

Metody analiz GMO w bazach danych JRC i EuGenius – jak z nich korzystać

Sławomir Sowa
Laboratorium Kontroli GMO
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB

Metody analiz GMO - cele

1. Wykrywanie GMO
2. **Identyfikacja GMO**
3. Ilościowe oznaczanie

Walidacja metod wykrywania, identyfikacji i ilościowego oznaczania GMO przez EURLGMFF w procesie autoryzacji GMO w UE



GMOs: EU decision-making process explained

GMOs for CULTIVATION (under Regulation 1829/2003)



Walidacja metod!

GMOs for FOOD AND FEED (under Regulation 1829/2003)



Walidacja metod!

EFSAs OPINION



EU countries
MEMBER STATES EXPERTS COMMITTEE
decides by Qualified Majority



EU Commission
DRAFT DECISION

Metody:

- Opracowane przez podmioty wprowadzające GMO na rynek!
- walidowane przez EURLGMFF
- Walidacja oznacza spełnienie minimalnych parametrów działania metod (MPR)
- Walidacja niemożliwa – brak autoryzacji GMO w UE!

Minimalne wymagania parametrów technicznych dla metod GMO

Wyzwania dla opracowania metod wykrywania GMO – spełnienie MPR

Dla metod jakościowych należy zebrać dane potwierdzające spełnienie wymagań w zakresie:

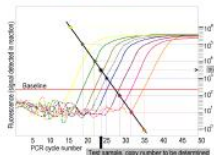
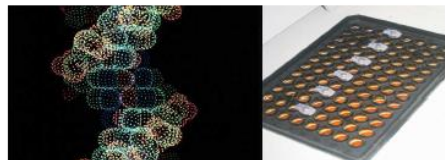
- Zastosowanie
- Praktyczność
- Specyficzność
- Granica wykrywalności (LOD)
- Stabilność (odporność na małe zmiany)

Dla metod ilościowych Rozporządzenie 1829/2003) należy potwierdzić, że metoda spełnia wymagania w zakresie

- Zakres roboczy
- Precyzja
- Wydajność amplifikacji R2 – współczynnik determinacji
- Odchylenie standardowe od powtarzalności (RSDr)
- Granica oznaczalności (LOQ)



JRC TECHNICAL REPORT



Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing

Nowe narzędzia na stronie EURLGMFF

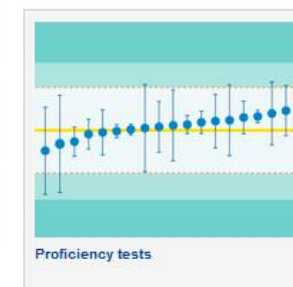
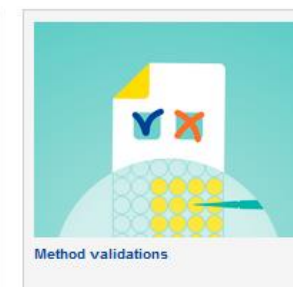
- GMOMETHODS
- GMO-Matrix
- GMO-Amplicons
- <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/>



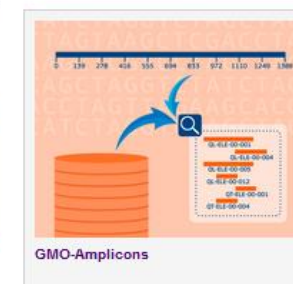
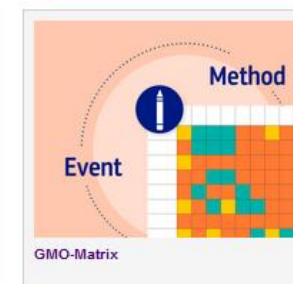
The European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (EURL GMFF) performs the scientific assessment and validation of detection methods for GM Food and Feed as part of the EU authorisation procedure. It also assists National Reference Laboratories (NRL) for GMO control in the EU Member States. The EURL GMFF is supported by the ENGL, the European Network of GMO Laboratories, and hosted by the Joint Research Centre (JRC) of the European Commission.



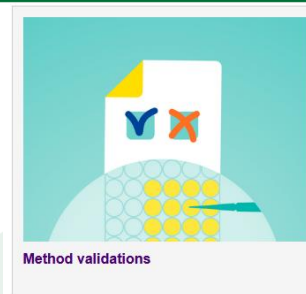
What we do



Tools



Walidacje metod



- Walidacje prowadzone przez EURLGMFF
- Rozporządzenie 1829/2003
- Dyrektywa 2001/18
- <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/method-validations>

European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (EURL GMFF)

Home
What we do ▾
Tools ▾
Our publications
ENGL ▾
National Reference Laboratories
Useful links
Contacts

Home > Method validations

Last update: 20/08/2022

Method validations

The following table provides information on the validation studies conducted by the EURL GMFF in support of applications submitted under Regulation (EC) No 1829/2003. In addition it provides information on former validations performed by the EURL GMFF on methods submitted under Directive 2001/18/EC.

Displaying 1 - 10 of 160 dossiers

EURL code	GMO Legislation	GM event	Organism	Unique ID	Applicant	Status
EURL-VL-02/19	Regulation (EC) No 1829/2003	LBFLFK	oilseed rape	BPS-BFLFK-2	BASF Plant Science	Validation completed
EURL-VL-04/20	Regulation (EC) No 1829/2003	MON 94100	oilseed rape	MON-94100-2	Bayer CropScience	Validation completed
EURL-VL-05/20	Regulation (EC) No 1829/2003	DP915635	maize	DP-915635-4	Pioneer	Step 5 (reporting)
EURL-VL-06/20	Regulation (EC) No 1829/2003	MON 95379	maize	MON-95379-1	Bayer Agriculture BVBA	Step 5 (reporting)
EURL-VL-03/20	Regulation (EC) No 1829/2003	DP4114 x MON 89034 x MON 87411 x DAS-40278-9	maize	DP-004114-3 x MON-89034-3 x MON-87411-9 x DAS-40278-9	Pioneer	Validation completed
EURL-VL-03/18	Regulation (EC) No 1829/2003	MON 87427 x MON 89034 x MON 810 x MIR162 x MON 87411 x MON 87419	maize	MON-87427-7 x MON-89034-3 x MON-00810-6 x SYN-IR162-4 x MON-87411-9 x MON-87419-8	Bayer Agriculture BVBA	Step 5 (reporting)
EURL-VL-01/19	Regulation (EC) No 1829/2003	MON 87427 x MON 89034 x MIR162 x MON 87419 x NK803	maize	MON-87427-7 x MON-89034-3 x SYN-IR162-4 x MON-87419-8 x MON-00803-6	Bayer Agriculture BVBA	Withdrawn
EURL-VL-05/19	Regulation (EC) No 1829/2003	NK803 x T25 x DAS-40278-9	maize	MON-00803-6 x ACS-ZM003-2 x DAS-40278-9	Pioneer	Validation completed
EURL-VL-07/19	Regulation (EC) No 1829/2003	MON 87429	maize	MON-87429-9	Bayer Agriculture BVBA	Validation completed
EURL-VL-07/17	Regulation (EC) No 1829/2003	Bt11 x MIR162 x MIR804 x MON 89034 x 5307 x	maize	SYN-BT011-1 x SYN-IR162-4 x SYN-IR604-5 x	Syngenta	Validation completed

Filter by

GMO Legislation
 ▾

Free text search

GM event
 ▾

Organism
 ▾

Unique ID
 ▾

Applicant
 ▾

Status
 ▾

Publication date

Search

Nieautoryzowane GMO

- Metody wykrywania nieautoryzowanych GMO
- GMO, które było poszukiwane w ramach „nadzwyczajnych środków”
- Nieautoryzowane GMM
- <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/unauthorised-gmos>



The screenshot shows the website of the European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (EURL GMFF). The page is titled "Unauthorised Genetically Modified plants and emergency measures". It features a navigation menu with options like "Home", "What we do", "Tools", "Our publications", "ENGL", "National Reference Laboratories", "Useful links", and "Contacts". The main content area includes a "PAGE CONTENTS" section with links to "Unauthorised Genetically Modified plants and emergency measures" and "Unauthorised Genetically Modified Microorganisms (GMM)". Below this, there is a section titled "Unauthorised Genetically Modified plants and emergency measures" which provides information on detection methods and validations reports for unauthorised GM plants. A list of links follows, including "Bt10 maize", "Bt63 rice", "CDC Trifid flax (FP967)", "E32 maize", "GM pollen DNA in honey", "GM rice from China", "GM wheat", "LLRICE601 rice", and "Oxy-235 Oilseed Rape". Another section titled "Unauthorised Genetically Modified Microorganisms (GMM)" provides information on detection methods for unauthorised GMMs, with links to "GMM protease1" and "GMM protease2".

GMOMETHODS

- Ilościowe
 - Jakościowe
- Specyficzne dla:
- GMO
 - konstrukt genetycznego
 - elementu genetycznego
 - Gatunku

• <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/>



GMOMETHODS

Last update: 06/10/2022

GMOMETHODS provides information on EU reference methods for GMO Analysis.

The tool assists control laboratories in selecting the appropriate methods, supplies core data on the experimental protocol and information on methods performance, ring-trial design, plasmid standards, reference materials and links to published articles or validation reports.

The assays are DNA-based detection methods that have been validated according to the principles and requirements of international standards and can assure therefore consistent and reproducible results in the analysis. Data is retrieved from peer-reviewed journals and final reports of collaborative studies. Few assays have been verified by the EURL GMFF for EU legal purposes.

Perform your search by keyword, select a GMO unique identifier or click a link in the section below.

keyword Search or by GMO unique identifier:

Quantitative methods

- GMO specific
 - Event specific
 - Cotton
 - Maize
 - Oilseed rape
 - Papaya
 - Potato
 - Rice
 - Soybean
 - Sugar beet
 - Construct specific
 - Element specific
 - CaMV 35S promoter (CaMV P-35S)
 - Synthetic cry1A(b) gene (cry1A(b))
 - Phosphinothricin N-acetyltransferase gene (pat)
- Taxon specific
 - Species-specific methods
 - Validated independently
 - Validated in combination

Qualitative methods

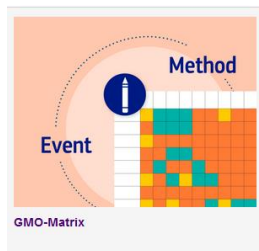
- GMO specific
 - Event specific
 - Carnation
 - E. coli
 - Maize
 - Oilseed rape
 - Papaya
 - Rice
 - Construct specific
 - Element specific
 - CaMV 35S promoter/terminator (CaMV P-35S, CaMV T-35S)
 - CP4-EPSPS gene (CP4-EPSPS)
 - Cry1A genes (Cr1Ab/Ac, Cry1A(b), Cry1Ac)
 - Figwort Mosaic Virus 35S promoter (P-FMV)
 - Neomycin phosphotransferase II gene (nptII)
 - Nopaline synthase promoter/terminator (P-nos, T-nos)
 - Phosphinothricin N-acetyltransferase gene (bar, pat)
 - tE9 terminator (tE9)
- Taxon specific
 - Species-specific methods
 - Validated independently
 - Validated in combination
 - Plant-specific methods

Last update

JRC GMO-Matrix

- GMO-Matrix
- GMO-Event Finder
- Pre-spotted plates

<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmomatrix/>



European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (EURL GMFF)

[Home](#) [What we do](#) [Tools](#) [Our publications](#) [ENGL](#) [National Reference Laboratories](#) [Useful links](#) [Contacts](#)

[Home](#) > [JRC GMO-Matrix](#)

JRC GMO-Matrix

Last update: 06/10/2022

JRC GMO-Matrix compiles *in silico* PCR predictions for GMOs detection.

This function helps control laboratories in designing screening strategies and interpreting the results.

The computer simulations are performed using primers and probe sequences from the GMOMETHODS database and GMOs sequences from the JRC internal database. The latter includes sequences provided by the applicants for authorisation of GMOs or retrieved independently from nucleotide/patent databases. The scripts that simulate PCR amplification use "re-PCR" (Rotmistrovsky et al, 2004) for detecting potential amplicons in GMO sequences and "matcher" from the EMBOSS package (Rice et al. 2000) for verifying probe annealing when the method contains one. The information on the authorisation status of GMOs is automatically extracted on a daily basis from the [Community register of GM food and feed](#).

Please select one of these interfaces:

GMO-Matrix

Assembles two-dimensional matrices (chosen GMO events vs chosen GMO methods) to visualise the analytical coverage of the methods and identify potential gaps in the users screening approach.

GMO-Event finder

Allows identification of potential GMO(s) present in a sample based on a set of detection methods defined by the user and the obtained positive and negative experimental results.

Pre-spotted plates

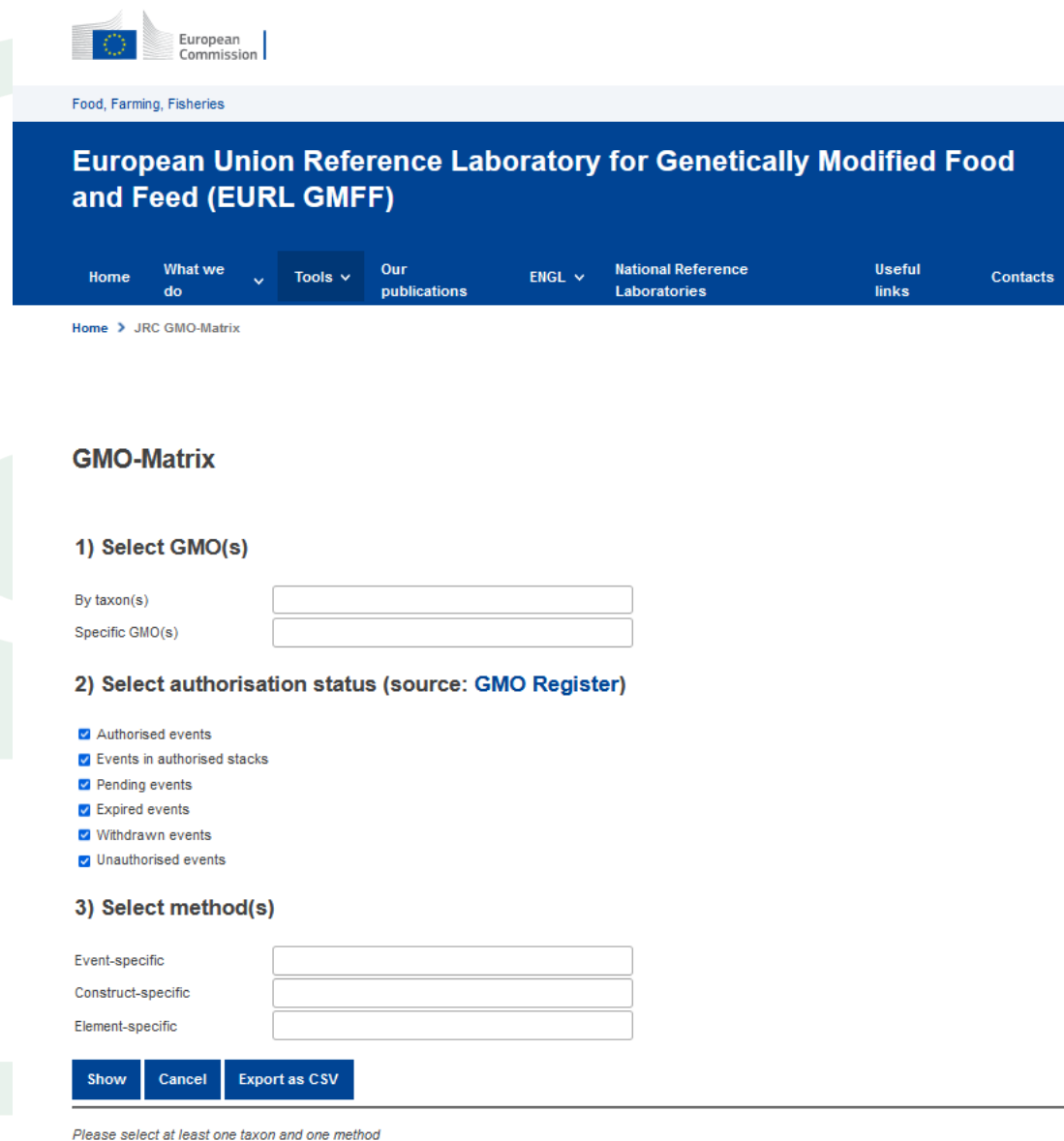
Provides a web-based tool to interpret the results from a ready-to-use, multi-target screening device developed by the JRC known as the Pre-Spotted Plate (PSP). This device allows testing for the presence of multiple GMO-targets in a single PCR experiment.

GMO-Matrix

Macierzowe podejście do wykrywania GMO

- Układ dwuwymiarowej matrycy
(wybrane GMO events vs wybrane metody GMO)
w celu wizualizacji analitycznego pokrycia metod
i zidentyfikowania potencjalnych luk w podejściu
do badań przesiewowych/skriningowych

<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmomatrix/matrices/full>



The screenshot shows the web interface for the GMO-Matrix tool. At the top, there is the European Commission logo and the text 'European Commission'. Below that, the navigation bar includes 'Food, Farming, Fisheries', 'European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (EURL GMFF)', and a menu with 'Home', 'What we do', 'Tools', 'Our publications', 'ENGL', 'National Reference Laboratories', 'Useful links', and 'Contacts'. The breadcrumb trail reads 'Home > JRC GMO-Matrix'. The main heading is 'GMO-Matrix'. The first section, '1) Select GMO(s)', has two input fields: 'By taxon(s)' and 'Specific GMO(s)'. The second section, '2) Select authorisation status (source: GMO Register)', has a list of checkboxes: 'Authorised events', 'Events in authorised stacks', 'Pending events', 'Expired events', 'Withdrawn events', and 'Unauthorised events'. The third section, '3) Select method(s)', has three input fields: 'Event-specific', 'Construct-specific', and 'Element-specific'. At the bottom, there are three buttons: 'Show', 'Cancel', and 'Export as CSV'. A footer note says 'Please select at least one taxon and one method'.

GMO-Event finder

- Umożliwia identyfikację potencjalnych GMO obecnych w próbce w oparciu o zestaw metod wykrywania zdefiniowanych przez użytkownika oraz uzyskane pozytywne i negatywne wyniki doświadczalne
- https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/jrcgmomatrix/matrices/event_finder

European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed (EURL GMFF)

Home | What we do | **Tools** | Our publications | ENGL | National Reference Laboratories | Useful links | Contacts

Home > JRC GMO-Matrix

GMO-Event finder

1) Select taxon(s)

By taxon(s)

2) Select positive method(s)

Event-specific

Construct-specific

Element-specific

3) Select negative method(s)

Event-specific

Construct-specific

Element-specific

4) Select maximum number of events

Please select at least one method

Try an example request:

Pre-spotted plates

- Internetowe narzędzie do interpretacji wyników analiz przy użyciu gotowej płytki PCR, do przesiewowej analizy GMO
- Narzędzie opracowane przez JRC, znane jako Pre-Spotted Plate (PSP).
- Umożliwia wykrywanie obecność wielu sekwencji GMO w jednym eksperymencie PCR

3.3 Plate layout

Figure 2 displays the plate layout that was adopted and ordered for production (Eurogentec, Liège, BE). All 16 methods are contained in two columns and the layout consists of six repeats of the 16 assays. The plate thus allows the analysis of two samples in duplicate plus one negative and one positive control.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HMG	p35S	HMG	p35S	HMG	p35S	HMG	p35S	HMG	p35S	HMG	p35S
B	Lec	bar	Lec	bar	Lec	bar	Lec	bar	Lec	bar	Lec	bar
C	CruA	pat	CruA	pat	CruA	pat	CruA	pat	CruA	pat	CruA	pat
D	Sah7	CTP2-EPSPS	Sah7	CTP2-EPSPS	Sah7	CTP2-EPSPS	Sah7	CTP2-EPSPS	Sah7	CTP2-EPSPS	Sah7	CTP2-EPSPS
E	UGP	CryIAb	UGP	CryIAb	UGP	CryIAb	UGP	CryIAb	UGP	CryIAb	UGP	CryIAb
F	Pld	tNOS	Pld	tNOS	Pld	tNOS	Pld	tNOS	Pld	tNOS	Pld	tNOS
G	Gs	CV127	Gs	CV127	Gs	CV127	Gs	CV127	Gs	CV127	Gs	CV127
H	DAS40278	305423	DAS40278	305423	DAS40278	305423	DAS40278	305423	DAS40278	305423	DAS40278	305423

Figure 2. Layout of the sPSP. In blue, the taxon-specific methods; in purple, the element-specific methods; in yellow and green, the event-specific methods for maize and soybean, respectively.

Pre-spotted plates z 2013 roku – JRC „ Development of a ready-to-use, multi-target screening pre-spotted plate (sPSP) for GMO detection

Pre-spotted plates

The JRC provides pre-spotted plates with element- and construct- specific methods for performing screening analysis and pre-spotted plates with event-specific methods for identifying soybean and maize authorised events. This decision-support system is designed for interpreting the positive (+), negative (-) and inconclusive (?) results of the tests.

1) Select the results of taxon-specific methods

Target	GMOMETHODS Reference	Result
hmg (maize)	QT-TAX-ZM-002	+ - ?
lec (soy)	QT-TAX-GM-002	+ - ?
cruA (rapeseed)	QT-TAX-BN-012	+ - ?
sah7 (cotton)	QT-TAX-GH-016	+ - ?
ugp (potato)	QT-TAX-ST-010	+ - ?
pld (rice)	QT-TAX-OS-017	+ - ?
gs (sugarbeet)	QT-TAX-BV-013	+ - ?

2) Select the results of element-specific methods

Target	GMOMETHODS Reference	Result
p35S	QT-ELE-00-004	+ - ?
tNos	QL-ELE-00-013	+ - ?
CTP2-CP4EPPS	QL-CON-00-008	+ - ?
pat	QT-ELE-00-002	+ - ?
bar	QL-ELE-00-014	+ - ?
cry1Ab/Ac	QL-ELE-00-016	+ - ?

3) Select the results of event-specific methods

Target	GMOMETHODS Reference	Result
DAS40278 (maize)	QT-EVE-ZM-004	+ - ?
CV127 (soybean)	QT-EVE-GM-011	+ - ?
DP-305423 (soybean)	QT-EVE-GM-008	+ - ?

Show Cancel

Overview

[Release 1.9.4](#)

[News on
\(commercialised\)
genome-edited
organisms](#)

EUginus views

[870 GMOs \(incl.
stacks\)](#)

[259 methods](#)

[441 reference
materials](#)

[Genetic elements](#)

[GMO-related websites](#)

[Suggest new GMO](#)
[Give feedback](#)

The European GMO database

EUginus (EUropean GMO INitiative for a Unified Database System) is an initiative of BVL - the Federal Office of Consumer Protection and Food Safety (Berlin, DE) and WFSR - Wageningen Food Safety Research (formerly RIKILT) of Wageningen UR (Wageningen, NL). EUginus' intention is to support competent authorities and private users who seek accurate information genetically modified organisms.

EUginus provides detailed information of major and relevant issues regarding the presence, detection and identification of GMOs:

- with a focus on the situation in the European Union
- as well as world-wide coverage

Since the European Union classifies organisms developed using 'new genomic techniques' (NGTs) into the GMOs, EUginus provides information about commercialised organisms as well as about published ones which present market-relevant traits. Please note that EUginus does not contain an exhaustive list of organisms developed with NGTs and presence of a market-relevant trait does not necessarily imply admission to the market.

<https://www.euginus.eu/euginus/pages/home.jsf>

Free-text search

Here you can perform any free-text keyword search on GMOs and literature. Use * as wildcard if necessary. Search for "gene editing" to find all registered organisms developed using NGTs.

Please also notice the advanced search options which are available below the respective search buttons for both GMOs and literature.

Search term

Search GMO

Search Literature

[advanced
GMO search](#)

[advanced
Literature search](#)



Detection Methods



Click on **Detection methods** to search for PCR-based GMO screening, identification, and quantification methods.

Click on **GMO/method matrix** to find information on the specificity of PCR methods and their ability to detect specific GMOs.

Select methods and relevant GMOs to create a matrix displaying the verification data and visualising the coverage of the detection methods for those GMOs.

Identify gaps and search in the entire pool of methods for methods that enable to those gaps.

Click on **Reference material** to search for GMO-specific reference materials.



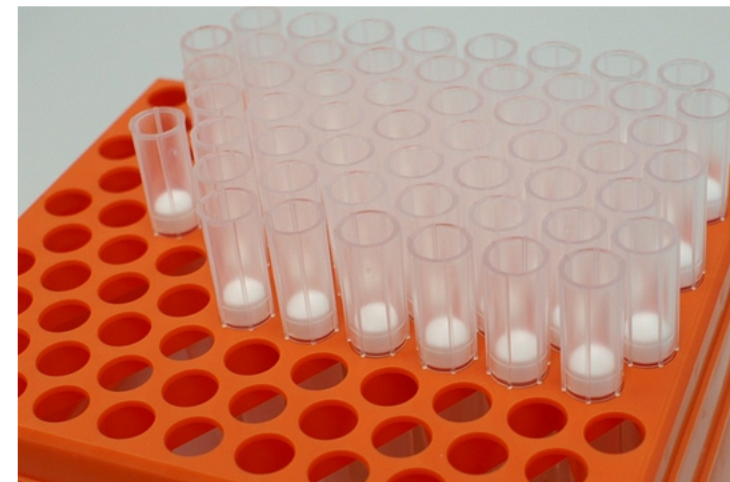
[Detection methods](#)



[GMO/method matrix](#)



[Reference material](#)



https://www.euginius.eu/euginius/pages/detection_index.jsf



PCR methods for GMO detection and identification



All methods for one GMO

Find all methods related to a GMO out of the pool of species, element, construct and event specific methods.

GMO

Search

Reset

Free text search for methods

Find methods using free text search.

Method name, target name but also primer and probe name as well as **primer, probe or amplicon sequences** can be use in this search.

Use * before the search text as a wild card if necessary. At the end of the search text a wildcard is used automatically.

Search term

Search

All methods corresponding to defined criteria

Find methods out of a method set that fulfill your filter criteria.

Entire pool of methods ALL

or select method set SCREENING

ABC



https://www.euginius.eu/euginius/pages/methodSearch_searchview.jsf



GMO analysis tool



This tool is designed to support labs that analyse samples for the presence of GMOs. Based on data you found in your GMO analysis you can use the search module on this page to find additional information on possible GMO targets. The analysis results can be entered by importing a result file (see below and Help file for format instructions) or manually :

Step 1: select detected targets. The chosen method becomes relevant in case the output needs to be filtered for GMOs that have a verified detection method (+3).

Step 2: select target that has been analysed, but not positively detected (= select confirmed negative targets).

If detected targets can be explained by detected events, no further action will be necessary.

If targets are not explained by the detected events, the table **Suggested output** will list GMOs that could explain these targets.

Step 1:

Select species, GMOs and elements that have been detected in a laboratory analysis:

Species:	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>
GMO:	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>
Promoter:	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>
Terminator:	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>
Coding Sequence:	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>
Other elements:	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>
Construct:	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>

Step 2:

Select species, GMOs and elements that have been searched for in a laboratory analysis, but were **NOT** detected:

Species:	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>
GMO:	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>
Promoter:	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>
Terminator:	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>
Coding Sequence:	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>
Other elements:	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>
Construct:	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>

Analyse

Reset

GMO/method matrix

Generate a verification matrix that shows the ability of the selected methods to detect specific GMOs.

The ability of detection is verified experimentally using reference material (+/-3), by sequence alignment (*in silico*) (+/-2) or theoretically according to available information (from application documents, publications, etc.) about potential presence/absence of targets (+/-1).

Select methods for the GMO/method matrix

- Entire pool of methods ALL
- or select method set SCREENING
- ABC

Screening: set restricted to methods for GMO screening (methods for the detection of elements and constructs).

ABC: set of ring-trial validated screening methods (national or ISO standard) methods that is constantly checked and adjusted by the German National Reference Laboratory (NRL) in collaboration with the national network of GMO laboratories (Waiblinger et al. 2010. Anal. Bioanal. Chem. 398: 2065-2072).

Restrict method list by:

Target

selecting more than one target broadens your results

Events	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>
Constructs	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>
Elements	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>
Species	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>

Target type

Validation

Standardisation

<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>
<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>
<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>

Add specific method to the selected set* of methods:

*when no set selected (all), results are restricted to the methods selected here

Method	<input type="text" value="any (select to add to method list)"/>
--------	---

Select GMOs for the GMO/method matrix:

Combining GMOs and species broadens your results

GMO	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>
Species	<input type="text" value="any (select to restrict options)"/>

Exclude stacked events:

Restrict GMO list by: Authorisation status

food	<input checked="" type="checkbox"/> approved	<input checked="" type="checkbox"/> approved with restrictions or phasing out	<input checked="" type="checkbox"/> not approved	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
feed	<input checked="" type="checkbox"/> approved	<input checked="" type="checkbox"/> approved with restrictions or phasing out	<input checked="" type="checkbox"/> not approved	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
cultivation	<input checked="" type="checkbox"/> approved	<input checked="" type="checkbox"/> approved with restrictions or phasing out	<input checked="" type="checkbox"/> not approved	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
other uses	<input checked="" type="checkbox"/> approved	<input checked="" type="checkbox"/> approved with restrictions or phasing out	<input checked="" type="checkbox"/> not approved	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>

Materiały referencyjne

Reference material



Search for reference materials; restrict your search to specific GMOs, species, suppliers, or material type.

If only certified material should be displayed, please mark the selection box.

 A warning symbol indicates that in addition to the particular GMO an adventitious presence of other GMOs has been detected for this reference material.

GMO:

Species:

Source:

Material type:

Certified:



GMO authorisation search



Check the authorisation status of a GMO.

Click on **Search for generic approval** to find information on the approval status of a specific GMO for use in food, for use as feed, for cultivation or for other uses.

Click on **Traffic light search** to filter GMOs by including or excluding characteristics and get information on the legal status of the filtered GMOs. Combine this search with criteria specifying the legal status of the GMOs (traffic light restriction).

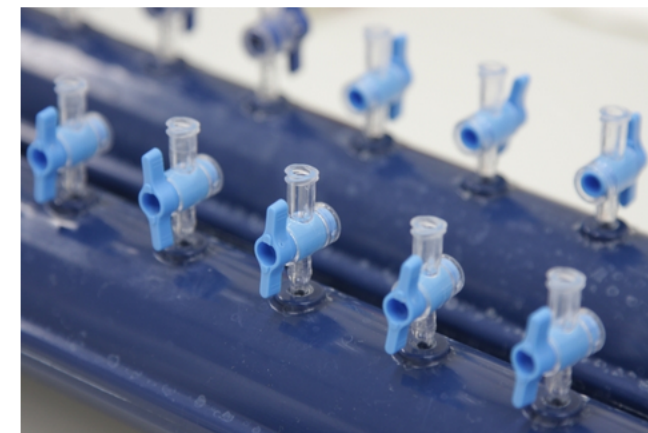
Or perform **free-text search**. Use * before/after search item for wildcard search if necessary. Click on Help for more details on free-text search modality. For technical reasons free-text search is currently limited to GMOs.



[Search for generic approval](#)



[Traffic light search](#)



Search term

Search

https://www.euginius.eu/euginius/pages/authorisation_index.jsf

- Nowe techniki genomowe
- Nowy typ GMO bez DNA pochodzącego z innych gatunków
- Bazy danych zawierają mało danych
- Poza UE mogą być traktowane jako nie-GMO

Edytowanie genomu poprzez kierunkową mutagenezę lub modyfikację

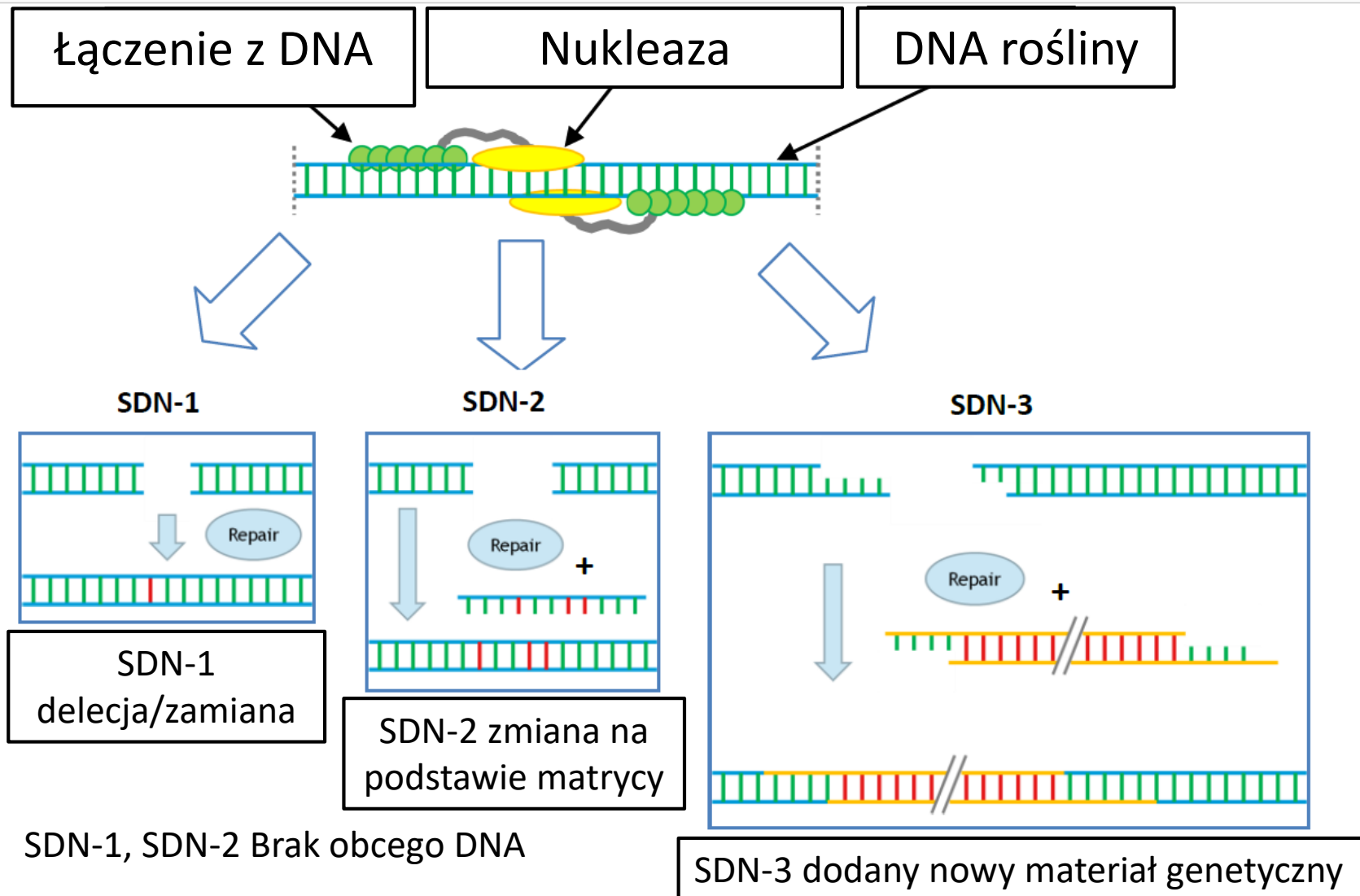
- Miejscowo specyficzne nukleazy oparte o naturalne mechanizmy naprawy DNA (HR, NHEJ)
- ✓ Meganukleazy
- ✓ Nukleazy z motywem palca cynkowego ZFN 1-3
- ✓ Aktywujące transkrypcję nukleazy TALENs
- ✓ Bakteryjny system CRISPR Cas9
- ✓ Prime editing (bez udziału DNA)

- Mutageneza sterowana oligonukleotydami - (ODM)



SDN-1, SDN-2, SDN-3 – różne produkty zastosowania miejscowo specyficznych nukleaz

SDN-1, SDN-2, SDN-3 – produkty miejscowo specyficznych nukleaz



System kontroli i monitorowania GMO w UE

- Opiera się na rozróżnieniu produktów powstałych przy użyciu konwencjonalnych metod hodowli (włączając konwencjonalną mutagenezę) od produktów powstałych przy użyciu technik rekombinowanego DNA (włączając transgenezę).

TSUE w swoim wyroku stwierdził, że

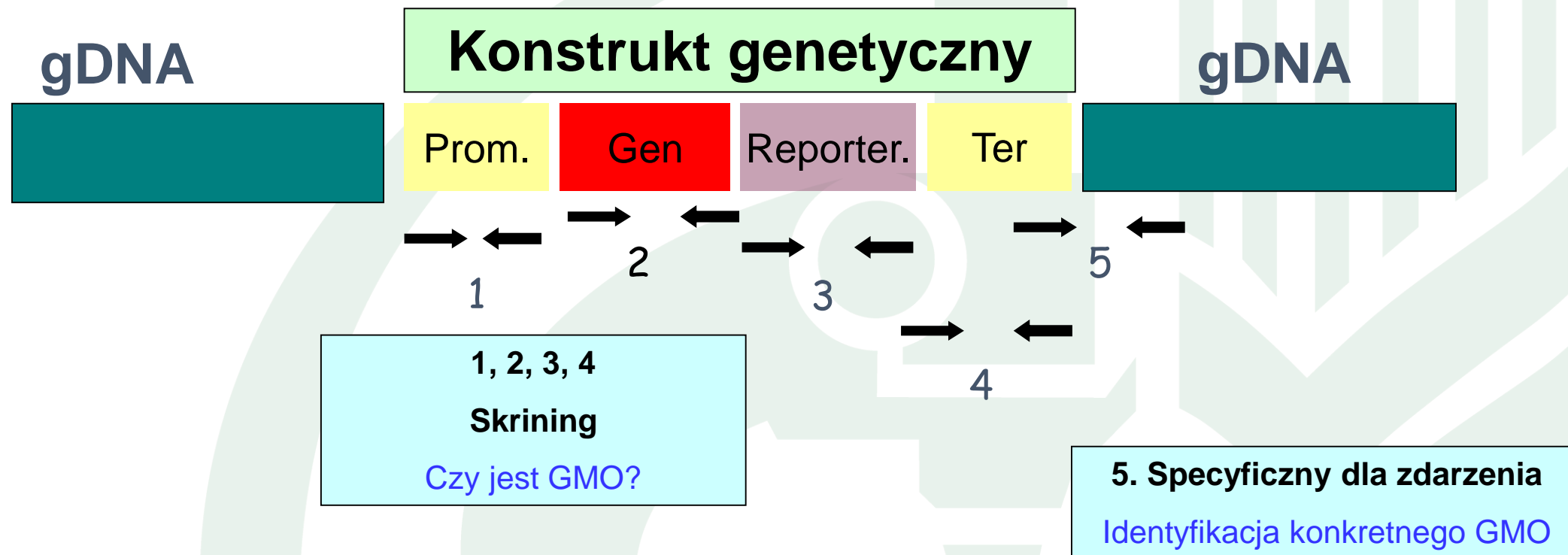
- wykorzystanie metod opartych o konwencjonalną mutagenezę nie prowadzi do uzyskania GMO, podlegających regulacjom prawa GMO.
- Wykorzystanie miejscowo specyficznych nukleaz czyli metod kierunkowej mutagenezy prowadzi do uzyskania GMO podlegającym prawu GMO.

Takie GMO wymagają procesu autoryzacji oraz kontroli obecności na rynku UE.

Pojęcie GMO „event” – zdarzenie modyfikacji genetycznej

- Modyfikacja genetyczna to unikatowa insercja materiału genetycznego
- Identyfikacja opiera się o wykrycie unikatowej sekwencji 70-150 pz
- Zastosowania metod edycji genomu delecja, insercja lub substytucja
- W przypadku krótkich sekwencji trudno mówić o nowym materiale genetycznym - takie same zmiany mogą powstać lub istnieć w naturze.
- Prawdopodobieństwo wystąpienia takiej mutacji rośnie wraz ze zmniejszającym się fragmentem DNA i wzrostem wielkości genomu.
- Nie można wykluczyć, że taka sama mutacja nie powstanie w naturze np. w innym genotypie
- Opracowanie metody wykrycia tej mutacji nie będzie wystarczająco specyficzne aby w sposób jednoznaczny zidentyfikować GMO

Wykrywanie i identyfikacja konwencjonalnych GMO - metody PCR



Każde GMO jest unikatowe – zdarzenie transformacyjne (GMO-event)

Produkty NGT – zwykle nie mają sekwencji skryningowych i nie muszą być unikatowe np. SNP!

Elementy regulatorowe/geny/konstrukty stosowane w analizach skringowych w PIORIN

Metody indywidualne dla każdego elementu genetycznego

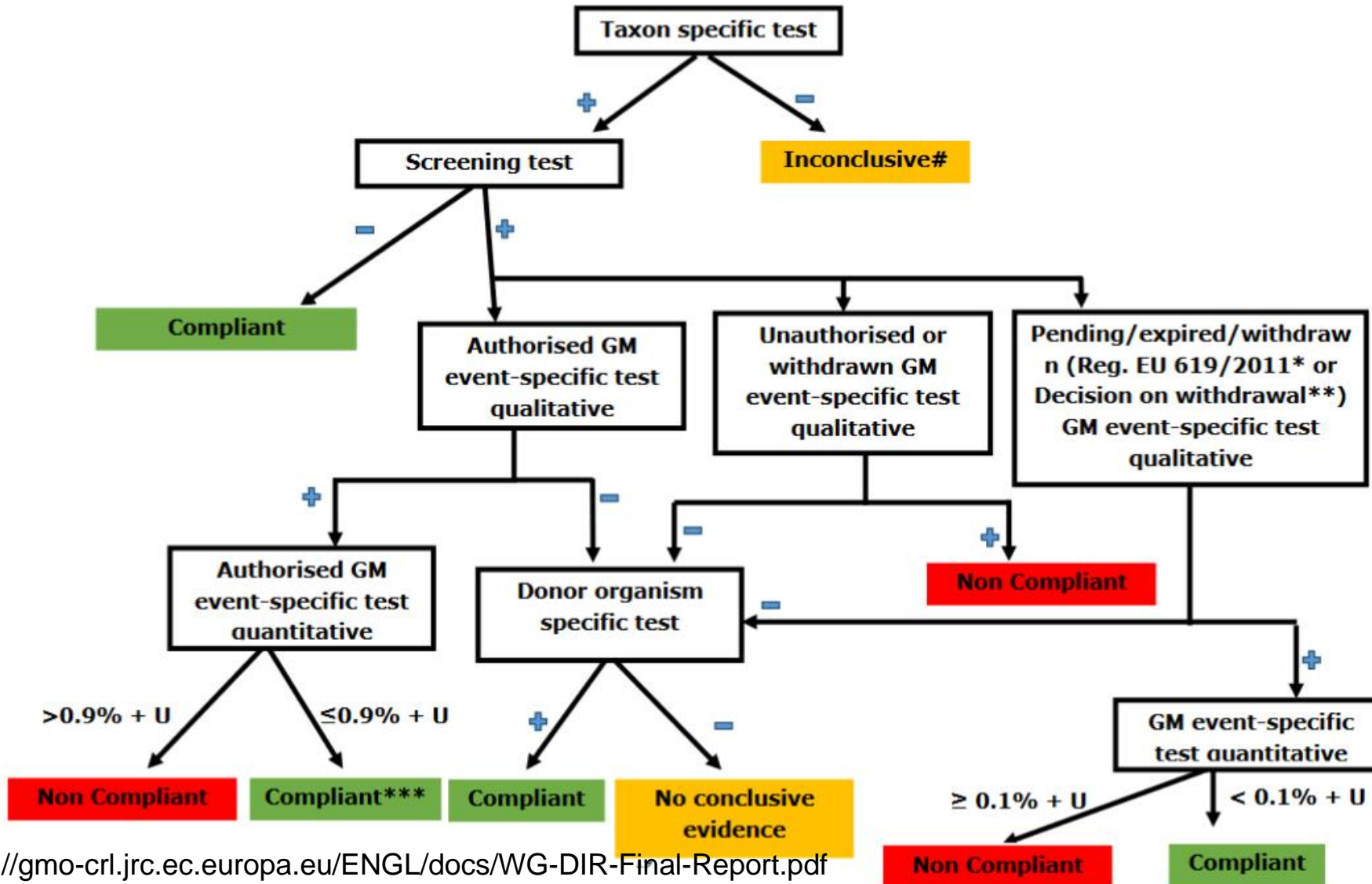
- promotor 35S z wirusa mozaiki kalafiora (CaMV P35S)
- promotor 35S z wirusa mozaiki trędownika (FMV P35S)
- promotor nos z *Agrobacterium tumefaciens* (Pnos)
- terminator nos z *Agrobacterium tumefaciens* (Tnos)
- gen *bar* ze *Streptomyces hygrosopicus*
- gen *barnase* z *Bacillus amyloliquefaciens*
- gen *epsps* z *Agrobacterium tumefaciens*, szczep CP4
- gen *gox* z *Ochrobactrum anthropi*
- gen *pat* ze *Streptomyces viridochromogenes*
- gen *nptII* z *Escherichia coli*
- gen Cry1Ab/Ac
- konstruktor promotor 35S z wirusa mozaiki kalafiora/gen *pat* ze *Streptomyces viridochromogenes* (CaMV P35S/pat)
- konstruktor CTP2-CP4 *epsps*
- konstruktor Pnos/*nptII*
- CaMV

Metoda wykrywania i identyfikacji GMO element autoryzacji GMO w UE.

Walidacja metody – wymagana przy autoryzacji GMO w UE

1. dokładność
2. odtwarzalność
3. powtarzalność
4. czułość
5. precyzja
6. poprawność
7. liniowość
8. granica wykrywalności
9. granica oznaczalności
10. selektywność,
- 11. specyficzność?**
12. zakres roboczy
13. stabilność
14. wydajność amplifikacji
15. niepewność

Wykrywanie autoryzowanych i nieautoryzowanych GMO



Autoryzowane vs nieautoryzowane GMO

- **Cel autoryzacji:** uprawa, żywność, pasze, przetwarzanie,
- **autoryzowane** - legalne wg. konkretnego prawa (EU, USA, Japonia, Australia, Chiny, etc.)
- **nieautoryzowane** – nielegalne wg. konkretnego prawa

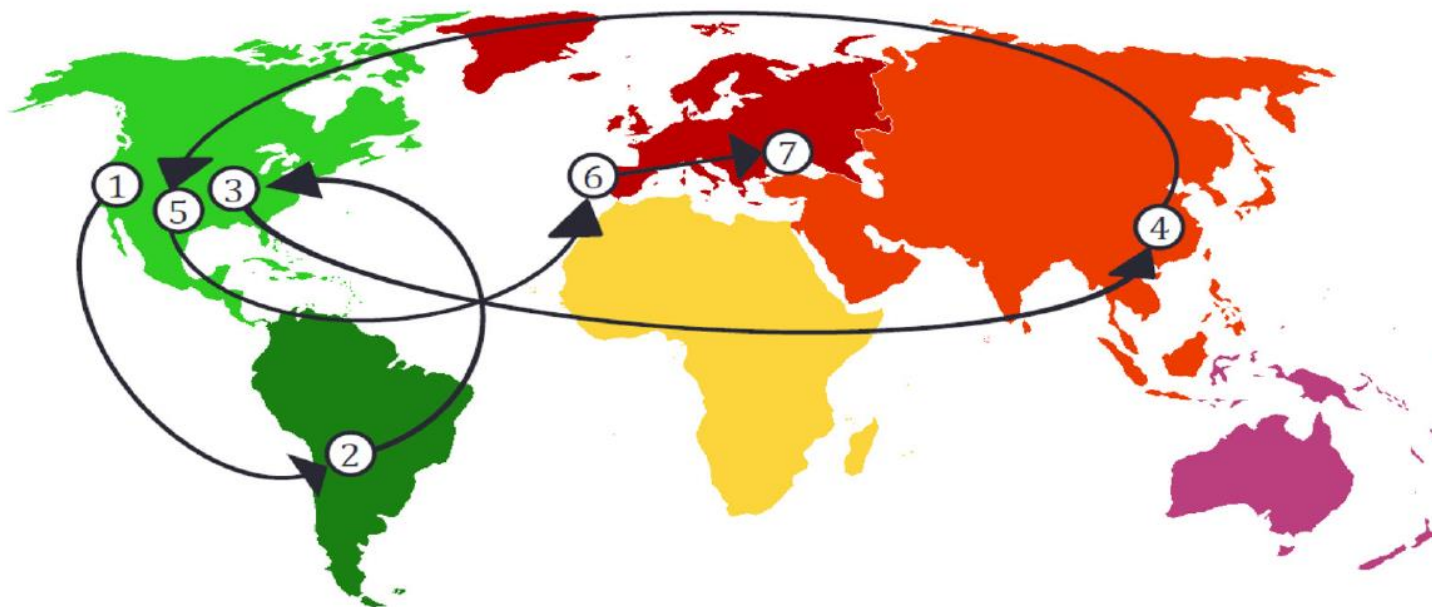
Zwiększone ryzyko

- **asynchroniczna autoryzacja** – (GMOs autoryzowane w jednym kraju ale jeszcze nieautoryzowane w drugim kraju)
- **asymetryczna autoryzacja**- GMO, które nie są przeznaczone na konkretne rynki
- **brak harmonizacji** w klasyfikacji NGT w UE i krajach trzecich

Globalizacja hodowli roślin i produkcji nasion ryzyko domieszek GMO i produktów NGT

Schemat produkcji nasion pomidora:

1. Produkcja nasion w stopniu przed-elitarne,
2. Produkcja nasion w stopniu elitarne,
3. Magazyn nasion,
4. Produkcja nasion kwalifikowanych,
5. Oczyszczanie, uszlachetnianie, pakowanie,
6. Dostawa nasion do głównego magazynu,
7. Dostawa do kraju finalnego przeznaczenia



Metody oparte o PCR

- Każda metoda PCR wymaga znajomości poszukiwanej sekwencji DNA
- Bez informacji o GMO wiarygodna identyfikacja nie jest możliwa
- Metody oparte o PCR pozwalają na wykrywanie i identyfikację z bardzo wysoką czułością i specyficznością
- Pozwalają wykryć organizmy nawet z małymi zmianami (SNP)
- Nie pozwalają odróżnić mutacji powstałych w sposób naturalny od tych generowanych przy użyciu NGT!

Wykrywanie przez sekwencjonowanie

NGS sekwencjonowanie nowej generacji (wysokoprzepustowe)

- wymaga informacji na temat intencjonalnie zmienionych sekwencji DNA
- NGS wykrywanie wielu GMO – kierunkowe sekwencjonowanie
- Sekwencjonowanie całogenomowe mimo coraz niższych kosztów nie ma zastosowania w rutynowym wykrywaniu GMO

Aktualnie prowadzone są prace w celu określenia minimalnych wymagań dla parametrów analiz NGS – Grupa Robocza ENGL/JRC

JRC TECHNICAL REPORTS

Explanatory Note

Challenges for the detection of genetically modified food or feed originating from genome editing

EU Reference Laboratory for Genetically Modified Food & Feed (EURL GMFF)

in consultation with the European Network of GMO Laboratories (ENGL)

Emons, H., Broothaerts, W., Bonfini, L.,
Corbisier, P., Gatto, F., Jacchia, S.,
Mazzara, M., Savini, C.

Do portu w Gdańsku przy pływa statek (20 000 t ziarna kukurydzy)

Hodowca otrzymuje nowy genotyp kukurydzy

- W dokumentach brak informacji o GMO.
- Laboratorium musi stwierdzić czy towar nie zawiera kukurydzy GM
- Analiza skringowa nie wykazuje, sekwencji DNA używanych w konstrukcjach genetycznych, co może wskazywać na brak obecności GMO
- Jednak jeśli zastosowano metody edytowania genomu laboratorium musi stwierdzić
- Czy odmiana powstała w wyniku „naturalnej” hodowli czy mutagenezy?
- Czy zastosowano techniki „konwencjonalnej mutagenezy” czy techniki edytowania genomu?

Możliwości wykrycia i identyfikacji „NGT GMO”

- Przy użyciu konwencjonalnej mutagenезy otrzymano przynajmniej 3281 odmian 175 gatunków roślin (min. kukurydza, ryż, pszenica, jęczmień, soja)
- Te mutacje to SNP, duplikacje, duże delecje.
- W literaturze mało informacji o mutacjach konkretnych genów.
- Dostępne info. nie obejmują wszystkich losowych zmian
- Bez dokładnych informacji nie można odróżnić tych roślin od roślin bez indukowanych mutacji

„FAO/IAEA Mutant Variety Database”

Możliwości wykrycia i identyfikacji „NGT GMO”

Jeśli odmiana kukurydzy została wytworzona przy użyciu mutacji to była to naturalna mutacja czy wynik edytowania genomu?

- Roślin powstałych przy użyciu edytowania genomu nie możemy wykryć stosując metody do wykrywania „konwencjonalnych GMO”

Trzy rodzaje GMO – produktów Nowych technik Genomowych (UE)

1. autoryzowane w UE (zgłoszone)
2. nieautoryzowane w UE, dla których mamy informacje o mutacji
3. nieautoryzowane, dla których informacje o mutacji nie są znane

1. Autoryzowane w UE rośliny - produkty NGT

- Metoda qPCR lub dPCR, materiał referencyjny, walidacja dostępna
- Dla mniejszych mutacji problem ze specyficnością i stabilnością metody
- Wolne od konstruktyw genetycznych

- Problem z ilościowym oznaczeniem jeśli taka sama mutacja jest w naturze

2. Nieautoryzowane w UE, produkty NGT znane informacje o mutacji

- Metoda qPCR lub dPCR może być opracowana na podstawie informacji z baz danych
- Kierunkowe sekwencjonowanie nastawione na prawdopodobnie edytowane sekwencje
- W przypadku małych zmian np. SNV nie będzie można wykryć źródła mutacji.
- Wykryte mutacje >20 pz mogą wskazywać raczej na indukowane niż spontaniczne mutacje.
- Wolne od konstruktyw genetycznych

3. Nieautoryzowane w UE, produkty NGT informacje o mutacji nie są znane

- Bardzo trudne – brak możliwości zaprojektowania PCR
- Screening przez sekwencjonowanie, sekwencjonowanie całogenomowe lub eksomowe najprawdopodobniej nie wykryje takich zmian ze względu na dostępność i kompletność genomów referencyjnych
- W przypadku dużych zmian łatwiejsze ale kosztowne
- Utworzenie baz pan-genomowych dla wielu gatunków bardzo kosztowne, czasochłonne i również niedoskonałe ze względu na dynamiczne zmiany w genomach

Podsumowanie

- W wielu przypadkach konieczne zastosowanie NGS, które jest mniej efektywne od PCR stosowanych do wykrycia konwencjonalnych GMO
- NGS wymaga analizy danych, trwa dłużej niż analiza PCR – problem z odprawą np. statków
- Wyniki często nie spełniają kryteriów określonych w prawie (100 % specyficzność), możliwość ich podważenia
- Trudności w wykryciu w próbkach złożonych
- Problem ze stwierdzeniem, że SNP jest efektem indukowanej mutagenyzy przy użyciu metod edycji genomu
- Problem z implementacją prawa w zakresie znakowania GMO

Wnioski

- W ciągu ostatnich 20 lat powstało wiele nowych techniki hodowli roślin, wywodzących się z biotechnologii.
- Różne modyfikacje (insercje, delecje, mutacje SNP).
- Prawo UE wymaga wykrywania, identyfikacji i oznaczania GMO
- Aktualnie stosowane metody PCR pozwalają na wykrycie produktów NGT ale nie na ich identyfikację
- Potencjalne problemy ilościowym oznaczaniem
- Konieczne opracowanie i walidacja metod qPCR, dPCR, NGS

Rozbieżności w zakresie ewentualnego statusu prawnego dla niektórych NGT są już widoczne co może spowodować duże problemy w handlu międzynarodowym.

Problem z identyfikacją oraz z autoryzacją

Bez harmonizacją prawa problemy będą narastać !

Dziękuję za uwagę

Sławomir Sowa

e-mail: s.sowa@ihar.edu.pl

Radzików

05-870 Błonie

tel. +48 22 733 45 00

NIP: 5290007029

REGON: 000079480

e-mail: postbox@ihar.edu.pl

www.ihar.edu.pl