

УДК 338.439.2:631.523

**РАЗРАБОТКИ ФБУН «УФИМСКИЙ НИИ МЕДИЦИНЫ ТРУДА И ЭКОЛОГИИ
ЧЕЛОВЕКА» В СОВЕРШЕНСТВОВАНИИ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ**

Каримов Д.О.¹, Бакиров А.Б.^{1,2}, Мухаммадиева Г.Ф.¹, Кудояров Э.Р.¹, Каримов Д.Д.¹,
Репина Э.Ф.¹, Ахмадеев А.Р.¹

¹ ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», Уфа, Россия

² ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, Уфа, Россия

Генетически модифицированные организмы (ГМО) являются самой быстро внедряемой технологией в истории современного сельского хозяйства. Выращивание ГМО во многих странах, в том числе и в России, строго регулируется, что требует совершенствования методов их обнаружения и маркировки. На сегодняшний день практически все ГМО были разработаны путем введения в геном трансгенной вставки (т.е. промотора, кодирующей последовательности, терминатора) и основным методом их обнаружения является ПЦР в реальном времени. Однако для создания новых ГМО будут использоваться новые типы генетических элементов. Кроме того, в ближайшем будущем может возрасти присутствие несанкционированных ГМО в образцах продуктов питания и кормов. Чтобы лаборатории могли продолжать выявлять все случаи ГМО и получать представление о возможном присутствии неразрешенных ГМО в образцах продуктов питания и кормов, потребуется интенсивный скрининг. В статье представлены новые подходы к методам обнаружения ГМО в продуктах питания и обзор эволюции ГМО и возникающие вследствие этого новые вопросы.

Ключевые слова: генетически модифицированные организмы, растения, методы определения.

Для цитирования: Каримов Д.О., Бакиров А.Б., Мухаммадиева Г.Ф., Кудояров Э.Р., Каримов Д.Д., Репина Э.Ф., Ахмадеев А.Р. Работа ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» в совершенствовании методов определения генетически модифицированных организмов. 2022;2:7-18.

Для корреспонденции: Каримов Денис Олегович – к.м.н., ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», заведующий отделом токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных; e-mail: karimovdo@gmail.com.

Финансирование: Отраслевая научно-исследовательская программа Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на 2021-2025 гг. «Научное обоснование национальной системы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия, управления рисками здоровью и повышения качества жизни населения России», п. 4.1.2.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2022-10201>

THE CONTRIBUTION OF THE UFA RESEARCH INSTITUTE OF OCCUPATIONAL HEALTH AND HUMAN ECOLOGY TO THE IMPROVEMENT OF TECHNIQUES FOR DETECTING GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS

Karimov D.O.¹, Bakirov A.B.^{1,2}, Mukhammadieva G.F.¹, Kudoyarov E.R.¹, Karimov D.D.¹, Repina E.F.¹, Akhmadeev A.R.¹

¹ Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, Russia

² Bashkirian State Medical University, Ufa, Russia

Genetically modified organisms (GMOs) are the fastest-growing technology in the history of modern agriculture. The cultivation of GMOs in many countries, including Russia, is strictly regulated, which requires improving methods of their detection and labeling. To date, almost all GMOs have been developed by introducing a transgenic insert into the genome (i.e., a promoter, coding sequence, terminator) and the main method of their detection is real-time PCR. However, new types of genetic elements will be used to create new GMOs. In addition, the presence of unauthorized GMOs in food and feed samples may increase in the near future. Intensive screening will be required so that laboratories can continue to identify all cases of GMOs and get an idea of the possible presence of unauthorized GMOs in food and feed samples. The article presents new approaches to the methods of detecting GMOs in food and an overview of the evolution of GMOs and the resulting new issues.

Keywords: *genetically modified organisms, plants, methods of determination.*

Citation: *Karimov D.O., Bakirov A.B., Mukhammadieva G.F., Kudoyarov E.R., Karimov D.D., Repina E.F., Akhmadeev A.R. The contribution of the Ufa research institute of occupational health and human ecology to the improvement of techniques for detecting genetically modified organisms. Occupational Health and Human Ecology. 2022;2:7-18*

Correspondence: *Denis O.Karimov Head of the Department of Toxicology and Genetics with Experimental Clinic of Laboratory Animals; e-mail: karimovdo@gmail.com.*

Financing: *The study had no financial support.*

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*

DOI: <http://dx.doi.org/10.24412/2411-3794-2022-10201>

Коммерциализация биотехнологических или генетически модифицированных (ГМО) культур была начата в 1996 г. С этого момента наблюдался огромный рост площади посевов, что делает биотехнологические культуры самой быстро внедряемой технологией выращивания сельскохозяйственных культур в истории земледелия [1].

Во всем мире существуют различные правила и нормы, регулирующие обращение с ГМО, которые приводят к тому, что некоторые ГМО, одобренные в стране-экспортере, могут импортироваться в другую страну, где статус этих ГМО отличается. Частота таких инцидентов, несомненно, будет возрастать.

Большинство современных ГМО создаются путем вставки конструкции трансгенной ДНК в геном хозяина. Полученный организм будет проявлять новые свойства благодаря тому, что чужеродная последовательность ДНК кодирует новый белок, экспрессируемый в этом растении. Исходя из этих характеристик, в основном были разработаны два типа методов обнаружения ГМО. Первый метод основан на анализе белков, второй – на поиске ДНК [2,3,4,5]. Белковые методы имеют ряд значительных недостатков и практически не используются [3,6].

В настоящее время наиболее часто используются методы на основе амплификации определенного фрагмента ДНК (т. е. методы, специфичные для элементов и конструкций). Но происходит постоянная эволюция методов получения ГМО и методы обнаружения часто за ними не успевают.

ГМО растения, которые были разработаны и коммерциализированы до сих пор, в основном трансформируются с использованием трансгенной вставки. Вставка состоит из регуляторной промоторной области, кодирующей последовательности и терминатора. Промоторные и терминаторные элементы, использованные в первых ГМО, в основном представляли собой промотор 35S вируса мозаики цветной капусты (p35S; [9]) и терминатор нопалинсинтазы *Agrobacteriumtumefaciens* (tNOS; [10]). Признаки также были ограничены генами, придающими устойчивость к гербицидам и насекомым. В последние годы были введены новые регуляторные последовательности [11,12], такие как терминатор 35S вируса мозаики цветной капусты (t35S), промотор вируса мозаики Фигворта (pFMV; [13]), промотор нопалинсинтазы *Agrobacteriumtumefaciens* (pNOS), промотор актина риса (pAct; [14]) и промотор убиквитина кукурузы (pUbiZM; [15]). В ближайшие годы список применяемых генов значительно расширится. Разнообразие используемых трансгенов и видов можно проиллюстрировать следующими примерами. Гавайские исследователи разработали папайю (*Caricarpaaya*), устойчивую к вирусу кольцевой пятнистости папайи [16], которая была коммерциализирована в 1998 году и экспортируется в Канаду с 2003 года. Баклажан (*Solanum melongena* L.) был модифицирован для придания устойчивости к колорадскому жуку (*Leptinotarsa decemlineata* Say; [17]) за счет экспрессии генов кассавы (*Manihot esculenta* Crantz). Есть растения модифицированные для снижения содержания амилазы в крахмале [18], что важно для промышленных целей, таких как производство бумаги и текстиля [19].

Эволюция стратегии скрининга ГМО

Из-за широкого спектра ГМО, как разрешенных, так и неразрешенных, которые присутствуют на мировом и российском рынке, стратегия индивидуальной идентификации становится все менее эффективной. Уже сейчас такие стратегии для идентификации известных последовательностей не рациональны, поскольку это чрезвычайно дорого и занимает много времени. В ближайшее время это станет просто невозможно. Поэтому в большинстве контрольно-надзорных лабораторий разработана стратегия скрининга, при которой минимальный набор ПЦР-тестов (нацеленных на определенные генетические элементы) должен позволить сделать выводы об отсутствии/наличии как можно большего числа ГМ-событий.

На сегодняшний день оптимальная признанная стратегия призвана для обнаружения ГМО с помощью 11 мишеней ПЦР (табл. 1).

Таблица 1
Стратегия скрининга для поиска компонентов ГМО в продуктах питания

Table 1

Screening strategy for searching of GMO components in foods

Обозначение	Название таргетного участка	Фрагмент (bp)	Ссылка
RBCL	Ribulose-1,5-biphosphate carboxylaseoxygenase	95	[21]
Специфичные растительные таксоны			
LEC	Lectin gene of soybean (<i>Glycine max</i> L.)	81	[22]
ADH	Alcohol dehydrogenase I gene from maize (<i>Zea mays</i> L.)	83	[21]
CRU	Cruciferin gene from oilseed rape (<i>Brassica napus</i>)	85	[21]
PLD	Phospholipase D gene from rice (<i>Oryza sativa</i>)	80	[21]
SAD1	Stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene of cotton (<i>Gossypium</i> genus)	107	[23]
GLU3	Glutamine synthetase gene from sugar beet (<i>Beta vulgaris</i>)	118	[8]
Специализированные генетические элементы			
p35S	Promoter of the 35 S cauliflower mosaic virus	75	[7]

tNOS	Terminator of the nopaline synthase gene	69	[7]
pFMV	Promoter of the figworth mosaic virus	79	[24]
pNOS	Promoter of the nopaline synthase gene	75	[24]
t35S	Terminator of the cauliflower mosaic virus	107	[20]
Специфичные ГМО-элементы			
<i>cryIAb/Ac</i>	Gene encoding the <i>Bacillus thuringiensis</i> δ -endotoxin (insect resistance)	73	[20]
<i>cry3Bb</i>	Gene encoding the <i>Bacillus thuringiensis</i> δ -endotoxin (insect resistance)	105	[20]
<i>pat</i>	Phosphinotricin- <i>N</i> -acetyltransferases gene from <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	109	[20]
<i>bar</i>	Phosphinotricin- <i>N</i> -acetyltransferases gene from <i>Streptomyces hygrosopicus</i>	69	[20]
<i>epsps</i>	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene from <i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain CP4	108	[20]
CRT	Reverse transcriptase gene from the cauliflower mosaic virus	94	[20]

Новые способы получения ГМО и связанные с этим проблемы

Пока разработка ГМО идет по пути генетических модификаций путем вставки генетической конструкции из промоутера, целевого гена и терминатора текущие подходы имеют практический смысл, но молекулярно-генетические методы продолжают развиваться и появляются новые способы получения ГМО. Стейкинг генов представляет собой новую проблему для лабораторий по обнаружению ГМО.

В последние годы биотехнологи начали использовать методы редактирования генома, такие как ODM (мутагенез, направленный на олигонуклеотиды), CRISPR/Cas (группированные, регулярно расположенные, короткие палиндромные повторы/CRISPR-ассоциированный белок), TALEN (подобная активатору транскрипции эффекторная нуклеаза) и ZFN (нуклеаза цинковых пальцев), для изменения характеристик организмов, важных для производства продуктов питания и кормов. В настоящее время в Северной Америке коммерциализированы два растения с отредактированным геномом: устойчивый к гербицидам сорт канолы [25] и сорт соевых бобов с модифицированным составом масла [26].

Также нет никакой нормативной базы в отношении сельскохозяйственных культур с отредактированным геномом и даже нет четкого определения для их обозначения и разделения. Отличие от классических видов ГМО заключается в том, что в данном случае встраивается не генетическая конструкция, а редактируется существующий геном. Соответственно, стратегия по обнаружению разных вариантов промоутеров, целевых вставок или терминаторов не имеет никакого смысла. Несмотря на коммерциализацию двух вышеупомянутых культур с отредактированным геномом, США даже не обозначили позицию в отношении регулирования методов редактирования генома. Европейский суд постановил [28], что культуры, модифицированные путем направленного мутагенеза, подпадают под действие Директивы 2001/18/ЕС о выбросе ГМО в окружающую среду [29]. На практике это означает, что сельскохозяйственные культуры с отредактированным геномом регулируются в соответствии с этой Директивой как обычные ГМО [29].

Один из аргументов, выдвигаемых в оправдание регулирования сельскохозяйственных культур с отредактированным геномом, отличного от регулирования ГМО на основе рекомбинантной ДНК, заключается в том, что Директива 2001/18/ЕС требует надзор за ГМО на основе анализа, в то время как методов их идентификации не разработано. Разработка методов аналитической идентификации и количественного определения растений с отредактированным геномом представляется сложным или даже невозможным [30,31,32,33,35,36], однако эти утверждения противоречивы [27,34].

Хочется сделать уточнение, что разработка методов обнаружения зарегистрированных ГМО представляется возможной, когда известны их последовательность и место редактирования генома, соответственно, известно, что нужно искать и что можно к этому региону разработать набор праймеров. Но совершенно иначе стоит вопрос, если редактирование генома не зарегистрировано. В прошлом товары проверялись на наличие несанкционированных ГМО с использованием тестов, которые обнаруживают общие элементы последовательности. Обнаружение растений с

отредактированным геномом – сложная процедура, поскольку они не несут этих общих последовательностей, поэтому неавторизованные культуры с отредактированным геномом не могут быть обнаружены с помощью этих широких методов скрининга [35]. Следует отметить, что это ограничение не относится исключительно к продуктам с отредактированным геномом. Как подробно обсуждалось в отчете ENGL [35] и в других источниках [37,38], нетрудно, используя даже методы рекомбинантной ДНК, разработать ГМО, свободные от общих элементов последовательности. Следовательно, многие такие ГМО были коммерциализированы, вполне возможно, что даже сейчас на рынке есть неутвержденные ГМО, которые не были обнаружены, потому что они не несут никаких общих последовательностей. Таким образом, несанкционированные продукты с отредактированным геномом представляют собой лишь один новый класс несанкционированных генетически модифицированных продуктов, которые не могут быть обнаружены с помощью существующей стратегии скрининга.

Возможные методы обнаружения новых видов ГМО

Возможным вариантом решения проблемы является разработка и обучение программы с элементами искусственного интеллекта к редактированию генома растений. При применении данного метода предполагаются особенно впечатляющие перспективы. Например, подразделение Microsoft — Microsoft Research — разработало алгоритмическое приложение Elevation, которое оказалось способным предсказывать неэффективные замены в человеческом геноме при попытках его редактирования: это позволяет предсказать оптимальные места редактирования участков ДНК и проектирования РНК-носителей для редактирования CRISPR. Этот алгоритм превзошел по эффективности другие алгоритмы CRISPR, при создании которых использовали глубокое обучение.

Создание программы с элементами искусственного интеллекта и ее обучение с помощью известных последовательностей ДНК растений и известных вариантов редактирования генома позволит анализировать результаты полногеномного скрининга или целевых участков у растений или животных. Предполагается дальнейшая активная разработка данного метода исследований при обнаружении ГМО в отделе токсикологии и генетики в ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека».

Участие ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» в разработке новых методов обнаружения ГМО

ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» на протяжении ряда лет разрабатывает новые методы обнаружения ГМО:

1. Методические рекомендации (МР) «Методы идентификации и количественного определения ГМ-кукурузы MON87403, DP4114, MON87411 и ГМ-сои MON87751»;
2. Методические рекомендации (МР) «Методы идентификации и количественного определения ГМ-кукурузы MON87419, MON87427 и ГМ-рапса MS11»;
3. Методические рекомендации (МР) «Методы идентификации и количественного определения ГМ-сои GMB151 и ГМ-рапса DP-073496-4».

Настоящие МР содержат описание методов идентификации и количественного определения событиеспецифичной рекомбинантной ДНК, характерной для уникальных трансформационных событий ГМ-кукурузы MON87403, DP4114, MON87411 и ГМ-сои MON87751, ГМ-кукурузы MON87419, MON87427 и ГМ-рапса MS11, ГМ-сои GMB151 и ГМ-рапса DP-073496-4, ГМ-сои GMB151 и ГМ-рапса DP-073496-4 (ГМ-специфичной ДНК).

Данные методы, основанные на полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (далее – ПЦР-РВ) по технологии TaqMan, могут быть использованы для контроля за ГМО в пищевых продуктах, а также в сырье (семена, зерна и другой материал растительного происхождения). Интерпретация результатов ПЦР-РВ и расчет содержания ГМО основаны на применении относительного анализа по двум калибровочным кривым. МР могут применяться при контроле растительного сырья и пищевых продуктов на наличие ГМО на этапах гигиенической экспертизы, государственной регистрации, закупки, ввоза и реализации в Российской Федерации. МР предназначены для органов и организаций Роспотребнадзора, осуществляющих контроль за качеством и безопасностью продовольственного сырья и пищевых продуктов, в том числе импортируемых в Российскую Федерацию, а также могут быть использованы организациями, аккредитованными в установленном порядке на проведение исследований продовольственного сырья, пищевых продуктов.

Метод выявления компонентов ГМО, не зарегистрированных в Российской Федерации, основан на использовании ПЦР-РВ. Интерпретация результатов ПЦР-РВ и расчет содержания ГМО базируется на применении относительного анализа по двум калибровочным кривым. Идентификация и количественное определение ГМО методом относительного анализа по двум калибровочным кривым включает использование двух независимых систем ПЦР-РВ (реакций, проводимых в отдельных пробирках), каждая из которых имеет специфичные ДНК-праймеры и флуоресцентно-меченные зонды:

- одна ПЦР-система выявляет последовательность области ДНК, специфичной для соответствующего трансформационного события (ГМ-специфичная ДНК);
- другая ПЦР-система выявляет последовательность области ДНК, специфичной для соответствующего вида растения (таксон-специфичная ДНК).

Предел обнаружения метода составляет не менее 0,03% в 200 нг ДНК сои; предел количественного определения метода составляет не менее 0,08% в 200 нг ДНК сои.

Полученные в ходе испытания данные (кривые накопления флуоресцентного сигнала) анализируют по каждому каналу детекции (FAM, JOE) для каждой реакции с использованием программного обеспечения прибора. Результаты интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией на графике зависимости интенсивности флуоресценции от количества циклов, что соответствует значению порогового цикла C_t для каждой реакции. Калибровочная кривая представляет собой линию линейной регрессии зависимости пороговых циклов C_t калибровочных точек от значений логарифма количества копий генома сои в растворах, которая может быть построена с помощью электронных таблиц или непосредственно в программном обеспечении прибора. По полученным калибровочным кривым путем линейной интерполяции рассчитывается количество копий ГМ-специфичной

ДНК и таксон-специфичной ДНК в анализируемых пробах. Содержание трансформационного события в пробе представляет собой отношение количества копий ГМ-специфичной ДНК к количеству копий таксон-специфичной ДНК, выраженное в процентах. Расчет производят по формуле:

$$\text{ГМО, \%} = \frac{\text{Количество ГМ – специфичной ДНК}}{\text{Количество таксон – специфичной ДНК}} \times 100$$

Перед началом количественного анализа результатов по каналу FAM для каждой реакции определяется значение порогового цикла Ct. Затем для каждой реакции рассчитывается значение ΔCt , равное величине абсолютной разницы между двумя значениями пороговых циклов, определенных для каждого калибровочного раствора в двух параллельных реакциях амплификации ГМ- и таксон-специфичной ДНК соответственно.

Для построения калибровочной кривой используются точки на координатной плоскости, образованные значениями ΔCt и десятичного логарифма процентного содержания ГМ-специфичной ДНК. Значения десятичного логарифма процентного содержания ГМ-специфичной ДНК в калибровочных растворах откладываются по оси абсцисс (x), а соответствующие им значения ΔCt по оси ординат (y). К построенной калибровочной кривой рассчитывается уравнение линейной регрессии ($y=ax+b$, где a – коэффициент наклона, b – коэффициент сдвига), и строится линия линейной регрессии, по которой определяют процентное содержание ГМ-специфичной ДНК в анализируемых пробах путем линейной интерполяции и последующего потенцирования.

Список литературы:

1. James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2011. Executive summary. ISAAA Brief 43.
2. Holst-Jensen A. Testing for genetically modified organisms (GMOs): past, present and future perspectives. *Biotechnology Advances*. 2009;27(6):1071–1082.
3. Zhang D, Guo J. The development and standardization of testing methods for genetically modified organisms and their derived products. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2011;53(7):539–551.
4. Dong W, Yang L, Shen K, et al. GMDD: a database of GMO detection methods. *BMC Bioinformatics*. 2008;9, article 260
5. Miraglia M, Berdal KG, Brera C, et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology*. 2004;42(7):1157–1180.
6. Holst-Jensen A, De Loose M, Van Den Eede G. Coherence between legal requirements and approaches for detection of genetically modified organisms (GMOs) and their derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(8):2799–2809.

7. Barbau-Piednoir E, Lievens A, Mbongolo-Mbella G, et al. SYBR Green qPCR screening methods for the presence of “35S promoter” and “NOS terminator” elements in food and feed products. *European Food Research and Technology*. 2010;230(3):383–393.
8. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed. Event-specific method for the quantification of sugar beet line H7-1 using Real-time PCR: protocol. 2006;(CRLVL28/04VP)
9. Odell JT, Nagy F, Chua NH. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*. 1985;313(6005):810–812.
10. Depicker A, Stachel S, Dhaese P. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics*. 1982;1(6):561–573.
11. Agbios. http://www.cera-gmc.org/?action=gm_crop_database&.
12. GMO Compass. <http://www.gmo-compass.org/eng/home/>
13. Sanger M, Daubert S, Goodman RM. Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus: comparison with the analogous 35S promoter from cauliflower mosaic virus and the regulated mannopine synthase promoter. *Plant Molecular Biology*. 1990;14(3):433–443.
14. McElroy D, Zhang W, Cao J, Wu R. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *The Plant Cell*. 1990;2(2):163–171.
15. Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology*. 1992;18(4):675–689.
16. Gonsalves D. Transgenic papaya in Hawaii and beyond. *AgBioForum*. 2004;7(1-2):36–40.
17. Acciarri N, Vitelli G, Arpaia S, Mennella G, Sunseri F, Rotino GL. Transgenic resistance to the Colorado potato beetle in Bt-expressing eggplant fields. *HortScience*. 2000;35(4):722–725.
18. Koehorst-van Putten HJJ, Sudarmonowati E, Herman M, et al. Field testing and exploitation of genetically modified cassava with low-amylose or amylose-free starch in Indonesia. *Transgenic Research*. 2012;21(1):39–50.
19. Sriroth K, Piyachomkwan K, Santisopasri V, Oates CG. Environmental conditions during root development: drought constraint on cassava starch quality. *Euphytica*. 2001;120(1):95–101.]
20. Barbau-Piednoir E, Lievens A, Vandermassen E, et al. Four new SYBR Green qPCR screening methods for the detection of Roundup Ready ,LibertyLink , and CryIAb traits in genetically modified products. *European Food Research and Technology*. 2012;234(1):13–23.
21. MbongoloMbella EG, Lievens A, Barbau-Piednoir E, et al. SYBR Green qPCR methods for detection of endogenous reference genes in commodity crops: a step ahead in combinatory screening of genetically modified crops in food and feed products. *European Food Research and Technology*. 2011;232(3):485–496.
22. Väitilingom M, Pijnenburg H, Gendre F, Brignon P. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999;47(12):5261–5266.]
23. Yang L, Chen J, Huang C, et al. Validation of a cotton-specific gene, *Sad1*, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic cottons. *The Plant Cell Reports*. 2005;24(4):237–245.

24. Broeders S, Barbau-Piednoir E, Vandermassen E, Debode F, Mazzara M, Roosens N. New SYBRGreen methods targeting promoter sequences used for screening of several GM events pending for authorisation in Europe. submitted.
25. Anon Cibus—Value-Enhancing Traits for Globally Accepted Crops. [(accessed on 16 May 2020)]. Available online: <https://cibus.com/crops.php>
26. Anon Products Calyxt. [(accessed on 16 May 2020)]. Available online: <https://calyxt.com/our-products/>
27. Duensing N., Sprink T., Parrott W.A., Fedorova M., Lema M.A., Wolt J.D., Bartsch D. Novel Features and Considerations for ERA and Regulation of Crops Produced by Genome Editing. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2018;6:79. doi: 10.3389/fbioe.2018.00079.
28. European Court of Justice C-528/16-Judgement of 25 July 2018 on New Mutagenesis Techniques. [(accessed on 16 May 2020)]. Available online: <http://curia.europa.eu/juris/document/document.jsf?text=&docid=204387&pageIndex=0&dclang=EN&mode=lst&dir=&occ=first&part=1&cid=138460>
29. Commission Declaration Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. *Off. J. Eur. Communities.* 2001;L106:39.
30. Scientific Advice Mechanism of the European Commission A Scientific Perspective on the Regulatory Status of Products Derived from Gene Editing and the Implications for the GMO Directive. [(accessed on 19 January 2020)]. Available online: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/a9100d3c-4930-11e9-a8ed-01aa75ed71a1/language-en/format-PDF/source-94584603>
31. Advisory Committee on Releases to the Environment Advice on a Plant Breeding Technique Involving Oligo-Directed Mutagenesis: RTDSTM. [(accessed on 16 May 2020)]; Available online: [https://www1.health.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/8884A10B0BA5CF42CA2580B10016087D/\\$File/Cibus%20-%203.pdf](https://www1.health.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/8884A10B0BA5CF42CA2580B10016087D/$File/Cibus%20-%203.pdf)
32. Advisory Committee on Releases to the Environment ACRE Advice: New Techniques Used in Plant Breeding. [(accessed on 10 May 2020)]; Available online: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/239542/new-techniques-used-in-plant-breeding.pdf
33. Broeders S.R.M., Keersmaecker S.C., Roosens N.H.C. How to Deal with the Upcoming Challenges in GMO Detection in Food and Feed. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012;2012:1–11. doi: 10.1155/2012/402418.
34. Bertheau Y. Reference Module in Food Science, *Encyclopedia of Food Chemistry*. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands: 2019. *New Breeding Techniques: Detection and Identification of the Techniques and Derived Products*; pp. 320–336.
35. European Network of GMO Laboratories Detection of Food and Feed Plant Products Obtained by New Mutagenesis Techniques. [(accessed on 16 May 2020)]. Available online: <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/JRC116289-GE-report-ENGL.pdf>

36. Grohmann L., Keilwagen J., Duensing N., Dagand E., Hartung F., Wilhelm R., Bendiek J., Sprink T. Detection and Identification of Genome Editing in Plants: Challenges and Opportunities. *Front. Plant Sci.* 2019;10:236. doi: 10.3389/fpls.2019.00236.
37. Holst-Jensen A., Bertheau Y., Alnutt T., Broll H., de Loose M., Grohmann L., Henry C., Hougs H., Moens W., Morisset D., et al. Overview on the Detection, Interpretation and Reporting on the Presence of Unauthorised Genetically Modified Materials: Guidance Document from the European Network of GMO Laboratories (ENGL) Publications Office of the European Union; Luxembourg: 2011. [GoogleScholar]
38. Holst-Jensen A., Bertheau Y., De Loose M., Grohmann L., Hamels S., Hougs L., Morisset D., Pecoraro S., Pla M., Bulcke M.V.D., et al. Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials. *Biotechnol. Adv.* 2012; 30:1318–1335. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.024. [PubMed] [CrossRef] [GoogleScholar]

Поступила/Received: 02.06.2022

Принята в печать/Accepted: 08.06.2022