Roosens, N.H., Busch, U., Berben, G., Morisset, D., Zel, J. (2017). Inter-laboratory studies for the validation of two singleplex (tE9 and pea lectin) and one duplex (pat/bar) real-time PCR methods for GMO detection. *Food Control*, 73, 452–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.08.022>
3. Direktiva 2001/18/EZ Europskog parlamenta i Vijeća. (2001). O namjernom uvođenju genetski modificiranih organizama u okoliš i o opozivu Direktive Vijeća 90/220/EEZ. Službeni list Europske zajednice, L 106, 17.4.2001., str. 1–39.
4. Dong, W., Yang, L., Xu, S., Xie, Z., & Zhang, D. (2008). A strategy for identifying and quantifying genetically modified organisms (GMOs) in complex food and feed matrices using real-time PCR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 5972–5979. <https://doi.org/10.1021/jf800530m>
5. European Commission. (2003). Uredba (EZ) br. 1829/2003 Europskog parlamenta i Vijeća od 22. rujna 2003. o genetski modificiranoj hrani i hrani za životinje. Službeni list Europske unije, L 268, 18.10.2003., str. 1–23.
6. Grohmann, L., Brunen-Nieweler, C., Nemeth, A., Waiblinger, H.U. (2009). Collaborative trial validation studies of real-time PCR-based GMO screening methods for detection of the bar gene and the ctp2-cp4epsps construct. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8913–8920. <https://doi.org/10.1021/jf900876t>
7. Grohmann, L., Reiting, R., Maede, D., Uhlig, S., Simon, K., Frost, K., Jit Randhawa, G., Zur, K. (2015). Collaborative trial validation of cry1Ab/Ac and Pubi-cry TaqMan-based real-time PCR assays for detection of DNA derived from genetically modified Bt plant products. *Accreditation and Quality Assurance*, 20, 85–96. <https://doi.org/10.1007/s00769-015-1137-5>
8. Lipp, M., Brodmann, P., & Pietsch, K. (1999). Isoelectric focusing of Bt11 maize: A tool for identity testing. *European Food Research and Technology*, 209(2), 100–103. <https://doi.org/10.1007/s002170050434>
9. Querci, M., Van den Eede, G., & Broll, H. (2004). New approaches in GMO detection. *Trends in Food Science & Technology*, 15(10), 471–478. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.07.005>
10. Reiting, R., Broll, H., Waiblinger, H.-U., & Grohmann, L. (2007). Collaborative study of a T-nos real-time PCR method for screening of genetically modified organisms in food products. *Journal of Verbr. Lebensm*, 2, 116–121. <https://doi.org/10.1007/s11483-007-0042-0>
11. Salisu, I. B., Abdullah, N., & Ahmed, Q. A. (2017). PCR-based methods for genetically modified organisms (GMO) detection in foods. *Malaysian Journal of Medical and Biological Research*, 4(1), 1–10.

12. Turnbull, C., Ryder, E., Dallimore, E. J., & Others. (2021). An overview of analytical strategies for the detection of genetically modified organisms in seed and food products. Food Control, 130, 108296.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108296>
13. Zakon o genetski modificiranim organizmima. (2019). Narodne novine, br. 126/19.
14. Zakon o službenim kontrolama koje se provode sukladno propisima o hrani, hrani za životinje, o zdravlju i dobrobiti životinja. (2021). Narodne novine, br. 52/21.

Adresa autora - Authors' address:

Katarina Pandžić, mag. ing.
Ksenija Duka, univ. spec. techn. aliment.
Dr. sc. Goran Jukić,
e-mail: goran.jukic@hapih.hr
Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu
Centar za sjemenarstvo i rasadničarstvo
Usorska 19, Brijest, 31000 Osijek

Prof. dr. sc. Vesna Gantner
Prof. dr. sc. Zvonimir Steiner
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek

Primljeno - Received:

17.03.2025.

Revidirano - Revised:

16.04.2025.

Prihvaćeno - Accepted:

18.04.2025.

