

UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRONOMICE ȘI
MEDICINĂ VETERINARĂ BUCUREȘTI

FACULTATEA DE HORTICULTURĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

*TEHNICI MODERNE DE CARACTERIZARE A
ALIMENTELOR DE ORIGINE VEGETALĂ*

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC,
PROF. UNIV. DR. GHEORGHE CÂMPEANU

DOCTORAND,
CĂTĂLINA MIHAELA VOAIDEȘ

București
2008

Cuprins

PARTEA I. Aspecte teoretice privind legislația, obținerea și metodele de identificare a organismelor modificate genetic.....	7
Introducere.....	7
CAPITOLUL I. Reglementarea introducerii pe piață a organismelor modificate genetic.....	10
1.1. Reglementarea OMG în UE.....	10
1.1.1 Reglementări ale UE referitoare la diseminarea deliberată în mediu a organismelor modificate genetic.....	10
1.1.2. Reglementări ale UE privind etichetarea produselor OMG.....	12
1.1.3. Detectarea OMG.....	16
1.1.4. Mișcarea transfrontalieră a OMG.....	17
1.2. OMG și Organizația Mondială a Sănătății (OMS).....	18
1.3. Reglementarea OMG în România.....	19
1.3.1. Introducerea pe piață a OMG.....	19
1.3.2. Etichetarea produselor care sunt sau conțin OMG.....	21
1.3.3. Detectarea OMG în România.....	22
1.3.4. Mișcarea transfrontalieră a OMG.....	23
CAPITOLUL II. Principii de transformare genetică la plante.....	25
2.1. Transferul genelor la plante prin intermediul vectorilor biologici.....	26
2.1.1. Sistemul <i>Agrobacterium</i>	27
2.1.2. Infiltrarea sub vacuum	32
2.1.3. Virusurile – vectori pentru transferul genelor la plante.....	33
2.2. Transferul direct al genelor la plante.....	34
2.2.1. Transformarea protoplaștilor.....	34
2.2.2. Metoda biolistică.....	35
2.3. Regenerarea plantelor din celule transformate.....	38
2.4. Caracteristicile plantelor de soia modificate genetic.....	42
CAPITOLUL III. Metode de identificare a organismelor modificate genetic...	50
3.1. Metode de identificare bazate pe analiza ADN.....	51
3.1.1. Extracția și purificarea ADN.....	51
3.1.1.a. Extracția cu CTAB și purificarea.....	54
3.1.2. Cuantificarea ADN prin metode spectrofotometrice.....	55
3.1.3. Electroforeza în gel de agaroză.....	56

3.1.4. PCR (The Polymerase Chain Reaction = Reacția de Polimerizare în Lanț).....	56
3.1.4.1. PCR specific ("Nested PCR").....	62
3.1.4.2. Multiplex PCR.....	62
3.1.4.3. Real-time PCR.....	63
3.2. Metode de identificare bazate pe analiza proteinelor.....	66
3.2.1. ELISA.....	66
3.3. Metode spectroscopice de identificare a organismelor modificate genetic.....	68
3.3.1. Spectroscopia în Infraroșu Apropiat (NIR = Near Infrared Spectroscopy).....	68
3.4. Alte metode de identificare a organismelor modificate genetic.....	72
3.4.1. Microcipuri ADN.....	72
3.4.2. Biosenzori.....	74
PARTEA a II-a. Cercetări experimentale privind utilizarea tehnicilor moderne de caracterizare a alimentelor de origine vegetală	
Scopul și obiectivele cercetării.....	79
CAPITOLUL IV. Analiza calitativă și cantitativă a probelor alimentare și nealimentare.....	80
Materiale și metode.....	80
4.1. Probe alimentare utilizate.....	80
4.2. Metode utilizate în experimente.....	82
4.2.1. Extracția ADN	84
4.2.1.1. Extracția ADN prin metoda clasică.....	84
4.2.1.2. Extracția ADN utilizând kit-ul i-Pure™ GMO (Bio-Rad).....	84
4.2.1.3. Extracția ADN utilizând sistemul automat Maxwell®16 (Promega).....	85
4.2.2. Verificarea electroforetică a integrității ADN.....	86
4.2.3. Determinarea spectrofotometrică a purității și a concentrației ADN izolat.....	87
4.2.4. Analiza calitativă a probelor - Reacțiile PCR.....	89
4.2.4.1. Determinarea prezenței genei pentru lectină (genă de referință).....	89
4.2.4.2. Determinarea prezenței promotorului CaMV 35S.....	91
4.2.4.3. Determinarea prezenței terminatorului nos.....	93
4.2.4.4. Reacția PCR specific (Nested PCR).....	95
4.2.5. Analiza cantitativă a probelor – Real-time PCR.....	98

4.2.5.1. Utilizarea kit-ului iQ-Check™ Quanti GMO Soya (Bio-Rad)	99
4.2.5.2. Utilizarea kit-ului RoundUp™ Ready Soya QT (Biotools)...	103
CAPITOLUL V. Rezultate și discuții privind analiza calitativă a probelor alimentare și nealimentare	107
5.1. Extracția ADN	107
5.1.1. Extracția ADN prin metoda clasică	107
5.1.2. Extracția ADN cu kit-ul i-Pure™ GMO (Bio-Rad)	112
5.1.3. Extracția ADN cu sistemul automat Maxwell®16	112
5.2. Determinarea spectrofotometrică a purității și a concentrației ADN izolat	114
5.3. Determinarea prezenței genei pentru lectină utilizând reacția PCR	122
5.4. Determinarea prezenței promotorului CaMV 35S	126
5.5. Determinarea prezenței secvenței terminator nos	136
5.6. Reacția PCR specific (Nested PCR)	144
5.7. Concluzii	151
CAPITOLUL VI. Rezultate și discuții privind analiza cantitativă a probelor alimentare și nealimentare	153
6.1. Rezultatele reacției qRT-PCR, utilizând kit-ul iQ-Check™ Quanti GMO Soya (Bio-Rad)	153
6.1.1. Analiza seriei I de probe	158
6.1.2. Analiza seriei II de probe	166
6.1.3. Analiza seriei III de probe	175
6.1.4. Analiza seriei IV de probe	184
6.1.5. Analiza seriei V de probe	192
6.1.6. Analiza seriei VI de probe	200
6.2. Rezultatele reacției qRT-PCR utilizând kit-ul RoundUp™ Ready Soya QT (Biotools)	209
6.3. Concluzii	220
CAPITOLUL VII. Rezultate și discuții privind percepția organismelor modificate genetic de către consumatorii din România	222
Concluzii	232
Concluzii generale	234
Bibliografie	238
Anexe	254
Lista lucrărilor publicate	257

Introducere

În prezent, majoritatea recoltelor obținute sunt produsul unei intense „domesticiri” a plantelor provenite din starea lor sălbatică originală, de-a lungul unei continue selecții și a unei înmulțiri controlate, pentru a fi mai productive, rezistente la pesticide sau să beneficieze de o calitate mai bună a produselor decât în cazul liniilor anterioare, ancestrale. Aceste schimbări, care au avut loc de-a lungul timpului, încă de la prima plantă cultivată, implică schimbul sau recombinarea caracteristicilor dorite, sau a genelor, datorită unei încrucișări continue în cursul timpului în cadrul speciilor sau între specii îndeaproape înrudite.

În ultimele decenii a devenit posibilă hibridizarea nu numai între specii de plante înrudite, dar și la alte specii îndepărtate taxonomic a căror încrucișare, în condiții naturale, nu este posibilă sau, dacă se realizează, hibridii sunt sterili. Amintim aici ca tehnici folosite în acest scop: tehnica izolării embrionilor, cultura de embrioni *in vivo* și *in vitro*, cultura de ovare, polenizarea și fertilizarea *in vitro*. În plus, prin iradierea semințelor, de exemplu, pot fi obținute mutații utile din punct de vedere practic.

În ciuda utilizării și perfecționării metodelor de hibridizare și selecție naturală, acestea prezintă și o serie de dezavantaje. Un dezavantaj major este acela că, de multe ori, cultivatorii doresc mai degrabă introducerea unei singure caracteristici decât să transfere și să recombine întreg genomul. De asemenea selecția și alegerea unei varietăți stabile este un proces lent.

Aceste neajunsuri par a fi îndepărtate prin aplicarea tehnicilor de recombinare ADN și a tehnicilor de transformare genetică. Termenul “organism modificat genetic ” (OMG) a fost introdus pentru a descrie organismele al căror material genetic a fost modificat într-un mod ce nu poate apărea în natură, în condiții naturale de încrucișare sau recombinare.

Organismul modificat genetic în sine trebuie să fie o unitate biologică, capabilă de a permite introducerea, recombinarea și multiplicarea stabilă a unei informații genetice noi, străine. În ceea ce privește culturile, termenul se referă la plante la care una sau mai multe gene provenite de la specii diferite, au fost introduse, în mod stabil, într-un genom gazdă utilizând tehnici de transfer genetic

și unde, în majoritatea cazurilor, astfel de gene sunt exprimate (transcrise și traduse), rezultând proteine noi, heterologe. Procesul de introducere a genelor într-o specie neînrudită cu organismul care a „furnizat” materialul genetic de interes și funcționarea acestora este cunoscut sub numele de transformare genetică.

Pentru detectarea și cuantificarea organismelor modificate genetic la toate nivelurile lanțului de producție a alimentelor de origine vegetală este necesară existența unor metode analitice optimizate și standardizate. În principiu, metodele de detectare a acestora au ca țintă identificarea ADN străin, ARNm corespunzător acestor gene, proteinele sau noile molecule biologice produse doar de către organismul modificat, ca o consecință directă sau indirectă a funcționării proteinelor transgenice. În prezent, metodele analitice de detectare a OMG se bazează aproape exclusiv pe identificarea ADN transgenic sau a proteinelor transgenice.

Pentru o perioadă lungă de timp, erau posibile doar testele calitative bazate pe reacția PCR sau semi-cantitative, bazate pe tehnica ELISA. Acestea erau capabile doar să precizeze dacă o probă conține sau nu organisme modificate genetic. În schimb, testele cantitative, care pot să ofere informații despre cât organism modificat genetic există într-o probă, sunt o descoperire relativ recentă. De asemenea, doar după descoperirea acestor proceduri a fost posibilă stabilirea și verificarea unor anumite valori limită în conținutul de organisme modificate genetic. Cu toate acestea, chiar și cele mai bune tehnici care există astăzi, pentru analiza calitativă și cantitativă a organismelor modificate genetic, sunt predispuse erorilor.

Astfel, o evaluare cantitativă este posibilă doar dacă poate fi extrasă o cantitate suficientă de ADN din proba analizată. Dacă acest lucru nu este posibil, reacția de amplificare prin PCR nu va oferi rezultate concludente și folositoare.

Pe de altă parte, în anumite cazuri, testele cantitative pot conduce la rezultate foarte variate. Extracția, amestecarea și procesarea introduc și mai multe variabile, care scad precizia testelor respective. Chiar dacă metodele de detectare utilizate sunt standardizate în țările europene, se pot obține rezultate diferite în laboratoare diferite în cazul efectuării aceluiași tip de analiză.

De aceea, orice tip de experiment de cuantificare trebuie să fie precedat de aplicarea și testarea metodelor calitative, mai ales în privința optimizării extracției ADN, în funcție de produsul analizat.

Pornind de la aceste considerente, în cadrul acestei lucrări ne-am propus să evidențiem și să utilizăm tehnici și metode moderne de caracterizare a alimentelor de origine vegetală. În mod particular, experimentele au vizat testarea unor probe alimentare și nealimentare, pe bază de soia, în vederea detectării prezenței organismelor modificate genetic și a cuantificării acestora, atunci când este cazul.