

პროცესირების გავლენა გენმოდიფიცირებული და
არამოდიფიცირებული მცენარეების დეტექციაზე საკვებში

კახა ბიჭვინაშვილი

*სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის
საბუნებისმეტყველო მეცნიერებებისა და მედიცინის ფაკულტეტზე სიცოცხლის
შემსწავლელ მეცნიერებათა დოქტორის აკადემიური ხარისხის მინიჭების მოთხოვნის
შესაბამისად*

სიცოცხლის შემსწავლელ მეცნიერებათა სადოქტორო პროგრამა

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: დავით მიქელაძე -აკადემიკოსი, პროფესორი,
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი
თანახელმძღვანელი: ნელი დათუკიშვილი - ასოცირებული პროფესორი,
ბიოლოგიის დოქტორი

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი
თბილისი, 2019

განაცხადი

როგორც წარდგენილი სადისერტაციო ნაშრომის (პროცესირების გავლენა გენმოდიფიცირებული და არამოდიფიცირებული მცენარეების დეტექციაზე საკვებში) ავტორი, ვაცხადებ, რომ ნაშრომი წარმოადგენს ჩემს ორიგინალურ ნამუშევარს და არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის მოხსენიებული ან ციტირებული სათანადო წესების შესაბამისად.

კახა ბიწკინაშვილი

16.12.2019

აბსტრაქტი

გენეტიკურად მოდიფიცირებული (გმ) მცენარეები და მათგან მიღებული საკვები თანამედროვე ბიოტექნოლოგიის პროდუქტებია. ტრანსგენური კულტურების გლობალურმა გავრცელებამ, ძლიერი გავლენა მოახდინა ეკოსისტემებზე და ადამიანის ჯანმრთელობაზე, ამიტომ, საჭირო გახდა გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმების (გმო) მონიტორინგი. ევროკავშირსა და საქართველოში მოქმედებს მკაცრი კანონმდებლობა და მარკირების სავალდებულო წესები გენმოდიფიცირებული საკვების შესახებ. კანონის მიხედვით, გმო-ების ან მათგან წარმოებული პროდუქტების შემცველი საკვების მარკირება სავალდებულოა 0.9%-იანი ზღვარს ზემოთ, ამასთან, მოითხოვება გმო-ს მიკვლევადობა კვების ჯაჭვში. მონიტორინგისა და მიკვლევადობის ეფექტური სისტემისთვის, საჭიროა გმო-ების ზუსტი დეტექცია, როგორც ნედლ მასალაში, ასევე ძლიერ პროცესირებულ საკვებში. გადამუშავებულ საკვებში არატრანსგენური და ტრანსგენური ინგრედიენტების ზუსტი იდენტიფიკაცია მნიშვნელოვანია საკვების ავთენტურობის, ხარისხისა და უვნებლობის შეფასებისათვის. თანამედროვე მოლეკულური ბიოტექნოლოგიისთვის დიდი გამოწვევაა ტრანსგენური სახეობების ზუსტი და ეფექტური დეტექცია.

საკვების ინგრედიენტების ანალიზისთვის ყველაზე ეფექტური საშუალებაა დნმ დიაგნოსტიკა, ვინაიდან საკვების პროცესირებისას დნმ ყველაზე სტაბილური მოლეკულაა. ამასთან, დნმ-ზე დაფუძნებული პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (პჯრ) აღიარებულია რეფერენსულ მეთოდად გმო-ს დეტექციისთვის. აღსანიშნავია, რომ საკვების წარმოებამ შეიძლება გამოიწვიოს გენომური დნმ-ის ფრაგმენტაცია და გავლენა მოახდინოს პჯრ-ის შედეგზე. აქედან გამომდინარე, განსაკუთრებით აქტუალურია პროცესირებულ საკვებში დნმ-ის სტაბილურობისა და ამპლიფიციურობის დეტალური გამოკვლევა.

ჩვენი კვლევის მიზანი იყო შეგვესწავლა პროცესირების გავლენა მოდიფიცირებული და არამოდიფიცირებული მცენარეების დნმ-ის სტაბილურობასა და პჯრ-ზე დაფუძნებულ დეტექციაზე საკვებში. ჩვენ შევისწავლეთ არამოდიფიცირებული ხორბლის, სიმინდისა და სოიას, აგრეთვე,

გენმოდულირებული სიმინდის დნმ-ების სტაბილურობა და ამპლიფიკაციურობა ტექნოლოგიური დამუშავების სხვადასხვა პირობებში. გამოკვლეული იქნა თერმული და მჟავე არეში დამუშავება. პირველად იქნა შესწავლილი შემდეგი პარამეტრების სხვადასხვა კომბინაციები: ტემპერატურა, დამუშავების ხანგრძლივობა, დნმ-ის ექსტრაქციის მეთოდი, არამოდულირებული და გენმოდულირებული სახეობები, ამპლიკონის ზომა, ენდოგენური და ტრანსგენური ამპლიკონები, პჯრ-პრაიმერები.

წარმოდგენილ კვლევას აქვს როგორც ფუნდამენტური, ასევე გამოყენებითი მნიშვნელობა. საკვების პროცესირებისას დნმ-ის სტაბილურობის შესახებ მიღებული ახალი მონაცემები უზრუნველყოფს მცენარეთა და საკვების გენომიკის მნიშვნელოვანი საკითხების შემეცნებას. დნმ დიაგნოსტიკის ახალი მეთოდები ხელს შეუწყობს მოლეკულური ბიოტექნოლოგიის საშუალებების განვითარებას.

კვლევამ გამოავლინა, რომ თერმულ-მჟავური დამუშავება იწვევს მცენარეული დნმ-ის დეგრადაციას და, შეიძლება, გავლენა მოახდინოს პჯრ-ამპლიფიკაციაზე. დნმ-ის დეგრადაციის ხარისხი იზრდება ტემპერატურის, მჟავიანობისა და ზემოქმედების ხანგრძლივობის მატებისას. დნმ-ის სტაბილურობა დამოკიდებულია მცენარის სახეობაზე. სოიას დნმ უფრო თერმოსტაბილური და ამპლიფიკირებადია, ვიდრე ხორბლისა და სიმინდის დნმ. პროცესირებული პროდუქტებიდან გენომური დნმ-ის ექსტრაქციისთვის CTAB-მეთოდი მეტად ეფექტურია, ვიდრე DNeasy მცენარის ნაკრები.

აღმოჩნდა, რომ საკვებში, გენმოდულირებული და არამოდულირებული მცენარეების ზუსტი დეტექციისთვის კრიტიკული ფაქტორებია: პროცესირების მეთოდი, ხანგრძლივობა, ტემპერატურა და pH; დნმ-ის ექსტრაქციის მეთოდი, საკვების მატრიქსი, მცენარის სახეობა და გმ-ვარიაცია, დნმ-მარკერი, პჯრ-პრაიმერები, ამპლიკონის სიგრძე და მდებარეობა.

იდენტიფიცირდა ახალი დნმ-მარკერები: ხორბლის გლუტენინის გენის 259bp და აცეტილ-კოენზიმ A კარბოქსილაზას გენის 134bp ფრაგმენტები ხორბლის იდენტიფიკაციისთვის; ტრანსგენური *Cry1A(b)* გენის 124bp ფრაგმენტი მწერების მიმართ რეზისტენტული გმ მცენარეების სკრინინგისთვის. კვლევის შედეგები

მიუთითებს, რომ პროცესირებულ საკვებში მცენარეული ინგრედიენტების ზუსტი დეტექციისთვის ამპლიკონის მაქსიმალური სიგრძე დაახლოებით 250bp.

დადგინდა ვალიდური მეთოდები პროცესირებული საკვების ანალიზისთვის: ესენია პჯრ მეთოდები, მიმართული შემდეგ ამპლიკონებზე: ხორბლის გლუტენინის გენის 67bp და აცეტილ-კოენზიმ A კარბოქსილზას გენის 134bp ამპლიკონები, სიმინდის ზეინის გენის 102bp ამპლიკონი, სოიას ლექტინის გენის 118bp და 101bp ამპლიკონები, გმო-ს ტრანსგენური CaMV 35S პრომოტორის 141bp ამპლიკონი.

კვლევის შედეგებიდან გამომდინარე, ვვარაუდობთ, რომ თითოეულ კონკრეტულ შემთხვევაში, საკვების ანალიზი უნდა ჩატარდეს საკვების მატრიქსის, პროცესირების მეთოდისა და ყოველი კრიტიკული პარამეტრის გათვალისწინებით. კვლევის შედეგები შეიძლება გამოყენებულ იქნეს პრაქტიკაში თესლების, მცენარეების, საკვებისა და გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების კონტროლისთვის.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: გენეტიკურად მოდიფიცირებული მცენარეები, საკვების პროცესირება, გენომური დნმ, პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია

Abstract

Genetically modified (GM) plants and foods derived thereof are products of modern biotechnology. The global distribution of transgenic crops has powerful impact on ecosystems and human health, thus causing growing demand for monitoring of genetically modified organisms (GMOs). Many countries have established regulatory systems and labeling regulations for genetically modified food. The European Union (EU) and Georgia have implemented strict legislation and mandatory rules for labeling food containing GMOs or products derived thereof above a threshold of 0.9% with a requirement for the traceability of the GMO in the food chains. The efficient system for the monitoring and traceability needs reliable detection of GMOs in raw materials as well as highly processed food. The accurate identification of non-transgenic and transgenic plant ingredients in processed foods is crucial for food authenticity, quality and safety assessment. Reliable and effective detection of transgenic species is a great challenge for molecular biotechnology.

DNA diagnostics represents the most effective tool for the analysis of food ingredients as DNA is the most stable molecule during food processing. Moreover, DNA-based polymerase chain reaction (PCR) is recognized as a reference method for GMO detection. However, food production may cause fragmentation of genomic DNA and affect PCR results. This demands comprehensive investigations of DNA stability and amplifiability in processed food.

The aim of our study was to investigate the effect of processing on the DNA stability and PCR-based detection of genetically modified and unmodified plants in foods. We investigated DNA stability and amplifiability of non-transgenic wheat, maize and soybean as well as GM maize under different conditions of technological treatment. Both thermal and acid treatment was examined. Various parameter combinations such as temperature, duration of treatment, DNA extraction method, non-transgenic and GM events, amplicon size, endogenous and transgenic amplicons, PCR primers are investigated for the first time.

The present study has both fundamental and applied values. New data about DNA stability will ensure understanding of important issues of plant and food genomics. New DNA diagnostic methods will promote tools of molecular biotechnology.

The study revealed that thermal and acid treatments induce plant DNA degradation and may affect PCR amplification. The extent of DNA degradation is intensified by the increasing temperature, acidity and duration of exposure. DNA stability is dependent on the plant species. The thermostability and amplifiability of soybean DNA are higher in compared with wheat and maize DNA. CTAB-based method was found more effective than Qiagen DNeasy plant kit for genomic DNA extraction from processed products.

The results obtained demonstrated several critical factors for reliable detection of genetically modified and unmodified plants in foods. These factors are: method, duration, temperature and pH of processing, DNA extraction method, food matrix, plant species and GM event, DNA marker, PCR primers, length and location of the amplicon.

New DNA markers were identified such as 259bp fragment of wheat glutenin gene and 134bp fragment of acetyl-coenzyme A carboxylase gene for identification of wheat as well as 124bp fragment of transgenic *Cry1A(b)* gene for screening of insect resistant GM crops. The outcomes of this study indicate that maximum amplicon length of about 250bp is suitable for accurate detection of plant ingredients in processed foods.

The valid methods were determined for analysis of processed foods. These PCR methods are targeted to the following amplicons: 67bp amplicon of wheat glutenin gene, 134 bp amplicon of wheat carboxylase gene, 102bp amplicon of maize zein gene, 118bp and 101 bp amplicons of soybean lectin gene and 141bp amplicon of GMO transgenic CaMV 35S promotor.

The results of the study suggested, that in each case food analysis should be carried out foreseen food matrix, processing method and every critical parameter. The outcomes of the study may be used in practice for control of seeds, plants, foods and GMOs.

Key Words: genetically modified plants, food processing, genomic DNA, Polymerase chain reaction

მ ა დ ლ ო ბ ა

წარმოდგენილი სადისერტაციო კვლევა შესრულებულია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის ქიმიური ბიოლოგიის ინსტიტუტსა და ივანე ბერიტაშვილის ექსპერიმენტული ბიომედიცინის ცენტრის გენომის სტრუქტურისა და ფუნქციის ლაბორატორიაში. დისერტაციაზე მუშაობის პერიოდში თანამშრომლებისგან ვგრძნობდი დიდ ყურადღებას, თანადგომას და პროფესიულ მხარდაჭერას, რისთვისაც მინდა, დიდი მადლობა გადავუხადო მათ.

განსაკუთრებული მადლობა მინდა გადავუხადო ჩემი სადისერტაციო კვლევის ხელმძღვანელს, ქიმიური ბიოლოგიის ინსტიტუტის დირექტორს, აკადემიკოსს ბატონ დავით მიქელაძეს, რომელმაც მომცა საშუალება, შემესრულებინა კვლევები ქიმიური ბიოლოგიის ინსტიტუტის ლაბორატორიაში. ჩემი სადისერტაციო კვლევა მისი უშუალო მეთვალყურეობით და ხელმძღვანელობით განხორციელდა. განსაკუთრებული მადლობა მინდა გადავუხადო ჩემი სადისერტაციო კვლევის თანახელმძღვანელს, ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის ასოცირებულ პროფესორს, ბიოლოგიის დოქტორს ქალბატონ ნელი დათუკიშვილს, მის მიერ გაწეული უდიდესი შრომისთვის, საკუთარი ცოდნის და გამოცდილების გაზიარებისთვის, რაც ჩემთვის იყო უდიდესი გამოცდილება. მისი თანადგომის გარეშე ჩემი სადისერტაციო ნაშრომი სადათანადოდ ვერ შესრულდებოდა. ასევე, განსაკუთრებული მადლობა მინდა გადავუხადო ივანე ბერიტაშვილის ექსპერიმენტული ბიომედიცინის ცენტრის გენომის სტრუქტურისა და ფუნქციის ლაბორატორიის უფროს მეცნიერ-თანამშრომელს, ბიოლოგიის დოქტორს ქალბატონ ინგა გაბრიამეს, რომლის მიერ გაწეული დაუდალავი შრომისა და თანადგომით მივიღე უდიდესი გამოცდილება, როგორც თეორიული ცოდნის, ასევე ლაბორატორიაში მუშაობის პრაქტიკული უნარ-ჩვევების ჩამოყალიბების თვალსაზრისით.

მადლობას ვუხდის შოთა რუსთაველის ეროვნულ სამეცნიერო ფონდსა და უკრაინის მეცნიერებისა და ტექნოლოგიის ცენტრს. ფონდებისგან მიღებულმა დაფინანსებამ, ფუნდამენტური, გამოყენებითი და მიზნობრივი კვლევების გრანტების სახით (უმტც/შრესფ #6064, #6306; შრესფ № 1-8/66, #30/37, დ-13/04), დიდად შეუწყო ხელი ჩემი კვლევის წარმატებით განხორციელებას.

ს ა რ ჩ ე ვ ი

სარჩევი.....	VIII
სურათების და ცხრილების ჩამონათვალი.....	XII
აბრევიატურების ჩამონათვალი.....	XIV
შესავალი.....	1
სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა.....	5
თავი 1. გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმები.....	5
1.1. გენეტიკური მოდიფიკაცია გენური ინჟინერიით.....	5
1.2. გენმოდიფიცირებული მცენარეები და საკვები პროდუქტები.....	6
1.3. გმო-ს უსაფრთხოებისა და უვნებლობის საკითხები.....	8
1.3.1. ეკოლოგიური რისკები.....	8
1.3.2. ჯანმრთელობასთან დაკავშირებული რისკები.....	9
1.4. გმო-სთან დაკავშირებული სოციალური ასპექტები.....	13
1.5. გმო-ს გამოყენებისა და გავრცელების რეგულირება.....	14
1.5.1. საერთაშორისო რეგულაციები.....	14
1.5.2. გმო-ს რეგულირება ევროკავშირში.....	16
1.5.3. გმ სურსათის რეგულირება აშშ-სა და კანადაში.....	18
1.5.4. გმო-ს რეგულირება საქართველოში.....	18
თავი 2. გენმოდიფიცირებული მცენარეების მოლეკულური სტრუქტურა.....	19
2.1. გენმოდიფიცირებული სიმინდის MON810-ის დახასიათება.....	19
2.2. გენმოდიფიცირებული სიმინდის Bt-176-ის დახასიათება.....	21

2.3. ჰერბიციდების მიმართ რეზისტენტული სოიას (Roundup Ready Soybean) დახასიათება.....	24
თავი 3. გენმოდულირებული ორგანიზმების ანალიზი საკვებ პროდუქტებში.....	26
3.1. გმო-ს დეტექციის ტექნოლოგიური მიდგომები.....	26
3.2. გმო-ს თვისებრივი დეტექცია: სკრინინგი და იდენტიფიკაცია.....	29
3.3. გმო-ს რაოდენობრივი დეტექცია პჯრ-ის მეთოდჯით.....	31
3.4. გმო-ს დეტექცია მულტიპლექსური ხერხებით.....	33
3.5. გმ საკვების ანალიზის პროცედურა.....	36
3.6. პროცესირების გავლენა კვების პროდუქტებში გმო-ს დეტექციაზე.....	38
3.6.1. დნმ-ის სტაბილურობა საკვების წარმოებისას.....	38
3.6.2. ტემპერატურის, pH -ის და მექანიკური ზემოქმედება.....	39
3.6.3. ამპლიკონის სიგრძის მნიშვნელობა საკვების პჯრ-დიაგნოსტიკაში.....	40
მასალები და მეთოდები.....	42
1. კვლევაში გამოყენებული მასალები.....	42
1.1. თესლები და სასურსათო პროდუქტები.....	42
1.2. გმო-ს სტანდარტები.....	43
2. კვლევაში გამოყენებული მეთოდები.....	43
2.1. ნიმუშების პროცესირება და მომზადება დნმ-ის ექსტრაქციისთვის.....	43
2.1.1. მარცვლების თერმული დამუშავება.....	43
2.1.2. მარცვლების დამუშავება მაღალ ტემპერატურასა და მჟავე pH-ზე.....	44
2.1.3. გენმოდულირებული და არამოდულირებული ფქვილების თერმული დამუშავება.....	44

2.1.4. სასურსათო პროდუქტების სინჯების დამუშავება.....	45
3. დნმ-ის ექსტრაქცია.....	45
4. დნმ-ის შეფასება სპექტროფოტომეტრით.....	46
5. დნმ-ის ელექტროფორეზი აგაროზას გელზე.....	47
6. დნმ-ის ამპლიფიკაცია პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით.....	47
7. სტატისტიკური ანალიზი.....	50
მიღებული შედეგები.....	51
თავი 1. ხორბლის, სიმინდისა და სოიას მარცვლებზე თერმულ-მჟავური ზემოქმედების ეფექტი დნმ-ის დეგრადაციასა და ამპლიფიკაციაზე.....	51
1.1. მარცვლებზე თერმული ზემოქმედების გავლენა გენომურ დნმ-ზე.....	51
1.2. მარცვლებზე თერმული ზემოქმედების გავლენა დნმ-ის ამპლიფიკაციაზე.....	52
1.3. მარცვლებზე კომბინირებული თერმულ-მჟავური ზემოქმედების გავლენა გენომურ დნმ-ზე.....	55
1.4. მარცვლებზე კომბინირებული თერმულ-მჟავური ზემოქმედების გავლენა დნმ-ის ამპლიფიკაციაზე.....	56
თავი 2. არამოდიფიცირებული და ტრანსგენური სიმინდის ფქვილებზე თერმული ზემოქმედების გავლენა დნმ-ის დეგრადაციასა და პჯრ-ზე დაფუძნებულ დეტექციაზე.....	60
2.1. ფქვილებზე თერმული ზემოქმედების გავლენა გენომურ დნმ-ზე.....	61
2.2. ფქვილებზე თერმული ზემოქმედების გავლენა ენდოგენურ ამპლიკონებზე.....	64
2.3. ფქვილებზე თერმული ზემოქმედების გავლენა გმო-სპეციფიკურ ამპლიკონებზე.....	66
2.4. სასურსათო პროდუქტების პჯრ-ანალიზი.....	70

2.4.1. სიმინდის პროდუქტების კვლევა პჯრ მეთოდებით.....	70
2.4.2. სოიას პროდუქტების კვლევა პჯრ მეთოდებით.....	73
შედეგების განხილვა.....	76
თავი 1. ხორბლის, სიმინდისა და სოიას მარცვლებზე თერმულ-მჟავური ზემოქმედების ეფექტი დნმ-ის დეგრადაციასა და ამპლიფიკაციაზე.....	77
თავი 2. არამოდულირებული და ტრანსგენური სიმინდის ფქვილებზე თერმული ზემოქმედების გავლენა დნმ-ის დეგრადაციასა და პჯრ-ზე დაფუძნებულ დეტექციაზე.....	81
დასკვნები.....	84
გამოყენებული ლიტერატურა.....	86

სურათების და ცხრილების ჩამონათვალი

ცხრილი 1. პჯრ-ში გამოყენებული ოლიგონუკლეოტიდური პრაიმერები.....	49
სურათი 1. ევროკავშირში გენმოდირეცირებული საკვების მარკირებისთვის საჭირო ანალიზის პროცედურა.....	17
სურათი 2. MON810-ის რეკომბინანტული დნმ.....	20
სურათი 3. Bt-176 სიმინდში კლონირებული <i>Cry1A(b)</i> გენის სიქვენსი (GenBank acc.no. 1414119).....	23
სურათი 4. Bt-176 სიმინდის რეკომბინანტული დნმ.....	23
სურათი 5. Roundup Ready სოიას რეგულატორული უბნის სქემატური გამოსახვა.....	26
სურათი 6. გენმოდირეცირებული ორგანიზმების ტრანსგენური უბნის სქემატური გამოსახულება.....	29
სურათი 7. მარცვლების 100°C-ზე თერმული დამუშავების გავლენა გენომურ დნმ-ზე.....	51
სურათი 8. მარცვლების 100°C-ზე თერმული დამუშავების გავლენა დნმ-ის ამპლიფიკაციაზე.....	54
სურათი 9. მარცვლებზე კომბინირებული თერმულ-მჟავური ზემოქმედების გავლენა გენომურ დნმ-ზე.....	56
სურათი 10. კომბინირებული თერმულ-მჟავურ ზემოქმედების ეფექტი ხორბლის დნმ-ის ამპლიფიკაციაზე.....	57
სურათი 11. კომბინირებული თერმულ-მჟავური ზემოქმედების ეფექტი სიმინდის დნმ-ის ამპლიფიკაციაზე.....	59
სურათი 12. ფქვილებზე თერმული ზემოქმედების გავლენა გენომურ დნმ-ებზე.....	61
სურათი 13. გენომური დნმ-ების სპექტროფოტომეტრული ანალიზი.....	62
სურათი 14. მცენარის სპეციფიური 550bp ამპლიკონის პჯრ ანალიზი.....	64
სურათი 15. სიმინდის ენდოგენური ამპლიკონების პჯრ-ანალიზი.....	65
სურათი 16. ეგზოგენური 258bp ამპლიკონის პჯრ-ანალიზი.....	67
სურათი 17. ეგზოგენური 141bp (a-b) და 124bp (c-d) ამპლიკონების პჯრ-ანალიზი.....	68

სურათი 18. პჯრ-ამპლიფიკაციის სტატისტიკური ანალიზი.....	69
სურათი 19. სიმინდის პროდუქტების გენომური დნმ-ები (A) და მცენარის სპეციფიური პჯრ (B).....	70
სურათი 20. საკვები პროდუქტების პჯრ-ანალიზი.....	71
სურათი 21. სოიას პროდუქტების გენომური დნმ-ები.....	73
სურათი 22. პროდუქტების პჯრ ანალიზი პრაიმერებით: plant1/plant2 (a) და LECTf/LECTr (b).....	74
სურათი 23. პროდუქტების პჯრ ანალიზი გმო-სპეციფიური პრაიმერებით: P35Sf/P35Sr.....	75

აბრევიატურების ჩამონათვალი

გმო - გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმი

პჯრ - პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია

რდ-პჯრ - რეალური დროის პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია

WHO - ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაცია

ISAAA (The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications) - აგრო-
ბიოტექნოლოგიური აპლიკაციების საერთაშორისო სერვისი

EU-ევროპის კავშირი

FDA - საკვებისა და მედიკამენტების ადმინისტრაცია

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) - თეორიული და
გამოყენებითი ქიმიის საერთაშორისო კავშირი

IDT (Integrated DNA Technologies) - ინტეგრირებული დნმ ტექნოლოგიები

P- CaMV 35S - ყვავილოვანი კომბოსტოს მოზაიკური ვირუსის 35S პრომოტორი

T-*CaMV 35S* - ყვავილოვანი კომბოსტოს მოზაიკური ვირუსის 35S ტერმინატორი

FMV P-35S - ლეღვის მოზაიკური ვირუსის 35S პრომოტორი

Bt - ბაქტერია *Bacillus thuringiensis*

CRYIA(b) - ბაქტერია *Bacillus thuringiensis*-ის δ -ენდოტოქსინის გენი

P-*PEPC* - ფოსფოენოლპირუვატ-კარბოქსილზას პრომოტორი

P-*CDPK* - კალციუმდამოკიდებული პროტეინ-კინაზას პრომოტორი

P-NOS - ბაქტერია *Agrobacterium tumefaciens*-ის ნოპალინ სინთაზას გენის პრომოტორი

T-NOS - ბაქტერია *Agrobacterium tumefaciens*-ის ნოპალინ სინთაზას გენის ტერმინატორი

RRS (Roundup Ready Soybean) – ჰერბიციდ რაუნდაპის მიმართ რეზისტენტული სოია

EPSPS - 5-ენოლპირუვილშიკიმატე-3-ფოსფატ სინთაზა

bp – Base pair (ფუძეთა წყვილი)

TAE (Tris-Acetate-EDTA) - ტრის-აცეტატ-ედტა

CTAB - ცეტილ ტრიმეთილ ამონიუმის ბრომიდი

UV - ულტრაიისფერი გამოსხივება

dNTP - დეზოქსირიბონუკლეოტიდ ტრიფოსფატი

შესავალი

მოცე საუკუნის 80-იან წლებში შესაძლებელი გახდა მცენარეების გენეტიკური მასალის (დნმ) მიზნობრივი შეცვლა მოლეკულური ბიოტექნოლოგიის გამოყენებით, რის შედეგადაც შეიქმნა გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმები (გმო). მათ ასევე უწოდებენ გენური ინჟინერიის პროდუქტებსა და ტრანსგენურ მცენარეებს. გენმოდიფიცირებული ორგანიზმები, არსებობს მცენარის, მარცვლის, თესლისა და საკვები პროდუქტების სახით. გენმოდიფიცირებულ მცენარეებს ახასიათებს სხვადასხვა სასარგებლო თვისება და გაუმჯობესებული, მაღალი პროდუქტიულობა, ამიტომ, მათ მიმართ არსებობს მნიშვნელოვანი აგრონომიული და კომერციული ინტერესი. უკანასკნელ ათწლეულებში ტრანსგენური ნათესების ფართობი ყოველწლიურად ექსპონენციალურად იზრდება, შესაბამისად, იზრდება გენმოდიფიცირებული პროდუქტების წილი საკვების წარმოებაში [ISAAA Brief 54, 2018].

გენმოდიფიცირებული ორგანიზმებიდან წარმოებული საკვები პროდუქტები მსოფლიო ბაზარზე იყიდება 1994 წლიდან, მაგრამ მათი უსაფრთხოების საკითხი საზოგადოებაში დღემდე საკამათოა. გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების შესახებ, არსებობს სხვადასხვა შეხედულება და დებატები საზოგადოებასა და მეცნიერებაში. არსებული ეკოლოგიური მონაცემებით, გარემოში გამოთავისუფლებული გენმოდიფიცირებული ორგანიზმები ზოგჯერ საფრთხეს უქმნის ადგილობრივ ბიომრავალფეროვნებას. გენმოდიფიცირებულმა პროდუქტებმა შეიძლება გამოიწვოს ალერგიები, კუჭ-ნაწლავის დაავადებები და სხვადასხვა გართულება ადამიანის ჯანმრთელობის კუთხით [Dougherty, et al 2006, Zhang, et al. 2016]. ზემოთქმულიდან გამომდინარე, საყოველთაოდ მიღებულია გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების გავრცელებისა და გამოყენების მონიტორინგი და რეგულირება [Codex Alimentarius, 2009]. განსაკუთრებული სიმკაცრით გამოირჩევა ევროკავშირის რეგულირების სისტემა. ევროპულ ქვეყნებში გენეტიკურად მოდიფიცირებული კვების პროდუქტების მარკირება სავალდებულოა და კონტროლდება ევროკავშირის კანონმდებლობით. დადგენილია, რომ კვების პროდუქტები, რომელთა ინგრედიენტები შეიცავს 0,9%-ზე მეტი რაოდენობის გენმოდიფიცირებულ

ორგანიზმს, უნდა მოინიშნოს ეტიკეტზე გმო-ს შემცველობის ზუსტი აღნიშვნით [European Commission Regulations (EC) (2003a, 2003b, 2004)]. ამ კანონების პრაქტიკაში დანერგვა, მოითხოვს გენმოდირიცირებული ორგანიზმების შესახებ ზუსტ მეცნიერულ ცოდნასა და დეტექტირების მეთოდებს.

საქართველოში გენმოდირიცირებულ ორგანიზმებთან დაკავშირებული კვლევის ხელშეწყობა და განვითარება, განსაკუთრებით აქტუალური გახდა საქართველოს პარლამენტის მიერ გენმოდირიცირებულ ორგანიზმებთან დაკავშირებული კანონის მიღების შემდეგ. ეს კანონი გულისხმობს, რომ, თუ საკვებ პროდუქტებში გმ ინგრედიენტის შემცველობა აღემატება 0.9%-ს, აუცილებელია მოხდეს მარკირება. გენმოდირიცირებული ორგანიზმის ეტიკეტის მარცხენა ზედა კუთხეში, წრიულ ფორმაში განთავსებული უნდა იყოს წარწერა „გმო“, ხოლო გენმოდირიცირებული პროდუქტის ეტიკეტის მარცხენა ზედა კუთხეში, წრიულ ფორმაში – წარწერა „გმ“. ამასთან, აუცილებელია გმ ინგრედიენტის სახელის მითითება [საქართველოს კანონი „სურსათად/ცხოველის საკვებად განკუთვნილი გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმებისა და მათგან წარმოებული გენმოდირიცირებული პროდუქტების ეტიკეტირების შესახებ; 2014]. იკრძალება ცოცხალი გენმოდირიცირებული ორგანიზმების იმპორტი საქართველოს ტერიტორიაზე, გარდა ამავე კანონით გათვალისწინებული მისი ჩაკეტილ სისტემაში გამოყენების მიზნით [საქართველოს კანონი ცოცხალი გენმოდირიცირებული ორგანიზმების შესახებ; 2014].

გენმოდირიცირებული ორგანიზმების მონიტორინგისთვის აუცილებელია მათი ზუსტი მოლეკულური დახასიათება, ანალიზი და მარკირება. ამასთან დაკავშირებით, მოლეკულურ ბიოტექნოლოგიაში აქტუალურია გენმოდირიცირებული ორგანიზმების იდენტიფიკაციისა და ანალიზის ზუსტი მეთოდების შემუშავება, დანერგვა და განვითარება. გმო-ს ანალიზისთვის აუცილებელია შესაბამის მცენარეთა სახეობების ზუსტი დეტექცია.

განსაკუთრებულ ინტერესს იწვევს გენმოდირიცირებული ორგანიზმების დეტექტირების მეთოდების შემუშავება პროცესირებულ საკვებ პროდუქტებში [Marmioli et al, 2008]. საკვების პროცესირებისას ხდება მისი მოლეკულური შემადგენლობის ცვლილება, რაც შეიძლება აისახოს გმო-ს იდენტიფიკაციაზე.

საკვებში გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების დეტექტირების ყველაზე ზუსტი და ეფექტური საშუალებაა დნმ-ზე დაფუძნებული დიაგნოსტიკა [Somma M. and Querci M, 2006], ვინაიდან დნმ უფრო სტაბილური მაკრომოლეკულაა, ვიდრე ცილები და რნმ, ამიტომ, იგი უკეთ ნარჩუნდება და დეტექტირდება გადამუშავებულ პროდუქტებში.

საქართველოში უკვე დანერგილია გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების თვისობრივი დეტექტირებისა და ანალიზის თანამედროვე მეთოდები [Datukishvili et al, 2007, Kutateladze et al, 2007] და მიმდინარეობს მუშაობა მათ ოპტიმიზაციასა და გაუმჯობესებაზე [Datukishvili et al, 2009, Kutateladze et al, 2009 Datukishvili et al, 2010; Datukishvili et al, 2015; Datukishvili et al, 2018].

საკვებში, გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების დეტექტირებისთვის რთულ ამოცანას წარმოადგენს გმო-ს მცირე რაოდენობის მიკვლევა, ვინაიდან პროდუქტების ინტენსიური პროცესირებისას (მექანიკური, ქიმიური და თერმული დამუშავებისას) ხდება დნმ-ის დეგრადაცია, კონცენტრაციის შემცირება და მისი გამოყოფის გართულება [Bauer et al, 2003]. დღეისთვის არსებული გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების დეტექტირების მეთოდები ამომწურავად ვერ პასუხობს საკვების უსაფრთხოების შეფასების თანამედროვე მოთხოვნებს და მოითხოვს სრულყოფასა და დაზუსტებას.

ჩვენი კვლევის მიზანი იყო პროცესირების მნიშვნელოვანი ფაქტორებისა და კრიტიკული პარამეტრების დადგენა, რომლებიც გავლენას ახდენს მცენარეების სახეობებისა და გმო-ს ზუსტ დეტექციაზე, აგრეთვე, გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების ანალიზისთვის მოლეკულური დიაგნოსტიკის ახალი, ზუსტი და ეფექტური მეთოდების შემუშავება. შესწავლილ იქნა სიმინდის, ხორბლისა და სოიას მარცვლებზე თერმული და ქიმიური დამუშავების ზემოქმედება. ასევე, გამოვიკვლიეთ სიმინდის გენმოდიფიცირებულ სტანდარტებზე თერმული დამუშავების ზემოქმედება. კვლევის დასკვნით ეტაპზე კი შესწავლილ იქნა პროცესირების გავლენა კვების პროდუქტებში მცენარეთა სახეობებისა და გმო-ს იდენტიფიკაციაზე. კვლევისთვის გამოყენებულ იქნა მოლეკულური ბიოლოგიისა და ბიოტექნოლოგიის თანამედროვე მეთოდები და ტექნიკური საშუალებები, კერძოდ, დნმ-ანალიზის მეთოდები და პჯრ-ტექნოლოგიები.

ნაშრომს აქვს როგორც ფუნდამენტური სამეცნიერო ღირებულება, ისე პრაქტიკული გამოყენებითი მნიშვნელობა. კვლევის შედეგად მიღებული ახალი ინფორმაცია მნიშვნელოვანწილად ნათელს ჰფენს მცენარეთა და საკვების გენომიკის უცნობ საკითხებს, ხოლო შემუშავებული ახალი მეთოდები შეიძლება გამოყენებულ იქნას პრაქტიკაში საკვები პროდუქტების ხარისხისა და უვნებლობის შეფასებისას. აშკარაა კვლევის შედეგების ეკონომიკური და სოციალური მნიშვნელობა: გენმოდირიცირებული ორგანიზმების დიაგნოსტიკის ზუსტი მეთოდების საკვების წარმოებაში გამოყენება, ხელს შეუწყობს მაღალი ხარისხისა და უვნებელი პროდუქციის წარმოებას, სურსათით ვაჭრობის გაზრდას, მომხმარებლის ნდობის აღდგენას საკვების ხარისხის მიმართ და მოსახლეობის ჯანმრთელობის დაცვას.

სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა

თავი 1. გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმები

1.1. გენეტიკური მოდიფიკაცია გენური ინჟინერიით

გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმები თანამედროვე ბიოტექნოლოგიის პროდუქტებია, რომელთა გენეტიკური მასალა მიზნობრივად შეცვლილია გენური ინჟინერიის გამოყენებით. ეს ტექნოლოგია ცნობილია როგორც რეკომბინანტული დნმ ტექნოლოგია, ანუ გენის კლონირების ტექნოლოგია. ამ დროს ხდება სხვადასხვა წყაროდან მიღებული დნმ-ის ფრაგმენტების გაერთიანება ერთ რეკომბინანტულ მოლეკულაში გენთა ახალი ნაკრების შესაქმნელად. შემდგომ რეკომბინანტული დნმ გადაიტანება ორგანიზმში, რის შედეგადაც მას ექნება მოდიფიცირებული ან უცხო გენები.

გენეტიკური მოდიფიკაცია მოიცავს გენის ჩართვასა და ამოჭრას. როდესაც ხდება გენთა ჩართვა, ისინი ჩვეულებრივ სხვადასხვა სახეობისგანაა აღებული, რაც წარმოადგენს გენთა გადატანის ჰორიზონტალურ ფორმას. ბუნებაში ეს შეიძლება მოხდეს, როდესაც უცხო დნმ რაიმე მიზეზით შეაღწევს უჯრედის მემბრანაში. ამ პროცესის ხელოვნურად განხორციელება საჭიროებს არსებული გენების ვირუსთან მიმაგრებას ან ფიზიკურად უცხო დნმ-ის ჩართვას მასპინძლის ბირთვში შპრიცით ან გენური ზარბაზნის ნაწილაკების საშუალებით. სხვა მეთოდებში იყენებენ გენის გადატანის ბუნებრივ ფორმას, როგორიცაა *Agrobacterium*-ის გენეტიკური მასალის გადატანა მცენარეებში ან ლენტივირუსის გენების გადატანა ცხოველურ უჯრედებში [Key et al, 2008].

გენური ინჟინერიის ფუძემდებლებად ითვლებიან ამერიკელი მეცნიერები სტენლი კოენი და ჰერბერტ ბოიერი. 1973 წელს მათ პირველად შექმნეს რეკომბინანტული პლაზმიდური დნმ, რომელიც შეიცავდა ანტიბიოტიკისადმი მდგრადობის გენს და მოახდინეს მისი კლონირება ბაქტერია *E.coli*-ში. შემდგომში დაარსდა პირველი ბიოტექნოლოგიური კომპანია „Genentech“, რომელიც იყენებდა რეკომბინანტული დნმ-ის ტექნოლოგიას სხვადასხვა ბიოტექნოლოგიური

პროდუქტების წარმოებისათვის. 1978 წელს კომპანიამ შეძლო *E.coli*-ის საშუალებით ადამიანის ცილის - ინსულინის წარმოება [Johnston et al, 1994].

1980-82 წლებში წარმატებით განხორციელდა გენური ინჟინერიის ექსპერიმენტები ცხოველებსა და მცენარეებზე, რის შედეგადაც შეიქმნა გენეტიკურად მოდიფიცირებული ცხოველები და მცენარეები, რომელთა თვისებები და მახასიათებლები მიზნობრივად შეცვლილია უცხო გენების საშუალებით. დღეისთვის, გენმოდიფიცირებული ორგანიზმები ფართოდ გამოიყენება როგორც ბიოლოგიურ და სამედიცინო კვლევებში, ასევე ბიოტექნოლოგიურ ინდუსტრიაში: კვების პროდუქტების, ფარმაცევტული პრეპარატებისა და ინდუსტრიული პროდუქტების წარმოებაში, ეკოლოგიურ ბიოტექნოლოგიასა და ექსპერიმენტულ მედიცინაში (მაგ., გენური თერაპია) [Johnston et al, 1994].

1.2. გენმოდიფიცირებული მცენარეები და საკვები პროდუქტები

გენური ინჟინერიის ერთ-ერთი ყველაზე კარგად ცნობილი და დიდი მიღწევაა გენეტიკურად მოდიფიცირებული მცენარეებისა და საკვების შექმნა. 1982 წელს კომპანია „მონსანტოში“ (აშშ) შეიქმნა პირველი გმ მცენარე - ანტიბიოტიკის მიმართ რეზისტენტული თამბაქო [Fraley et al., 1983]. 1984-86 წლებში შეიქმნა ჰერბიციდების მიმართ ტოლერანტული და მწერების მიმართ რეზისტენტული ტრანსგენური მცენარეები [Herrera-Estrella et al., 1984].

გენმოდიფიცირებული მოსავლის პირველ თაობას ახასიათებდა: მწერებისადმი, ჰერბიციდებისადმი, სოკოებისა და ვირუსებისადმი მდგრადობა. ეს სტრატეგია განვითარებული იყო მწერებისა და სარეველების კონტროლისთვის და მოსავლის რაოდენობის გაზრდისთვის.

გენეტიკურად მოდიფიცირებული მოსავლის მეორე თაობა შეიქმნა მოსავლანობის გასაზრდელად, სიცივისა და გვალვისადმი მდგრადობისა და მოსავლის საკვები ღირებულების გასაზრდელად. მესამე თაობა შეიქმნა ფარმაცევტული პროდუქტების წარმოების მიზნით, რომლებიც მოიცავს ვაქცინებსა და სხვადასხვა წამლებს. ზოგიერთი, აგროკულტურული მნიშვნელობის ცხოველი

გენეტიკურად მოდიფიცირებულია მათი ზომის გასაზრდელად, ზოგიერთი გამოყვანილია სხვადასხვა ცილის ექსპრესირებისთვის და ა.შ. [Bauer et al, 2003].

გენური ინჟინერიით მიღებული გენეტიკურად მოდიფიცირებული მცენარეების მინდორში დათესვა და გავრცელება დაიწყო კანადასა და შეერთებულ შტატებში 1980-იან წლებში. პირველი მსხვილი კულტივაცია დაიწყო 1990-იანების შუა პერიოდში. მას შემდეგ, ფერმერების მიერ გენმოდიფიცირებული მცენარეების მოყვანა უჩვეულოდ გაიზარდა [Bakshi A, 2003, ISAAA Brief 54, 2018].

ISAAA (The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications - აგრო-ბიოტექნოლოგიური აპლიკაციების საერთაშორისო სერვისი)-ს მონაცემებით, 2018 წელს გენმოდიფიცირებული კულტურები გავრცელებულია 191.7 მილიონ ჰექტარზე, 26 ქვეყანაში, მაშინ, როდესაც, გენმოდიფიცირებული კულტურების გავრცელების საწყის ეტაპზე, 1996 წელს მათი გავრცელება მოხდა 1.7 მილიონ ჰექტარზე [ISAAA Brief 54, 2018].

სხვადასხვა გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმი გამოიყენება როგორც ფერმენტების წყარო მრავალი ინდუსტრიული პროდუქტის საწარმოებლად. ზოგიერთი გმო შექმნილია ბაქტერიულ ალფა-ამილაზას დასასინთეზებლად, რომელიც სახამებელს გარდაქმნის შაქრებად, ზოგიერთი გმო ასინთეზირებს ბაქტერიულ და სოკოვან ქიმოზინს, რომელიც კრავს რძის ცილებს ყველის დასამზადებლად და სოკოვან პექტინესთერაზას, რომელიც აუმჯობესებს ხილის წვენის გამჭვირვალობას [Bauer et al, 2003].

გენმოდიფიცირებული კვების პროდუქტები ბაზარზე პირველად გამოჩნდა ადრეულ 1990-იან წლებში. ცხოველური პროდუქტები განვითარდა 2010 წელს. გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების ტექნოლოგია გამოყენებულია მოსავლის წარმოებაში, რომელიც მდგრადია კომერციული ჰერბიციდების მიმართ ან აქვთ უნარი, აწარმოონ პესტიციდური ცილები თავად მცენარეში, თესლში ან ორივეში ერთად.

გმო-ს იყენებენ სხვადასხვა დაავადებებთან საბრძოლველად ან ამ დაავადებების მიმდინარეობის შესამსუბუქებლად. ზოგიერთი, გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმს ახასიათებს დაჩქარებული ზრდა, არამოდიფიცირებულ ანალოგთან შედარებით, ზოგიერთი მეტი პროდუქტიულობით გამოირჩევა, ზოგიერთი მეტ

გვალვამდობასა და ყინვამდობას ავლენს, ზოგი კი განსხვავებულ სეზონურ პირობებთან და განსხვავებულ ნიადაგთან ადაპტირდება, ვიდრე მათი არამოდულირებული ანალოგები. ზოგი გმო პესტიციდების და ინსექტიციდების გამოყენებას არ საჭიროებს, ასევე, სხვადასხვა ქიმიკატების გამოყენებას ნაკლებად მოითხოვს, ამიტომ, ითვლება, რომ მსგავსი ტიპის გმო ნაკლებად მავნეა ჯანმრთელობასა და გარემოზე ზემოქმედების კუთხით, ვიდრე ქიმიკატების დახმარებით მოყვანილი ტრადიციული კულტურები. ზოგიერთი გმო შეიცავს გაცილებით მეტ მიკროელემენტს და ვიტამინს და გაუმჯობესებულია გემოს თვისებები. ასევე, არის გმ საკვები, რომლებიც ნაკლებად მალფუჭდება და შედარებით მეტ ხანს ინარჩუნებს კვებით ღირებულებებს [Bawa et al, 2013].

1.3. გმო-ს უსაფრთხოებისა და უვნებლობის საკითხები

დღეისთვის, გენმოდულირებული ორგანიზმებისა და მათგან წარმოებული საკვების უსაფრთხოებისა და უვნებლობის საკითხებზე ურთიერთსაწინააღმდეგო მონაცემები და შეხედულებები არსებობს. ეს შეეხება ადამიანის ჯანმრთელობისა და გარემოს მიმართ გმო-ს უვნებლობას, რისკების შეფასებას, გმო-ს ეტიკეტირებას, საკვებში გმო-ს ზღვრულად დასაშვებ ნორმებს, მსოფლიო მასშტაბით მოსახლეობის რაოდენობის მატებით გამოწვეულ საკვების დეფიციტსა და გმო-ს გავრცელების რისკებს შორის შუალედური ნორმების ჩამოყალიბებას.

1.3.1. ეკოლოგიური რისკები

განსაკუთრებით საყურადღებოა გმო-თან დაკავშირებული ეკოლოგიური რისკები. რისკის შემცველადაა შეფასებული ჰერბიციდებისა და პესტიციდების მიმართ მდგრადი მცენარეების გარემოში გავრცელება იმ კუთხით, რომ თუ გმ მცენარეების დათესვა მოხდება სისტემატიურად ერთსა და იმავე ადგილას, რამაც, შესაძლოა, გამოიწვიოს სარეველა ბალახების და მწერების ადაპტირება ახალ

რეალობასთან და მოხდეს გმო-სგან მოსალოდნელი ეფექტის ანულირება [Steinbrecher et al, 1996]. რისკის შემცველად განიხილება ჯვარედინი დამტკვერვის უნარის მქონე გმ მცენარეების მხრიდან გენთა დრეიფის შესაძლებლობა მათ არამოდულირებულ ანალოგებთან და, შესაბამისად, გარემოზე უარყოფითი ზეგავლენის საშიშროება. არსებობს მოსაზრება, რომ ჰერბიციდებისა და პესტიციდების მიმართ მდგრადმა გმო-მ შესაძლოა გამოიწვიოს რომელიმე ტიპის მავნებლების ან სარეველა მცენარეების დათრგუნვა ან განადგურება, რამაც შესაძლოა დაარღვიოს ბალანსი, შეამციროს კონკურენცია და გააძლიეროს სხვა მავნებლების და სარეველა მცენარეების რაოდენობის მატება. შესაძლებელია, რომელიმე ტიპის მავნებლის რაოდენობის მკვეთრად მომატებამ საფრთხე შეუქმნას ისეთ მცენარეულ კულტურებსაც, რომელსაც აღნიშნული მავნებლები არ აზიანებენ, იმ შემთხვევასთან შედარებით, როცა განსაზღვრულ ჩარჩოებშია მოქცეული მათი რაოდენობა. გასათვალისწინებელია გმო-ს ნიადაგზე და მის მიკროფლორაზე ზემოქმედების რისკებიც [Louda et al, 1999].

1.3.2. ჯანმრთელობასთან დაკავშირებული რისკები

ჯანმრთელობის მიმართ რისკების კუთხით, განიხილება გმო-ს შესაძლო ტოქსიურობა, ალერგიულობა და გენომზე ზემოქმედების საფრთხე. ორგანიზმზე მოქმედების მექანიზმის მიხედვით, გმ საკვების შესაძლო უარყოფით ზემოქმედებას ყოფენ სამ ძირითად კატეგორიად: პირველი კატეგორია, რომელიც გულისხმობს კონკრეტული ტრანსგენური ცილის უშუალო ნეგატიურ ზემოქმედებას ორგანიზმზე; მეორე კატეგორიის რისკად განხილულია პირველი კატეგორიის რისკების თანმდევი, მეორეული რისკები, რაც გულისხმობს მასპინძელ ორგანიზმში აღნიშნული ტრანსგენური ცილის მიერ ბიოქიმიური პროცესების საფეხურებზე ზემოქმედება და მათში ცვლილებების შეტანა; ხოლო მესამე კატეგორიის რისკებად განხილულია კონკრეტული ტრანსგენის პლეიოტროპული მოქმედების შედეგად წარმოქმნილი რისკები, რაც მეორე კატეგორიის მსგავსად, მასპინძელ ორგანიზმებში ბიოქიმიურ მექანიზმებზე ზემოქმედებას გულისხმობს. ბიოქიმიური პროცესების საფეხურებზე

ზემოქმედების შედეგად კი განიხილავენ მეტაბოლური პროცესების დარღვევის რისკებს და ისეთი შუალედური ან საბოლოო ბიოქიმიური პროდუქტების დაგროვებას, რომელიც შესაძლოა იყოს ტოქსიკური ან ალერგიული რეაქციების გამომწვევი. ასევე, შესაძლებელია მეტაბოლურმა დარღვევებმა უჯრედში გამოიწვიოს რომელიმე სუბსტრატის განლევა ან ენდოგენური გენების ინაქტივაცია [Bawa et al, 2013].

გენმოდირებული მცენარეებიდან მიღებული საკვები პროდუქტების ჯანმრთელობაზე რისკის შეფასება მოითხოვს ფაქიზ მიდგომას, რადგან გასათვალისწინებელია ყველა ის ასპექტი, რამაც შეიძლება ჯანმრთელობაზე მოახდინოს ესა თუ ის ზემოქმედება. ფაქტების დადგენა საფრთხის შესახებ დაკავშირებულია ბიოლოგიური, ქიმიური ან ფიზიკური აგენტების არსებობასთან როგორც ცალკეულ, ერთი სახეობის საკვებ პროდუქტში, ასევე, სხვადასხვა საკვები პროდუქტების ჯგუფთან და იმ აგენტების უნართან, მოახდინონ უარყოფითი ეფექტი ჯანმრთელობის მდგომარეობაზე. შეერთებულ შტატებში FDA (Food and Drug Administration) ცენტრმა თავდაპირველად ეჭვქვეშ დააყენა გენური ინჟინერიით შემუშავებული პროდუქტები, თუმცა შემდგომ სამეცნიერო კვლევებზე დაყრდნობით იგი უსაფრთხოდ სცნო. 2008 წელს მედიცინის სამეფო საზოგადოებამ აღნიშნა, რომ გენმოდირებული საკვები მოხმარებულ იქნა მილიონობით ადამიანის მიერ 15 წლის განმავლობაში მსოფლიოში უკუჩვენებითი ეფექტის გარეშე. 2004 წელს შეერთებული შტატების მეცნიერებათა ეროვნულმა აკადემიამ აღნიშნა, რომ ადამიანთა პოპულაციაში გენური ინჟინერიით ჯანმრთელობის გაუარესება არ აღინიშნება. ეპიდემიოლოგიური შესწავლითაც დადგინდა, რომ მოდიფიცირებულ მოსავალს მოსახლეობისთვის ზიანი არ მიუყენებია და მსგავსი შემთხვევები არ დაფიქსირებულა [Key et al. 2008].

ცხოველებზე გენმოდირებული საკვების შესაძლო გავლენის შესწავლამ არ დაადასტურა მნიშვნელოვანი სხვაობა გენმოდირებულ და არამოდირებულ მცენარეებში უსაფრთხოებისა და კვებითი ღირებულების მხრივ. სპეციფიკურმა შესწავლამ აჩვენა, რომ რეკომბინანტული დნმ-ის ან უცხო ცილების ნარჩენები არ იყო ნაჩივნი გენმოდირებული მცენარეებით მკვებავი ცხოველების რომელიმე ორგანოსა თუ ქსოვილში [Key, et al, 2008]. კანამიციის

მიმართ რეზისტენტული გენით მოდიფიცირებულ პომიდორზე ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ მნიშვნელოვანი ცვლილებები მის შემადგენლობაში არ აღინიშნა. ექსპერიმენტში ვირთაგვებზე, რომლებსაც კვებადნენ აღნიშნული პომიდვრით, არ დადგინდა უარყოფითი ეფექტი [Redenbaugh et al. 1992], თუმცა არის საწინააღმდეგო მონაცემებიც. შარმამ და თანაავტორებმა კვლევები აწარმოეს ცხვრებზე და ღორებზე, რომლებსაც საკვებად აძლევდნენ გენმოდიფიცირებულ კანოლას (Roundup Ready canola). აღნიშნული მცენარე მოდიფიცირებულია *CP4 EPSPS* ტრანსგენით, რომელიც უზრუნველყოფს *EPSPS* სინთაზას სინთეზს. პჯრ და Southern Blot ანალიზების საფუძველზე დაადგინეს, რომ როგორც აღნიშნული მცენარის სახეობისთვის დამახასიათებელი გენების ფრაგმენტები, ასევე *EPSPS* ტრანსგენი აღმოჩენილ იქნა ცხვრის საყლაპავის, კუჭის შემადგენელი ნაწილების - ფაშვის და მაჭიკის, წვრილი და მსხვილი ნაწლავის, ღვიძლის და თირკმლის ქსოვილში. ხოლო ღორის შემთხვევაში, დნმ-ის აღნიშნული ფრაგმენტები აღმოჩნდა თორმეტგოჯა ნაწლავის, აპენდიქსის, ღვიძლის, ელენთის და თირკმლის ქსოვილებში. მიუხედავად იმისა, რომ *EPSPS* ტრანსგენის არსებობა დადასტურდა აღნიშნულ ქსოვილებში, მათზე დაკვირვებამ აღნიშნული ორგანოების ფუნქციონირების დარღვევა არ გამოავლინა [Sharma et al, 2006].

გმო-ს ტოქსიკურობა. ბაქტერია *Bacillus thuringiensis CryIA(b)* გენით მოდიფიცირებული პომიდორზე *in vitro* პირობებში ჩატარებულმა იმუნოციტოქიმიურმა ექსპერიმენტებმა დაადასტურა *CryIA(b)* გენის ტოქსინის არსებობა ადამიანის და მაკაკას გვარის მაიმუნების აპენდიქსსა და მსხვილ ნაწლავში [Noteborn et al, 1995]. ჰერბიციდების მიმართ რეზისტენტული სიმინდი, რომლის ტრანსგენი ასინთეზირებს გლუფოსინატ-აცეტილტრანფერაზას, არამოდიფიცირებულ სიმინდთან შედარებით მნიშვნელოვანი განსხვავება აღინიშნა მათ ცხიმოვან და ნახშირწყლოვან შემადგენლობასთან დაკავშირებით. ექსპერიმენტები აღნიშნული გმ სიმინდის ტოქსიკურობაზე ხაზგასმით არ დადასტურდა [Brake et al, 1998]. გლიფოსატის მიმართ მდგრადობის გენით მოდიფიცირებული სოიას ვარიაციაზე (GTS), რომელიც რეზისტენტულია ჰერბიციდების მიმართ, ჩატარდა ექსპერიმენტები მის კვებით ღირებულებაზე [Hammond et al. 1996] და ტოქსიკურობაზე [Harrison et al. 1996]. კვლევები წარუბდა

ვირთაგვებზე, ბროილერის ქათმებზე, მეწველ ძროხებზე და ლოქოებზე. აღნიშნული ცხოველების ზრდაზე, ლოქოს ფილეს შემადგენლობაზე, ბროილერი ქათმის მკერდის კუნთოვანი მასის შემადგენლობასა და წონაზე, რძის პროდუქტების შემადგენლობაზე, კუჭის ფერმენტების სეკრეციაზე და მონელების ეფექტურობაზე განსხვავებული ეფექტი არ მოუხდენია აღნიშნული ვარიაციის გმ სოიას, არამოდიფიცირებულ სოიასთან შედარებით. ცვლილებები არც პანკრეასის ქსოვილების შესწავლისას აღმოჩნდა. სხვაობა გენმოდიფიცირებული და არამოდიფიცირებული საკვებით კვებისას აღინიშნა მხოლოდ ვირთაგვების და ლოქოების ზრდაზე და ძროხების ლაქტაციის ეფექტურობაზე [Harrison et al. 1996]. სოიას გლიცინის გენით მოდიფიცირებულ კარტოფილზე ჩატარებული ექსპერიმენტებით, რომლითაც კვებავდნენ ვირთაგვებს, არ აღინიშნა სხვაობა მათ ზრდაში, წონაში, სისხლის შემადგენლობასა და ფორმიანი ელემენტების რაოდენობაში. ბაქტერია *Bacillus thuringiensis*-ის *CryIA(b)* გენით მოდიფიცირებული კარტოფილით ჩატარებული ექსპერიმენტისას კი აღმოჩნდა, რომ Bt ტოქსინი თავგებში იწვევს ბეწვის ეპითელური უჯრედების ჰიპერტროფიას და მრავალბირთვიანობას, იწვევს მიტოქონდრიების დეგენერაციას, ლიზოსომების და ვაკუოლების რაოდენობის ზრდას უჯრედში და ააქტივებს წვრილი ნაწლავის მიკროხაოებს და ზოგჯერ აზიანებს მათ [Fares and El-Sayed 1998].

გმო-ს ალერგიულობა. არსებობს სხვადასხვა მოსაზრება გმო-ს ალერგიულობასთან დაკავშირებით. ერთი შეხედულებით, თუ ტრანსგენი აღებულია ისეთი ორგანიზმიდან, რომელიც ხასიათდება ალერგიულობით, შესაძლოა ამ გენით მოდიფიცირებულმა ორგანიზმმაც ანალოგიურად გამოიწვიოს ალერგიები, თუნდაც არამოდიფიცირებული ანალოგი არ ხასიათდებოდეს ალერგიულობით [Bawa et al, 2013]. 1990-იანების შუა პერიოდში ჩატარდა ცდა ალერგიულობაზე ტრანსგენურ სოიაში, რომელიც მოდიფიცირებული იყო ბრაზილიური თხილის გენით, მასში ამინომჟავა მეთიონინის გაზდილი დონის აღმოჩენის იმედით. აღნიშნული თხილი ზოგიერთ ინდივიდში იწვევდა ალერგიულ რეაქციებს. ცდებმა (რადიოალერგოსორბენტული ანალიზი, იმუნობლოტინგი და კანის ნიმუშის კვლევა) აჩვენა, რომ ბრაზილიურ თხილზე ალერგიული ინდივიდები ასევე იყვნენ ალერგიულები ახალი გენმოდიფიცირებული სოიას მიმართ. მეცნიერებმა აღნიშნეს,

რომ მომავალში ბრაზილიური თხილის კულტივაცია აღარ გაგრძელდებოდა, რადგან მასში შემავალი ცილა ალერგენს წარმოადგენდა (Nordlee, et al, 1996). არის მოსაზრება იმასთან დაკავშირებითაც, რომ ცილა, რომელიც არ ხასიათდება ალერგიული რეაქციებით, მისი მაკოდირებელი გენის სხვა ორგანიზმში შეტანით, შესაძლოა ტრანსგენურ ორგანიზმში ისეთი ცვლილებები გამოიწვიოს, რომ შეფასდეს ალერგიის გამომწვევად, მაშინ როდესაც, მისი არამოდიფიცირებული ანალოგი არ განიხილება ალერგიის გამომწვევად [Bawa et al, 2013].

ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ *B. Thuringiensis*-ის *CryIA(b)* გენით მოდიფიცირებული ორგანიზმები, რომლების გამოიმუშავებენ Bt ტოქსინს, ფერმერების ნაწილში იწვევდა კანის მგრძნობელობის მატებას, ასევე, მათი სისხლის შრატის ანალიზისას დაფიქსირდა იმუნოგლობულინი E-ს მატება. აღსანიშნავია, რომ უმეტეს შემთხვევებში, გმო-ს ალერგიულობის შეფასებისას *in vitro* პირობებში ჩატარებული ექსპერიმენტები შეფასება გართულებულია ან გვაძლევს მცდარ მონაცემებს [Bernstein et al. 1999].

ამგვარად, გმო-ს გამოყენებასთან დაკავშირებული რისკების შესაფასებლად ჩატარებული კვლევები და ურთიერთსაწინააღმდეგო შედეგები მიუთითებს, რომ გარემოსა და ადამიანის ჯანმრთელობაზე გმო-ს ზემოქმედების საკითხი შესწავლილი და განხილულ უნდა იქნას ინდივიდუალურად, ყოველ კონკრეტულ შემთხვევაში. ამასთან, აუცილებელია გმო-ს ზემოქმედების გრძელვადიანი შესწავლა და შეფასება.

1.4. გმო-სთან დაკავშირებული სოციალური ასპექტები

ამჟამად არსებული მონაცემები არასრულყოფილია გმო-თან დაკავშირებული რისკების შესახებ, ამასთან, მწირი ინფორმაციაა ადამიანის ორგანიზმზე გმო-ს ხანგრძლივი მოქმედების ეფექტის შესახებ, ამიტომაც ადამიანთა უმეტესობა მიიჩნევს, რომ უმჯობესია თავი შეიკავოს გმო საკვების მიღებისგან, შესაძლოა რისკებისგან თავის დაზღვევის მიზნით. ამის გამო, მომხმარებლები ზოგჯერ არ უთითებენ ეტიკეტზე წარმოებულ საკვებ პროდუქტში გმო-ს არსებობის შესახებ,

რადგან ფიქრობენ, რომ ეს აზარალებს მათ ბიზნესს. სხვადასხვა რელიგიისა და სხვადასხვა კულტურის წარმომადგენლები ეწინააღმდეგებიან გმ საკვების წარმოებას, რადგან თვლიან, რომ ეს არაა საკვების წარმოების ბუნებრივი მეთოდი. ადამიანთა დიდი ნაწილი ნეგატიურად აფასებს გენების გადატანას ერთი ორგანიზმიდან მეორე ორგანიზმებში. ასევე, უარყოფითადაა შეფასებული ისეთი ტრანსგენური მცენარეების შესაძლო ნეგატიურ ზემოქმედება გარემოზე, რომლებიც მრავლდება ჯვარედინი დამტკვერვის საშუალებით და საფრთხედ განიხილება გენთა დრეიფი არამოდულიფიცირებულ ვარიაციების მიმართულებით. აღნიშნული რისკების გათვალისწინებით ადამიანთა დიდ ნაწილში სკეპტიკურ დამოკიდებულებას და შიშს იწვევს რეკომბინანტული დნმ ტექნოლოგია [Bawa et al, 2013].

2011 წლის ივლისში, არასამთავრობო გარემოსდაცვითი ორგანიზაციის „Greenpeace“-ის აქტივისტები შეიჭრნენ „Commonwealth Scientific“-ის და სამრეწველო-სამეცნიერო ორგანიზაციის „CSIRO“-ს ბაზაზე და სრულად გაანადგურეს გენმოდულიფიცირებული ხორბლის ნათესები. 2013 წლის აგვისტოში ფილიპინებში ბრინჯის კვლევის საერთაშორისო ინსტიტუტს (IRRI) თავს დაესხნენ ანტი-გმო აქტივისტები. აღნიშნულმა ორგანიზაციამ 25 წლის ლაბორატორიული მუშაობის შემდეგ გამოიყვანა გენმოდულიფიცირებული „ოქროს ბრინჯი“, ბეტა-კაროტინის სინთეზის უნარით, როგორც იაფი და მარტივი გზა ვიტამინი A-ს წარმოებაში. სამეცნიერო თანამეგობრობამ მკაცრად გააკრიტიკა აღნიშნული ფაქტები, თუმცა ამას სათანადო კონსესუსი არ მოჰყოლია საზოგადოებრივ წრეებში, გმო-ს შესახებ მათი არასრული ინფორმატიულობის გამო [Zhang, et al 2016].

1.5. გმო-ს გამოყენებისა და გავრცელების რეგულირება

1.5.1. საერთაშორისო რეგულაციები

პირველი საერთაშორისო დოკუმენტი, რომლის მიხედვითაც აღიარებული იქნა, რომ თანამედროვე ბიოტექნოლოგიით მიღებული, გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმები წარმოადგენენ ახალ საფრთხეს

ბიომრავალფეროვნების შენარჩუნებისთვის და დასაბუთებული იქნა სათანადო მარეგულირებელი სისტემების შექმნის აუცილებლობა, არის გაეროს გენერალური ასამბლეის მიერ, 1992 წლის 5 ივნისს, რიო-დე-ჟანეიროში, გარემოსა და განვითარების საერთაშორისო კონფერენციაზე (United Nations Conference on Environment and Development) მიღებული „ბიომრავალფეროვნების დაცვის საერთაშორისო კონვენცია“, რომელიც ხელმოწერილია ევროგაერთიანებისა და სხვა 162 სახელმწიფოს მიერ. ასევე, ეს კონვენცია მიზნად ისახავს ბიომრავალფეროვნების დაცვას და მისი კომპონენტების მდგრად გამოყენებას. საყურადღებოა, რომ აღნიშნული კონვენციის საერთაშორისო მონაცემებით, საქართველო მსოფლიოს 25 რეგიონიდან ერთ-ერთია, რომელიც უნიკალური მრავალფეროვნების გამო დაცვასა და გაფრთხილებას საჭიროებს [კონვენცია ბიოლოგიური მრავალფეროვნების შესახებ, 1994].

გენმოდიფიცირებული პროდუქციის სამართლებრივი რეგულირების შესახებ უმნიშვნელოვანესი დოკუმენტია ბიომრავალფეროვნების კონვენციის ბიოუსაფრთხოების კარტახენას ოქმი, რომელიც მიღებული იქნა 2000 წლის ნოემბერში და ძალაში შევიდა 2003 წლის 11 სექტემბერს. მას შეუერთდა ევროკავშირის, აფრიკისა და სხვა კონტინენტების მრავალი ქვეყანა. საქართველო კარტახენას ოქმს შეუერთდა 2008 წელს [საქართველოს პარლამენტის დადგენილება N 305-II ს, 2008 წლის 26 სექტემბერი]. კარტახენას ოქმი - ეს არის საერთაშორისო შეთანხმების დოკუმენტი, რომელიც მიზნად ისახავს, ხელი შეუწყოს უსაფრთხოების სათანადო დონის დაცვას იმ სფეროში, რომელიც ეხება თანამედროვე ბიოტექნოლოგიის მეთოდების გამოყენებით მიღებული ისეთი ცოცხალი მოდიფიცირებული ორგანიზმების უსაფრთხო გადაცემას, მოპყრობასა და გამოყენებას, რომლებსაც შეუძლიათ მავნე ზეგავლენა მოახდინონ ბიოლოგიური მრავალფეროვნების დაცვასა და მდგრად გამოყენებაზე. ამავე დროს, ოქმის მიზანია, „გაითვალისწინოს საფრთხე ადამიანის ჯანმრთელობისთვის და განსაკუთრებული ყურადღება დაუთმოს ზემოხსენებული ორგანიზმების ტრანსსასაზღვრო გადაადგილებას“. ოქმის მიზანია, დაიცვას ბიომრავალფეროვნება პოტენციური რისკებისგან, რომლებიც შესაძლოა, გამოიწვიონ ცოცხალმა გენმოდიფიცირებულმა

ორგანიზმებმა [ბიოლოგიური მრავალფეროვნების კონვენციის ბიოუსაფრთხოების კარტახენას ოქმი, 2000].

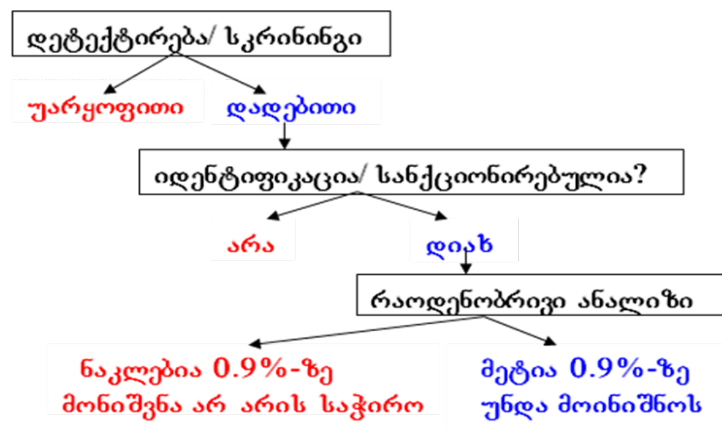
მიუხედავად შემოღებული ნორმატივებისა, მსოფლიოში ყველა ქვეყანას აქვს ინდივიდუალური მიდგომა გენმოდირიცირებული ორგანიზმებისა და მათი პროდუქტების საკანონმდებლო რეგულირებასა და მარკირებასთან დაკავშირებით.

1.5.2. გმო-ს რეგულირება ევროკავშირში

გენმოდირიცირებული ორგანიზმების მარეგულირებელი კანონმდებლობის ჩამოყალიბება დასავლეთ ევროპის ქვეყნებში გასული საუკუნის 80-იან წლებში დაიწყო. ევროკავშირში გმ მცენარეების გარემოში გავრცელება რეგულირდება ყოველ კონკრეტულ შემთხვევაში ადგილობრივ გარემოსთან დაკავშირებული რისკების შეფასების საფუძველზე [DIRECTIVE 2001/18/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, 12 March 2001].

იმისთვის, რომ ევროკავშირის ქვეყნებში დაცული იქნას ადამიანისა და ცხოველის ჯანმრთელობა, გენმოდირიცირებული სასურსათო პროდუქტები მკაცრად რეგულირდება ბაზარზე გატანამდე. ევროკავშირის კანონმდებლობა პრევენციის პრინციპითაა შექმნილი და აღიარებს გენმოდირიცირებას, როგორც სარისკო ტექნოლოგიას. ითვალისწინებს რა, სხვა ლეგიტიმურ ფაქტორებს და მარკირების დაწესებით თავისუფალ არჩევანს აძლევს ფერმერებსა და მომხმარებლებს; გასცემს ნებართვას კონკრეტული შემთხვევის უვნებლობის შეფასების საფუძველზე. ამასთანავე, ითვალისწინებს სამთავრობო საექსპერტო განხილვის აუცილებლობას, უზრუნველყოფს სახელმწიფო რეესტრის გამჭვირვალობას, ასევე, საჯარო ეროვნული მმართველობის ორგანოს შეფასების ანგარიში და ევროპის სურსათის უვნებლობის ორგანოს დასკვნა. ამასთან, საზოგადოებას ეძლევა ორივე შემთხვევაში კომენტარის გაკეთების საშუალება [Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council; Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council].

ევროკავშირში მარკირებას ექვემდებარება თანამედროვე ტექნოლოგიებით დამზადებული სასურსათო პროდუქტები ან ის პროდუქტები, რომლებიც შეიცავენ გენმოდირებული ორგანიზმებს. კანონმდებლობა ითვალისწინებს ჩვეულებრივ კვების პროდუქტებში რომელიმე ინგრედიენტის გენმოდირებული მასალის გამოყენების 0,9%-იან ზღვარს (სურ. 1), რაც გამოითვლება გენომის ასლების რაოდენობის მიხედვით. ამასთან, მნიშვნელოვანია გმო-ს შემოწმება და მიკვლევა პროდუქტის წარმოების ყველა ეტაპზე [Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council]. 0,9%-იან ზღვარს ქვევით პროდუქტი არ საჭიროებს მარკირებას (სურ.1).



სურათი 1. ევროკავშირში გენმოდირებული საკვების მარკირებისთვის საჭირო ანალიზის პროცედურა.

ევროკავშირის მარკირების რეჟიმის თანახმად, მარკირების მოთხოვნები ეფუძნება არა ახალი დნმ-ის და/ან ახალი ცილის არსებობას მზა სასურსათო პროდუქტში, არამედ, რამდენად იქნა გამოყენებული წარმოების პროცესის რომელიმე ეტაპზე გენმოდირებული ორგანიზმიდან მიღებული გენმოდირებული პროდუქტი ან ინგრედიენტი. ევროკავშირის რეგულაციის თანახმად, სურსათის ეტიკეტირება სავალდებულოა, თუ ის შეიცავს 0,9%-ზე მეტ გმო-ს, ამასთან გენმოდირებულ პროდუქტს გავლილი უნდა ჰქონდეს შემოწმება უვნებლობაზე [Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council].

1.5.3. გმ სურსათის რეგულირება აშშ-სა და კანადაში

ამერიკასა და კანადაში გენმოდირებული სურსათი ბაზარზე განთავსების წინ მოწმდება უვნებლობაზე. ეს ორივე ქვეყანა მიიჩნევს, რომ გენმოდირებული სურსათი იმგვარადვე უნდა იქნას განხილული, როგორც სხვა დანარჩენი სურსათი. მარკირებასთან დაკავშირებით არ არსებობს რაიმე ზოგადი სახის „ყოვლისმომცველი“ სავალდებულო მარკირების მოთხოვნები. მარკირება სავალდებულოა მხოლოდ იმ შემთხვევაში, როდესაც გენმოდირებული სურსათი არამოდირებულ ანალოგთან შედარებით არ არის ეკვივალენტური შემადგენლობის, კვებითი ღირებულების ან შესაძლოა გამოყენებულ იქნას არადანიშნულებისამებრ. ალერგენები აუცილებლად უნდა იყოს მითითებული ისევე, როგორც სხვა დანარჩენი კომპონენტები, რომელთა გამოყენებამაც შესაძლოა გარკვეული ზემოქმედება მოახდინოს ადამიანის ჯანმრთელობაზე. ამერიკის შეერთებულ შტატებში შემუშავებულია საწარმოთა სახელმძღვანელო, რომელშიც მითითებულია, რომ, იმ შემთხვევაში, როდესაც მეწარმეს სურს, ნებაყოფლობით გაუკეთოს მარკირება გმო-გან წარმოებულ პროდუქტს, ეტიკეტზე განთავსებული წარწერები ექვემდებარება ზოგად დებულებებს, რომლებმაც შეცდომაში არ უნდა შეიყვანოს მომხმარებელი [Guide to U.S. Regulation of Genetically Modified Food and Agricultural Biotechnology Products].

1.5.4. გმო-ს რეგულირება საქართველოში

საქართველოს კანონმდებლობით იკრძალება ცოცხალი გენმოდირებული ორგანიზმების იმპორტი და გარემოში ინტროდუქცია, გარდა კვლევითი მიზნით ჩაკეტილ სისტემაში გამოყენებისა [საქართველოს კანონი ცოცხალი გენმოდირებული ორგანიზმების შესახებ, 2014]. საქართველოში მოქმედებს გმ საკვების შესახებ ევროკავშირის ქვეყნების მსგავსი რეგულაცია. 2014 წელს საქართველოს პარლამენტმა მიიღო კანონი გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმებისა და მათგან წარმოებული გენმოდირებული პროდუქტის

ეტიკეტირების შესახებ, რომლის თანახმადაც, აუცილებელია მოხდეს მარკირება, თუ საკვებ პროდუქტებში გმ ინგრედიენტის შემცველობა აღემატება 0.9%-ს [საქართველოს კანონი „სურსათად/ცხოველის საკვებად განკუთვნილი გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმებისა და მათგან წარმოებული გენმოდიფიცირებული პროდუქტის ეტიკეტირების შესახებ“, 2014], რაც შეეხება ეტიკეტირების წესებს: გენმოდიფიცირებული ორგანიზმის ეტიკეტის მარცხენა ზედა კუთხეში, წრიულ ფორმაში განთავსებული უნდა იყოს წარწერა „გმო“, ხოლო გენმოდიფიცირებული პროდუქტის ეტიკეტის მარცხენა ზედა კუთხეში, წრიულ ფორმაში – წარწერა „გმ“. აღნიშნული წარწერები იმდენად თვალსაჩინო, ადვილად აღქმადი და მკვეთრად გამოსახული უნდა იყოს, რომ მომხმარებელმა ადვილად შეძლოს მათი იდენტიფიცირება. აუცილებელია, რომ გმ ინგრედიენტის სახელი იყოს მითითებული. აღნიშნული ეტიკეტირების წესების შესაბამისობა დგინდება სახელმწიფო კონტროლისა და საბაჟო კონტროლის დროს [საქართველოს კანონი „სურსათად/ცხოველის საკვებად განკუთვნილი გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმებისა და მათგან წარმოებული გენმოდიფიცირებული პროდუქტის ეტიკეტირების შესახებ“, 2014].

თავი 2. გენმოდიფიცირებული მცენარეების მოლეკულური სტრუქტურა

2.1. გენმოდიფიცირებული სიმინდის MON810-ის დახასიათება

სიმინდი მარცვლოვანთა ოჯახის წარმომადგენელია, რომლის სელექციური შეჯვარება ადამიანმა დაახლოებით 10 000 წლის წინ დაიწყო. მწერებითა და მცენარის დაავადებებით გამოწვეული კულტურების ყოველწლიური დანაკარგი მსოფლიო მასშტაბით 10-15%-ს აღემატება, რაც ნიშნავს ეკონომიკურ და საწარმოო ზარალს, ამიტომ მავნე მწერებისა და დაავადებების კონტროლი ერთ-ერთ უმნიშვნელოვანეს საკითხს წარმოადგენს აგრომეურნეობის სფეროში. ტრადიციული ინსექტიციდები არ წარმოადგენს მათთან ბრძოლის სრულყოფილ საშუალებას, რადგან ხდება სასარგებლო მწერების განადგურებაც [Gewin et al, 2003].

მსოფლიოში გენმოდირეცირებული კულტურების გავრცელების მიხედვით, სიმინდი მეორე ადგილზეა სოიას შემდეგ. გენმოდირეცირებული სიმინდის ერთ-ერთი ვარიანტი არის MON810, რომელიც რეზისტენტულია ევროპული მარცვლეულის ჭიის (European corn borer-ECB), სიმინდის მატლისა (ფარვანა) და კოლორადოს ჭიის მიმართ. MON810 სიმინდის შეიქმნა კომპანია „მონსანტოში“ რეკომბინანტული დნმ-ტექნოლოგიის გამოყენებით. მიკრონაწილაკებით ბომბარდირების გზით მცენარეულ უჯრედებში შეიტანეს ნიადაგის ბაქტერიის *Bacillus thuringiensis*-ის ინსექტიციდური ცილის გენი. MON810-ში ექსპრესირდება ინსექტიციდური ცილის, *Cry1A(b)* δ-ენდოტოქსინის მოკლე ფორმა და იცავს სიმინდს ევროპული მარცვლეულის ჭიის მიერ გამოწვეული დაზიანებისგან. MON810-სიმინდი ტრანსფორმირებულ იქნა *Cry1A(b)* გენის ერთი ასლით, რომელიც კონტროლდება ყვავილოვანი კომპოსტოს მოზაიკური ვირუსის CaMV 35S ძლიერი პრომოტორითა და სიმინდის hsp 70 ინტრონის ლიდერ-თანმიმდევრობით (სურ. 2). *Bacillus thuringiensis*-ის *Cry1A(b)*-ის მაკოდირებელი სიქვენსი მოდიფიცირებულ იქნა, რათა მომხდარიყო მცენარეში δ-ენდოტოქსინის ცილის ოპტიმალური და მაქსიმალური ექსპრესია, ტერმინატორის სახით კი გამოყენებულია აგრობაქტერიის *Agrobacterium tumefaciens*-ის ნოპალინ-სინთაზას გენის მოდიფიცირებული ტერმინატორი (T-NOS) [Querci M. and Mazzara M. Session 7].



სურათი 2. MON810-ის რეკომბინანტული დნმ

რეკომბინანტული დნმ-ის კონსტრუირებისათვის გამოყენებულია PV-ZMBK07 და PV-ZMGT10 პლაზმიდური დნმ-ების ნარევი. PV-ZMBK07 შეიცავს *Cry1A(b)* გენს, ხოლო PV-ZMGT10 პლაზმიდა - *CP4 EPSPS* და *gox* გენებს. *EPSPS* - გენი განსაზღვრავს ჰერბიციდი გლიფოსატის მიმართ ტოლერანტობას. ორივე პლაზმიდა შეიცავს *nptII* გენს სელექციისთვის. ტრანსფორმაციის შემდეგ უჯრედები ხდებიან გლიფოსატ

ტოლერანტულნი და სელექციის შემდეგ აღნიშნული ტრანსფორმირებული უჯრედების კულტივირება ხდება რეგენერაციის მიზნით [Querci M. and Mazzara M. Session 7].

სიმინდი MON810 აშშ-ში პირველად გავრცელდა 1996 წლის ივლისში, ხოლო ევროპაში მისი კომერციალიზაცია 1998 წლის 22 აპრილის 98/294/EC-ს გადაწყვეტილებით იქნა ნებადართული. კანადის სურსათის ინსპექციის სააგენტომ გამოსცა დადგენილება მისი საკვებად გამოყენების შესახებ. მისი გავრცელება მოხდა თანდათან არგენტინაში, ავსტრალიაში, იაპონიაში, სამხრეთ აფრიკასა და შვეიცარიაში [Querci M. and Mazzara M. Session 7].

2.2. გენმოდიფიცირებული სიმინდის Bt-176-ის დახასიათება

სიმინდი Bt-176 გენმოდიფიცირებული სიმინდის ერთ-ერთი ყველაზე გავრცელებული ხაზია, რომელშიც შეტანილია ბაქტერია *Bacillus thuringiensis* (Bt) გენი, შესაბამისად, ამ სიმინდს უწოდებენ Bt სიმინდს. *Bacillus thuringiensis* (Bt) არის ნიადაგის გრამდადებითი ბაქტერია, ის წარმოქმნის მწერების, პეპლებისა და ჩრჩილის (ლეპიდოპტერა) მიმართ ტოქსიკურ ცილას, რომელიც უკავშირდება მწერის ნაწლავის რეცეპტორებს და ნორმალურ მონელებას უშლის ხელს. ეს ცილა ადამიანის ორგანიზმისთვის არ არის ტოქსიკური, ამიტომ აქტიურად ხდება მისი გენის კლონირება მნიშვნელოვან სასოფლო-სამეურნეო კულტურებში, რათა მწერებით გამოწვეული მოსავლიანობის შემცირება იქნას თავიდან აცილებული პესტიციდების გამოყენების გარეშე [Gewin et al, 2003].

Bt-176 სიმინდი ტრანსფორმირებულია *Cry1A(b)* გენის (სურ. 3) ორი ასლით.

```
ID   I41419      standard; DNA; UNC; 1947 BP.
AC   I41419;
.....
DE   Sequence 3 from patent US 5625136.
.....
```

RA Koziel M.G., Desai N.M., Lewis K.S., Kramer V.C., Warren G.W., Evola S.V.,
RA Crossland L.D., Wright M.S., Merlin E.J., Launis K.L., Rothstein S.J.,
RA Bowman C.G., Dawson J.L., Dunder E.M., Pace G.M., Suttie J.L.;
RT "Synthetic DNA sequence having enhanced insecticidal activity in maize";
RL Patent number [US5625136](#)-A/3, 29-APR-1997.

.....

FT [source](#) 1..1947
FT /db_xref="taxon:[12908](#)"
FT /organism="unclassified"

SQ Sequence 1947 BP; 412 A; 729 C; 528 G; 278 T; 0 other;
60 atggacaaca accccaacat caacgagtgc atcccctaca actgcctgag caaccccgag
120 gtggaggtgc tgggcggcga gcgcctcgag accggctaca ccccatcgga catcagcctg
180 agcctgaccc agttcctgct gagcgagttc gtgcccgggc cgggcttcgt gctggggcctg
240 gtggacatca tctggggcat cttcgccccc agccagtggg acgccttcct ggtgcagatc
300 gagcagctga tcaaccagcg catcgaggag ttcgcccga accaggccat cagccgcctg
360 gagggcctga gcaacctgta ccaaattctac gccgagagct tccgcgagtg ggaggccgac
420 cccaccaacc ccgccctgcg cgaggagatg cgcattccagt tcaacgacat gaacagcgcc
480 ctgaccaccg ccatccccct gttcgccgtg cagaactacc aggtgcccct gctgagcgtg
540 tacgtgcagg ccgccaacct gcacctgagc gtgctgcgcg acgtcagcgt gttcggccag
600 cgctggggct tcgacgccgc caccatcaac agccgctaca acgacctgac ccgcctgac
660 ggcaactaca ccgaccagc cgtgcgctgg tacaacaccg gcctggagcg cgtgtggggg
720 cccgacagcc gcgactggat caggtacaac cagttccgcc gcgagctgac cctgaccgtg
780 ctggacatcg tgagcctgtt cccaactac gacagccgca cctaccccat ccgcaccgtg
840 agccagctga ccgcgagat ttacaccaac ccctgtctgg agaacttcga cggcagcttc
900 cgcggcagcg ccagggcat cgagggcagc atccgcagcc ccacctgat ggacatcctg
960 aacagcatca ccatctacac cgacgcccac cgcggcgagt actactggag cggccaccag
1020 atcatggcca gccccgtcgg cttcag[cggc cccgagttca cctt](#)ccccct gtacggcacc
[CRYIA1 forward primer outer PCR](#)
1080 atgggcaacg ctgcacctca gcagcgcctc gtggcacagc tgggccaggg agtgta[ccgc](#)
[accctgagca gcac](#)cctgta ccgtcgacct ttcaacatcg gcatcaacaa ccagcagctg
1140 [CRYIA3 forward primer inner \(nested\) PCR](#)
1200 agcgtgctgg acggcaccga gttcgccctac ggaccagca gcaacctgcc cagcgccgtg
1260 taccgcaaga gcggcaccgt ggacagcctg gacgagatcc [ccctcagaa caacaacgtg](#)
[CRYIA4 reverse primer inner \(nested\) PCR](#)

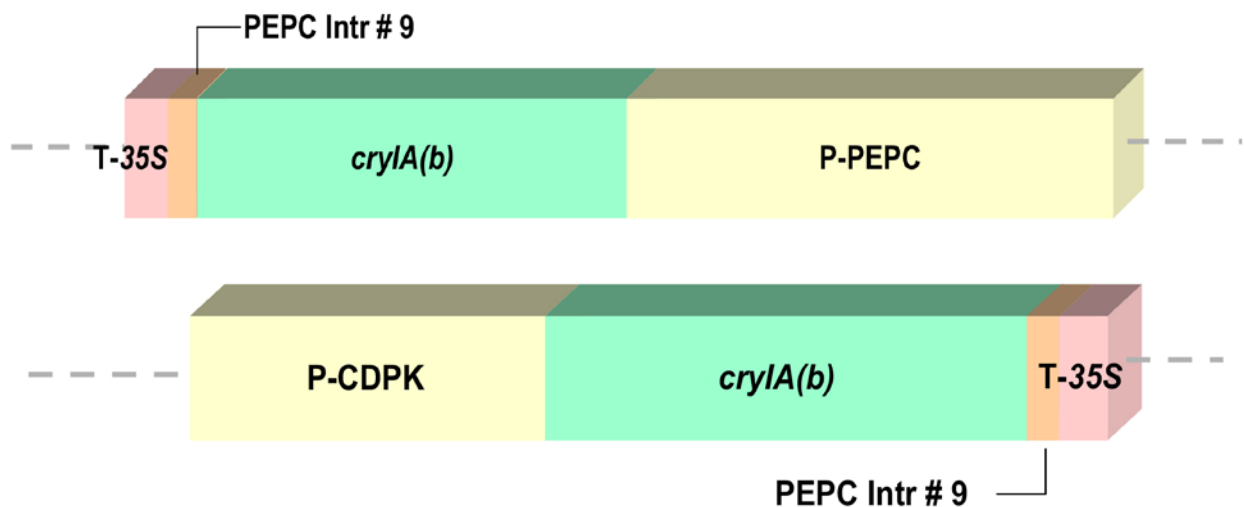
```

1320 ccacctcgac agggcttcag ccaccgtctg agccacgtga gcatgttccg cagtggcttc
1380 agcaacagca gcgtgagcat catccgtgca cctatgttca gctggattca ccgcagtgcc
1440 gagttcaaca acatcatccc cagcagccaa atcaccaga tccccctgac caagagcacc
      CRYIA2 reverse primer outer PCR
1500 aacctgggca gcggcaccag cgtggtgaag ggccccggct tcaccggcgg cgacatcctg
1560 cgccgcacca gccccggcca gatcagcacc ctgcgcgtga acatcaccgc cccccctgagc
1620 cagcgtctacc gcgtccgcat ccgctacgcc agcaccacca acctgcagtt ccacaccagc
1680 atcgacggcc gcccacatcaa ccagggaac ttcagcgcca ccatgagcag cggcagcaac
1740 ctgcagagcg gcagcttccg caccgtgggc ttcaccaccc cttcaactt cagcaacggc
1800 agcagcgtgt tcaccctgag cgcccacgtg ttcaacagcg gcaacgaggt gtacatcgac
1860 cgcacgcagt tcgtgcccg cagagtgacc ttcgaggccg agtacgacct ggagagggct
1920 cagaaggccg tgaacgagct gttcaccagc agcaaccaga tcggcctgaa gaccgacgtg
      accgactacc acatcgatca ggtgtag

```

სურათი 3. Bt-176 სიმინდში კლონირებული *CryIA(b)* გენის სიქვენსი (GenBank acc.no. 1414119)

CryIA(b) გენის ერთი ასლის ექსპრესია მიმდინარეობს მწვანე ქსოვილებში, რომელსაც აკონტროლებს ფოსფოენოლპირუვატ-კარბოქსილაზას პრომოტორი (P-*PEPC*), ხოლო *CryIA(b)* გენის მეორე ასლის ექსპრესია მიმდინარეობს მტვრიანებში და მის კონტროლს ახორციელებს კალციუმდამოკიდებული პროტეინ-კინაზას პრომოტორი (P-*CDPK*) (სურ. 4).



სურათი 4. Bt-176 სიმინდის რეკომბინანტული დნმ

ორივე კონსტრუქტი ბოლოვდება ყვავილოვანი კომბოსტოს მოზაიკური ვირუსიდან მიღებული ტერმინატორით (T-*CaMV 35S*). ასევე, მის შემადგენლობაში შედის სიმინდის ფოსფონოლპირუვატ-კარბოქსილაზას გენის მონაკვეთი intron 9. *Cry1A(b)* გენის ექსპრესია მწვანე ქსოვილებში მცენარეს იცავს მწერების ლარვების პირველი თაობისგან, რომლებიც იკვებებიან მწვანე ქსოვილებით, ხოლო *Cry1A(b)* გენის ექსპრესია მტვრიანებში მცენარეს იცავს მწერების ლარვების მეორე თაობისგან, რომლებიც იკვებებიან აღნიშნული ქსოვილით [Querci M. and Mazzara M. Session 7].

დღეისთვის ბიოტექნოლოგიით მიღებულ სიმინდს უკავია 60.6 მილიონი ჰექტარი მსოფლიოში, რაც შეადგენს სიმინდის ნათესების საერთო რაოდენობის 64%-ს. [ISAAA Brief 54, 2018].

2.3. ჰერბიციდების მიმართ რეზისტენტული სოიას (Roundup Ready Soybean)

დახასიათება

1994 წელს ამერიკის ბაზარზე პირველად გამოჩნდა კომპანია მონსანტოს მიერ შექმნილი გენეტიკურად მოდიფიცირებული სოია. ეს იყო ჰერბიციდ გლიფოსატის მიმართ რეზისტენტული Roundup Ready სოია (პირველი ნაირსახეობა ცნობილი იყო როგორც GTS 40-3-2). 2014 წელს მსოფლიოს მასშტაბით გმო სოია დაითესა 90.7 მილიონი ჰექტარზე, რაც იყო სოიას კულტივირებული ტერიტორიის 82% [Homrich et al., 2012].

სოიას გენეტიკური მანიპულაცია მისი მრავალმხრივ გამოყენების საშუალებას იძლევა, რაც ზრდის მასზე მოთხოვნას. თავდაპირველად, მწარმოებლებს სურდათ, გამოეყენებინათ ტრანსგენური მცენარე, რათა მიეღოთ უფრო მეტი მოსავალი ნაკლები დანახარჯებით. ასევე, მათ უნდოდათ, გამოეწოვებინათ ის პრობლემები, რომელიც ხელს უშლიდა ზრდის პროცესს, მაგრამ საბოლოოდ აღმოაჩინეს, რომ სოიას მოდიფიცირებით უნდა მიეღოთ ან უფრო ჯანსაღი კომპონენტების მქონე მცენარე, ან აქცენტი უნდა შეჩერებულიყო დიდი რაოდენობით მოსავალის მიღებაზე. ეს ფაზები ცნობილი გახდა როგორც გენეტიკურად მოდიფიცირებული საკვების პირველი და მეორე თაობა [ISAAA Brief 54, 2018]. როგორც პიტერ ცელეკი აღწერს,

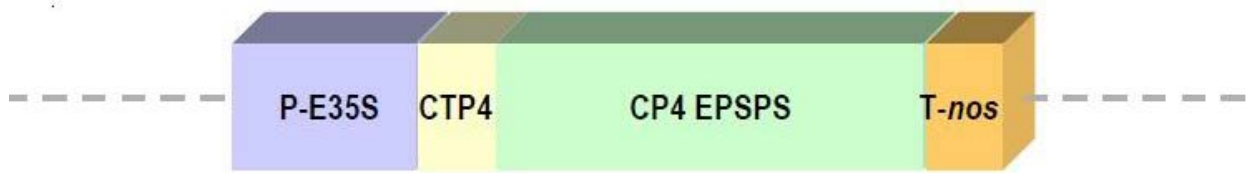
გმო-პროდუქტების პირველი თაობის სარგებელი ორიენტირებული იქნა წარმოების პროცესსა და კომპანიებთან მიმართებაში, ხოლო მეორე თაობა კი პირიქით სხვადასხვა უპირატესობებსა და დამატებით ღირებულებებს სთავაზობს მომხმარებელს, როგორცაა კვებითი კომპოზიცია და თერაპიული ეფექტი [Celec, et al., 2005].

ჰერბიციდი გლიფოსატი (Roundup-ის აქტიური ინგრედიენტი) გამოიყენება სარეველა ბალახებთან საბრძოლველად. ის არის ერთ-ერთი ყველაზე გავრცელებული ჰერბიციდი, რომელსაც მსოფლიო მასშტაბით მოიხმარენ. მისი მოქმედების მექანიზმი მდგომარეობს იმაში, რომ ის აინჰიბირებს შეუცვლელი ამინომჟავების სინთეზს, როგორცაა: ფენილალანინი, თიროზინი და ტრიფტოფანი, რის შედეგადაც მცენარე იღუპება. მოცემული ამინომჟავების სინთეზი არ შეუძლიათ ცხოველებს, მას მხოლოდ მცენარეები და მიკროორგანიზმები წარმოქმნიან [Querci M. Mazzara M. Session 7].

მცენარეები და მიკროორგანიზმები აღნიშნულ ამინომჟავებს ქმნიან ფერმენტით, რომელსაც ეწოდება 5-ენოლპირუვილშიკიმატე-3-ფოსფატ სინთაზა (*EPSPS*). იგი წარმოადგენს შიკიმატეს ბიოქიმიური გზის მთავარ ფერმენტს, საიდანაც არომატული ამინომჟავები წარმოიქმნება. *EPSPS*-ცილა არის პირდაპირი სამიზნე გლიფოსატისთვის და მისი ზემოქმედებით ფერმენტი იცვლის კონფორმაციას. მას ვეღარ უკავშირდება ფოსფოენოლპირუვატი და ფერმენტი ინჰიბირდება. ამის შედეგად ამინომჟავები აღარ სინთეზირდება [Querci M. and Mazzara M. Session 7].

ჰერბიციდ რაუნდაპის მიმართ რეზისტენტულ სოიაში (Roundup Ready Soybean-RRS) ჩასმულია აგრობაქტერია *Agrobacterium tumefaciens*-ის CP4-შტამიდან აღებული *EPSPS* გენი. ეს გენი აკოდირებს ბაქტერიულ *EPSPS* ფერმენტს, რომელიც არაა მგრძნობიარე გლიფოსატის მიმართ. მას შეუძლია ყველა იმ არომატული ამინომჟავის სინთეზი, რომელიც საჭიროა მეტაბოლიზმისთვის [Querci M. and Mazzara M. Session 7].

RRS - სოიაში *EPSPS* გენი მკაცრად რეგულირდება ყვავილოვანი კომბოსტოს მოზაიკური ვირუსის ძლიერი პრომოტორით (P-CaMV E35S) და *Agrobacterium tumefaciens*-ის ნოპალინ სინთაზას ტერმინატორით (T-nos).



სურათი 5. Roundup Ready სოიას რეგულატორული უბნის სქემატური გამოსახვა [Padgett et al. 1995].

EPSPS გენის 5'-ბოლოზე დააკლონირეს ქლოროპლასტების სატრანზიტო პეპტიდის (CTP4) მაკოდირებელი დნმ-სიქვენსი (სურ. 5). ეს სასიგანალო პეპტიდი შესაძლებელს ხდის ახლად სინთეზირებული ფერმენტის იმპორტს ქლოროპლასტებში, სადაც განლაგებულია „შიკიმატეს გზა“ და გლიფოსატთან ურთიერთქმედების საიტები. *EPSPS* ცილის ტრანსპორტირების დასრულების შემდეგ სატრანზიტო პეპტიდი მოშორდება და დეგრადირდება სპეციფიური პროტეაზების საშუალებით [Querci M. and Mazzara M. Session 7].

თავი 3. გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების ანალიზი საკვებ პროდუქტებში

3.1. გმო-ს დეტექციის ტექნოლოგიური მიდგომები

გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების დეტექცია შედგება სამი თანმიმდევრული საფეხურისგან: თვისებრივი დეტექტირება, იდენტიფიკაცია და რაოდენობრივი შეფასება.

1. თვისებრივი დეტექტირება (გმო-ს სკრინინგი). დეტექტირების მიზანია იმის განსაზღვრა, პროდუქტი შეიცავს თუ არა გენმოდიფიცირებულ ორგანიზმს. ამ მიზნით, შესაძლებელია სკრინინგ-მეთოდის გამოყენება. დეტექტირებისას ანალიზური მეთოდები უნდა იყოს საკმაოდ მგრძნობიარე და უტყუარი, რათა მიღებულ იქნას ზუსტი და სარწმუნო შედეგები.

2. იდენტიფიკაცია. იდენტიფიცირების მიზანს წარმოადგენს გმო-ს ვარიაციის (ხაზის) დადგენა და განსაზღვრა, არის თუ არა ის სანქცირებული. გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების იდენტიფიკაციისთვის სპეციფიური

ინფორმაცია (დეტალები გმო-ს რეკომბინანტული დნმ-ის სტრუქტურისა და სიქვენსის შესახებ) აუცილებლად ხელმისაწვდომი უნდა იყოს.

3. რაოდენობრივი შეფასება. თუ საკვები პროდუქტის შემადგენლობაში შედის ერთი ან მეტი გენმოდიფიცირებული ორგანიზმი, რომლის გამოყენებაც ნებადართულია, ამ შემთხვევაში, აუცილებელია, ცალკეულ ინგრედიენტში დადგინდეს გმო-ს არსებობა და შეფასდეს მისი პროცენტული შემცველობა 0,9%-იანი ზღვრული მნიშვნელობის გათვალისწინებით [Bonfini et al, 2001].

გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების ან მათი პროდუქტების დეტექცია შესაძლებელია გმო-ში კლონირებული დნმ-ის ან ექსპრესირებული ახალი ცილის საშუალებით [Dong et al, 2008, Anklam et al, 2002]. მეთოდთა უმეტესობა მიმართულია დნმ-ის დეტექციაზე და შედარებით მცირე რაოდენობის მეთოდები შემუშავებულია ცილების ან რნმ-ის გამოსაკვლევად, რასაც რამდენიმე მიზეზი აქვს: (1) დნმ მდგრადი მოლეკულაა რნმ-თან შედარებით, ცილების მდგრადობა კი ცვალებადია და დამოკიდებულია ცილის ბუნებაზე; (2) დნმ-ის საინტერესო ფრაგმენტები შეიძლება გამოიყოს და გამრავლდეს მილიონობით ასლით რამდენიმე საათში დნმ-ზე დაფუძნებული პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის (პჯრ) ტექნოლოგიის გამოყენებით, ხოლო რნმ-ისა და ცილების გამრავლება შედარებით რთული და ნელი პროცესია.

ცილის დეტექციაზე დაფუძნებული მეთოდები ემყარება ცილისა და ანტისხეულების სპეციფიკურ დაკავშირებას. ანტისხეული შეიცნობს უცხო ცილის მოლეკულას, უკავშირდება მას და ეს კომპლექსი წარმატებით დეტექტირდება ქრომოგენული (ფერადი) რეაქციით. ამ ტექნიკას ELISA (enzyme linked immunosorbent assays) ეწოდება. ცილის დეტექციისთვის ანტისხეულს ესაჭიროება, რომ ეს ცილა იქნას გამოყოფილი. ცილა შეიძლება გამოიყოს გენმოდიფიცირებული ორგანიზმიდან ან სინთეზირებულ იქნას ლაბორატორიაში, თუ მისი აგებულება დეტალურადაა ცნობილი [Bonfini et al, 2001].

დნმ-ის დეტექციაზე დაფუძნებული მეთოდები ძირითადად პჯრ-ტექნიკაზეა დამყარებული. პჯრ არის მოლეკულური ბიოლოგიის მეთოდი, რომელიც გამოიყენება დნმ-ის ფერმენტული რეპლიკაციისთვის ცოცხალი ორგანიზმების გამოყენების გარეშე. ეს მეთოდი დნმ მოლეკულების მცირე რაოდენობის

ექსპონენციალური ამპლიფიცირების საშუალებას იძლევა. პჯრ *in vitro* მეთოდია, ამიტომ შეიძლება გამოყენებულ იქნას დნმ-ის ყველა ფორმისთვის სხვადასხვა სახის გენეტიკური მანიპულაციების შესასრულებლად. პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის მეთოდი დაფუძნებულია დნმ-ის კონკრეტული უბნის მრავალჯერად კოპირებაზე თერმოსტაბილური დნმ-პოლიმერაზას საშუალებით, თუ ცნობილია ამ უბნის ბოლოების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა. კოპირება ხდება წინასწარ შერჩეული უბნიდან სინთეტური ოლიგონუკლეოტიდების (პრაიმერების) თანაობისას. პრაიმერები კომპლემენტარულია დნმ-ის შერჩეული უბნის სხვადასხვა ჯაჭვის ბოლოების სიქვენსების. პჯრ-ის საშუალებით ამპლიფიცირდება დნმ-ს მოკლე მონაკვეთები, რომელთა სიგრძე არ აღემატება 3000 ფუძე წყვილს (3 Kbp) [Somma M. and Querci M. Session 6].

პჯრ წარმოადგენს გმო-ს დეტექციის რეფერენს მეთოდს და სხვა მეთოდებზე ხშირად გამოიყენება. გმო-ს დეტექციისას ხდება ტრანსგენური მონაკვეთის ამპლიფიცირება პჯრ-ით. პჯრ ანალიზისთვის საკმარისია თუნდაც მცირე რაოდენობის სამიზნე დნმ-ის არსებობა სინჯში, რამაც აღნიშნული ტექნოლოგია შეუცვლელი გახადა პროცესირებული პროდუქტების სკრინინგისთვის. პჯრ მეთოდი მაღალი სიზუსტის და მგრძნობელობის გამო ერთ-ერთ ყველაზე საიმედო მეთოდად არის აღიარებული გმო-ს დეტექციისთვის ძლიერ პროცესირებული საკვების ანალიზისას [Anklam et al, 2002; Randhawa et al, 2016; Broeders et al, 2012].

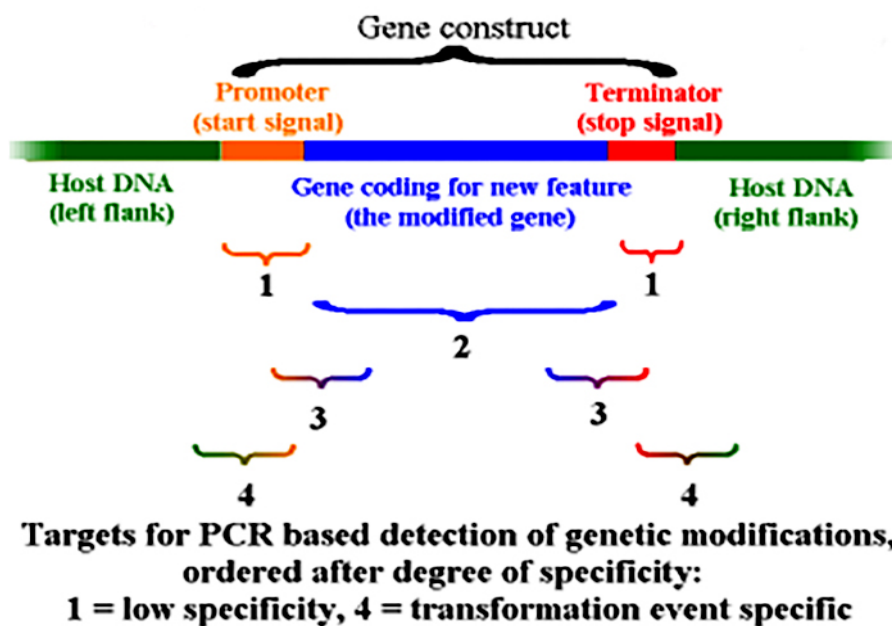
გმო-ს დეტექციის მეთოდების მონაცემთა ბაზა მოიცავს 300-ზე მეტ სხვადასხვა დნმ-ზე დაფუძნებულ (პჯრ) და ცილაზე დაფუძნებულ (ELISA) მეთოდებს [Dong et al 2008]. გმო-ს დეტექციის სხვა მიდგომები დაფუძნებულია შემდეგი ტექნიკური ხერხების გამოყენებაზე: კაპილარული ელექტროფორეზი (CE), ხილული სპექტროსკოპია და ინფრაწითელ არეში სპექტროსკოპია (vis/NIR), მასური სპექტრომეტრია, მიკროარეები და სხვადასხვა ტიპის ბიოსენსორები, მათ შორის პლაზმურ-რეზონანსული სენსორები [Placido et al 2016].

3.2. გმო-ს თვისებრივი დეტექცია: სკრინინგი და იდენტიფიკაცია

გენმოდიფიცირებული ორგანიზმები ახალი გენის კლონირების უბანში ჩვეულებრივ შეიცავს სამ ელემენტს (სურათი 6):

1. პრომოტორ ელემენტს, რომლის ჩართვა-გამორთვით იწყება ჩასმული გენის ტრანსკრიფცია.
2. გენს, რომელიც ჩასმულია წინასწარ შერჩეული თვისების მისანიჭებლად.
3. ტერმინატორ ელემენტს, რომელიც უზრუნველყოფს ჩასმული გენის ტრანსკრიფციის დამთავრებას.

ამის გარდა, შესაძლებელია სხვა რამდენიმე ელემენტის არსებობა რეკომბინანტული დნმ-ის კონსტრუქციაში, რომლებიც აკონტროლებენ და ასტაბილიზებენ გენის ექსპრესიას. ახალი ნაკრები შესაძლებელია მყარად გადაეცეს მემკვიდრეობით.



სურათი 6. გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების ტრანსგენური უბნის სქემატური გამოსახულება (Holst-Jensen).

გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების სკრინინგის ანუ თვისებრივი დეტექტირების მეთოდები ემყარება გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების საერთო რეგულატორული ელემენტების (პრომოტორისა და ტერმინატორის), ან ჩართული გენის დეტექტირებას (სურ. 3), ხოლო გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების

ვარიაციის (ხაზის) იდენტიფიკაცია ხდება იმ მოსაზღვრე უზნის დეტექციით, რომელიც მოთავსებულია ტრანსგენურ თანმიმდევრობასა და მასპინძელი მცენარის გენომში [Querci M, and Mazzara M. Session 8].

მცენარეებში გენეტიკური მოდიფიკაციებისთვის ყველაზე ხშირად გამოყენებული რეგულატორული ელემენტებია ყვავილოვანი კომბოსტოს მოზაიკური ვირუსის 35S პრომოტორი (CaMV P-35S) და *Agrobacterium tumefaciens*-ის ნოპალინ სინთაზას ტერმინატორი (T-Nos). გარდა ამისა, გენმოდიფიცირებულ მცენარეებში გამოიყენება სხვა პრომოტორები და ტერმინატორები, როგორიცაა ლელვის მოზაიკური ვირუსის 35S პრომოტორი (FMV P-35S), ყვავილოვანი კომბოსტოს მოზაიკური ვირუსის 35S ტერმინატორი (T-35S), *Agrobacterium tumefaciens*-ის ნოპალინ სინთაზას გენის პრომოტორი (P-NOS). შესაბამისად, მეთოდი, რომელიც ახდენს ერთ-ერთი ამ ელემენტის დეტექციას, სკრინინგისთვის მეტად პოპულარულია. ამ მეთოდთა ერთ-ერთი პრობლემა ისაა, რომ ელემენტი, რომლის დეტექციაც ხდება, ბუნებრივად არსებობს ვირუსების და ბაქტერიების გენომში. ასეთი ელემენტები წარმოადგენს მნიშვნელოვან რისკს ცრუ-დადებითი შედეგის მისაღებად. ამიტომ, აუცილებელია დადებითი შედეგის შემოწმება და დადასტურება რამდენიმე მეთოდით [Bonfini et al, 2001].

გმო-ს სკრინინგის შესახებ არსებული პირველი შრომებით, თვისობრივი პჯრ მეთოდებით შესწავლილ იქნა ყვავილოვანი კომბოსტოს მოზაიკური ვირუსის 35S პრომოტორის და *Agrobacterium tumefaciens*-ის ნოპალინ-სინთაზას გენის ტერმინატორის (T-NOS) მქონე გმ ვარიაციები და შემუშავებულ იქნა მათი დეტექციის მეთოდები [Pietsch et al. 1997; Studer et al, 1997]. შემდგომში აღნიშნული მეთოდები შემოწმებული იქნა თეორიული და გამოყენებითი ქიმიის საერთაშორისო კავშირის (IUPAC) 29 ლაბორატორიის მიერ. ამ კვლევის დროს ლიპმა და თანაავტორებმა შექმნეს და ვალიდაცია მოახდინეს თვისობრივი პჯრ მეთოდებისა სხვადასხვა პროცესირებულ საკვებში გმო სკრინინგისთვის [Lipp et al, 1999]. შემდგომ წლებში სხვადასხვა, ახალი გმ რეგულატორული ელემენტების გამოყენებასთან ერთად, შეიქმნა სხვადასხვა სკრინინგ მეთოდები მათი დეტექციისთვის [Anklam et al, 2002; Datukishvili et al, 2009]. ასევე, შექმნილია გმო-ს სკრინინგისა და იდენტიფიკაციისთვის სხვადასხვა თვისობრივი პჯრ მეთოდი, რომელიც

მიმართულია სინჯში სხვადასხვა ტრანსგენის ან კონსტრუქტ-სპეციფიური შეერთების მონაკვეთების (ინტროდუცირებული და ენდოგენური უბნების მონაკვეთების შეერთების ადგილები) აღმოჩენაზე. ამ შემთხვევაში პჯრ-პრაიმერის წყვილიდან ერთი უკავშირდება ტრანსგენურ მონაკვეთს, ხოლო მეორე - ენდოგენურ მონაკვეთს [Dong et al, 2008; European Union reference laboratory for GM food and feed]. დღეისთვის შემუშავებულია მცენარეთა სახეობებისა და გმო-ს თვისებრივი დეტექციის სხვადასხვა პჯრ-მეთოდი [Dong et al 2008, Placido et al 2016, Datukishvili et al 2015]. თვისებრივი პჯრ მეთოდები შემუშავებულია სიმინდის ინვერტაზას გენისა [Kutateladze et al, 2013, Ehlers et al 1997] და სიმინდის ზეინის გენისთვის [Gabriadze et al 2014].

3.3. გმო-ს რაოდენობრივი დეტექცია პჯრ-ის მეთოდით

იმისთვის, რომ განისაზღვროს საკვები პროდუქტი შეიცავს თუ არა 0,9%-ზე მეტ გმო-ს, აუცილებელია მისი რაოდენობრივი შეფასება. გმო-ს რაოდენობრივი ანალიზისთვის, ძირითადად გამოიყენება რეალური დროის პჯრ (რდ-პჯრ) მეთოდი. ამ ტექნიკის გამოყენებისას, პჯრ-ის დროს სინთეზირებული პროდუქტის რაოდენობის განსაზღვრა ხდება რეაქციის მომდინარეობისას რეალურ დროში ფლუორესცენციის პირდაპირი გაზომვით. რდ-პჯრ-ის დროს შეიძლება გამოყენებულ იქნას ჰიბრიდიზაციული ზონდებისა და ფლუორესცენტული საღებავების რამდენიმე ტიპიდან ერთ-ერთი. რეაქციის დროს წარმოქმნილი ფლუორესცენტული ნათება შეესაბამება სინთეზირებული დნმ-ის რაოდენობას. სინთეზირებული პროდუქტის შეფასება შეიძლება ფლუორესცენტული საღებავით, როგორიცაა SYBR მწვანე ინტერკალაციური საღებავი. ეს საღებავი დნმ-ის ორ ჯაჭვს შორის თავსდება, მაგრამ ამ მეთოდით შეუძლებელია სპეციფიკური და არასპეციფიკური პროდუქტების ერთმანეთისგან გარჩევა. ამიტომ უპირატესობა ენიჭება სპეციფიკური ჰიბრიდიზაციული ზონდების (მაგ. TaqMan ზონდები) გამოყენებას.

რდ-პჯრ-ის იდეა მდგომარეობს შემდეგში: ფლუორესცენციის გამოყენებით შესაძლებელია ზუსტად განისაზღვროს ციკლების რაოდენობა (Ct-რიცხვი), რომელიც საჭიროა განსაზღვრული რაოდენობის პჯრ-პროდუქტის მისაღებად. გმო-ს პროცენტული შეფასება ეფუძნება გმო-ს სპეციფიკური სიქვენსისა და შესაბამისი რეფერენს გენის რაოდენობების შეფარდებით გამოთვლას. გმო-ს სპეციფიკური სიქვენსისა და რეფერენს გენის Ct-რიცხვების შედარებით გამოითვლება გმო-ს სიქვენსის ფარდობითი რაოდენობა რეფერენს სიქვენსებთან შედარებით. რეფერენს გენად გამოიყენება შესაბამისი სახეობის სპეციფიკური გენი. მაგალითად, გმ სოიას შემთხვევაში რეფერენს გენად გამოიყენება სოიას სპეციფიკური ლექტინის გენი, გმ სიმინდის შემთხვევაში სიმინდის სპეციფიკური ზეინისა ან ინვერტაზას გენი და ა.შ. გმო-ს სპეციფიკურ სიქვენსად შეიძლება გამოყენებულ იქნეს საკვლევი გმ ვარიაციის ტრანსგენური უბნის რომელიმე თანმიმდევრობა (პრომოტორი, ტერმინატორი, კლონირებული გენი ან კლონირებული რეკომბინანტული დნმ-ის სხვა ფრაგმენტები) [Bonfini et al, 2001].

დღეისთვის შექმნილია და ვალიდირებულია რაოდენობრივი პჯრ-ის სხვადასხვა მეთოდი მცენარეთა სახეობებისა და გმო-ს დეტექციისთვის [Dong et al, 2008; European Union reference laboratory for GM food and feed]. რაოდენობრივი პჯრ მეთოდები შემუშავებულია სიმინდის ზეინის და ალკოჰოლდეჰიდროგენაზას I (*Adh-I*) გენების [Samson et al, 2013] და სახამებლის მასინთეზირებელი ფერმენტის გენის (*starch synthase IIb*) დეტექტირებისთვის [Debode et al, 2017]. წარმატებით გამოიყენება რაოდენობრივი რეალური დროის პჯრ-ზე დაფუძნებული მეთოდები სხვადასხვა ტრანსგენური ვარიაციების სკრინინგის, იდენტიფიკაციისა და რაოდენობრივი შეფასებისთვის [Samson et al, 2013; Debode et al, 2017; Noguchi et al, 2015; Wei et al, 2018]. ჰერნანდესმა კოლეგებთან ერთად შეიმუშვა და ოპტიმიზაცია მოახდინა სხვადასხვა რაოდენობრივი პჯრ მეთოდის, ისეთი გმ მცენარეების სკრინინგისთვის, როგორებიცაა: სიმინდი, ქერი, ბრინჯი, ხორბალი და მზესუმზირა [Hernández et al, 2004; Hernández et al, 2005]. ასევე, შემუშავებულია რაოდენობრივი პჯრ მეთოდები ჰერბიციდების მიმართ რეზისტენტული სოიას (RRS) ვარიაციის დეტექციისთვის [Taverniers et al, 2001; Terry et al, 2001], MON810 სიმინდის ვარიაციისთვის [Hernández et al, 2003] და Starlink სიმინდის ვარიაციისთვის [Windels et al, 2003].

3.4. გმო-ს დეტექცია მულტიპლექსური ხერხებით

გენმოდირიცრებული ვარიაციების მატებასთან ერთად, მოთხოვნადი ხდება ისეთი მეთოდების შემუშავება, რომელიც საშუალებას იძლევა ერთი ექსპერიმენტით მოხდეს რამდენიმე ტრანსგენის დეტექტირება. მულტიპლექსურ პჯრ-ზე დაფუძნებული მეთოდის საშუალებით, შესაძლებელია რამდენიმე სამიზნე დნმ-ის სკრინინგი ერთი რეაქციით. ამიტომაც, მულტიპლექსური პჯრ გახდა გენმოდირიცრებული ორგანიზმების დეტექციისთვის მოწინავე ტექნოლოგიად. ის იძლევა საშუალებას, პრაიმერების რამდენიმე წყვილის ერთდროულად გამოყენებით მოვახდინოთ შესაბამისი დნმ-ის მონაკვეთების ერთდროული, სწრაფი და იაფი დეტექცია.

ჯეიმსმა და თანაავტორებმა შეიმუშვეს მულტიპლექსური პჯრ მეთოდები, რომლითაც მოხდა რამდენიმე სამიზნე სიქვენსის დეტექცია გენმოდირიცრებული სოიასთვის (RRS), გმ სიმინდის სხვადასხვა ვარიაციისთვის (Bt-176, Bt-11, MON810, T14/25) და გმ კანოლას ვარიაციებისთვის (GT73, HCN92/28, MS8/RF3, Oxy 235). ენდოგენურ კონტროლად გამოიყენეს ინვერტაზას გენი სიმინდისთვის, ლექტინის და β -აქტინის გენი სოიასთვის, ექსპერიმენტების ეფექტურობის შეფასების მიზნით, რათა გამორიცხულიყო ცრუ უარყოფითი შედეგები. [James et al, 2003]. შემუშავებულია მულტიპლექსური პჯრ მეთოდი, სადაც გამოყენებულია პრაიმერების შვიდი წყვილი, რომელიც იძლევა საშუალებას ერთდროულად მოხდეს გმ სიმინდის ოთხი სხვადასხვა ვარიაციის (MON810, Bt-11, Bt-176, and GA21) და ერთი გმ სოიას (RRS) დეტექცია, რაც ბევრად ამარტივებს და აჩქარებს აღნიშნული გმ ვარიაციების დეტექციის შესაძლებლობას [Germini et al, 2004]. ასევე, შექმნილია სხვადასხვა მულტიპლექსური პჯრ მეთოდები გმ სიმინდის სხვადასხვა ვარიაციის ერთდროულად დეტექციისთვის [Onishi et al, 2005; Shrestha et al, 2008; Heide et al, 2008]. ნადალმა და თანამშრომლებმა შეიმუშავეს მულტიპლექსური პჯრ მეთოდი, რომელიც კაპილარული გელ ელექტროფორეზის (CGE) საშუალებით გმ სიმინდის სხვადასხვა ვარიაციის ერთდროულად გამოვლენის შესაძლებლობას იძლევა. აღნიშნული მეთოდით შესაძლებელია სხვადასხვა ზომის სიქვენსები ერთმანეთისგან გავარჩიოთ როგორც ზომით, ასევე - ფერით (CGE-SC) [Nadal et al, 2006]. შექმნილია

მულტიპლექსური პჯრ მეთოდები როგორც მცენარეთა სახეობების იდენტიფიკაციისთვის, ასევე გმო-ს სკრინინგისთვის [Kutateladze et al, 2013; Gabriadze et al, 2014; Datukishvili et al, 2015]. დათუკიშვილმა თანაავტორებთან ერთად შეიმუშავა მულტიპლექსური პჯრ მეთოდები გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმების (გმო) სწრაფი და საიმედო სკრინინგისთვის. კვლევაში გამოყენებულია ახალი დიზაინის პჯრ პრაიმერები, რომლებიც გმო-ს სპეციფიკური ოთხი თანმიმდევრობის იდენტიფიცირების საშუალებას იძლევა. ეს თანმიმდევრობებია: ყვავილოვანი კომბოსტოს მოზაიკური ვირუსის CaMV 35S პრომოტორის 141bp ზომის ფრაგმენტი, *Agrobacterium tumefaciens*-ის ნოპალინ-სინთაზას (NOS) ტერმინატორის 224bp ზომის ფრაგმენტი, 5-ენოლპირუვილშიკიმატე-3-ფოსფატ სინთაზას (*EPSPS*) გენის 256bp ზომის ფრაგმენტი და δ-ენდოტოქსინის (*Cry1A(b)*) გენის 258bp-ის ზომის ფრაგმენტი. კვლევებში გამოყენებულია RRS სოიასა და MON810 სიმინდის შემცველი სერთიფიცირებული საკონტროლო მასალები. მათი საშუალებით მოხდა უნიპლექსური და მულტიპლექსური პჯრ სისტემების შემუშავება და ოპტიმიზაცია. აგაროზას გელზე ელექტროფორეზის საშუალებით პჯრ პროდუქტების შეფასებამ მაღალი სპეციფიკურობა და მგრძნობელობა აჩვენა როგორც RRS-ის, ასევე MON810-ის 0,1%-იან სინჯებზე. შემუშავებულ იქნა ოთხმაგი პჯრ, რომელიც საშუალებას იძლევა, ერთდროულად იქნას იდენტიფიცირებული 35S პრომოტორის, NOS ტერმინატორის, *EPSPS* გენის და სოიას სახეობას პეციფიკური ლექტინის გენის თანმიმდევრობები. ასევე, შემუშავებულ იქნა სამმაგი პჯრ, რომელიც საშუალებას იძლევა, ერთდროულად იქნას იდენტიფიცირებული 35S პრომოტორის, *Cry1A(b)* ტრანსგენისა და სიმინდის სახეობასპეციფიკური ზეინის გენის თანმიმდევრობები. სხვადასხვა სახის პროცესირებული საკვების ანალიზმა აჩვენა, რომ ამ კვლევაში შემუშავებული მულტიპლექსური პჯრ მეთოდები ვარგისია გენმოდიფიცირებული საკვები პროდუქტების ზუსტი და სწრაფი სკრინინგისთვის [Datukishvili et al, 2015].

მულტიპლექსური მიდგომის განსაკუთრებული ხერხია დნმ-მიკროარე. დნმ-ის მიკროარეების ტექნოლოგიები ძირითადად გამოიყენება ეუკარიოტული და პროკარიოტული ორგანიზმების გენომის შემადგენლობის ან ექსპრესიის დასადგენად. ამასთან, დნმ-მიკროარე წარმოადგენს ერთ-ერთ ყველაზე საიმედო

მეთოდს გმო-ს სკრინინგისთვის და სწრაფ და ხელმისაწვდომ საშუალებას სოფლის მეურნეობის პროდუქტების კვლევაში. იგი იძლევა საშუალებას, ეფექტურად მოვახდინოთ შეუზღუდავი რაოდენობის გმო-ს ვარიაციების დეტექცია, იდენტიფიკაცია და რაოდენობრივი შეფასება ერთი ექსპერიმენტით. აღნიშნული ტექნოლოგიები ძირითადად დაფუძნებულია დნმ/რნმ-ის ან დნმ/დნმ-ის ჰიბრიდიზაციის პრინციპებზე. დნმ-ის მიკროარეები შეიცავს დნმ-ის ზონდებს გენომის სხვადასხვა სპეციფიკური ლოკუსისთვის. კერძოდ, მიკროარეების ზონდები წარმოადგენს ორგანიზმის გენომში თითოეული გენის/ლოკუსის შესატყვის მოკლე ოლიგონუკლეოტიდურ თანმიმდევრობებს. ზონდები ჰიბრიდიზირდება საცდელი გენომის დნმ-ის ან რნმ-ის საცდელ ნიმუშებთან. ამ გზით, მიკროარეების ტექნოლოგია საკვლევ ბიოლოგიურ ობიექტში ერთდროულად მრავალი გენეტიკური ლოკუსის სკრინინგის საშუალებას იძლევა [Bonfini et al, 2001].

საკვებში გმო-ს დეტექციისთვის გამოყენებული დნმ-მიკროარეების ტექნოლოგია შეიძლება დაფუძნებული იყოს გენეტიკური ელემენტების სკრინინგზე (როგორიცაა, P35S, TNos, pat, bar, MON810, Bt-11 ან GT73). ბოლო წლების განმავლობაში, შემუშავებულია მიკროარეების ტექნოლოგია მულტიპლექსურ პჯრ-თან კომბინაციაში, რომელიც გამოიყენება სხვადასხვა გმ ვარიაციების დეტექცირებისთვის [Marmioli et al, 2008; Broeders et al, 2012]. იტალიელმა მკვლევარებმა შექმნეს უნივერსალური მიკროარე, რომელიც გამოიყენება ტრანსგენური უბნების დეტექციისთვის ნედლეულ მასალებში და საკვებ პროდუქტებში. მათ მოახდინეს მულტიპლექსური პჯრ-ის ოპტიმიზაცია გმ სიმინდის ოთხი ვარიაციის (MON810, Bt-176, Bt-11, GA21), ჰერბიციდების მიმართ რეზისტენტული სოიას (RRS) და ორი საკონტროლო გენის (სიმინდის ზეინის გენი და სოიას ლექტინის გენი) ერთდროულად დეტექციისთვის [Bordoni et al, 2005]. შემუშავებულია მულტიპლექსურ პჯრ-თან გაწყვილებული მიკროარეს ტექნოლოგია, რომლითაც შესაძლებელია სოიას, სიმინდის, რაფსის და ბამბის 20 სხვადასხვა გენეტიკური ელემენტის ერთდროული დეტექცია [Xu et al, 2006], ასევე, გმ სიმინდის ექვსი ვარიაციის (MON810, MON863, Bt-176, Bt-11, GA21, T25) და გმ სოიას (GTS 40-3-2) ერთდროული დეტექცია [Xu et al, 2007]. ლეიმანისმა და სხვებმა შეიმუშვეს მულტიპლექსურ პჯრ-თან გაწყვილებული მიკროარეს ტექნოლოგია, რომლის

საშუალებითაც მოახდინეს 9 გმო ორგანიზმის, 5 სახეობის მცენარისა და 3 გმ სკრინინგ-ელემენტის (P35S - ყვავილოვანი კომბოსტოს მოზაიკური ვირუსის 35S პრომოტორული უბანი, T-NOS - *Agrobacterium tumefaciens*-ის ნოპალინ-სინთაზას გენის NOS ტერმინატორი, *nptII* - ბაქტერიის ნეომიცინ ფოსფოტრანსფერაზას გენი) ერთდროული იდენტიფიკაცია [Leimanis et al, 2006].

3.5. გმ საკვების ანალიზის პროცედურა

საკვებში გენმოდირეცირებული ორგანიზმების ან მათი წარმოებულების ანალიზი ეტაპობრივი პროცესია. ძირითადად გამოიყოფა შვიდი მთავარი ეტაპი:

I - ნიმუშის აღება

II - ნიმუშის მომზადება და ჰომოგენიზაცია

III - დნმ-ის ექსტრაქცია

IV - გენმოდირეცირებული ორგანიზმების სკრინინგი, თვისობრივი დეტექცია

V - გენმოდირეცირებული ორგანიზმების იდენტიფიკაცია

VI - გენმოდირეცირებული ორგანიზმების რაოდენობრივი ანალიზი

VII - შედეგების სტატისტიკა და ინტერპრეტაცია

პირველ საფეხურს წარმოადგენს ანალიზისთვის ნიმუშის აღება, რაც დამოკიდებულია საკვლევი მასალის შემადგენლობაზე, თვისებებსა და რაოდენობაზე. დადგენილია ნიმუშის აღების სპეციფიკური წესები სხვადასხვა მასალისთვის.

მეორე და მესამე ეტაპს წარმოადგენს სინჯის ჰომოგენიზაცია და დნმ-ის გასუფთავება რნმ-ისა და ცილებისგან. დნმ/რნმ-ის ან ცილის ხარისხი, სისუფთავე და კონცენტრაცია წარმოადგენს კრიტიკულ ფაქტორს გმო-ს სწორი ანალიზისთვის და განსაზღვრავს დნმ-ის ექსტრაქტის სინჯად გამოყენების შესაძლებლობას.

მეოთხე ეტაპზე ხდება აღებული ნიმუშის ანალიზი, სადაც გამოიკვლევა, არის თუ არა ის გენმოდირეცირებული. მთელი რიგი ალტერნატიული მეთოდებისა მიმართულია გენმოდირეცირებულ ორგანიზმების ანალიზში ცრუ-დადებითი ან

ცრუ-უარყოფითი შედეგისგან თავის ასარიდებლად. სხვადასხვა პრობლემები წარმოიქმნება, როდესაც:

1. დეტექციისთვის საჭირო მოლეკულა რთულად დასაშლელია და შეიძლება არ მოხდეს მისი სწორი დეტექცია.
2. საკვების დამუშავების პროცესში საკვლევი მოლეკულები შეიძლება დაიშალოს და არ მოხდეს მათი დეტექცია.
3. ნიმუშში შეიძლება შერეული იყოს რამდენიმე გენმოდიფიცირებული ორგანიზმი და საჭირო გახდეს თითოეული მათგანის იდენტიფიცირება.

მეხუთე ეტაპს წარმოადგენს დეტექტირებული გმო-ს იდენტიფიცირება. ამ დროს ხდება გმო-ს ხაზის დადგენა.

მეექვსე ეტაპზე ხდება გმო-ს რაოდენობის განსაზღვრა, დგინდება რა რაოდენობით შეიცავს ნიმუში გენმოდიფიცირებულ მასალას. რთულია ერთ მეთოდზე დაყრდნობა, ამიტომ ხდება შედეგების შემოწმება სხვადასხვა გზით: (1) მოწმდება, რამდენად კარგად განსაზღვრავს ეს მეთოდი უკვე ცნობილი შემადგენლობის ნიმუშს (სტანდარტულ რეფერენს მასალას); (2) ტარდება იგივე ნიმუშის ანალიზი სხვა მეთოდით; (3) სინჯის შემოწმება ხდება რამდენიმე ლაბორატორიაში.

მეშვიდე და საბოლოო ეტაპი, ანალიზის შედეგების სტატისტიკური ანალიზი და ინტერპრეტაციაა, ნებისმიერი უზუსტობის ახსნა, რაც სტატისტიკური ცდომილებებით ან მეთოდის შეზღუდულობითაა გამოწვეული [Siekel P, 2008].

უნდა აღინიშნოს რომ, გმო-ს ზუსტი დეტექციისთვის აუცილებელია ყველა შედეგის ვალიდაცია და შემოწმება როგორც სხვადასხვა მეთოდით, ასევე სხვადასხვა შემსრულებლის მიერ. საერთაშორისო პრაქტიკაში მიღებულია გმო-ს დეტექციის მეთოდების ვალიდაცია სხვადასხვა ქვეყნის ლაბორატორიებში.

3.6. პროცესირების გავლენა კვების პროდუქტებში გმო-ს დეტექციაზე

3.6.1. დნმ-ის სტაბილურობა საკვების წარმოებისას

სასურსათო პროდუქტების წარმოებისას გამოიყენება ნედლეულის გადამუშავების (პროცესირების) სხვადასხვა ხერხები და მეთოდები. მათ შორის, ხშირად გვხვდება ტემპერატურული, მექანიკური, pH (ტუტე / მჟავე) და სხვა სახის დამუშავება. საკვების პროცესირებამ შეიძლება გავლენა მოახდინოს მისი დნმ-ის სტრუქტურაზე და გამოიწვიოს გარკვეული დეგრადაცია, რაც უარყოფითად მოქმედებს დნმ-ზე დამოკიდებული მეთოდების (მათ შორის პჯრ-ის) სიზუსტეზე. ამიტომ კვების პროდუქტების მეცნიერების აქტუალური საკითხია საკვების გენომის მდგრადობის შესწავლა სხვადასხვა სტრესულ პირობებში.

საკვების ინგრედიენტების დეტექტირებაში გართულებები წარმოიქმნება წარმოების იმ საფეხურებზე, რომლებმაც შეიძლება გამოიწვიოს ფერმენტ-კატალიზური რეაქციების ჩართვა ან სხვა ქიმიური რეაქციები, რამაც შეიძლება არანაკლები ზემოქმედება მოახდინოს, ვიდრე მექანიკურმა პროცედურებმა ან დაფქვის პროცესმა. წარმოების პროცესში, საკვები პროდუქტები გადის დამუშავების სხვადასხვა საფეხურს და ხდება მათზე უხეში ფიზიკო-ქიმიური ზემოქმედება, რომელიც სერიოზულ ზეგავლენას ახდენს ამა თუ იმ საკვებში შემავალი დნმ-ის მდგრადობასა და სისუფთავეზე. როგორც ჩატარებული ცდებით დასტურდება, დნმ-ის დეგრადაციას ძირითადად pH-ის დაბალი მაჩვენებელი იწვევს. ხოლო დეგრადაციის მაჩვენებელი იზრდება, თუ ამ პროცესს თერმული ზემოქმედების თანაობისას წარვმართავთ. აგრეთვე, დნმ-ის ფრაგმენტაციაზე გავლენას ახდენს ფერმენტაციის პროცესი [Somma et al, 2006].

ზოგიერთი კვლევის დროს აქცენტს აკეთებენ პროცესირებული პროდუქტის ნიმუშების ანალიზზე გმო-ს რაოდენობის დადგენის მიზნით, თუმცა არ შეისწავლიან გმო-ს შემცველობას არაპროცესირებულ მასალაში. ეს კი გაურკვევლობასა და აზრთა სხვადასხვაობას იწვევს დათვლის შედეგების მიმართ და რთულია გარკვევა, ეს შედეგები მიღებულია დნმ-ის დეგრადაციით, თუ ეს რაოდენობრივი შეფასების სისტემის წუნს წარმოადგენს. ამიტომ, ძალიან მნიშვნელოვანია პროცესირებული და

არაპროცესირებული გმ პროდუქტების ერთობლივი შესწავლა და მათი ურთიერთშედარება.

დღეისთვის უკვე შესწავლილია დნმ-ის სტაბილურობა ზოგიერთ გადამუშავებულ და შესანახად გამიზნულ საკვებში, მაგრამ ჯერ კიდევ მწირი მონაცემებია დნმ-ის დეგრადაციის კინეტიკაზე, მნიშვნელოვან ფაქტორებსა და პარამეტრებზე ცალკეული პროდუქტის პროცესირებისას სხვადასხვა პირობებში. რიგ კვლევებში შესწავლილია საკვების პროცესირების გავლენა მცენარეული დნმ-ის დეგრადაციასა და გმო-ს დეტექციაზე [Hupfer et al, 1998; Bauer et al, 2003; Bergerova et al, 2010; Bergerova et al, 2011; Fernandes et al, 2013]. ჩატარებული კვლევები აჩვენებს, რომ დნმ სრულიად დეგრადირდება შაქრის წარმოების პროცესში, ხოლო პურის წარმოებისას მცენარეული დნმ-ის დეგრადაციის ძირითადი განმაპირობებელი ფაქტორებია ტემპერატურა და pH [Bauer et al, 2003].

3.6.2. ტემპერატურის, pH-ის და მექანიკური ზემოქმედება

როგორც ჩატარებული გამოკვლევები აჩვენებს, მაღალ ტემპერატურაზე გაცხელება იწვევს გენომური დნმ-ის დეგრადაციას, ამასთან, დნმ-ის ფრაგმენტების ზომა თანდათან მცირდება ტემპერატურის აწევისას ან თერმული ზემოქმედების ხანგრძლივობის გაზრდისას. 100°C-ზე 15წთ-ით გაცხელებისას 1,5kb ფრაგმენტები არ დეგრადირდება, მაგრამ 121°C-ზე გაცხელებით იგივე ფრაგმენტები იშლება 30წმ-ში [Chen et al, 2005]. მორენომ და სხვებმა დაადგინეს, რომ საკვების პროცესირებისას ინგრედიენტების ნაწილაკების ზომა, ტექნოლოგიური დამუშავების ხარისხი და ხანგრძლივობა უარყოფითად მოქმედებს საკვების კომპონენტების დეტექციაზე რეალური დროის პჯრ-ით. თერმული დამუშავება გავლენას ახდენს დნმ-ის დეგრადაციასა და გმო-ს რაოდენობრივ შეფასებაზე [Moreano et al, 2005].

გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების თვისობრივი სკრინინგის მეთოდები, რომლებიც გულისხმობს 200bp-მდე ამპლიკონების დეტექტირებას, ვარგისია პროცესირებული პროდუქტების ანალიზისთვის ექსტრემალური თერმული სტრესის დროს, როგორიცაა გაცხელება 45წთ-ით 100°C-ზე ან 10წთ 180°C-ზე [Lipp et al, 1999,

Lipp et al, 2001]. სიკელმა და თანაავტორებმა შეისწავლეს თერმული დეგრადაციის გავლენა ექსტრაგირებული დნმ-ის რაოდენობაზე და ამპლიფიციურობაზე სიმინდისა და სოიას საკვებ პროდუქტებში და დაადგინეს, რომ 200°C-ზე დამუშავება მნიშვნელოვნად ამცირებს ექსტრაგირებული დნმ-ის ზომას. 200bp-მდე პჯრ-ფრაგმენტების სინთეზზე არ მოქმედებს გაცხელება 200°C-ზე, მაგრამ 1kb-ზე გრძელი ფრაგმენტები არ ამპლიფიცირდება, თუ დამუშავდა 100°C-ზე 60წთ-ზე მეტად ან 200°C-ზე 30წთ-ზე მეტხანს [Siekel et al, 2008].

ბოლო წლებში აქტიურად იქნა შესწავლილი მცენარეული საკვები პროდუქტების დნმ-ზე მოქმედი ფაქტორები, როგორიცაა ტემპერატურა, წნევა, pH-ის სხვადასხვა მნიშვნელობა, ულტრაიისფერი რადიაცია (UV), პროდუქტის შემადგენელი ნაწილაკების ზომა [Vijayakumar et al, 2009, Bergerová et al, 2011, Ballari et al, 2013]. კვლევებმა აჩვენა, რომ დნმ-ის ექსტრაქციის დროს გამოსავლიანობაზე მოქმედებს მცენარეული პროდუქტის შემადგენელი ნაწილაკების ზომა, დაფქვის ხარისხი, მექანიკური ზემოქმედების ხანგრძლივობა, ასევე, მათზე თერმული ზემოქმედების მაჩვენებელი და მისი მოქმედების ხანგრძლივობა [Hrnčířová et al, 2008, Hupfer et al. 1998, Bauer et al. 2003, Bergerova et al. 2011 and Godalova et.al 2013]. pH და ტემპერატურა აღმოჩნდა ყველაზე მნიშვნელოვანი პარამეტრები, რომლებიც მოქმედებს საკვებ პროდუქტებში დნმ-ის დეგრადაციაზე. ბაიერისა და სხვების კვლევებმა აჩვენა დეტექტირებადი მცენარეული დნმ-ის ზომის ჩქარი შემცირება pH 4,75-ზე. მათ აღწერეს, თუ როგორაა გართულებული დნმ-ის დეტექტირება მჟავე საკვებ პროდუქტებში, თუ ეს პროდუქტები აგრეთვე განიცდის თერმულ ზემოქმედებას [Bauer et al. 2003]. უფრო ძლიერ დეგრადაციას განიცდიდა დნმ მაღალი ტემპერატურის, დაბალი pH-ის და მაღალი წნევის კომბინირებული ზემოქმედების დროს. [Bergerova et al 2011, Godalova et.al 2013].

3.6.3. ამპლიკონის სიგრძის მნიშვნელობა საკვების პჯრ-დიაგნოსტიკაში

პჯრ-ზე დაფუძნებული დეტექტირების მეთოდების საშუალებით კარგადაა შესწავლილი დნმ-ის დეგრადაციის ეფექტი დეტექციის სიზუსტეზე საკვების

წარმოების პროცესში. ცნობილია, რომ სამიზნე გენის თანმიმდევრობის სიგრძე შემზღუდავი და გადამწყვეტი პარამეტრია დნმ-ის დეტექტირებისას. თვისობრივი და რაოდენობრივი პჯრ-ანალიზი გვიჩვენებს, რომ 300bp-ზე მეტი ზომის თანმიმდევრობები უფრო მეტად განიცდის დეგრადაციას, ვიდრე მცირე ზომის (დაახლოებით 200bp) ფრაგმენტები, მათზე ამა თუ იმ ზემოქმედების პირობებში. პჯრ-ანალიზისთვის სპეციფიკური გენების სათანადო ზომის სამიზნე თანმიმდევრობების შერჩევით შესაძლებელია გავაუმჯობესოთ და დავხვეწოთ პჯრ-დიაგნოსტიკა, რაც ძალზე მნიშვნელოვანია გენმოდირეცირებული პროდუქტების განსაზღვრისთვის. მიჩნეულია, რომ რეკომბინანტული და ენდოგენური გენების სამიზნე თანმიმდევრობები, რომლებიც დაახლოებით თანაბარი სიგრძისაა, ერთნაირად დეგრადირდება პროცესირებისას [Bonfini et al, 2001; Somma et al, 2006].

ჰუპფერმა და თანაავტორებმა შეიმუშავეს სტანდარტული პჯრ მეთოდი, მიმართული *Cry1A(b)* გენის მიმართ, მწერების მიმართ რეზისტენტული სიმინდის დეტექციისთვის თერმულად დამუშავებულ პროდუქტებში. კვლევებმა აჩვენა, რომ გმო-ს დეტექციის ალბათობა იზრდებოდა, როდესაც იყენებდნენ მცირე ზომის (211bp) ამპლიკონს [Hupfer et al, 1998]. მორენომ და თანაავტორებმა აჩვენეს, რომ გმო-ს რაოდენობრივი შეფასების სიზუსტე ძლიერ იცვლება თერმულად დამუშავებულ საკვებში რეკომბინანტული და რეფერენსული სამიზნე ამპლიკონების დეგრადაციის სხვადასხვა სიჩქარის გამო, თუ ამპლიკონების ზომები ძლიერ განსხვავდება ერთმანეთისგან [Moreano et al, 2005].

ვიჯაიაკუმარმა და სხვებმა შეიმუშავეს სტანდარტული პჯრ მეთოდები, მიმართული სხვადასხვა ზომის ამპლიკონებზე MON810 სიმინდის და Roundup Ready სოიას გმ-ხაზებისა და კონსტრუქტების სპეციფიური გენების დეტექციისთვის. კვლევებმა აჩვენა, რომ დნმ-ის მთლიანობა, გამოსავლიანობა და პჯრ-ამპლიკონის ზომა მთავარი ფაქტორებია პროცესირებულ საკვებში გმო-ს წარმატებული დეტექციისთვის [Vijaiakumar et al, 2009].

მაღალი ტემპერატურის (121°C), მაღალი წნევის (0.1MPa) და დაბალი pH-ის (2.25) კომბინირებული ზემოქმედებით MON810 სიმინდის რაოდენობრივი შეფასებისას აღმოჩნდა, რომ ძლიერი პროცესირება იწვევდა ცრუ-უარყოფით შედეგებს გმო-ს რაოდენობის გამოთვლისას, როდესაც საკონტროლო და

ტრანსგენულ ამპლიკონების სიგრძეს შორის სხვაობა შეადგენდა 14bp-ზე მეტს [Godalova et al, 2013]. ბალარიმ და მარტინმა შეისწავლეს თერმული და ულტრაიისფერი რადიაციის გავლენა MON810 სიმინდის ტრანსგენურ შემადგენლობაზე. ამასთან, სისტემის მოდელად გამოიყენეს პლაზმიდური დნმ. მათმა კვლევამ აჩვენა, რომ საკვების პროცესირებას მივყავართ დნმ-ის არსებით დეგრადაციამდე, თუმცა გავლენას არ ახდენს გმო-ს რაოდენობრივ შეფასებაზე, თუ ტრანსგენური და ენდოგენური გენების ამპლიკონებს შორის სხვაობაა 16bp-ზე ნაკლები [Ballari et al 2013].

ამგვარად, ზემოთ აღნიშნული კვლევების შედეგებს შორის არსებული შეუსაბამობები გვიჩვენებს, რომ ყოველ კონკრეტულ შემთხვევაში სათანადოდ უნდა დადგინდეს პროცესირების გავლენა დნმ-ის დეგრადაციაზე, რათა სწორად შეირჩეს დნმ-ზე დაფუძნებული მეთოდი გმო-ს დეტექციისთვის პროცესირებულ პროდუქტში [Ballari et al, 2013]. აქედან გამომდინარე, მნიშვნელოვანია გაგრძელდეს კვლევები და დაგროვდეს ინფორმაცია სხვადასხვა სახის პროცესირების გავლენაზე ცალკეული საკვები პროდუქტის დნმ-ის მთლიანობასა და პჯრ-ით დეტექციაზე.

მასალები და მეთოდები

1. კვლევაში გამოყენებული მასალები

1.1. თესლები და სასურსათო პროდუქტები

კვლევები ჩატარდა ხორბლის (*Triticum estivum* var. *estivum*), სიმინდისა (*Zea mays* var. *indentata*) და სოიას (*Glycine max*) მარცვლებზე, ფქვილზე და სხვადასხვა სახის პროცესირებულ პროდუქტებზე, რომელიც შეძენილ იქნა თბილისის ბაზრებში და სუპერმარკეტებში. გამოყენებულ იქნა როგორც ადგილობრივი, ასევე უცხოური წარმოშობის პროდუქტები, კერძოდ: სიმინდის მარცვლები (ლომთაგორა), სიმინდის ფქვილი 1 (G ჯგუფის), სიმინდის ფქვილი 2 (ლაითი), ბურბუშელა 1 (ხრამუნა),

ბურბუშელა (ბურბუ), ბატი-ბუტი, რომლებიც წარმოებულია საქართველოში; ხოლო დანარჩენი პროდუქტები არის იმპორტირებული - სიმინდის მარინადი (Coopoliva, Spain), მარცვლეულის გრანულები კაკაოს არომატით („Start“, Lantmannen Axa, Ukraine), მულტიკომპონენტური საბავშვო ფაფა (Nestle Russia, Russia), ჩიპსი ბეკონით, სოიას ფარში, ოთხი სახეობის ძეხვი, სარდელი და ხორცის კატლეტი.

1.2. გმო-ს სტანდარტები

გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების სტანდარტებად გამოიყენებულ იქნა ჰერბიციდ რაუნდაპის მიმართ რეზისტენტული გენმოდიფიცირებული სოიას ხაზის RRS (ERM-BF-410), გენმოდიფიცირებული სიმინდის ორი ხაზის MON810 (ERM-BF-413) და Bt-176 (ERM-BF-411) სერტიფიცირებული საკონტროლო მასალები, რომლებიც დამზადებულია გაერთიანებული კვლევითი ცენტრის რეფერენსული მასალებისა და გაზომვების ინსტიტუტში (IRMM-JRC, ბელგია). თითოეული გმ-ვარიაციის ნაკრები შეიცავს ფიქსირებული რაოდენობისგმ ფხვნილს, კერძოდ 0.1%, 0.5%, 1%, 2% და 5% MON810-ს ან Bt-176-ს ან 0%, 0.1%, 0.5%, და 10% RRS-ს. ისინი შესყიდულ სიგმას კომპანიიდან (Fluka, Sigma-aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

2. კვლევაში გამოყენებული მეთოდები

2.1. ნიმუშების პროცესირება და მომზადება დნმ-ის ექსტრაქციისთვის

2.1.1. მარცვლების თერმული დამუშავება

ხორბლის, სიმინდის და სოიას მარცვლები ავწონეთ 150g ოდენობით ცალ-ცალკე, მოვათავსეთ მინის სხვადსხვა ჭურჭელში, დავასხით ოთახის ტემპერატურის დეიონიზირებული წყალი და დავიწყეთ გაცხელება. ნიმუშების ადუღებას დაახლოებით 25წთ დასჭირდა. ერთი სინჯი ავიღეთ ადუღების მომენტში, დანარჩენი

სინჯების აღებას შორის ინტერვალი შეადგენდა 60წთ-ს, ხოლო ბოლო სინჯი ავიღეთ ადულებიდან 300წთ-ის შემდეგ. ამის შემდეგ თერმულად დამუშავებული სინჯები გავაშრეთ ოთახის ტემპერატურაზე და წმინდად დავფქვით ელექტრო საფქვავით (Siemens, Munich, Germany). თითოეული სინჯიდან ავწონეთ 100mg ფქვილი და მოვათავსეთ 2ml-იან სინჯარებში.

2.1.2. მარცვლების დამუშავება მაღალ ტემპერატურასა და მჟავე pH-ზე

დნმ-ის დეგრადაციაზე ტემპერატურის და pH-ის კომბინირებული ზემოქმედების შესასწავლად, ავიღეთ 150g ხორბლისა და სიმინდის მარცვლები მოვათავსეთ 3 სხვადასხვა მინის ჭიქაში, რომლებშიც ჩავასხით 400ml 0.4% NaCl სამი სხვადასხვა pH-ით (6.5, 4.0 და 2.0). მჟავე pH-ის მისაღებად გამოვიყენეთ 0.1 mol·l⁻¹ ძმარმჟავა (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). მარცვლები თერმულად დამუშავდა 100°C-ზე 120წთ-ის განმავლობაში. პირველი სინჯები მათგან ავიღეთ ადულების მომენტში, დანარჩენი სინჯები კი ავიღეთ 30წთ-იანი ინტერვალით. სინჯები გამოვაშრეთ ოთახის ტემპერატურაზე და წმინდად დავფქვით ელექტრო საფქვავით. თითოეული სინჯიდან ავწონეთ 100mg რაოდენობის ფქვილი და მოვათავსეთ 2ml-იან სინჯარებში.

2.1.3. გენმოდიფიცირებული და არამოდიფიცირებული ფქვილების თერმული დამუშავება

გენმოდიფიცირებული სიმინდის ორი ვარიაციის (BT-176, MON810) ფქვილი და არამოდიფიცირებული სიმინდის ფქვილი, თერმულად დავამუშავეთ 100°C-ზე და 121°C-ზე მშრალ თერმოსტატში AccuBlock Digital Dry Baths (Labnet International, Edison, NJ, USA). თითოეული მასალა 50mg ოდენობით მოთავსებული იყო ეპენდორფის პლასტიკურ სინჯარაში ცალ-ცალკე. ჩატარდა ოთხი ერთმანეთისგან დამოუკიდებელი ექსპერიმენტი, რათა შეგვეფასებინა ზემოქმედების სხვადასხვა

ფაქტორები სიმინდის როგორც გენმოდულირებულ ვარიაციებზე, ასევე, არამოდულირებულ ვარიაციაზე. პირველი ექსპერიმენტისას სინჯები დავამუშავეთ 100°C-ზე, მეორე, მესამე და მეოთხე ექსპერიმენტისას კი - 121°C ტემპერატურაზე. გმ სიმინდის Bt-176 ვარიაცია გამოყენებულ იქნა პირველ, მეორე და მესამე ექსპერიმენტში, ხოლო MON810 ვარიაცია - მეოთხე ექსპერიმენტში. პირველი და მეორე ექსპერიმენტისას სინჯებიდან დნმ-ის ექსტრაქცია მოვახდინეთ CTAB მეთოდით, ხოლო მესამე და მეოთხე ექსპერიმენტის შემთხვევაში - DNeasy ნაკრებით (Qiagen, Hilden, Germany) მეთოდით. არამოდულირებული სიმინდის მარცვლები დავფქვით ელექტრო საფქვავით და 50mg ოდენობით ავწონეთ ეპენდორფის სინჯარებში. პირველი სინჯი თერმულად არ დაგვიმუშავებია და გამოვიყენეთ როგორც დადებითი კონტროლი, მეორე სინჯი დავამუშავეთ 60წთ-ის განმავლობაში, მესამე - 180წთ-ის განმავლობაში, ხოლო მეოთხე სინჯი - 300წთ-ის განმავლობაში.

2.1.4. სასურსათო პროდუქტების სინჯების დამუშავება

მარცვლები და მშრალი სახის პროდუქტები დავფქვით ელექტროსაფქვავით (Siemens, Munich, Germany). სველი სახის ან ცხიმოვანი პროდუქტები, როგორცაა მარინადი, სიმინდის ბურბუმელა, მარცვეულის გრანულები და ბატი-ბუტი, გავყინეთ თხევადი აზოტის საშუალებით, ხოლო გაყინული მასა დავაქუცმაცეთ როდინში. თითოეული სინჯიდან ავწონეთ 100mg რაოდენობის დაქუცმაცებული მასა და მოვათავსეთ 2ml-იან სინჯარებში.

3. დნმ-ის ექსტრაქცია

დნმ-ის ექსტრაქციისთვის გამოვიყენეთ ორი ერთმანეთისგან განსხვავებული მეთოდი: ცეტილტრიმეთილ-ამონიუმ-ბრომიდზე (CTAB) დაფუძნებული მეთოდი და მცენარისგან დნმ-ის ექსტრაქციის მინი ნაკრები (Qiagen DNeasy plant mini kit) (Qiagen, Hilden, Germany). კვლევის დროს ძირითადად გამოვიყენეთ CTAB მეთოდი,

კერძოდ, სიმინდის, სოიასა და ხორბლის მარცვლების თერმული და pH-ით დამუშავების შემდეგ მიღებული სინჯებისთვის, აგრეთვე, სასურსათო პროდუქტებისთვის. DNeasy ნაკრები გამოვიყენეთ თერმოსტატში თერმულად დამუშავებული სიმინდის ფქვილებზე ჩატარებული მესამე და მეოთხე ექსპერიმენტების დროს. DNeasy ნაკრებით დნმ-ის ექსტრაქცია მოხდა პროტოკოლის მიხედვით.

CTAB მეთოდი მოდიფიცირებული იყო ჩვენს ლაბორატორიაში და მდგომარეობს შემდეგში: 100mg ჰომოგენიზებულ საექსტრაქციო ნიმუშს ემატება 500µl CTAB ბუფერი (20g CTAB/l, 1.4 NaCl, 0.1M Tris-HCl, 20mM EDTA) და 20µl პროტეინკინაზა K (20mg/ml). 65°C-ზე 1სთ-ით ინკუბაციის შემდეგ ემატება 20µl რნმ-აზა A (10mg/ml) და ხდება ინკუბაცია 65°C-ზე 10წთ-ის განმავლობაში. ცენტრიფუგირება ხდება 16000xg-ზე 10წთ-ის განმავლობაში. სუპერნატანტი მუშავდება 500µl ქლოროფორმით ორჯერ. ზედა ფაზა გადაგვაქვს ახალ სინჯარებში და ვამატებთ ორ მოცულობა CTAB პრეციპიტაციურ ხსნარს (5g/l CTAB, 0,04M NaCl) და ვაინკუბირებთ 1სთ-ის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე. შემდეგ ხდება ცენტრიფუგირება 16000xg-ზე 5წთ-ის განმავლობაში, სუპერნატანტს ვღვრით და ნალექს ვხსნით 350µl 1.2M NaCl-ში და ვამატებთ 350µl ქლოროფორმს. შემდეგ 16000xg-ზე 10წთ-ის განმავლობაში ხდება ცენტრიფუგირება, ზედა ფაზა გადაგვაქვს ახალ სინჯარებში, ვამატებთ 0,6 მოცულობა იზოპროპანოლს, ვაჩერებთ 10წთ-ის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე და ვაცენტრიფუგირებთ ხსნარს მაქსიმალურ სიჩქარეზე 10წთ-ის განმავლობაში. ვღვრით სუპერნატანტს და ნალექს ვრეცხავთ 500µl ეთანოლით (70% v/v). ცენტრიფუგირების შემდეგ სუპერნატანტს ვღვრით ფრთხილად, ნალექს ვაშრობთ და დნმ-ს ვხსნით 100µl დეიონიზებულ წყალში.

4. დნმ-ის შეფასება სპექტროფოტომეტრით

გენომური დნმ-ის რაოდენობრივი შეფასება მოხდა სპექტროფოტომეტრული მეთოდით (Jenway Genova Life Science Analyzer (Cole-Parmer, Stone, United Kingdom)) ან DeNovix DS-11 (DeNovix Inc. Wilmington, USA) ულტრაიისფერ უბანში 260nm

ტალღის სიგრძეზე ოპტიკური შთანთქმის გაზომვით. დნმ-ის კონცენტრაციის გამოთვლა ხდება იმის გათვალისწინებით, რომ ორჯაჭვიანი დნმ-ის შთანთქმის მაჩვენებელი $A=1$, 260nm-ზე. ამასთან, სპექტროფოტომეტრით შეფასდა დნმ-ის სისუფთავე ცილებისგან, ამის მაჩვენებელია სიდიდე A_{260}/A_{280} . ცნობილია, რომ სუფთა დნმ-თვის A_{260}/A_{280} - შეფარდება 1.8-2.0 შუალედშია.

5. დნმ-ის ელექტროფორეზი აგაროზას გელზე

გენომური დნმ-ებისა და პჯრ-პროდუქტების შემოწმება მოხდა აგაროზას გელზე ელექტროფორეზით (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA). გენომური დნმ-სთვის გამოყენებულ იქნა 1%-იანი აგაროზას გელი, ხოლო პჯრ-პროდუქტებისთვის - 2%-იანი გელი (SeaKem LE agarose; Cambrex, East Rutherford, New Jersey, USA). ელექტროფორეზის დროს გამოვიყენეთ ბუფერი TAE (Tris-Acetate-EDTA), რომელიც შეიცავდა $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ეთიდიუმ-ბრომიდს (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). ელექტროფორეზი ჩატარდა ჰორიზონტალური გელ-ელექტროფორეზის აპარატების (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) გამოყენებით 120V ძაბვის პირობებში. ელექტროფორეზის შემდეგ, აგაროზას გელში დნმ-ის ზოლების ვიზუალიზაცია და ფოტოგრაფირება ჩატარდა გელ-დოკუმენტაციის სისტემის გამოყენებით (PhotoDoc-It imaging system, UVP, Upland, California, USA).

6. დნმ-ის ამპლიფიკაცია პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით

კვლევაში გამოყენებული პჯრ-პრაიმერები მოცემულია ცხრილში (ცხრილი 1). მცენარეული დნმ-ის დეტექცია ჩატარდა ქლოროპლასტური გენომის კონსერვატიული უბნის სპეციფიკური პრაიმერებით - plant1/plant2 [Taberlet et al., 1991]. სიმინდის დეტექციისთვის გამოყენებულ იქნა სახეობის სპეციფიური ინვერტაზისა და ზეინის გენების შესაბამისი პრაიმერები. სოიას დეტექციისთვის გამოყენებულ იქნა სოიას სახეობის სპეციფიური ლექტინის გენის შესაბამისი

პრაიმერები. ხორბლის დეტექციისთვის გამოყენებულ იქნა ხორბლის სახეობის სპეციფიური გლუტენინისა და აცეტილ-კოენზიმ A კარბოქსილაზას გენების შესაბამისი პრაიმერები. გმ სიმინდის დეტექციისთვის გამოვიყენეთ ყვავილოვანი კომბოსტოს მოზაიკური ვირუსის 35S პრომოტორისა CaMV 35S და *CryIA(b)* დენდოტოქსინის გენის შესაბამისი პრაიმერები. გმ სოიას იდენტიფიკაციისთვის გამოვიყენეთ ყვავილოვანი კომბოსტოს მოზაიკური ვირუსის 35S პრომოტორის CaMV 35S პრაიმერი. პრაიმერების უმრავლესობის დიზაინი შესრულდა ჩვენს ლაბორატორიაში, გარდა რამდენიმე პრაიმერებისა: plant1/plnat2 (Taberlet et al, 1991), IVTAS1/IVTAS2 (Ehlers et al., 1997), TEN2/TEN3 (Terzi et al., 2003). პჯრ-პრაიმერების სინთეზი მოხდა კომპანია Integrated DNA Technologies (IDT, აშშ) მიერ.

სამიზნე გენი	პრაიმერები	პრაიმერის სიკეენსი	ამპლიკონის სიგრძე (bp)
მცენარის ქლოროპლასტული გენომი	Plant1 plant2	CGAAATCGGTAGACGCTACG GGGGATAGAGGGACTTGAAC	400-600
სიმინდის ინვერტაზას გენი	IVTAS1 IVTAS2	CCGCTGTATCACAAGGGCTGGTACC GGAGCCCCGTGTAGAGCATGACGATC	226
სიმინდის ინვერტაზას გენი	IVRf IVRr	TCTCCCGTGATCCTGCCCCG GCTTGACCGTGTGCGCTTCCT	140
სიმინდის ზეინის გენი	ZEIN94f ZEIN94r	GACGATTCCACCCATGTTCTTA CGATGGCATGTCAACTCATTATTC	94
სიმინდის ზეინის გენი	ZEIN102f ZEIN102r	ACACCACCGACCATGGCAGC TGGTGGCAAAGTGCCTGGAA	102
ხორბლის გლუტენინის გენი	TEN2 TEN3	GATATGTCGATGCAGCGGTG ACTAGTTTGGGCGGGTCACA	67
ხორბლის გლუტენინის გენი	GLU1 GLU2	CAAGGTATTCTCCAGCAGTGCAGC GGGTTGGGAAACACATTGGCCCA	259
ხორბლის აცეტილ-კოენზიმ A კარბოქსილაზას გენი	ACACf ACACr	CCGGTGCTGCATTCCAACCA GCCGGCAAGACCTTGGCGAAT	134
სოიას ლექტინის გენი	LECTf LECTr	ACGGCACCCCAAAACCCTCG GGAAGCGGCGAAGCTGGCAA	101
<i>CryIA(b)</i> გენი	Cry1f Cry1r	GCACCTCCGTGGTGAAGGGC AACCACCGGTGCGGAAGCTG	258
<i>CryIA(b)</i> გენი	Cry124f Cry124r	CATCCTCAACAGCATCACTATCT GCCGTAGAGAGGAAAGGTAAAC	124

CaMV 35S პრომოტორი	P35Sf P35Sr	CGTGCACCATGATGTGTGATTCGAC GTGGGATTGTGCGTCATCCCTT	141
--------------------	----------------	---	-----

ცხრილი 1. პჯრ-ში გამოყენებული ოლიგონუკლეოტიდური პრაიმერები

პჯრ-ის სინჯების მომზადება ჩატარდა სტერილურ პირობებში UV პჯრ კაბინეტში (Biosan, Latvia). პჯრ-ამპლიფიკაცია ჩატარდა 25 μ l მოცულობაში, რომელიც შეიცავდა 1.25 ერთეულ Taq დნმ-პოლიმერაზასა და მის შესაბამის სტანდარტულ ბუფერს - New England BioLabs (Ipswich, Massachusetts, USA); 1.5mM MgCl₂, 0.2mM თითოეულ dNTP-ს - New England BioLabs (Ipswich, Massachusetts, USA); 0.3 – 0.5 μ M თითოეულ პრაიმერს და 1 μ l (60-70ng) გენომურ დნმ-ს.

თვისებრივი პჯრ-ის ანალიზები ჩატარდა თერმოციკლერში 3PRIMEBASE/02 (Techne, Minneapolis, Minnesota, USA). plant1/plant2 პრაიმერებისთვის პჯრ-ის პირობები იყო შემდეგი: საწყისი დენატურაცია 95°C-ზე 4წთ, რასაც მოჰყვებოდა 35 ციკლი 95°C -ზე 30წმ, 62°C-ზე 30წმ, 72°C-ზე 2წთ, ხოლო საბოლოო ეტაპი 72°C-ზე 5წთ-ის განმავლობაში.

პჯრ-ის ერთი და იგივე პირობები გამოვიყენეთ სიმინდის და ხორბლის სპეციფიკური პრაიმერებისთვის: LECTf/LECTr, LECT1/LECT2, IVTAS1/IVTAS2, IVRf/IVRr, ZEIN94f/ZEIN94r, ZEIN102f/ZEIN102r, ACACf/ACACr, GLU1/GLU2-სთვის: დენატურაცია 95°C-ზე 3წთ, შემდეგი 40 ციკლი 95°C-ზე 30წმ, 63°C-ზე 30 წმ, 72°C-ზე 35წმ, საბოლოო ეტაპი კი 72°C-ზე 5წთ-ის განმავლობაში.

ხორბლის სპეციფიკური პრაიმერისთვის TEN2/TEN3 პჯრ-ის პირობები იყო: დენატურაცია 94°C-ზე 2წთ, შემდეგი 35 ციკლი 94°C-ზე 30წმ, 60°C-ზე 30წმ, 72°C-ზე 30წმ, საბოლოო ეტაპი კი 72°C-ზე 3წთ-ის განმავლობაში.

სოიას სპეციფიკური პრაიმერებისთვის LECTf/LECTr და LECT1/LECT2 გამოვიყენეთ პჯრ-ის შემდეგი პირობები: დენატურაცია 95°C-ზე 3წთ, შემდეგი 40 ციკლი 95°C-ზე 30წმ, 63°C-ზე 30წმ, 72°C-ზე 30წმ, საბოლოო ეტაპი კი 72°C-ზე 3წთ-ის განმავლობაში.

გენმოდიფიცირებული სიმინდის პრაიმერებისთვის Cry1f/Cry1r, Cry124f/Cry124r, P35Sf/P35Sr გამოყენებულ იქნა პჯრ-ის შემდეგი პირობები:

დენატურაცია 95°C-ზე 3წთ, შემდეგი 45 ციკლი 95°C-ზე 25წმ, 63°C-ზე 30წმ, 72°C-ზე 45წმ, საბოლოო ეტაპი კი 72°C-ზე 7წთ-ის განმავლობაში.

7. სტატისტიკური ანალიზი

კვლევის შედეგად მიღებული მონაცემების შეფასებისა და ანალიზისთვის გამოვიყენეთ კომპიუტერული სტატისტიკური დამუშავების სხვადასხვა ხერხები და მეთოდები.

აგაროზას გელზე პჯრ პროდუქტების გამოსხივების ინტენსივობა შევაფასეთ პროგრამით Imagej - ვერსია 1.51q (Institut Pasteur, Paris, France). აღნიშნული პროგრამით შესაძლებელია პჯრ-ამპლიკონების ნახევრად რაოდენობრივი შეფასება ელექტროფორეზის გელების ციფრული ანალიზით. მონაცემები დავითვალეთ პიქსელებში. აღნიშნული მონაცემების გაანალიზებისას თერმულად დამუშავებული სინჯების შედარება მოხდა თერმულად დაუმუშავებელ სინჯებთან. Imagej პროგრამით მიღებული მონაცემების საფუძველზე გრაფიკები ავაგეთ პროგრამით Excel (Microsoft office 2007, Redmond, Washington, USA).

გენომური დნმ-ის კონცენტრაციის მაჩვენებლები გრაფიკული სახით ავაგეთ პროგრამით SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc., San Jose, California, USA). აბსოლუტურად იდენტურ პირობებში ჩატარებული ექსპერიმენტებით მიღებული პჯრ პროდუქტების ურთიერთშედარება და მათ შორის სტანდარტული ცდომილების (SEM) შეფასება მოხდა One-Way-ANOVA მეთოდით, როდესაც $P < 0.05$. აღნიშნული მონაცემების შესაფასებლად გამოვიყენეთ პროგრამა GraphPad Prism 6 (GraphPad Software).

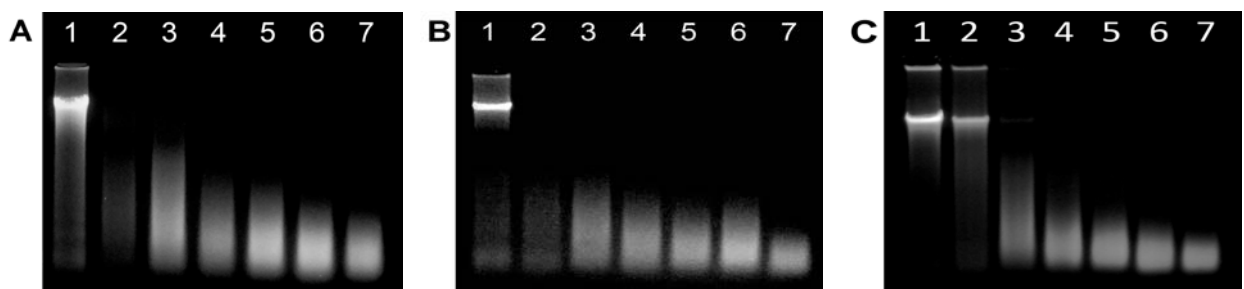
მიღებული შედეგები

თავი 1. ხორბლის, სიმინდისა და სოიას მარცვლებზე თერმულ-მყავური ზემოქმედების ეფექტი დნმ-ის დეგრადაციასა და ამპლიფიკაციაზე

1.1. მარცვლებზე თერმული ზემოქმედების გავლენა გენომურ დნმ-ზე

თერმული სტერილიზაცია საკვების შენახვისა და კონსერვირების ტექნოლოგიის მთავარი საფეხურია. თესლების დუღილი ძირითადად გამოიყენება კონსერვების წარმოებაში. კონსერვირებული მარცვლეული, მათ შორის სიმინდი, ხორბალი და სოია ფართოდ გავრცელებულია როგორც სასურსათო, ისე ფურაჟის ინდუსტრიაში.

კვლევის პირველ ეტაპზე შევისწავლეთ ხორბლის, სიმინდისა და სოიას გენომური დნმ-ები, მათი მარცვლების წყალში დუღილისას დროის სხვადასხვა ინტერვალში. სურ. 7-ზე ნაჩვენებია 100°C-ზე 300წთ-ის განმავლობაში, დროის სხვადასხვა ინტერვალში თერმული ზემოქმედების გავლენა ხორბლის, სიმინდისა და სოიას გენომურ დნმ-ზე. აგაროზას გელზე დნმ-ის ელექტროფორეტული პროფილების შედარება აშკარად მიუთითებს სამივე სახეობის გენომური დნმ-ის დროზე დამოკიდებულ დეგრადაციაზე (სურ. 7-A,B,C).



სურათი 7. მარცვლების 100°C-ზე თერმული დამუშავების გავლენა გენომურ დნმ-ზე.
A - ხორბალი B - სიმინდი C - სოია

სიხეგრე: (1) დაუმუშავებელი; დამუშავებული (2) ადუღებისთანავე აღებული; (3) 60წთ-ით; (4) 120წთ-ით; (5) 180წთ-ით; (6) 240წთ-ით; (7) 300წთ-ით.

საკონტროლო, თერმულად დამუშავებული სინჯების მაღალმოლეკულური დნმ-ის ინტენსიური ზოლები უკვე აღარ შეიმჩნევა სიმინდისა და ხორბლის სინჯებში, რომლებიც აღებულია ადულებისთანავე (წყალში მოთავსებული მარცვლების 22°C-დან 100°C-მდე თერმული დამუშავების შემდეგ) (სურ. 7. A,B, ზოლები 1-2), ხოლო სოიას შემთხვევაში ანალოგიური სინჯი ჯერ კიდევ შეიცავს გარკვეული რაოდენობის მთლიან გენომურ დნმ-ს (სურ. 7. C, ზოლები 1-2). სოიას დნმ-ის ძლიერი დეგრადაცია იწყება 100°C-ზე 60წთ-ის განმავლობაში დუღილის შემდეგ, თუმცა სინჯში მცირე რაოდენობით შეინიშნება ინტაქტური დნმ-ის არსებობაც (სურ. 7. C, ზოლი 3). კვლევის მონაცემები მიუთითებს, რომ სოიას დნმ უფრო მეტად თერმოსტაბილურია, ვიდრე ხორბლისა და სიმინდის დნმ. აღსანიშნავია, რომ მაღალმოლეკულური დნმ-ის შემცირებასთან ერთად მოკლე დნმ-ების შესაბამისი ზოლების ინტენსივობა მატულობდა ზემოქმედების დროის ზრდის შესაბამისად (სურ. 7. A,B, C, ზოლები 3-7). მიღებული შედეგებით გამოვლინდა, რომ მარცვლების თერმული დამუშავება წყალში დუღილით 100°C-ზე იწვევს გენომური დნმ-ის დეგრადაციას, ამასთან ექსტრაგირებული მცენარეული გენომური დნმ-ის სიგრძე მცირდება თერმული დამუშავების დროის გაზრდის შესაბამისად.

1.2. მარცვლებზე თერმული ზემოქმედების გავლენა დნმ-ის ამპლიფიკაციაზე

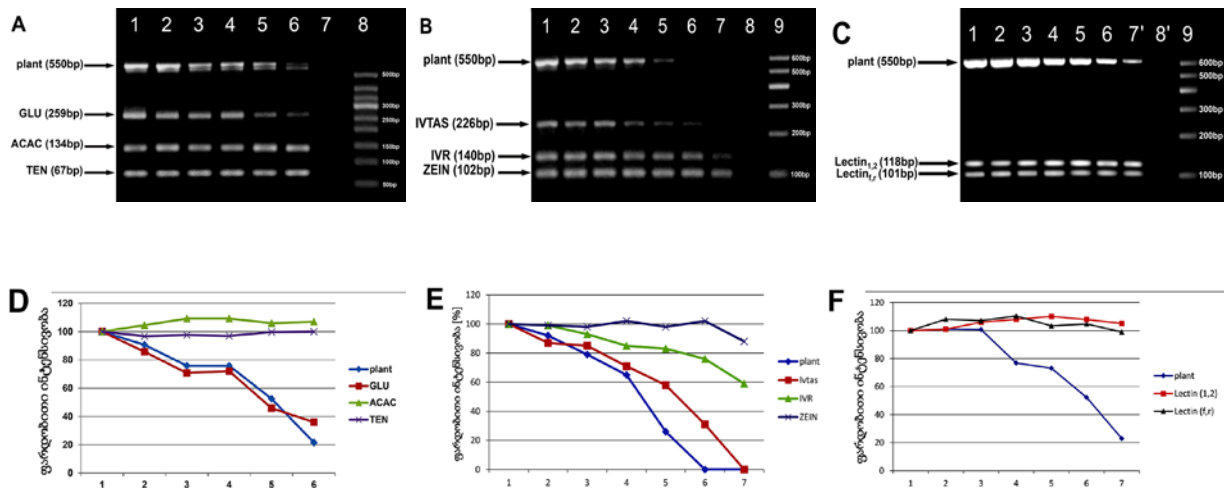
თერმულად დამუშავებული მარცვლებიდან ექსტრაგირებული დნმ-ების დეგრადაციის კინეტიკა შემოწმდა სხვადასხვა ზომის პჯრ-ამპლიკონების დეგრადაციის შეფასებით. დნმ-ების ამპლიფიციურობის უნარის შესასწავლად გამოყენებულ იქნა როგორც მცენარის სპეციფიური პჯრ, ასევე სახეობასპეციფიური პჯრ-სისტემები. მცენარის სამივე სახეობის დნმ-ების ამპლიფიკაცია ჩატარდა მცენარის სპეციფიური პრაიმერებით plant1/plant2, რომლებიც კომპლემენტარულია ქლოროპლასტური გენომის კონსერვატიული უბნის და იძლევა დაახლოებით 500-600bp პროდუქტს მცენარის სახეობის მიხედვით [Taberlet et al., 1991]. სახეობის სპეციფიური სამი პჯრ-სისტემა იქნა გამოყენებული სიმინდისა და ხორბლის დნმ-ების შესასწავლად, ხოლო სოიას დნმ შეფასდა სახეობის სპეციფიური ორი პჯრ-ით.

კვლევისათვის შერჩეულ იქნა ამპლიკონები 67–259bp ზომის შუალედში, იმის გათვალისწინებით, რომ არსებული მონაცემების მიხედვით, მოკლე ამპლიკონები ეფექტურია პროცესირებული პროდუქტების ანალიზისთვის [Bergerová et al, 2011; Ballari et al, 2013; Hrnčírová et al, 2008; Kutateladze et al, 2010]. სიმინდის ამპლიფიკაცია შეფასდა პრაიმერების სამი წყვილის საშუალებით. ორი მათგანი IVTAS1/IVTAS2 და IVRf/IVRr მიმართულია სიმინდის სპეციფიურ ინვერტაზას გენზე. პრაიმერები IVTAS1/IVTAS2 იძლევა 226bp ამპლიკონს [Ehlers et al., 1997], IVRf/IVRr წყვილი წარმოქმნის 140bp ამპლიკონს [Kutateladze et al., 2013], ხოლო პრაიმერები ZEINf/ZEINr, რომლებიც მიმართულია სიმინდის სპეციფიურ ზეინის გენის მიმართ, იძლევა 102bp პროდუქტს [Gabriadze et al., 2014].

ხორბლის დნმ-ის ამპლიფიკაციის შესასწავლად გამოვიყენეთ სამი პჯრ-სისტემა. პრაიმერები TEN2/TEN3, რომლებიც მიმართულია დაბამოლეკულური გლუტენინის გენზე და იძლევა 67bp ზომის პროდუქტს, რომელიც ავიღეთ ტერზისა და თანამშრომლების პუბლიკაციიდან [Terzi et al., 2003]. ჩვენი კვლევის დროს შემოწმდა და გამოყენებულ იქნა ხორბლის სპეციფიური პრაიმერების ორი ახალი წყვილი, კერძოდ ACACf/ACACr, რომელიც აცეტილ-კოენზიმ A კარბოქსილაზას გენის სპეციფიურია და იძლევა 134bp პროდუქტს, აგრეთვე დაბამოლეკულური გლუტენინის გენზე მიმართული GLU1/GLU2 პრაიმერები, რომლებიც წარმოქმნის 259bp ზომის პჯრ ფრაგმენტს. სოიას დნმ-ის ამპლიფიკაცია შესწავლილ იქნა სოიას სპეციფიური ლექტინის გენზე მიმართული ორი წყვილი პრაიმერით, როგორცაა LECT1/LECT2, რომელიც იძლევა 118bp ამპლიკონს [Lipp et al., 2001] და LECTf/LECTr, რომელიც იძლევა 101bp ამპლიკონს [Kutateladze et al., 2013].

სურ. 8-ზე წარმოდგენილია 100°C-ზე 300წთ-ის განმავლობაში მარცვლების თერმული დამუშავების გავლენა ხორბლის, სიმინდისა და სოიას დნმ-ის ამპლიფიკაციაზე. თითოეული სინჯის ყველა პჯრ-პროდუქტი შეტანილ იქნა გელის ერთ ფოსოში, რათა პჯრ-ზოლების შედარებისას თავიდან აგვეცილებინა განსხვავება აგაროზას გელებსა და ელექტროფორეზის ექსპერიმენტებს შორის (სურ. 8. A, B, C). დნმ-ის დეგრადაციის კინეტიკის შესაფასებლად პჯრ-პროდუქტების გამოსხივების ინტენსივობა გავზომეთ Imagej 152q პროგრამის საშუალებით. საკონტროლოდ ავიღეთ თერმულად დაუმუშავებელი სინჯი და მასთან მიმართებით

პროცენტულად გამოვთვალეთ დანარჩენი სინჯების გამოსხივების ინტენსივობის მაჩვენებლები. მიღებული მონაცემები გამოსახულია გრაფიკების სახით (სურ. 8. D, E, F). ელექტროფორეზის გელების ნახევრად რაოდენობრივი ანალიზის შედეგად შესაძლებელი გახდა სტანდარტული პჯრ-ის შედეგების უფრო ზუსტი ინტერპრეტაცია, როგორც მითითებულია სხვა ავტორების პუბლიკაციებშიც [Antiabong et al., 2016; Souza et al., 2009].



სურათი 8. მარცვლების 100°C-ზე თერმული დამუშავების გავლენა დნმ-ის ამპლიფიკაციაზე. A-C. აგაროზას გელზე ელექტროფორეზის სურათები; D-F. ფარდობითი ინტენსივობის გრაფიკები.

A, D - ხორბალი B, E - სიმინდი C, F - სოია.

სინჯები: (1) დაუმუშავებელი; დამუშავებული: (2) ადუღებისთანავე აღებული, (3) 60წთ-ით, (4) 120წთ-ით, (5) 180წთ-ით, (6) 240წთ-ით. (7, 8') წყალი, (8) 50bp დნმ-ის მარკერი, (7') დამუშავებული 300წთ-ით, (9) 100bp დნმ-ის მარკერი

ელექტროფორეზმა აჩვენა, რომ თითოეული პრაიმერული წყვილის გამოყენებით ამპლიფიცირდა მოსალოდნელი პჯრ-პროდუქტი სამივე სახეობის დნმ-მატრიცებისთვის (სურ. 8. A, B, C). გრძელი ამპლიკონების ანალიზმა აჩვენა დროზე დამოკიდებული მნიშვნელოვანი დეგრადაცია. ეს ამპლიკონებია: ქლოროპლასტური გენომის 550bp ფრაგმენტი, ხორბლის გლუტენინის გენის 259bp ფრაგმენტი და სიმინდის ინვერტაზის გენის 226bp ფრაგმენტი. უფრო მეტიც, სიმინდის გენომის 550bp და 226bp ფრაგმენტები აღარ ჩანს 240წთ და 300წთ დუღილის შემდეგ (სურ. 8. B, D, სინჯები 6, 7). აღსანიშნავია, რომ სოიას გენომის 550bp ფრაგმენტი ყველაზე ნაკლებ დეგრადაციას გვიჩვენებს (სურ. 8. C, F), რაც შეესაბამება სოიას გენომის უფრო

მაღალ თერმოსტაბილობას ხორბლისა და სიმინდის გენომებთან შედარებით, რაც ზემოთ იყო აღნიშნული.

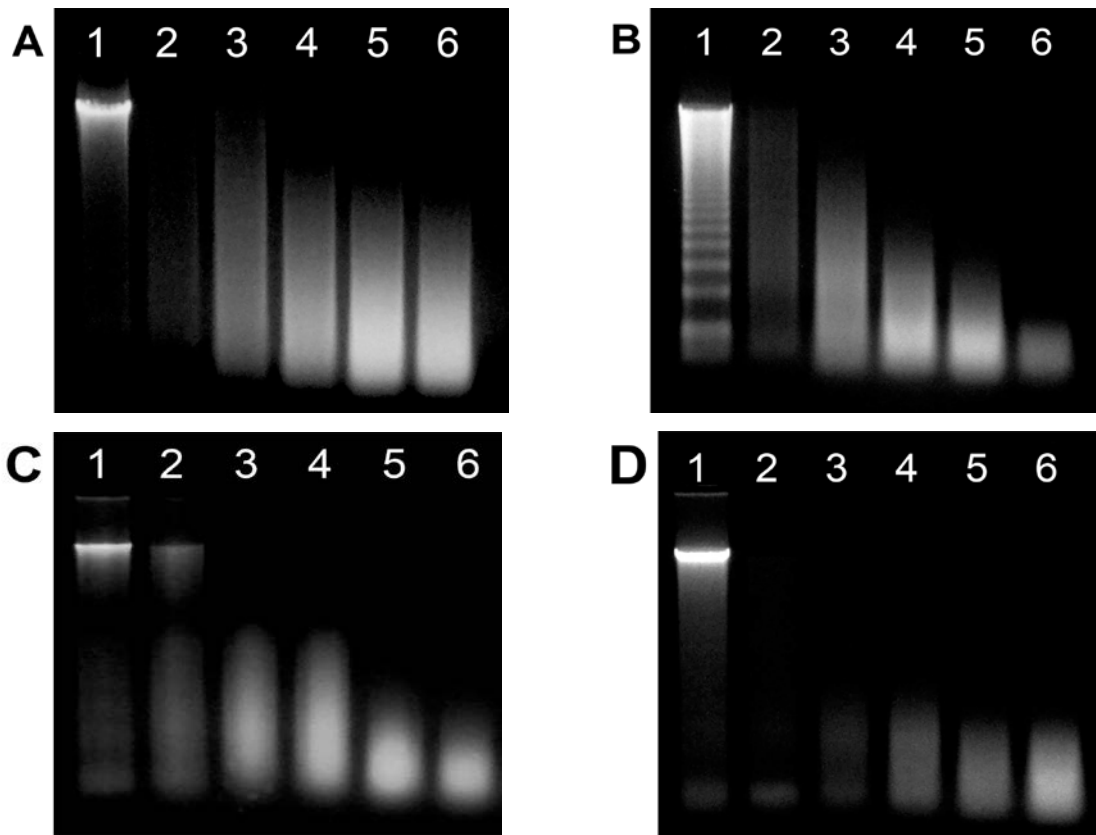
სიმინდის ინვერტაზას გენის 140bp ფრაგმენტმა აჩვენა ამპლიფიკაციის უნარის გარკვეული შემცირება ზემოქმედების დროის გაზრდის შესაბამისად, დნმ-ის ზოლის ინტენსივობა შემცირდა 40%-ით 300წთ-ის განმავლობაში დუდილის შემდეგ (სურ. 8. E). მოკლე ამპლიკონები, როგორცაა ხორბლის გლუტენინის გენის 67bp ფრაგმენტი და აცეტილ-კოენზიმ A კარბოქსილაზას გენის 134bp ფრაგმენტი, სიმინდის ზეინის გენის 102bp ფრაგმენტი, სოიას 118bp და 101bp ფრაგმენტები, ინარჩუნებდნენ თითქმის უცვლელ ამპლიფიციურობას ზემოქმედების მთელი დროის განმავლობაში (სურ. 8.). სიმინდის 140bp ფრაგმენტისა და ხორბლის 134bp ფრაგმენტის შედარება მიანიშნებს სიმინდის გენომის უფრო ნაკლებ თერმომედეგობაზე ხორბლის გენომთან შედარებით.

1.3. მარცვლებზე კომბინირებული თერმულ-მჟავურ ზემოქმედების გავლენა გენომურ დნმ-ზე

მაღალი ტემპერატურისა და დაბალი pH-ის კომბინაცია ხშირად გამოიყენება საკვების პროცესირებისა და შენახვის დროს. კომბინირებული თერმულ-მჟავური ზემოქმედების შესასწავლად, ხორბლისა და სიმინდის მარცვლები დავამუშავეთ სხვადასხვა pH-ის (6.5, 4.0 და 2.0) მქონე 0.4% NaCl-ის ხსნარში მაღალ ტემპერატურაზე (100°C-ზე ადუღებისას) 120წთ-ის განმავლობაში. მარცვლების დამუშავებამ 100°C-ზე 0.4% NaCl (pH 6.5)-ის ხსნარში მოგვცა იგივე შედეგი, რაც მიღებული იყო 100°C-ზე წყალში დუდილისას (სურ. 7 A, B). როგორც მე-9 სურათზე ჩანს, აგაროზას გელზე ელექტროფორეზმა გამოავლინა ხორბლისა და სიმინდის გენომური დნმ-ების დროზე დამოკიდებული დეგრადაცია.

საკონტროლო დაუმუშავებელი სინჯების მაღალმოლეკულური გენომური დნმ-ის ინტენსიური ზოლები გაქრა დუდილის დაწყებისას ადებულ სინჯებში, მარცვლების 0.4%-იან NaCl-ის ხსნარში pH (4 და 2)-ზე, 22°C-დან 100°C-მდე დამუშავების შემდეგ (სურ 9, სინჯები 2). აღსანიშნავია, რომ მჟავიანობის გაზრდამ

pH 4-დან (სურ. 9, A, C) pH 2-მდე (სურ. 9. B, D) გამოიწვია დნმ-ის დეგრადაციის გაძლიერება.



სურათი 9. მარცვლებზე კომბინირებული თერმულ-მჟავური ზემოქმედების გავლენა გენომურ დნმ-ზე

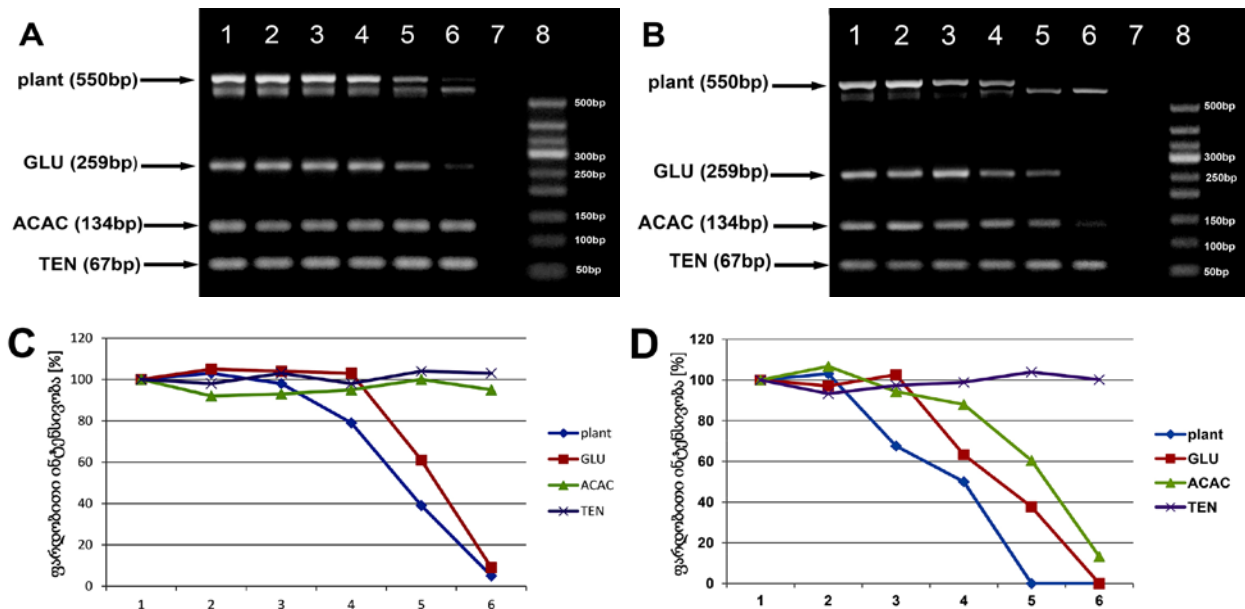
A – ხორბლის სინჯები 100°C, pH 4; B – ხორბლის სინჯები 100°C, pH 2; C – სიმინდის სინჯები 100°C, pH 4; D – სიმინდის სინჯები 100°C, pH 2.

სინჯები: (1) დაუმუშავებელი, დამუშავებული: (2) ადულებისთანავე ალებული, (3) 30წთ, (4) 60წთ, (5) 90წთ, (6) 120წთ.

1.4. მარცვლებზე კომბინირებული თერმულ-მჟავურ ზემოქმედების გავლენა დნმ-ის ამპლიფიკაციაზე

ხორბლის დნმ-ის ამპლიფიციურობაზე კომბინირებული თერმულ-მჟავური ზემოქმედების შესაფასებლად გამოვიყენეთ ოთხი პჯრ-სისტემა მიმართული ქლოროპლასტურ გენომზე, ხორბლის სპეციფიურ აცეტილ-კონზიმ A

კარბოქსილაზასა და გლუტენინის გენების მიმართ, რომლებიც გამოვიყენეთ წინა ექსპერიმენტებშიც (სურ. 8 A). როგორც მე-10 სურათი გვიჩვენებს, ყველაზე მცირე ზომის ამპლიკონს ზომით 67bp pH-ის წყალბადიონების კონცენტრაციის ორივე მაჩვენებელზე (pH 4 და pH 2) და 134bp ამპლიკონს - pH 4-ზე თითქმის უცვლელი ამპლიფიკაცია ახასიათებთ ზემოქმედების მთელი დროის განმავლობაში (სურ. 10 A, B). მსგავსი შედეგი იყო მიღებული ადრე თერმული დამუშავებისას (სურ. 8 A). მაგრამ 134bp ფრაგმენტის ზოლის ინტენსივობა მცირდებოდა pH 2-ზე პროცესირების ხანგრძლივობის მატების შესაბამისად, თუმცა პჯრ-პროდუქტი რჩებოდა დეტექტირებადი (სურ. 10 B).



სურათი 10. კომბინირებული თერმულ-მჟავური ზემოქმედების ეფექტი ხორბლის დნმ-ის ამპლიფიკაციაზე.

აგაროზის გელის ელექტროფორეზი სინჯებისთვის, რომლებიც დამუშავებულია: A – 100°C, pH 4; B – 100°C, pH 2;

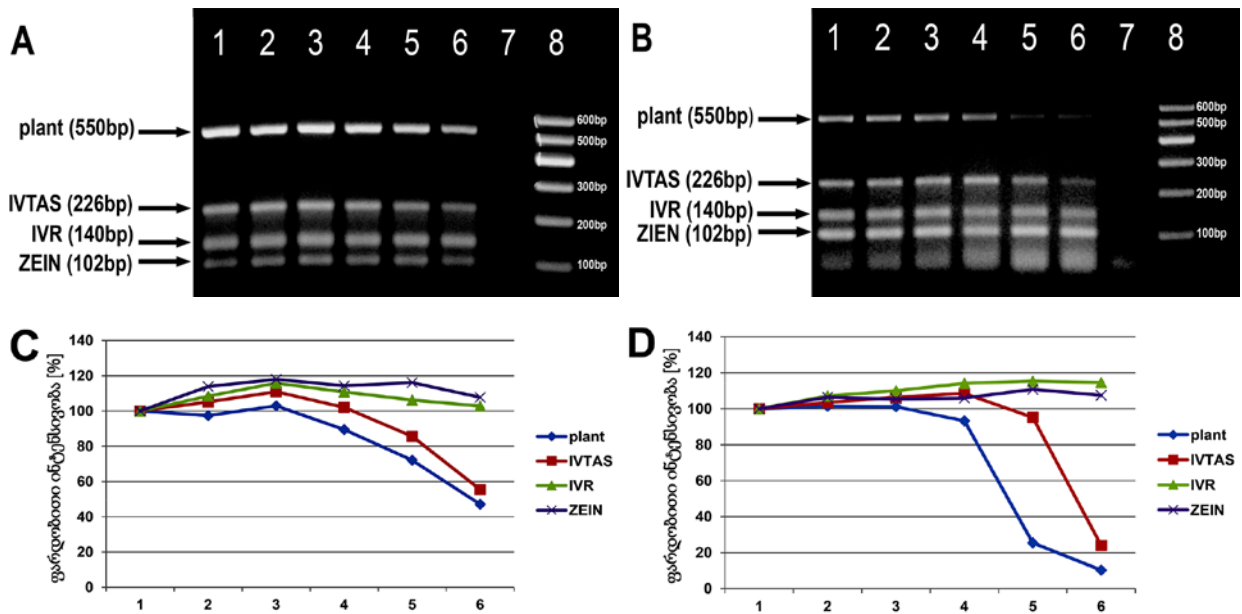
ფარდობითი ინტენსივობების გრაფიკები სინჯებისთვის, რომლებიც დამუშავებულია: C – 100°C, pH 4; D – 100°C, pH 2;

სინჯები: 1. დაუმუშავებელი, დამუშავებული: (2) ადულებისთანავე, (3) 30წთ, (4) 60წთ, (5) 90წთ, (6) 120წთ, 7 - წყალი, 8. დნმ-ის 50bp მარკერი

დნმ-ის გრძელი ფრაგმენტები, როგორიცაა 550bp და 259bp, დეგრადირდა დროის ხანგრძლივობის მატების შესაბამისად წყალბადიონების კონცენტრაციის ორივე მაჩვენებელზე, თუმცა pH 2-ზე დეგრადაცია უფრო სწრაფად მოხდა, ვიდრე pH

4-ზე (სურ. 10). პროცესირების სხვადასხვა პირობებში, ამპლიკონების ფარდობითი ინტენსივობის შედარებამ აჩვენა, რომ დაბალ pH-ზე მნიშვნელოვნად შემცირდა დნმ-ის ამპლიფიკაცია (სურ. 10 C, D). კერძოდ, 100°C-ზე, pH 6.5-ზე პროცესირებისას 120წთ-ის განმავლობაში, 550bp და 259bp ფრაგმენტების ინტენსივობა 25%-ით და 28%-ით შემცირდა შესაბამისად, ხოლო 100°C, pH 4-ზე ბევრად უფრო დიდი კლება დაფიქსირდა, როგორცაა 95% და 91%. უფრო მეტიც, 100°C-ზე, pH 2-ზე დამუშავებისას 550bp და 259bp ფრაგმენტების ინტენსივობა შესაბამისად შემცირდა 100%-ით 90წთ-ში და 120წთ-ში (სურ. 10 C, D). მიღებული შედეგებით დასტურდება, რომ ორი პჯრ-მეთოდი, რომელიც იძლევა 67bp და 134bp ამპლიკონებს, გამოსადეგია ხორბლის ზუსტი დეტექციისათვის ძლიერად პროცესირებულ საკვებში.

კომბინირებული თერმულ-მქავური დამუშავებისას სიმინდის დნმ-ის დეგრადაციის მონიტორინგისთვის გამოყენებულ იქნა ზემოთხსენებული ოთხი პჯრ-სისტემა (სურ. 8 B) მიმართული ქლოროპლასტური გენომის, სიმინდის ინვერტაზისა და ზეინის გენების მიმართ. აგაროზას გელზე ელექტროფორეზით გამოვლინდა 102bp და 140bp ამპლიკონების თითქმის უცვლელი ამპლიფიკაცია ორივე პირობებში 100°C, pH 4-ზე და 100°C, pH 2-ზე ზემოქმედების მთელი დროის განმავლობაში (სურ. 11 A, B). უფრო მეტიც, რამდენიმე სინჯში ამ პჯრ-პროდუქტების ინტენსივობა 10-17%-ით გაიზარდა საკონტროლო დაუმუშავებელ სინჯთან შედარებით (სურ. 11. C, D). აქედან გამომდინარე, შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ მოკლე ფრაგმენტების რაოდენობის გაზრდა გამოიწვია მაღალმოლეკულური გენომური დნმ-ის დეგრადაციამ (სურ. 9. C, D). ექსპერიმენტულად პროცესირებულ სინჯებზე მიღებული ეს შედეგები ემთხვევა ჩვენი ადრინდელი კვლევის მონაცემებს, როდესაც ეს პჯრ-სისტემები ეფექტურად გამოვიყენეთ სიმინდის იდენტიფიკაციისთვის ბაზარში შეძენილ პროცესირებულ პროდუქტებში [Kutateladze et al., 2013; Gabriadze et al., 2014]



სურათი 11. კომბინირებული თერმულ-მჟავური ზემოქმედების ეფექტი სიმინდის დნმ-ის ამპლიფიკაციაზე.

აგაროზას გელის ელექტროფორეზი სინჯებისთვის, რომლებიც დამუშავებულია: A – 100°C, pH 4; B – 100°C, pH 2;

ფარდობითი ინტენსივობების გრაფიკები სინჯებისთვის, რომლებიც დამუშავებულია: C – 100°C, pH 4; D – 100°C, pH 2;

სინჯები: 1. დაუმუშავებელი, დამუშავებული: (2) ადულებისთანავე, (3) 30წთ, (4) 60წთ, (5) 90წთ, (6) 120წთ, 7 - წყალი, 8. დნმ-ის ზომის 50bp მარკერი

226bp და 550bp ფრაგმენტების ამპლიფიკაციის ეფექტურობა თითქმის უცვლელი იყო შესაბამისად 30წთ-ისა და 60წთ-ის განმავლობაში, ხოლო შემდეგ გამომჟღავნდა ამ ამპლიკონების დროზე დამოკიდებული დეგრადაცია (სურ.11. A, B). დამუშავების სხვადასხვა პირობებში სიმინდის პჯრ-ფრაგმენტების ფარდობითი ინტენსივობების ანალიზმა აჩვენა, რომ დაბალი pH იწვევს სიმინდის გენომური დნმ-ის ძლიერ დეგრადაციას. კერძოდ, 550bp და 226bp პჯრ პროდუქტების ფარდობითი ინტენსივობა ზემოქმედების 120წთ-ის განმავლობაში შესაბამისად შემცირდა 10%-ით და 23%-ით 100°C, pH 6.5-ზე დამუშავებისას, მაშინ როცა 100°C, pH 4-ზე შემცირდა 47% და 55%-ით, ხოლო 100°C, pH 2-ზე - 65% და 71%-ით. წყლის უარყოფით კონტროლებში არ ჩანს ამპლიფიკაციის პროდუქტები (სურ. 10 და 11, სინჯი 7), რაც მიუთითებს, რომ გარემო, ბუფერები და რეაქტივები არაა დაბინძურებული რაიმე დნმ-ით.

ჩვენი შედეგები ემთხვევა სხვა ავტორების მიერ ადრე გამოქვეყნებულ მონაცემებს, კერძოდ, MON810 სიმინდის ინვერტაზის გენის 224bp ამპლიკონი

დეტექტირდა 100°C, pH 2.25-ზე 30წთ-ის განმავლობაში ზემოქმედების შემდეგ [Bergerova et al., 2011]; აგრეთვე, 957bp-მდე სიგრძის ფრაგმენტები ამპლიფიცირდა 85°C/pH 8.4-ზე ან 65°C/pH 4.0-ზე 90წთ-ით ინკუბაციის შემდეგ [Bauer et al., 2003]. ამ მონაცემებისგან განსხვავებით, Bt სიმინდის 211bp ტრანსგენური ფრაგმენტი არ დეტექტირდა pH 2-3-ზე 15წთ დუღილის შემდეგ [Hupfer et al., 1998]. გარდა ამისა, ბერგეროვამ და თანამშრობლებმა აღმოაჩინეს, რომ ლობიოს გენომის 469bp ფრაგმენტი არ ამპლიფიცირდა 100°C, pH 7.6-ზე 10წთ-ით დამუშავების შემდეგ [Bergerova et al., 2011]. ჩვენი ვარაუდით, ეს განსხვავებები შეიძლება გამოწვეული იყოს პროცესირების სხვადასხვა ტექნოლოგიებით ან პჯრ-სისტემების ამპლიფიკაციის სხვადასხვა ეფექტურობით.

ამგვარად, ჩვენს მიერ მიღებული შედეგები ადასტურებს სხვა ავტორების მიერ აღრე მიღებულ მონაცემებს [Bauer et al., 2003; Bergerova et al., 2011; Hupfer et al., 1998; Godalova et al., 2013], რომ მაღალ ტემპერატურასა და დაბალი pH-ის კომბინირებული ზემოქმედება ძლიერ გავლენას ახდენს გენომური დნმ-ის მთლიანობაზე.

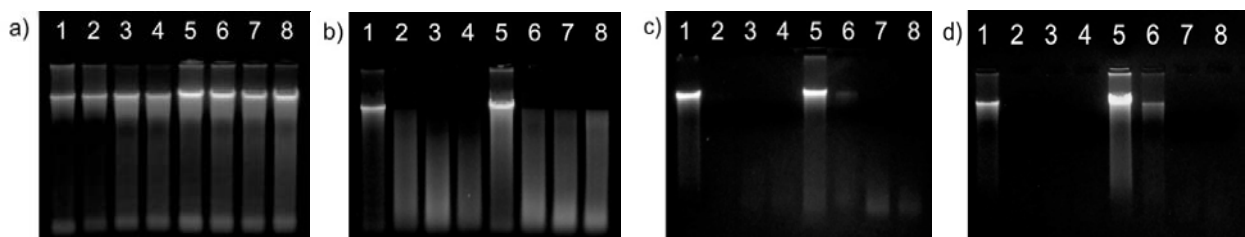
თავი 2. არამოდიფიცირებული და ტრანსგენური სიმინდის ფქვილებზე თერმული ზემოქმედების გავლენა დნმ-ის დეგრადაციასა და პჯრ-ზე დაფუძნებულ დეტექციაზე

კვლევის შემდგომ ეტაპზე პროცესირების ფორმად გამოვიყენეთ მშრალი თერმული დამუშავება 100°C-ზე და 121°C-ზე სხვადასხვა დროის განმავლობაში. კვლევები ჩატარდა როგორც არამოდიფიცირებულ, ასევე გენეტიკურად მოდიფიცირებული სიმინდის ორი ვარიაციის (BT-176-ს და MON810) ფქვილებზე. თითოეულ ექსპერიმენტში გმ სიმინდის დნმ შევადარეთ არამოდიფიცირებული სიმინდის დნმ-თან. ანალიზური პროცედურა შედგებოდა შემდეგი თანმიმდევრული საფეხურისგან: სინჯების მომზადება (1), თერმული დამუშავება (2); გენომური დნმ-ის ექსტრაქცია (3), დნმ-ის შეფასება აგაროზას გელზე ელექტროფორეზითა და სპექტროფოტომეტრით (4); ენდოგენური ამპლიკონების პჯრ-ამპლიფიკაცია (5); გმო-სპეციფიური ამპლიკონების ამპლიფიკაცია (6); შედეგების შედარება და

ინტერპრეტაცია (7). ჩავატარეთ ოთხი დამოუკიდებელი ექსპერიმენტი, რათა შეგვესწავლა რამდენიმე ფაქტორის სხვადასხვა კომბინაცია. ეს კომბინაციებია: (1) არამოდიფიცირებული და Bt-176 სიმინდი დამუშავებული 100°C-ზე, დნმ-ის ექსტრაქცია CTAB მეთოდით; (2) არამოდიფიცირებული და Bt-176 სიმინდი დამუშავებული 121°C-ზე, დნმ-ის ექსტრაქცია CTAB მეთოდით; (3) არამოდიფიცირებული და Bt-176 სიმინდი დამუშავებული 121°C-ზე, დნმ-ის ექსტრაქცია DNeasy ნაკრებით; (4) არამოდიფიცირებული და MON810 სიმინდი დამუშავებული 121°C-ზე, დნმ-ის ექსტრაქცია DNeasy ნაკრებით. ოთხივე კომბინაციაში სინჯების თერმული დამუშავების ხანგრძლივობა ერთნაირია.

2.1 ფქვილებზე თერმული ზემოქმედების გავლენა გენომურ დნმ-ზე

თერმული დამუშავება ჩატარდა 100°C-ზე და 121°C-ზე, რადგან ეს ტემპერატურები ხშირად გამოიყენება საკვების წარმოებისა და შენახვის დროს. კერძოდ, ზოგიერთი პროდუქტის პასტერიზაცია ხდება 100°C-ზე, ხოლო 121°C-ზე ხორციელდება სტერილიზაცია. გენომური დნმ-ის ელექტოფორეზით მიღებულმა შედეგებმა გვიჩვენა, რომ თერმული ზემოქმედების ეფექტი დიდწილად დამოკიდებულია ტემპერატურაზე და დამუშავების ხანგრძლივობაზე (სურ. 12).



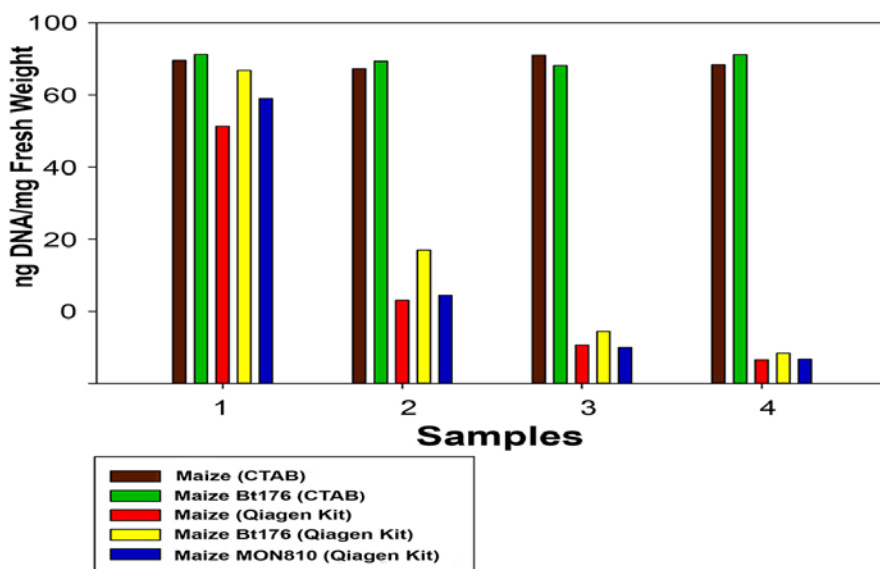
სურათი 12. ფქვილებზე თერმული ზემოქმედების გავლენა გენომურ დნმ-ებზე.

სინჯები დამუშავებული: (a) 100°C-ზე და (b-d) 121°C-ზე. ზემოქმედების ხანგრძლივობა: სინჯები 1, 5 – 0წთ, სინჯები 2, 6 – 60წთ, სინჯები 3, 7 – 180წთ, სინჯები 4, 8 – 300წთ. ექსტრაქცია: CTAB მეთოდით (a, b), Dneasy ნაკრებით (c-d). სინჯები: არაგენმოდიფიცირებული სიმინდი (a-d, 1-4), გმ სიმინდი Bt-176 (a-c, 5-8), გმ სიმინდი MON810 (d, 5-8).

მნიშვნელოვანი განსხვავება გამოვლინდა სხვადასხვა ტემპერატურაზე დამუშავებულ ნიმუშებს შორის. 100°C-ზე დამუშავებულ სინჯებში თერმული

ზემოქმედების კვალი მნიშვნელოვნად სუსტი იყო, 121°C-ზე დამუშავებულ სინჯებთან შედარებით. თერმულად დაუმუშავებელ ყველა სინჯში შესამჩნევია მაღალმოლეკულური გენომური დნმ-ის ზოლები ძლიერი ინტენსივობით. 100°C-ზე დამუშავებულ სინჯებში შენარჩუნებულია მთლიანი გენომური დნმ-ების დიდი რაოდენობა დაბალმოლეკულური ფრაგმენტების სუსტი კვალით (შმირით) (სურ. 12a).

ხოლო 121°C-ზე დამუშავებულ სინჯებში აღინიშნება ძლიერად დეგრადირებული დნმ-ის კვალი, ამასთან, დნმ-ის ფრაგმენტების ზომა მცირდება პროცესირების დროის მატების შესაბამისად (სურ. 12b, 12c, 12d). შესაბამისად, მიღებული შედეგები ნათლად გვიჩვენებს, რომ მაღალი ტემპერატურა უარყოფითად მოქმედებს დნმ-ის მთლიანობაზე. ამასთან, 121°C-ზე დამუშავება ბევრად ძლიერ დეგრადაციას იწვევს, ვიდრე 100°C-ზე გაცხელება. აღსანიშნავია, რომ DNeasy ნაკრებით ექსტრაქტირებული სინჯების (სურ. 12a, 12b) შემთხვევაში უფრო მეტად გამოხატულია დეგრადაციის ეფექტი, CTAB მეთოდით ექსტრაგირებულ სინჯებთან შედარებით (სურ. 12c, 12d).



სურათი 13. გენომური დნმ-ების სპექტროფოტომეტრული ანალიზი

სინჯები: არამოდიფიცირებული სიმინდი ექსტრაქტირებული CTAB მეთოდით = Maize (CTAB) და DNeasy ნაკრებით = Maize (Qiagen Kit), გმ სიმინდი BT-176 ექსტრაქტირებული CTAB მეთოდით = Maize BT-176 (CTAB) და DNeasy ნაკრებით = Maize BT-176 (Qiagen Kit), სიმინდი MON810 ექსტრაქტირებული DNeasy ნაკრებით = Maize MON810 (Qiagen Kit); 121°C-ზე თერმული დამუშავების ხანგრძლივობა: 1=0წთ, 2=60 წთ, 3=180 წთ, 4=300 წთ.

სპექტროსკოპულმა ანალიზმა გამოავლინა მნიშვნელოვანი სხვაობა დნმ-ის ექსტრაქციის მეთოდებს შორის დნმ-ის გამოსავლიანობის კუთხით (სურ. 13). კერძოდ, CTAB მეთოდმა მოგვცა უფრო მეტი დნმ, ვიდრე DNease ნაკრებმა. განსაკუთრებით მნიშვნელოვანი განსხვავება გამოვლინდა ძლიერად დამუშავებული სინჯებისთვის. 121°C-ზე 30წთ-ის განმავლობაში დამუშავებამ არ მოახდინა გავლენა CTAB-მეთოდით ექსტრაგირებული დნმ-ის რაოდენობაზე როგორც არამოდიფიცირებული, ასევე გმ სიმინდის (Bt-176 ვარიაცია) შემთხვევაში, მაგრამ 121°C-ზე პროცესირებამ ძლიერი გავლენა მოახდინა DNeasy ნაკრებით ექსტრაგირებულ დნმ-ზე (სურათი. 13).

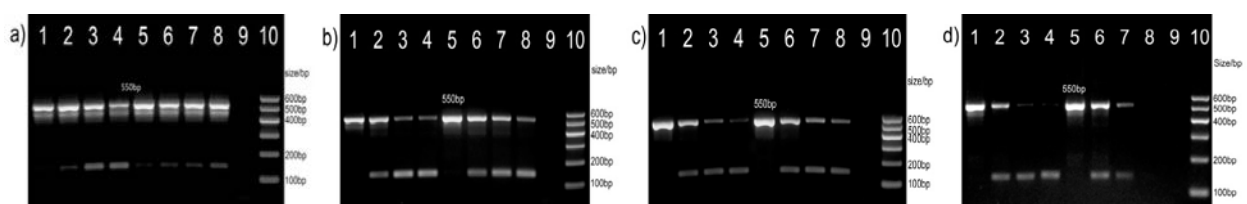
უფრო მეტიც, როგორც არამოდიფიცირებული, ასევე გმ სინჯებისთვის (Bt-176 და MON810), დნმ-ის გამოსავლიანობა მკვეთრად ეცემა ზემოქმედების დროის ზრდასთან ერთად. მაგ; დაუმუშავებელ სინჯებთან შედარებით, 60წთ-ით დამუშავებულ სინჯებში დნმ-ის გამოსავლიანობა შემცირებულია 50-60%-ით, ხოლო 300წთ-ით დამუშავებულში - 90%-ით.

ეს შესაძლებელია აიხსნას ამ მეთოდებში გამოყენებული დნმ-ის გაწმენდის სხვადასხვა ხერხით. კერძოდ, CTAB-ის ექსტრაქტები შეიცავს პროცესირებისას წარმოქმნილ დნმ-ის ყველა ფრაგმენტს, მაშინ როდესაც, DNease ნაკრებით მიღებულ ექსტრაქტებში მოკლე დნმ-ის ფრაგმენტები მოშორებულია. ამგვარად, პროცესირებული საკვებიდან დნმ-ის ექსტრაქციისთვის CTAB მეთოდი უფრო ეფექტური და ვარგისია, ვიდრე DNease ნაკრები.

მიღებული შედეგები გვიჩვენებს, რომ თერმული დამუშავების ტემპერატურა და ხანგრძლივობა, აგრეთვე, დნმ-ის ექსტრაქციის მეთოდი გადამწყვეტი ფაქტორებია, რომლებიც გავლენას ახდენენ დნმ-ის მთლიანობასა და რაოდენობაზე.

2.2. ფეკილებზე თერმული ზემოქმედების გავლენა ენდოგენურ ამპლიკონებზე

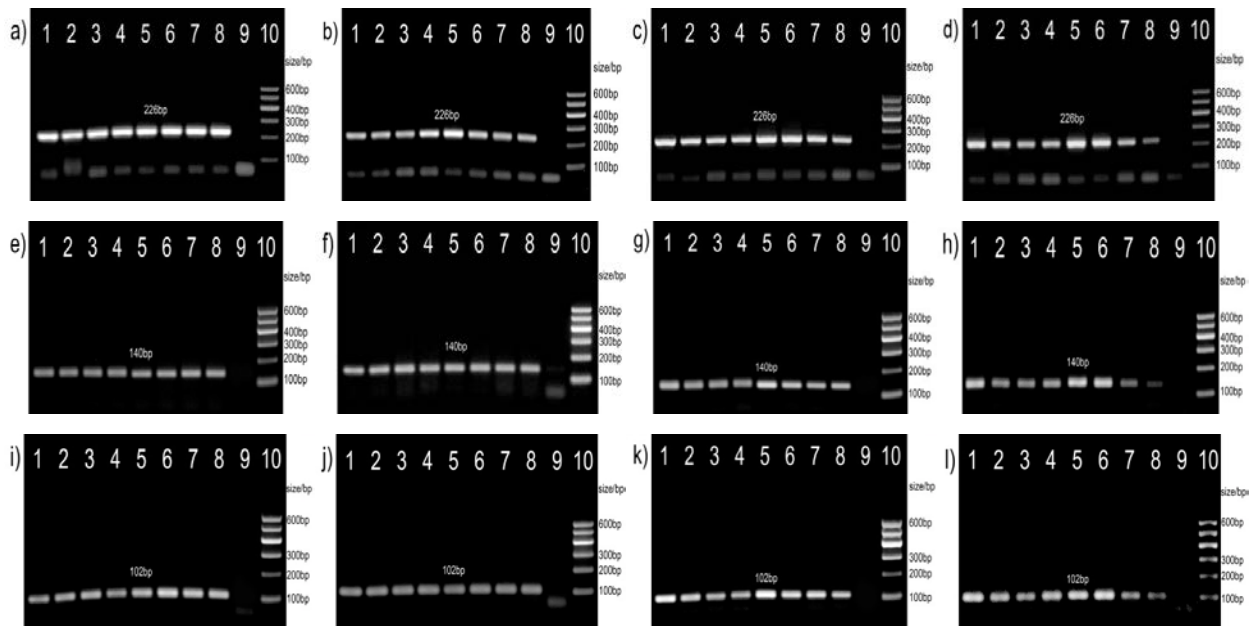
იმისათვის, რომ დეტალურად შეგვესწავლა დნმ-ის დეგრადაციის შედეგად წარმოქმნილი ფრაგმენტების სიგრძე და მათი გენეტიკური ლოკაცია, კვლევისთვის შევარჩიეთ სხვადასხვა სიგრძისა და მდებარეობის ამპლიკონები. გამოვიკვლიეთ როგორც ენდოგენური, ასევე ეგზოგენური ამპლიკონები, რომელთა სიგრძეა 102bp-დან 258bp-მდე. აგრეთვე, კვლევაში გამოვიყენეთ მცენარის სპეციფიური ქლოროპლასტური დნმ-ის 550bp სიგრძის ამპლიკონი.



სურათი 14. მცენარის სპეციფიური 550bp ამპლიკონის პჯრ ანალიზი

სინჯები დამუშავებული მაღალ ტემპერატურაზე: (a) 100°C-ზე და (b-d) 121°C-ზე. ზემოქმედების ხანგრძლივობა: სინჯები 1, 5 = 0წთ, სინჯები 2, 6 = 60წთ, სინჯები 3, 7 = 180წთ, სინჯები 4, 8 = 300წთ. დნმ-ის ექსტრაქცია: CTAB მეთოდით (a-b), Dneasy ნაკრებით (c-d). სინჯები: არამოდიფიცირებული სიმინდი (სინჯები 1-4, a-d), გმ სიმინდი Bt-176 (სინჯები - 5-8, a-c), გმ სიმინდი MON810 (სინჯები - 5-8, d), წყალი (სინჯი 9, a-d), GelPilot 100bp მარკერი (Qiagen) (10, a-d)

მცენარის სპეციფიური პჯრ-ით ამპლიფიკაციის შედეგები წარმოდგენილია მე-14 სურათზე. როგორც მოსალოდნელი იყო, 550bp სიგრძის ერთი მთავარი ამპლიკონი წარმოიქმნა ყველა სინჯში, გარდა 121°C-ზე 300წთ-ით დამუშავებული MON810 ვარიაციისა. 100°C-ზე დამუშავებამ სუსტად იმოქმედა 550bp პროდუქტის ამპლიფიკაციაზე (სურ. 14 a), თუმცა 121°C-ზე პროცესირებისას ამ ამპლიკონის ინტენსივობა მცირდებოდა თერმული პროცესირების დროის გაზრდის შესაბამისად. უფრო მეტიც, პროდუქტის ძლიერი შემცირება გამოვლინდა 180წთ-ით დამუშავების შემდეგ (სურ. 14 b-d).



სურათი 15. სიმინდის ენდოგენური ამპლიკონების პჯრ-ანალიზი

ამპლიკონის ზომა: (a-d) 226bp, (e-h) 140bp და (i-l) 102bp. სინჯების დამუშავების ტემპერატურა: 100°C (a, e, i) და 121°C (b-d, f-h, j-l). ზემოქმედების ხანგრძლივობა: სინჯები 1, 5 = 0წთ, სინჯები 2, 6 = 60წთ, სინჯები 3, 7 = 180წთ, სინჯები 4, 8 = 300წთ. დნმ-ის ექსტრაქცია: CTAB მეთოდით (a-b, e-f, i-j), Dneasy ნაკრებით (c-d, g-h, k-l). სინჯები: არამოდიფიცირებული სიმინდი (სინჯები 1-4, a- l), გმ სიმინდი Bt-176 (სინჯები - 5-8, a-c, e-g, i-k), გმ სიმინდი MON810 (სინჯები - 5-8, d, h, l), წყალი (სინჯი 9, a-l), GelPilot 100bp მარკერი (Qiagen) (10, a-l)

სიმინდის დნმ-ის დეგრადაციისა და პჯრ-დეტექციის შესაფასებლად გამოვიყენეთ სიმინდის სახეობასპეციფიური სამი ამპლიკონი, რომელთა ზომაა 102bp-დან 226bp-მდე. ეს ამპლიკონებია: სიმინდის ზეინის გენის 102bp ზომის ფრაგმენტი, ინვერტაზას გენის 140bp და 226bp ზომის ორი ფრაგმენტი. მე-15 სურათზე წარმოდგენილია პჯრ-პროდუქტების აგაროზას გელზე ელექტროფორეზის სურათები. თვალსაჩინოა, რომ სიმინდის ყველა სინჯის პჯრ-რეაქციის შედეგად მიღებულ იქნა მოსალოდნელი სიგრძის ერთი ამპლიკონი (სურ. 15. სინჯები 1-8): IVTAS1/IVTAS2 პრაიმერების შემთხვევაში - 226bp ზომის პჯრ ფრაგმენტი (სურ. 15a, 15b, 15c და 15d), IVRf/IVRr პრაიმერების შემთხვევაში - 140bp ზომის პროდუქტი (სურ. 15e, 15f, 15g და 15h), ხოლო ZEINf/ZEINr პრაიმერების შემთხვევაში - 102bp ზომის პჯრ პროდუქტი (სურ. 15i, 15j, 15k და 15l). აღსანიშნავია, რომ აღნიშნული ამპლიკონების დეგრადაცია არ გამოვლინდა არამოდიფიცირებული სიმინდის და BT-176 ვარიაციის სიმინდის არც ერთ სინჯში, მიუხედავად ექსტრაქციის მეთოდისა

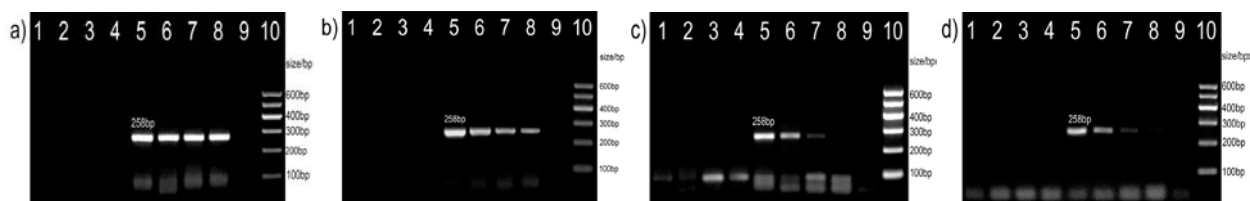
(CTAB და DNeasy ნაკრების მეთოდები) და თერმული დამუშავების ტემპერატურისა (100°C და 121°C) (სურ. 15).

რაც შეეხება, 121°C-ზე დამუშავებული MON810 ვარიაციიდან DNeasy ნაკრებით მიღებული დნმ-ის სინჯებს, მათ ამპლიკონებში გამოვლინდა მნიშვნელოვანი დეგრადაცია, რომელიც ძლიერდება თერმული დამუშავების ხანგრძლივობის მატებასთან ერთად (სურათი 15d, 15h და 15l). მიღებული მონაცემები მიუთითებს ტრანსგენური ხაზის მნიშვნელობაზე პჯრ-ის შედეგისთვის. აღსანიშნავია, რომ ინვერტაზის გენის 226bp ფრაგმენტის ამპლიფიკაცია უფრო ეფექტურად მიმდინარეობდა, 140bp ფრაგმენტთან შედარებით, რაც მეტყველებს იმაზე, რომ საკვები პროდუქტების კვლევისას დიდი მნიშვნელობა ენიჭება პრაიმერების სწორად შერჩევას პჯრ-ზე დაფუძნებული ანალიზების სისწორეში. ამპლიფიკაციის პროდუქტი არ ფიქსირდება წყლის უარყოფით კონტროლში, რამაც ექსპერიმენტის გარემოსა და აღნიშნულ პჯრ რეაქციებში შემავალი ყველა კომპონენტის დაბინძურების ალბათობა გამორიცხა (სურ. 15. სინჯი 9). მიღებული შედეგებით დასტურდება, რომ კვლევაში გამოყენებული პჯრ მეთოდები შეიძლება გამოყენებულ იქნას თერმულად დამუშავებულ პროდუქტებში სიმინდის დეტექციისთვის.

2.3. ფევილებზე თერმული ზემოქმედების გავლენა გმო - სპეციფიკურ ამპლიკონებზე

ჩვენ გამოვიკვლიეთ გმო-სპეციფიური სამი ამპლიკონი: 141bp ზომის ამპლიკონი, რომელიც შეესაბამება ყვავილოვანი კომბოსტოს მოზაიკური ვირუსის CaMV 35S პრომოტორს; აგრეთვე, 124bp და 258bp ზომის ორი ამპლიკონი, რომლებიც შეესაბამება ტრანსგენულ *CryA(b)* გენს. ყვავილოვანი კომბოსტოს მოზაიკური ვირუსის CaMV 35S პრომოტორი და *CryA(b)* გენი წარმოდგენილია ჩვენი კვლევის ობიექტებად არჩეულ ორივე ტრანსგენულ ვარიაციაში Bt-176-სა და MON810-ში. CaMV 35S პრომოტორი ხშირად გამოიყენება გმ მცენარეებში კლონირებული გენების ტრანსკრიფციის რეგულირებისათვის. *CryA(b)* გენი აღებულია ბაქტერია *Bacillus thuringiensis*-ის გენომიდან. აღნიშნული გენი აკოდირებს ინსექტიციდურ ცილას δ-

ენდოტოქსინს და ტრანსგენურ Bt მცენარეს ანიჭებს მწერების მიმართ რეზისტენტულ თვისებას.



სურათი 16. ეგზოგენური 258bp ამპლიკონის პჯრ-ანალიზი

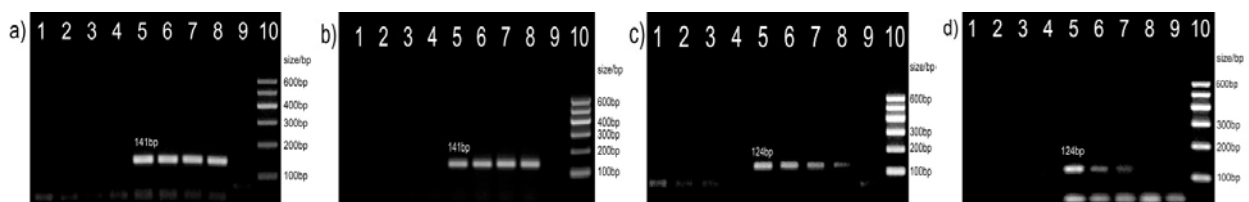
სინჯების დამუშავების ტემპერატურა: 100°C (a) და 121°C (b-d). ზემოქმედების ხანგრძლივობა: სინჯები 1, 5 = 0წთ, სინჯები 2, 6 = 60წთ, სინჯები 3, 7 = 180წთ, სინჯები 4, 8 = 300წთ. დნმ-ის ექსტრაქცია: CTAB მეთოდით (a-b), DNeasy ნაკრებით (c-d).

სინჯები: არამოდიფიცირებული სიმინდი (სინჯები 1-4, a- d), გმ სიმინდი Bt-176 (სინჯები 5-8, a-c), გმ სიმინდი MON810 (სინჯები - 5-8, d), წყალი (სინჯი 9, a-d), GelPilot 100bp მარკერი (Qiagen) (10, a-d).

მე-16 სურათზე წარმოდგენილია ტრანსგენური *CryA(b)* გენის 258bp ზომის ფრაგმენტის ამპლიფიკაციის შედეგები. სათანადო სიგრძის პჯრ-პროდუქტები გამოჩნდა მხოლოდ ტრანსგენური სიმინდის სინჯებში (სურ. 16. სინჯი 5-8), ხოლო არამოდიფიცირებულ სიმინდის სინჯებში ამპლიკონების არსებობა არ აღინიშნება (სურ. 16. სინჯი 1-4). ეს ყველაფერი კვლევაში გამოყენებული მეთოდის მაღალ სპეციფიურობაზე და სიზუსტეზე მიუთითებს. ნეგატიურ კონტროლშიც არ დაფიქსირებულა ამპლიკონების არსებობა (სურ. 16. სინჯი 9), რაც ექსპერიმენტში გამოყენებული რეაგენტების დაბინძურების ალბათობას გამორიცხავს. აღნიშნული პჯრ პროდუქტების აგაროზას გელზე ელექტროფორეზმა გვიჩვენა, რომ 100°C-ზე 300წთ-ით დამუშავება არ ახდენს გავლენას 258bp ფრაგმენტის ამპლიფიკაციაზე (სურ. 16. სინჯი 5-8), მაგრამ 121°C-ზე დამუშავებამ გამოიწვია ამპლიკონის რაოდენობის შემცირება ზემოქმედების დროის გაზრდის შესაბამისად (სურ. 16b, 16c და 16d, სინჯები 5-8), რაც გავლენას ახდენს გმო-ს დეტექციის სიზუსტეზე.

პჯრ-პროდუქტები არ დეტექტირდა 121°C-ზე 300წთ-ით დამუშავებულ ტრანსგენური სიმინდის ორივე ვარიაციის დნმ-ებში, რომლებიც ექსტრაგირებული იყო DNeasy ნაკრებით (სურ. 16c, 16d, სინჯი 8). ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ პროცესირებული სინჯებიდან CTAB მეთოდით გამოიყოფა უფრო მეტი ამპლიფიცირებადი დნმ, ვიდრე - DNeasy ნაკრებით. აღნიშნული შედეგი

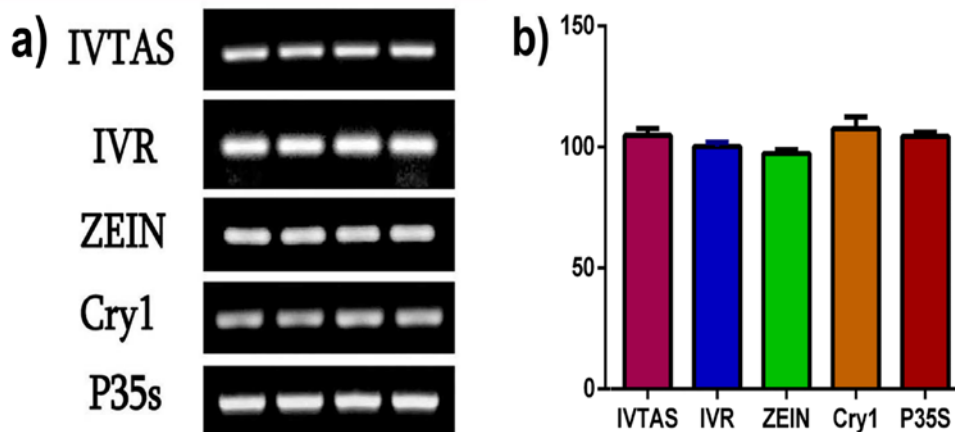
თანხვედრაში მოდის ზემოხსენებულ მონაცემებთან, სადაც ვსაუბრობდით, რომ CTAB მეთოდის გამოყენებისას მეტია დნმ-ის გამოსავლიანობა, DNeasy ნაკრებთან შედარებით (სურ. 12, 13). ამ შემთხვევაში, მნიშვნელოვანი განსხვავება არ გამოვლინდა ტრანსგენური სიმინდის BT-176 და MON810 ვარიაციების ურთიერთშედარებისას. შედეგებმა ნათლად გვიჩვენა ტემპერატურის, თერმული დამუშავების ხანგრძლივობის და დნმ-ის ექსტრაქციის მეთოდის მნიშვნელოვანი როლი პჯრ მეთოდით გმო-ს დეტექციისას.



სურათი 17. ეგზოგენური 141bp (a-b) და 124bp (c-d) ამპლიკონების პჯრ-ანალიზი
 121 °C ზემოქმედების ხანგრძლივობა: სინჯები 1, 5 = 0წთ, სინჯები 2, 6 = 60წთ, სინჯები 3, 7 = 180წთ, სინჯები 4, 8 = 300წთ. დნმ-ის ექსტრაქცია DNeasy ნაკრებით.
სინჯები: არამოდიფიცირებული სიმინდი (სინჯები 1-4, a- d), გმ სიმინდი Bt-176 (სინჯები 5-8, a, c), გმ სიმინდი MON810 (სინჯები - 5-8, b, d), წყალი (სინჯი 9, a-d), GelPilot 100bp მარკერი (Qiagen) (10, a-d).

მოკლე ტრანსგენური ამპლიკონების, როგორებიცაა ყვავილოვანი კომბოსტოს მოზაიკური ვირუსის CaMV 35S პრომოტორის 141bp ზომის ფრაგმენტი და *CryA(b)* გენის 124bp ზომის ფრაგმენტი, პჯრ-ანალიზით მივიღეთ შესაბამისი ზომის პჯრ პროდუქტები გმ სიმინდის სინჯებში (სურ. 17a-d, სინჯები 5-8). არამოდიფიცირებული სიმინდის სინჯებში პჯრ პროდუქტების არსებობა არ დასტურდება (სურ. 17a-d, სინჯები 1-4), რაც აღნიშნული პჯრ მეთოდის სიზუსტეს და მაღალ სპეციფიურობას გვიჩვენებს. ნეგატიურ კონტროლზე დაკვირვებამ აღნიშნული სინჯების დაბინძურების შესაძლებლობა გამორიცხა (სურ. 17a-d, სინჯი 9). 121°C-ზე 300წთ-ით დამუშავებამ არ მოახდინა გავლენა 141bp ფრაგმენტის ამპლიფიკაციაზე (სურ. 17a, b). მაშინ როდესაც, 124bp ამპლიკონის ინტენსივობა მცირდებოდა თერმული ზემოქმედების ხანგრძლივობის მატების შესაბამისად, გმ სიმინდის ორივე ვარიაციისთვის (Bt-176, MON810) (სურ. 17c, d). ამგვარად, დაფიქსირდა მოულოდნელი შედეგი, რაც გამოიხატა იმაში, რომ ზომით გრძელმა

141bp პჯრ ამპლიკონმა გამოავლინა მეტი თერმოსტაბილობა, 124bp ამპლიკონთან შედარებით (სურ. 17), რაც მიუთითებს ამპლიკონის სპეციფიურობის მნიშვნელობაზე. წყლის სინჯებში არ ჩანს ამპლიფიკაციის პროდუქტები (სურ. 14-17, სინჯი 9), რაც რეაქტივების დაბინძურების ალბათობას გამორიცხავს.



სურათი 18. პჯრ-ამპლიფიკაციის სტატისტიკური ანალიზი

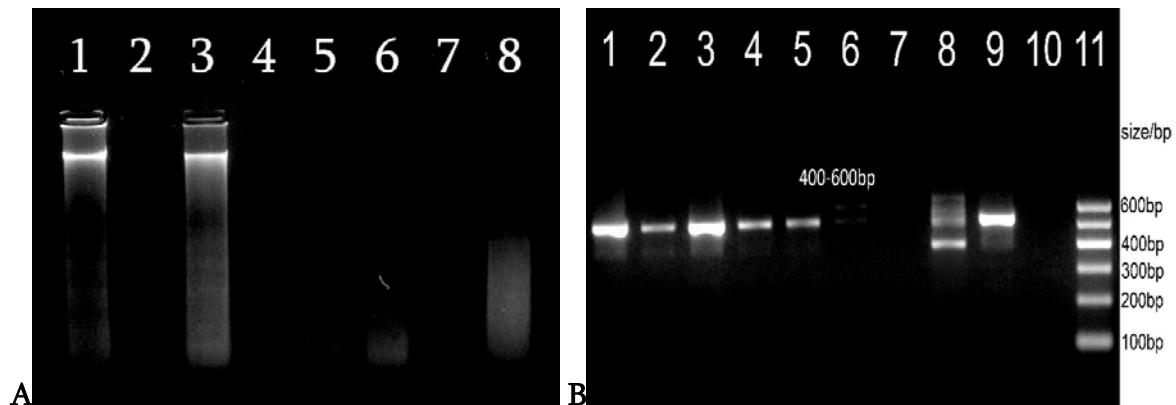
a) ოთხი დამოუკიდებელი პჯრ-ექსპერიმენტის ამპლიკონების აგაროზას გელები;
b) შედეგები გამოსახულია როგორც საშუალო სიდიდეს პლუს სტანდარტული გადახრა, სტანდარტული ცდომილების (SEM) შეფასება, როდესაც $P < 0.05$.
ამპლიკონები:: IVTAS=226bp, IVR=140bp, ZEIN=102bp, Cry1=258bp და P35S=141bp

ამასთანავე, ჩატარდა 4 ერთმანეთისგან დამოუკიდებელი პჯრ ექსპერიმენტი თითოეული პჯრ ამპლიკონისთვის, სტატისტიკური შეფასების მიზნით. თითოეული ამპლიკონის პჯრ პროდუქტები ერთმანეთის გვერდიგვერდ იქნა გაშვებული აგაროზას გელზე, ურთიერთშედარების მიზნით (სურ. 18a). სხვადასხვა პჯრ-ექსპერიმენტის შედეგები შევადარეთ ერთმანეთს. შედეგები გამოსახულია საშუალო მაჩვენებლის სახით, ასევე ნაჩვენებია სტანდარტული გადახრაც (სურ. 18 b). სტატისტიკური ანალიზით დასტურდება ჩატარებული პჯრ-ექსპერიმენტების ვალიდურობა.

2.4. სასურსათო პროდუქტების პჯრ-ანალიზი

2.4.1. სიმინდის პროდუქტების კვლევა პჯრ მეთოდებით

იმისთვის, რომ გამოგვეკვლია, რამდენად ეფექტური იქნებოდა ზემოთხსენებული პჯრ-მეთოდების გამოყენება საკვების ანალიზისთვის, გამოვიკვლიეთ სხვადასხვა სახის საკვები პროდუქტები. კერძოდ, სიმინდის ფქვილები 1 და 2 შეიცავდა მხოლოდ სიმინდის მასალას და გავლილი ჰქონდა მექანიკური დამუშავება დაფქვის პროცესში. მარინადის, სიმინდის ბურბუშელას და ბატი-ბუტის მთავარი ინგრედიენტია სიმინდი, რამაც განიცადა მექანიკური და თერმული დამუშავება. მარცვლეულის გრანულები და საბავშვო ფაფა შეიცავდა სიმინდის მასალას დაბალი პროცენტული შემადგენლობით (1.7% და 6.3%). აღსანიშნავია, რომ საბავშვო ფაფა განიცდის მექანიკურ ზემოქმედებას წარმოების პროცესში, მაშინ როდესაც მარცვლეულის მშრალი ბურთულები გარდა მექანიკური ზემოქმედებისა, განიცდის თერმულ დამუშავებასაც.

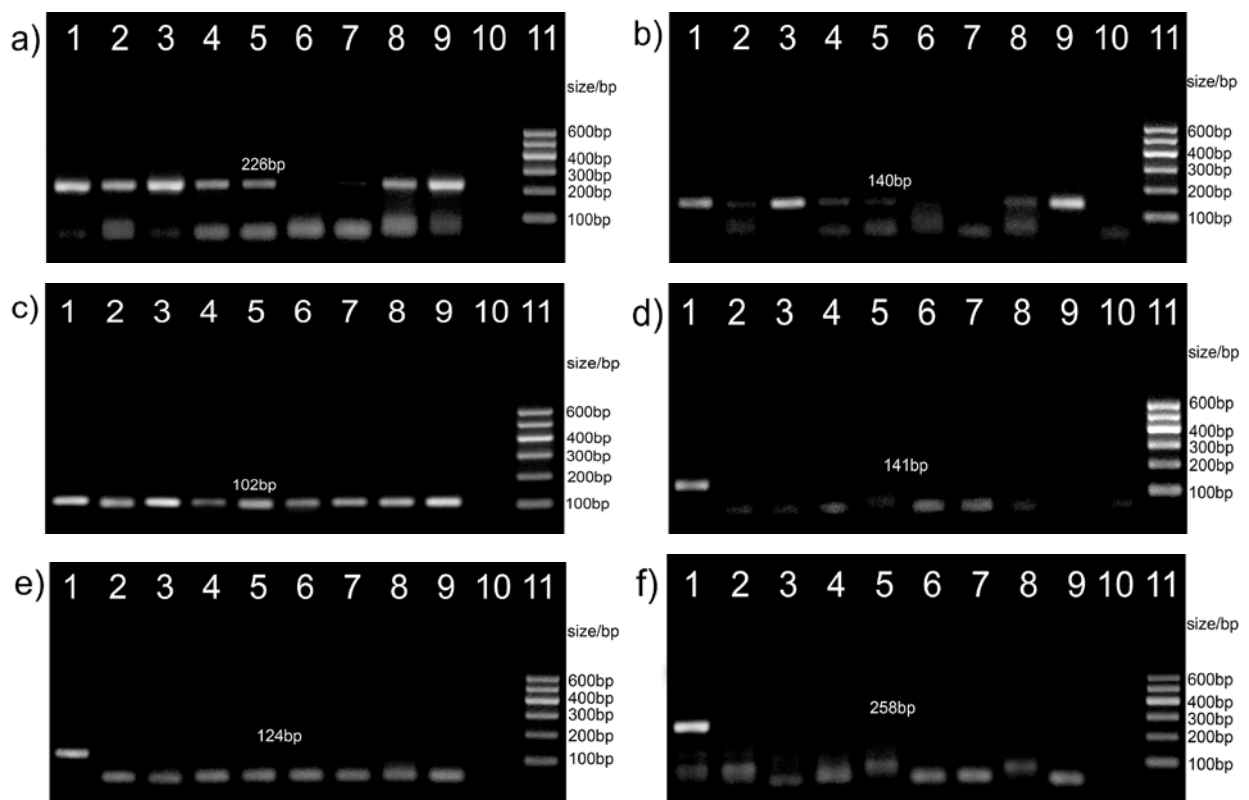


სურათი 19. სიმინდის პროდუქტების გენომური დნმ-ები (A) და მცენარის სპეციფიური პჯრ (B).

სინჯები: 1. გმ სიმინდი MON810 (2%), 2. მარინადი, 3. სიმინდის ფქვილი, 4 - ბურბუშელა 1, 5 - ბურბუშელა 2, 6. მარცვლეულის გრანულები, 7 - ბატიბუტი, 8 - საბავშვო ფაფა, 9. სიმინდის მარცვალი, 10. წყალი, 11. GelPilot 100bp მარკერი (Qiagen)

დნმ-ის რაოდენობრივი შეფასება და დეგრადაციის ხარისხის განსაზღვრა მოხდა აგაროზას გელზე ელექტროფორეზის საშუალებით (სურ. 19 A). მიღებულმა შედეგებმა გვიჩვენა, რომ სიმინდის ფქვილის და MON810 სიმინდის სტანდარტული

ფქვილის ექსტრაქტები შეიცავს დიდი რაოდენობით ინტაქტურ გენომურ დნმ-ს, ხოლო სხვა პროდუქტებიდან ექსტრაგირებული დნმ ძლიერადაა დეგრადირებული (სურ. 19 A). აღნიშნული სურსათის დნმ-ების პჯრ-ამპლიფიკაცია ჩავატარეთ მცენარესპეციფიური პრაიმერების წყვილით plant1/plant2, რომელიც იძლევა 550bp პროდუქტს. ძლიერი ინტენსივობის სიგნალი მოგვცა MON810 სიმინდის, სიმინდის ფქვილის და სიმინდის მარცვლების პჯრ პროდუქტებმა (სურ. 19B, სინჯები 1,3,9) საშუალო ინტენსივობის სიგნალი მოგვცა სიმინდის მარინადის, ბურბუმელა 1-ის, ბურბუმელა 2-ის და საბავშვო ფაფის პჯრ პროდუქტებმა (სურ. 19 B, სინჯები 2,4,5,8). მარცვლეულის გრანულების პჯრ პროდუქტი ძალიან სუსტ სიგნალს იძლევა (სურ. 19, სინჯი 6), ხოლო ბატიბუტის სინჯის პჯრ პროდუქტის დეტექცია ვერ მოხერხდა (სურ. 19, სინჯი 7).



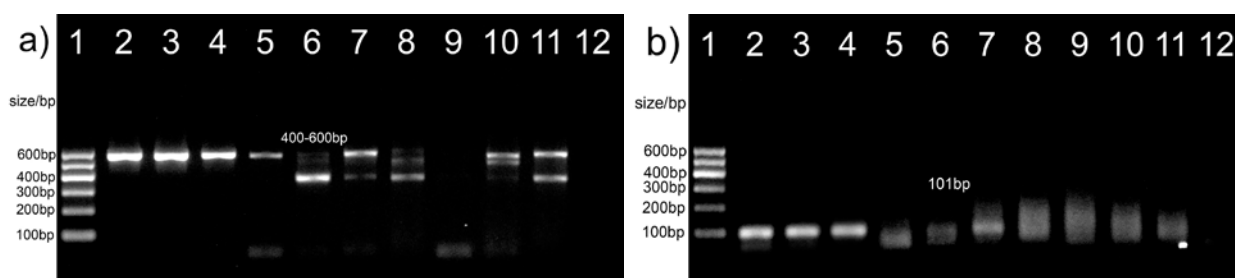
სურათი 20. საკვები პროდუქტების პჯრ-ანალიზი

სინჯები: 1. გმ სიმინდი MON810 (2%), 2. მარინადი, 3. სიმინდის ფქვილი, 4. ბურბუმელა 1, 5. ბურბუმელა 2, 6. მარცვლეულის გრანულები, 7 - ბატიბუტი, 8 - საბავშვო ფაფა, 9. სიმინდის მარცვალი, 10. წყალი, 11. GelPilot 100bp მარკერი (Qiagen). სიმინდის სპეციფიური ამპლიკონები ზომებით: (a) 226bp, (b) 140bp და (c) 102bp. გმო-სპეციფიური ამპლიკონები ზომებით: (d) 141bp, (e) 124bp და (f) 258bp.

საკვებ პროდუქტებში ენდოგენური (სიმინდის სპეციფიური) და ეგზოგენური (ტრანსგენური) ამპლიკონების დეგრადაცია შევისწავლეთ პჯრ-ანალიზით, შესაბამისი პრაიმერების გამოყენებით (სურ. 20). სიმინდის ინვერტაზის გენის 226bp და 140bp ზომის ფრაგმენტების ამპლიფიცირებისას, ყველა სინჯში მივიღეთ მოსალოდნელი სიგრძის ამპლიკონი, გარდა მარცვლეულის გრანულებისა და ბატიბუტისა (სურ. 20a, 20b. სინჯი 6-7). რაც შეეხება ზეინის გენის 102bp ზომის ამპლიკონს, მისი ამპლიფიცირება მოხდა ყველა საკვებ პროდუქტში (სურ. 20c). წყლის სინჯში არ დაფიქსირებულა ამპლიკონის არსებობა, რაც პჯრ-ში გამოყენებული კომპონენტების დაბინძურების ალბათობას გამორიცხავს (სურ. 20a-20f, სინჯი 10).

მიღებული შედეგებით გამოვლინდა, რომ შესწავლილი საკვები პროდუქტები შეიცავს სხვადასხვა რაოდენობის სიმინდის ინგრედიენტს. სიმინდის დეტექცია დამოკიდებულია სამ ფაქტორზე: პროდუქტში სიმინდის ინგრედიენტის შემცველობაზე, პროდუქტის პროცესირების დონეზე და დნმ-მარკერზე. სიმინდის სპეციფიური პჯრ-ებით, MON810 გმ სიმინდის სტანდარტში, სიმინდის მარცვლებში და ფქვილში გამოჩნდა ყველაზე ძლიერი ინტენსივობის მქონე ამპლიფიცირებული პროდუქტი. მარინადში, სიმინდის ბუბუშელასა და საბავშვო ფაფაში გამოვლინდა მსგავსი ინტენსივობის ამპლიკონები. მარცვლეული გრანულები და ბატი-ბუტი განიცდიან უფრო ძლიერ დამუშავებას, ვიდრე სხვა პროდუქტები, რამაც შეუძლებელი გახადა მათი 226bp და 140bp ამპლიკონების სინთეზი. ზეინის გენის 102bp ამპლიკონი აღმოჩნდა ყველაზე ეფექტური მარკერი პროცესირებულ საკვებში სიმინდის დეტექციისათვის. მიღებული მონაცემები აჩვენებს, რომ შესაბამისი დნმ-მარკერის არჩევა ძალიან მნიშვნელოვანია საკვების ზუსტი ანალიზისთვის. გმოსპეციფიკური პრაიმერებით ჩატარებულმა პჯრ-ანალიზებმა არ მოგვცა დადებითი შედეგი არც ერთი პროდუქტის სინჯში. ეს მიუთითებს, რომ ეს პროდუქტები არ შეიცავს გმ ინგრედიენტებს (სურ. 20, d-f).

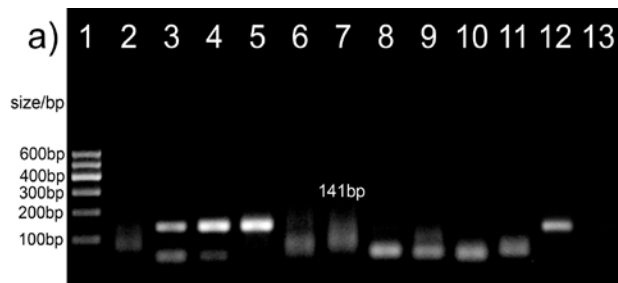
22-ე სურათზე წარმოდგენილია სასურსათო პროდუქტების პჯრ-ანალიზი. მცენარის სპეციფიური პჯრ ჩატარდა Plant1/plant2 პრაიმერებით, რომელიც იძლევა დაახლოებით 400-600bp ზომის პჯრ-პროდუქტს. ზუსტი ზომა დამოკიდებულია მცენარის სახეობაზე [Kutateladze et al., 2013] (სურ. 22a). სოიას ლექტინის გენის სპეციფიური პჯრ ჩატარდა LECTf/LECTr პრაიმერებით, რომელიც წარმოქმნის 101bp ამპლიკონს (სურ. 22b). ორივე პჯრ-ის პროდუქტების აგაროზას გელზე ელექტროფორეზით აშკარად გამოვლინდა მოსალოდნელი ზომის მაღალი ინტენსივობის ამპლიკონების არსებობა სამ სინჯში, როგორიცაა სოიას მარცვლები, RRS სოია და სოიას ფარში, რაც მიუთითებს, რომ ეს სინჯები შეიცავს დიდი რაოდენობით სოიას დნმ-ს (სურ.22 (a, b) სინჯები 2,3,4). მცენარის სპეციფიური პჯრ-ით იგივე ზომის სუსტი ინტენსივობის ამპლიკონები აღმოჩნდა რამდენიმე სინჯში: ჩიპსი ბეკონით, ძეხვი I, ძეხვი IV და სარდელი (სურ.22 a, სინჯები 5, 7, 10, 11), რაც მიუთითებს ამ სინჯებში სოიას მცირე ინგრედიენტების შესაძლო შემცველობაზე, თუმცა სოიას სპეციფიური პჯრ-ის სურათზე ეს დადასტურდა მხოლოდ ძეხვი I-თვის (სურ. 22 b, სინჯი 7). არც ერთ სხვა სინჯში სოიას სპეციფიური პრაიმერით სოიას შეცველობა არ გამოვლინდა (სურ. 22 b, სინჯები 5, 8-11). აღსანიშნავია, რომ მცენარის სპეციფიური პჯრ-ით წარმოიქმნა დაახლოებით 400bp ზომის ამპლიკონი სამ სინჯში: 6 - ხორცის კატლეტი 8 - ძეხვი II და სარდელი (სურ. 22 a, სინჯები 6, 8, 11), რაც მიაანიშნებს ამ სინჯებში მცენარის სხვა სახეობის ინგრედიენტის არსებობას. ძეხვი III-ში მცენარეული ინგრედიენტის არსებობა არ გამოვლინდა (სურ. 22 a, სინჯი 9).



სურათი 22. პროდუქტების პჯრ ანალიზი პრაიმერებით: plant1/plant2 (a) და LECTf/LECTr (b)

1 - GelPilot 100bp მარკერი (Qiagen), სინჯები: 2-სოიას მარცვლები, 3 – RRS 10%, 4 – სოიას ფარში, 5 - ჩიპსი ბეკონით, 6 - ხორცის კატლეტი, 7 - ძეხვი I, 8 - ძეხვი II, 9 - ძეხვი III, 10 - ძეხვი IV, 11 - სარდელი, 12. წყალი.

კვლევის შემდგომ ეტაპზე სოიას პროდუქტებში გმო-ს დეტექტირებისთვის გამოვიყენეთ გმო სპეციფიური პჯრ CAMV 35S პრომოტორის შესაბამისი პრაიმერები P35Sf და P35Sr, რომლებიც წარმოქმნიან 141bp ამპლიკონს.



სურათი 23. პროდუქტების პჯრ ანალიზი გმო-სპეციფიური პრაიმერებით: P35Sf/P35Sr

1 - GelPilot 100bp მარკერი (Qiagen), სინჯები: 2- სოიას მარცვლები, 3 – RRS 0.5%, 4 - RRS 10%, 5 – სოიას ფარში, 6 - ჩიპსი ბეკონით, 7 - ხორცის კატლეტი, 8 - ძეხვი I, 9 - ძეხვი II, 10 - ძეხვი III, 11 - ძეხვი IV, 12 - სარდელი, 13. წყალი.

მიღებულმა შედეგებმა გვიჩვენა, რომ გმო სოიას სტანდარტებში (0.5% RRS და 10% RRS) გამოვლინდა სათანადო სიგრძის (141bp) პჯრ-პროდუქტი, თანაც 10% RRS-ის ამპლიკონის ინტენსივობა ბევრად ძლიერია, ვიდრე 0.5% RRS-ის (სურ. 23, სინჯები 3,4). ამასთან, წყლის სინჯში ამპლიფიკაციის პროდუქტი არ ჩანს. მიღებული მონაცემები აჩვენებს აღნიშნული მეთოდის სიზუსტესა და მაღალ მგრძნობელობას (სულ მცირე 0.5%). სასურსათო პროდუქტების ანალიზის დროს გამოვლინდა სათანადო პჯრ-პროდუქტი ორ სინჯში: სოიას ფარში და სარდელში (სურ.23, სინჯები 5,12), თანაც, ფარშის ამპლიკონის ინტენსივობა უფრო ძლიერია, ვიდრე 10% RRS-ის, ხოლო სარდელის ამპლიკონის ინტენსივობა დაახლოებით 0.5% RRS-ის მსგავსია. მიღებული შედეგები მიანიშნებს ფარშში და სარდელში გმო ინგრედიენტის არსებობაზე, ხოლო სხვა პროდუქტებში გმო-ს შეცველობა არ გამოვლინდა.

შედეგების განხილვა

ტექნოლოგიურმა პროცესირებამ, განსაკუთრებით ძლიერი ზემოქმედების დროს, შეიძლება დააზიანოს საკვების მოლეკულების მთლიანობა და გავლენა მოახდინოს საკვების მოლეკულურ დიაგნოსტიკაზე და ავთენტურობის დადგენაზე. დნმ-ზე დაფუძნებული პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (პჯრ) ყველაზე ეფექტური მეთოდია საკვების ანალიზისთვის, ვინაიდან დნმ ყველაზე სტაბილური მოლეკულაა საკვების პროცესირებისას [Marmiroli et al., 2008; Michelini et al., 2008]. მიუხედავად ამისა, საკვების პროცესირებამ შეიძლება გამოიწვიოს დნმ-ის დეგრადაცია და მოახდინოს გავლენა დნმ-ზე დაფუძნებულ საკვების ანალიზზე [Bergerova et al., 2010; Gryson, 2010]. აქედან გამომდინარე, განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია დნმ-ის დეგრადაციის კვლევები პროცესირებული საკვების მატრიქსებში. განსაკუთრებული ყურადღება ექცევა მცენარეული დნმ-ის კვლევას, ვინაიდან მცენარეებისგან მიღებული პროდუქტები ადამიანისა და ცხოველის საკვების მნიშვნელოვანი ნაწილია.

ხორბალი, სიმინდი და სოია ფართოდ გამოიყენება მსოფლიოში სასურსათო პროდუქტებისა და ცხოველის საკვების წარმოებაში. პროცესირებული საკვები პროდუქტები, მათ შორის პურ-ფუნთუშეული, რძისა და ხორცის პროდუქტები, სწრაფი კვების პროდუქტები ხშირად შეიცავს ხორბლის, სიმინდისა და სოიას ინგრედიენტებსა თუ დანამატებს. მათი გამოყენება შეიძლება მავნე იყოს ჯანმრთელობისთვის, ვინაიდან ეს სახეობები მიეკუთვნებიან მნიშვნელოვან ალერგენებს [Stevens et al., 2011]. გარდა ამისა, სოია და სიმინდი ყველაზე გავრცელებული გენმოდიფიცირებული მცენარეებია, ხოლო ხორბლის მოდიფიკაციაზე მიმდინარეობს ინტენსიური კვლევები. არსებული მონაცემებით, გმ საკვების გამოყენება სარისკოა ჯანმრთელობისთვის [Bernstein et al., 2003; Dougherty, et al 2006, Zhang, C, et al. 2016]. აღსანიშნავია, რომ ხორბალი და სიმინდი განსაკუთრებით აქტუალური კულტურებია საქართველოსთვის. აქედან გამომდინარე, საკვების უვნებლობის დაცვისთვის, ავთენტურობისა და მიკვლევადობისთვის დიდი მოთხოვნილებაა მცენარეთა ამ სახეობების ზუსტი იდენტიფიკაციაზე.

დღეისთვის შემუშავებულია ხორბლის, სიმინდისა და სოიას სახეობებისა და გენეტიკურად მოდიფიცირებული ხაზების დეტექციის მოლეკულური მეთოდები [Dong et al, 2008, Anklam et al, 2002, Kutateladze et al., 2013, Datukishvili et al., 2015]. განსაკუთრებულ ინტერესს იწვევს პროცესირებულ პროდუქტებში არსებული ინგრედიენტების ზუსტი იდენტიფიკაცია. ამ სფეროში ჯერ კიდევ ბევრი ხარვეზია. დადგენილია, რომ საკვების პროცესირება გავლენას ახდენს მის დნმ-ზე და ართულებს მისი ინგრედიენტების ზუსტ დეტექციას დნმ-ზე დაფუძნებული მეთოდებით.

წარმოდგენილ კვლევაში ჩვენ შევისწავლეთ არამოდიფიცირებული ხორბლის, სიმინდისა და სოიას, აგრეთვე გენმოდიფიცირებული სიმინდის დნმ-ების სტაბილურობა და ამპლიფიციურობა ტექნოლოგიური დამუშავების სხვადასხვა პირობებში. ჩვენი შედეგები იძლევა ღირებულ ინფორმაციას ამ სახეობების ზუსტი დეტექციისთვის პროცესირებულ პროდუქტებში.

ამპლიკონების მისაღებად გამოყენებულ იქნა სტანდარტული პჯრ, ვინაიდან ის წარმოადგენს სწრაფ და ხელმისაწვდომ ტექნიკას დნმ-ის ამპლიფიკაციისთვის. ამასთან, ადრე იგი წარმატებით გამოიყენეს მსგავს კვლევებში [Hupfer et al., 1998; Bauer et al., 2003; Vijayakumar et al., 2009]. პჯრ-პროდუქტების ელექტროფორეზის გელების ურთიერთშედარებით შესაძლებელია ნახევრად რაოდენობრივი შეფასება.

კვლევაში გამოყენებულ იქნა საკვების პროცესირების ორი ფართოდ გავრცელებული ფორმა, როგორცაა თერმული ზემოქმედება და დაბალ pH-ზე დამუშავება. თერმული დამუშავება განხორციელდა ორი განსხვავებული მეთოდით ორ სხვადასხვა ტემპერატურაზე: (1) მარცვლების დამუშავება 100°C-ზე მდულარე წყალში; (2) ფქვილების დამუშავება მშრალ თერმოსტატში 100°C-ზე და 121°C-ზე.

თავი 1. ხორბლის, სიმინდისა და სოიას მარცვლებზე თერმულ-მჟავური ზემოქმედების ეფექტი დნმ-ის დეგრადაციასა და ამპლიფიკაციაზე

თერმული და მჟავე დამუშავება ფართოდ გამოიყენება საკვების პროცესირებისა და შენახვის დროს. ასეთ დამუშავებას იყენებენ პათოგენური მიკროორგანიზმების

მოშორებისთვის, ვარგისიანობის ვადის გახანგრძლივებისთვის, აგრეთვე სასურველი მახასიათებლების, გემოსა და სუნის მიცემისთვის.

ჩვენი კვლევის პირველ სერიაში შევისწავლეთ ხორბლის, სიმინდისა და სოიას გენომური დნმ-ების სტაბილურობა და ამპლიფიციურობა, მათი მარცვლების დამუშავებისას მდულარე წყალში 100°C, pH 6.5-ზე, აგრეთვე 100°C, pH (2 და 4)-ზე ზემოქმედების სხვადასხვა დროის განმავლობაში.

მიღებული შედეგები აშკარად მიუთითებს სამივე სახეობის გენომური დნმ-ის დროზე დამოკიდებულ დეგრადაციაზე, როგორც თერმული დამუშავებისას 100°C-ზე, ასევე, თერმულ-მჟავური 100°C-ზე, pH (2 და 4)-ზე კომბინირებული ზემოქმედების დროს. კვლევის შედეგად გამოვლინდა, რომ ექსტრაგირებული მცენარეული გენომური დნმ-ის სიგრძე მცირდება დამუშავების დროის შესაბამისად, ამასთან მჟავიანობის გაზრდამ pH 4-დან pH 2-მდე გამოიწვია დეგრადაციის გაძლიერება. აშკარაა, რომ პროცესირების დროის შესაბამისად მოკლე ფრაგმენტების რაოდენობის გაზრდა გამოწვეულია მაღალმოლეკულური გენომური დნმ-ის დეგრადაციით. აღსანიშნავია, რომ დეგრადაციის ხარისხი დამოკიდებულია მცენარის სახეობაზე. ჩვენი კვლევის მონაცემები მიუთითებს, რომ სოიას დნმ უფრო მეტად თერმოსტაბილურია, ვიდრე ხორბლისა და სიმინდის დნმ. ჩვენს მიერ მიღებული შედეგები ადასტურებს სხვა ავტორების მიერ ადრე მიღებულ მონაცემებს [Bauer et al., 2003; Bergerova et al., 2011; Hupfer et al., 1998; Godalova et al., 2013], რომ მაღალ ტემპერატურასა და დაბალ pH-ზე ერთობლივი დამუშავება ძლიერ გავლენას ახდენს გენომური დნმ-ის მთლიანობაზე. ნაჩვენები იყო, რომ მაღალმა ტემპერატურამ (100°C, 200°C) მნიშვნელოვნად შეამცირა სიმინდის, სოიასა და ბარდას გენომური დნმ-ის ზომა, ზემოქმედების დროის გაზრდის შესაბამისად.

დნმ-ების დეგრადაციის კინეტიკა შემოწმდა სხვადასხვა ზომის პჯრ-ამპლიკონების დეგრადაციის შეფასებით. იმის შესასწავლად, თუ როგორ მოქმედებს დნმ-ების დეგრადაცია მათ პჯრ-ამპლიფიკაციაზე, გამოყენებულ იქნა როგორც მცენარის სპეციფიური პჯრ, ასევე სახეობის სპეციფიური პჯრ-სისტემები. მცენარის სპეციფიური პჯრ-ით ამპლიფიცირდა ქლოროპლასტური გენომის კონსერვატიული უბნის დაახლოებით 500-600bp პროდუქტი მცენარის სახეობის მიხედვით [Taberlet et al., 1991]. იმის გათვალისწინებით, რომ არსებული მონაცემების მიხედვით, მოკლე

ამპლიკონები ეფექტურია პროცესირებული პროდუქტების ანალიზისთვის [Bergerová et al., 2010; Ballari et al., 2013, Hrnčířová et al., 2008, Kutateladze], ჩვენი კვლევისთვის შერჩეულ იქნა სახეობის სპეციფიური ამპლიკონები 67–259bp ზომის შუალედში. ეს ამპლიკონებია: სიმინდის ზეინის გენის 102bp, ინვერტაზის გენის 226bp და 140bp ფრაგმენტები; ხორბლის კარბოქსილაზას გენის 134bp, გლუტენინის გენის 67bp და 259bp ფრაგმენტები; სოიას ლექტინის გენის 118bp და 101bp ფრაგმენტები.

მცენარის სამივე სახეობის გრძელი ამპლიკონების (226bp–550bp) ანალიზმა აჩვენა დროზე დამოკიდებული მნიშვნელოვანი დეგრადაცია, როგორც თერმული დამუშავებისას 100°C-ზე, ასევე თერმულ-მჟავური 100°C, pH (2 და 4)-ზე კომბინირებული ზემოქმედების დროს. ამასთან, მჟავიანობის გაზრდისას, ამპლიკონები უფრო სწრაფად დეგრადირდა და მნიშვნელოვნად შემცირდა მათი ამპლიფიკაცია. აღმოჩნდა, რომ სოიას გენომის ეს ფრაგმენტები უფრო თერმოსტაბილურია, ვიდრე ხორბლისა და სიმინდის გენომების შესაბამისი ფრაგმენტები, რაც შეესაბამება სოიას გენომური დნმ-ის ძლიერ სტაბილურობას, რაც ზემოთ იყო აღნიშნული. ამასთან, მცენარის ამ სამი სახეობიდან, სიმინდის დნმ-ის ფრაგმენტები ყველაზე ნაკლებად სტაბილური აღმოჩნდა. მოკლე ამპლიკონების (67bp-140bp) კვლევამ აჩვენა მათი თითქმის უცვლელი ამპლიფიციურობა როგორც თერმული დამუშავებისას 100°C-ზე, ასევე თერმულ-მჟავური 100°C, pH (2 და 4)-ზე კომბინირებული ზემოქმედებისას, გარდა 134bp ამპლიკონისა 100°C, pH 2-ზე დამუშავებისას განიცადა დროზე დამოკიდებული დეგრადაცია. დღემდე ძალზე მწირი მონაცემები იყო ხორბლის დნმ-ის თერმოსტაბილურობის შესახებ [Masataka et al., 2004], ჩვენმა კვლევამ ეს ხარვეზი შეავსო.

მიღებული შედეგებით დასტურდება, რომ პჯრ-მეთოდები, რომლებიც მიმართულია დნმ-ის მცირე ზომის მონაკვეთების ამპლიფიცირებაზე, გამოსადეგია მცენარეული ინგრედიენტების დეტექციისთვის ძლიერად პროცესირებულ პროდუქტებში. ეს ამპლიკონებია: ხორბლის გლუტენინის გენის 67bp და 134bp ამპლიკონები, სიმინდის ზეინის გენის 102bp და ინვერტაზის გენის 140bp ამპლიკონები და სოიას ლექტინის გენის 118bp და 101bp ამპლიკონები. წარმოდგენილი კვლევის მონაცემები ექსპერიმენტულად დამუშავებულ სინჯებზე შეესაბამება ჩვენს მიერ ადრე მიღებულ შედეგებს. აღნიშნული პჯრ-სისტემების

ვარგისიანობაზე კომერციული პროცესირებული პროდუქტების ანალიზისთვის [Kutateladze et al., 2013, Gabriadze et al., 2014].

ჩვენი შედეგები დაემთხვა სხვა მკვლევრების მიერ მიღებულ შედეგებს, საკვების პროცესირებისას გრძელი პჯრ-პროდუქტების შემცირებული ამპლიფიკაციისა და მცირე ზომის ფრაგმენტების უცვლელი ამპლიფიციურობის შესახებ. კერძოდ, სიმინდის ინვერტაზას გენის 1339bp ზომის ფრაგმენტის ამპლიფიკაცია ვერ მოხერხდა მდულარე წყალში 15წთ-ის განმავლობაში დამუშავებული სიმინდის კვლევისას [Hrnčířová et al., 2008]. 100°C-ზე 30წთ-ის და 60წთ-ის განმავლობაში დამუშავებული ტრანსგენური სიმინდის 356bp ზომის ფრაგმენტის რაოდენობა შემცირდა, ხოლო სიმინდის ზეინის გენის 84bp ზომის ფრაგმენტის ამპლიფიკაცია არ შეიცვალა [Ballari et al., 2013]. სიმინდის ზეინის გენის 100bp-დან 200bp-მდე ზომის ფრაგმენტების ამპლიფიკაცია ხდებოდა 100°C-ზე და 220°C-ზე, 60წთ-ის განმავლობაში დამუშავებულ სიმინდის ფქვილში [Bergerová et al., 2010]. ტრანსგენური სიმინდის *CryIA(b)* გენის 211bp ფრაგმენტი ამპლიფიცირდა 100°C-ზე 105წთ-ით დამუშავებულ სინჯში [Hupfer et al., 1998]. განსხვავებული შედეგი დაფიქსირდა მასატაკას და თანამშრომლების მიერ, მათ აღმოაჩინეს 18S რიბოსომული რნმ-ის გენის 1794bp პჯრ-ფრაგმენტი 100°C-ზე 60წთ-ით ხორბლის დამუშავების შემდეგ [Masataka et al., 2004]. ეს შედეგი შეიძლება აიხსნას გენომში რიბოსომული რნმ-ის გენის მრავალი ასლის არსებობით.

ამგვარად, ჩვენი კვლევის შედეგები ადასტურებს პჯრ-ამპლიკონის სიგრძის განსაკუთრებულ მნიშვნელობას საკვების კომპონენტების დეტექციისთვის და ჩვენი ვარაუდით 140bp-მდე სიგრძის ამპლიკონები გამოსადეგია ძლიერად პროცესირებული პროდუქტების ანალიზისთვის. ჩვენი შედეგი შეესაბამება ადრე გამოქვეყნებულ მონაცემებს [Bergerova et al., 2011; Hrnčířová et al., 2008; Vijayakumar et al., 2009]. კერძოდ, ვიჯაიაკუმარმა და თანაავტორებმა აღმოაჩინეს, რომ 200bp-მდე სიგრძის ამპლიკონებით შესაძლებელია გმო-ების წარმატებული დეტექცია პროცესირებულ საკვებში [Vijayakumar et al., 2009]. ჰრნციროვამ და სხვებმა დაასკვნეს, რომ პროცესირებული საკვების პჯრ-ანალიზისთვის ამპლიკონების სიგრძე უნდა იყოს დაახლოებით 200bp [Hrnčířová et al., 2008]. ბერგეროვამ და სხვებმა

აჩვენეს, რომ ძლიერ პროცესირებულ მატრიქსებში ამპლიკონების მაქსიმალური სიგრძეა 300bp [Bergerova et al., 2011].

წარმოდგენილი კვლევის შედეგებით გამოვლინდა, რომ თერმული და დაბალ pH-ზე დამუშავება იწვევს მცენარეული დნმ-ის დეგრადაციას და შეიძლება გავლენა მოახდინოს პჯრ-ამპლიფიკაციაზე. დნმ-ის დეგრადაციის ხარისხი დამოკიდებულია ტემპერატურაზე, pH-ის მაჩვენებელზე და პროცესირების ხანგრძლივობაზე. თერმული დამუშავებისას გენომური დნმ-ის დეგრადაცია გაძლიერდა კომბინირებული თერმულ-მჟავური ზემოქმედებისას. ამპლიფიცირებადი დნმ-ის მონაკვეთების რაოდენობის შემცირების მაჩვენებელი შეესაბამებოდა გენომური დნმ-ის ფრაგმენტაციის ხარისხს, მასზე ზემოქმედების ხანგრძლივობის მატების შესაბამისად. ამპლიფიკაციის ეფექტურობისთვის კრიტიკული მნიშვნელობა აქვს პჯრ-ამპლიკონის სიგრძეს. დიდი ზომის ამპლიკონების ამპლიფიკაციურობის კლების მაჩვენებელი შეესაბამებოდა დნმ-ის დეგრადაციის ხარისხის მატებას. 140bp-მდე სიგრძის მოკლე ამპლიკონებმა შეინარჩუნა ამპლიფიციურობა ძლიერად პროცესირებულ სინჯებშიც, ამიტომ ისინი შეიძლება გამოყენებულ იქნეს ხორბლის, სიმინდისა და სოიას ზუსტი დეტექციისთვის ძლიერად გადამუშავებულ სასურსათო პროდუქტებშიც.

თავი 2. არამოდულირებული და ტრანსგენური სიმინდის ფქვილებზე თერმული ზემოქმედების გავლენა დნმ-ის დეგრადაციასა და პჯრ-ზე დაფუძნებულ დეტექციაზე

იმისთვის, რომ შეგვესწავლა საკვების მატრიქსისა და თერმული პროცესირების მეთოდის მნიშვნელობა, წინა ექსპერიმენტებისგან განსხვავებით, კვლევის ამ ეტაპზე მოხდა ფქვილების მშრალად თერმული დამუშავება. შევისწავლეთ არამოდულირებული და ტრანსგენური სიმინდის დნმ-ის დეგრადაცია და პჯრ-ამპლიფიციურობა თერმული დამუშავებისას 100°C-ზე და 121°C-ზე 300წთ-ის განმავლობაში. გამოკვლეულ იქნა რამდენიმე მნიშვნელოვანი ფაქტორი, როგორიცაა თერმული დამუშავების ტემპერატურა და ზემოქმედების ხანგრძლივობა, დნმ-ის ექსტრაქციის მეთოდები, არამოდულირებული და ტრანსგენური სიმინდის ხაზები,

ენდოგენური და ეგზოგენური პჯრ-პრაიმერები. მათი როლის დასადგენად გამოვიკვლიეთ ამ ფაქტორების სხვადასხვა კომბინაციების ზემოქმედება გმო-ს დეტექციაზე. ეს გმ კულტურები და მათზე ზემოქმედების ფაქტორები აქამდე არასდროს იყო შესწავლილი მსგავსი პროცესირების პირობებში. შემუშავდა ახალი პჯრ-მეთოდი ტრანსგენური *Cry1A(b)* გენის მიმართ, მწერების მიმართ რეზისტენტული გმ კულტურების დეტექციისთვის.

კვლევები ჩატარდა ორ, ფართოდ გავრცელებულ ტრანსგენური სიმინდის ვარიაციაზე, როგორიცაა მწერების მიმართ რეზისტენტული Bt სიმინდის ხაზები Bt-176 და MON810. ისინი ნებადართულია სასურსათო და საფურაჟე პროდუქტებად რამდენიმე ქვეყანაში, მათ შორის ევროკავშირში. უფრო მეტიც, MON810 ერთადერთი ტრანსგენური ვარიაციაა, რომელიც იზრდება ევროპულ ქვეყნებში. თითოეულ ექსპერიმენტში, გმ სიმინდის ვარიაციების დნმ შევადარეთ არამოდიფიცირებული სიმინდის დნმ-თან.

დნმ-ის დეგრადაციის ხარისხის შესაფასებლად შევისწავლეთ სხვადასხვა სიგრძისა და ლოკაციის ამპლიკონები. გმო-ს რაოდენობრივი ანალიზისთვის საჭიროა ენდოგენური და ეგზოგენური სამიზნეების ზუსტი დეტექცია. შესაბამისად, საკვების პროცესირებისას მათი დეგრადაციის ფარდობითი ანალიზი მნიშვნელოვანია გმ საკვების ზუსტი დეტექციისთვის [Chen et al, 2007, Xing et al., 2015]. ამის გათვალისწინებით, ჩვენ გამოვიკვლიეთ მსგავსი ზომის სიმინდის სპეციფიური და გმო-სპეციფიური ამპლიკონები, კერძოდ, სიმინდის ზეინის გენის 102bp ფრაგმენტი, ინვერტაზის გენის 140bp და 226bp ფრაგმენტები, აგრეთვე, გმო-ს სპეციფიური ამპლიკონები: ყვავილოვანი კომბოსტოს მოზაიკური ვირუსის CaMV 35S პრომოტორის 141bp ფრაგმენტი, ტრანსგენური *Cry1A(b)* გენის 258bp და 124bp ფრაგმენტები. ეს ტრანსგენური უბნები არსებობს გმ სიმინდის ორივე შესწავლილ ვარიაციაში: Bt-176 და MON810. აღსანიშნავია, რომ გმ მცენარეები ხშირად შეიცავენ CaMV 35S პრომოტორს კლონირებული გენის ტრანსკრიფციის რეგულაციისთვის [Randhawa et al, 2016], ხოლო *Cry1A(b)* გენი აკოდირებს ბაქტერიულ ენდოტოქსინს და განსაზღვრავს მწერების მიმართ რეზისტენტობის თვისებას Bt-კულტურებში. შერჩეულ იქნა პჯრ-პროდუქტები ზომით 102bp-258bp შუალედში, ვინაიდან

სასურსათო პროდუქტების ანალიზისთვის ეფექტურია მოკლე ამპლიკონები [Datukishvili et al., 2015; Alarcon et al., 2019].

მიღებულმა შედეგებმა ნათლად აჩვენა, რომ 100°C-ზე თერმულ დამუშავებას სუსტი გავლენა ჰქონდა დნმ-ის მთლიანობასა და ამპლიფიციურობაზე, მაგრამ 121°C-ზე დამუშავებამ გამოიწვია გენომური დნმ-ის დროზე დამოკიდებული დეგრადაცია, მნიშვნელოვანი გავლენა მოახდინა ზოგიერთი ამპლიკონის ამპლიფიციურობაზე და გმო-ს დეტექციაზე. CTAB მეთოდით მიღებულ იქნა უფრო მეტი გენომური და ამპლიფიცირებადი დნმ, ვიდრე DNeasy ნაკრებით, განსაკუთრებით პროცესირებული სინჯებიდან. ენდოგენური ამპლიკონების კვლევამ აჩვენა 102bp-დან 226bp-მდე ზომის ამპლიკონების მდგრადობა, გარდა ტრანსგენური MON810-ის სინჯებისა. ეგზოგენური *Cry1A(b)* გენის ფრაგმენტებს ჰქონდათ მსგავსი დეგრადაციის ხარისხის მაჩვენებლები გმო-ს ორივე ვარიანტში. ყველა შემოწმებულ ამპლიკონს შორის ტრანსგენური CaMV 35S პრომოტორის 141bp ამპლიკონმა აჩვენა ყველაზე მაღალი თერმოსტაბილობა და აღმოჩნდა ყველაზე ეფექტური მარკერი ძლიერად პროცესირებული გმ საკვების ანალიზისთვის.

საინტერესო შედეგი მოგვცა 100°C-ზე თერმოსტატში მშრალად დამუშავებული სიმინდის ფქვილებისა და 100°C-ზე სიმინდის მარცვლების დუღილისას მიღებული შედეგების შედარებამ. აღმოჩნდა, რომ ერთსა და იმავე ტემპერატურაზე ერთი და იგივე დროით დამუშავების შემთხვევაში მარცვლების დუღილმა გამოიწვია გენომური დნმ-ისა და პჯრ-ამპლიკონების ბევრად უფრო ძლიერი დეგრადაცია, ვიდრე ფქვილების მშრალად დამუშავებამ. აქედან გამომდინარე, ვვარაუდობთ, რომ საკვების მატრიქსსა და თერმული ზემოქმედების მეთოდს განსაკუთრებული როლი აქვთ დნმ-ის დეგრადაციასა და პჯრ-ამპლიფიკაციაში.

სასურსათო პროდუქტების ანალიზმა აჩვენა, რომ ინგრედიენტის ზუსტი დეტექცია დამოკიდებულია პროდუქტში ინგრედიენტის შემცველობაზე, პროცესირების ხარისხზე და დნმ-მარკერზე. პროცესირებულ საკვებში სიმინდის ზუსტი დეტექციისთვის ყველაზე ეფექტური მარკერია ზეინის გენის 102bp ამპლიკონი.

ამგვარად, ჩვენმა კვლევამ აშკარად აჩვენა, რომ პროცესირების სხვადასხვა პარამეტრები, როგორცაა ტემპერატურა, ზემოქმედების ხანგრძლივობა და დნმ-ის

ექსტრაქციის მეთოდი, აგრეთვე ტრანსგენური ვარიაცია, პჯრ-პრაიმერები, ამპლიკონების სიგრძე და მათი შესაბამისი მონაკვეთების მდებარეობა გენომში წარმოადგენს კრიტიკულ ფაქტორებს, რომლებიც გავლენას ახდენენ საკვების ინგრედიენტების პჯრ-იდენტიფიკაციაზე და გმო-ს დეტექციის სიზუსტეზე. კვლევაში გამოყენებულმა პჯრ-მეთოდებმა აჩვენა მაღალი სპეციფიურობა და მგრძნობელობა სიმინდისა და გმო-ს ზუსტი დეტექციისთვის პროცესირებულ პროდუქტებში.

ჩატარებული კვლევების შედეგების საფუძველზე შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ საკვების ანალიზი უნდა ჩატარდეს ყოველ ცალკეულ შემთხვევაში საკვების მატრიქსის, პროცესირების მეთოდისა და თითოეული კრიტიკული პარამეტრის გათვალისწინებით.

კვლევის შედეგად მიღებული ახალი მონაცემები დნმ-ის სტაბილურობის შესახებ მნიშვნელოვანია მცენარეთა და საკვების გენომიკის უცნობი საკითხების უკეთ შემეცნებისათვის. ვალიდირებული დნმ-დიაგნოსტიკური მეთოდები შეიძლება გამოყენებულ იქნეს პრაქტიკაში თესლების, მცენარეების, სურსათის და გმო-ს ანალიზში.

დასკვნები

1. თერმული და მჟავური დამუშავება იწვევს მცენარეული დნმ-ის დეგრადაციას და შეიძლება გავლენა მოახდინოს პჯრ-ამპლიფიკაციაზე. დნმ-ის დეგრადაციის ხარისხი იზრდება ტემპერატურის, მჟავიანობის და მათი ზემოქმედების ხანგრძლივობის მატებისას.
2. დნმ-ის სტაბილურობა დამოკიდებულია მცენარის სახეობაზე. სოიას დნმ უფრო თერმოსტაბილური და ამპლიფიცირებადია, ვიდრე ხორბლისა და სიმინდის დნმ.
3. საკვებში გენმოდირიცირებული და არამოდირიცირებული მცენარეების ზუსტი დეტექციისთვის კრიტიკული ფაქტორებია: პროცესირების მეთოდი, ხანგრძლივობა, ტემპერატურა და pH; დნმ-ის ექსტრაქციის მეთოდი, საკვების

მატრიქსი, მცენარის სახეობა და გმ-ვარიაცია, პჯრ-პრაიმერები, ამპლიკონის სიგრძე და მდებარეობა გენომში.

4. პროცესირებული პროდუქტებიდან გენომური დნმ-ის ექსტრაქციისთვის CTAB-მეთოდი უფრო ეფექტურია, ვიდრე DNeasy მცენარეთა ნაკრები.
5. პროცესირებულ საკვებში მცენარეული ინგრედიენტების ზუსტი დეტექციისთვის ამპლიკონის მაქსიმალური სიგრძეა დაახლოებით 250bp.
6. იდენტიფიცირდა ახალი დნმ-მარკერები: ხორბლის გლუტენინის გენის 259bp და აცეტილ-კოენზიმ A კარბოქსილაზას გენის 134bp ფრაგმენტები ხორბლის იდენტიფიკაციისთვის; ტრანსგენური *Cry1A(b)* გენის 124bp ფრაგმენტი მწერების მიმართ რეზისტენტული გმ მცენარეების სკრინინგისთვის.
7. დადგინდა ვალიდური მეთოდები პროცესირებული საკვების ანალიზისთვის, რომლებიც მიმართულია შემდეგ ამპლიკონებზე: ხორბლის გლუტენინის გენის 67bp და კარბოქსილაზას გენის 134bp ამპლიკონები, სიმინდის ზეინის გენის 102bp ამპლიკონი, სოიას ლექტინის გენის 118bp და 101bp ამპლიკონები, ტრანსგენური CaMV 35S პრომოტორის 141bp ამპლიკონი.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Alarcon C. M., Shan G., Layton D. T., Bell T. A., Whipkey S. and Shillito R. D. 2019. „Application of DNA and protein-based detection methods in agricultural biotechnology“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 67, no. 4, pp. 1019–1028.
2. Anklam E., Gadani F., Heinze P., Pijnenburg H., Van den Eede G. 2002. „Analytical Methods for Detection and Determination of Genetically Modified Organisms (GMOs) in Agricultural Crops and Plant-derived Food Products“. *European Food Research and Technology*. 214:3-26.
3. Antiabong J. F., Ngoepe M. G., Abechi A. S. 2016. „Semi-quantitative digital analysis of polymerase chain reaction-electrophoresis gel: Potential applications in low-income veterinary laboratories“. *Veterinary World*, vol. 9, pp. 935–939. DOI: 10.14202/vetworld. 2016.935-939.
4. Bakshi A. „Potential adverse health effects of genetically modified crops". 2003. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 6 (3): 211–25.
5. Ballari R. V. and Martin A. 2013. „Assessment of DNA degradation induced by thermal and UV radiation processing: implications for quantification of genetically modified organisms“. *Food Chemistry*, vol. 141, no. 3, pp. 2130–2136.
6. Bauer T., Weller P., Hammes W. P., Hertel Ch. 2003. „The effect of processing parameters on DNA degradation in food /*Eur Food Res Technol*“. V. 217, pp.338–343
7. Bawa A.S., Anilakumar K.R. 2013. „Genetically modified foods: safety, risks and public concerns—a review“. *J Food Sci Technol*; 50(6):1035–1046; DOI 10.1007/s13197-012-0899-1
8. Bergerova E., Hrnčirova Z., Stankovska M., Lopasovska M., and Siekel P. 2010. „Effect of thermal treatment on the amplification and quantification of transgenic and non-transgenic soybean and maize DNA“. *Food Analytical Methods*, vol. 3, no. 3, pp. 211–218.

9. Bergerova E. Godalova Z. and Siekel P. 2011 „Combined effects of temperature, pressure and low pH on the amplification of DNA of plant derived foods“. *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 29, no. 4, pp. 337–345.
10. Bernstein I.L., Bernstein J.A., Miller M., Tierzieva S, Bernstein D.I., Lummus Z., Selgrade M.K., Doerfler D.L., Seligy V.L. 1999. „Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. *Environmental Health Perspect* 107:575–582. DOI: 10.1289/ehp.99107575
11. Bernstein J.A., Bernstein I.L., Bucchini L., Goldman L.R., Hamilton R.G., Lehrer S., Rubin C. and Sampson H.A. 2003. „Clinical and laboratory investigation of allergy to genetically modified foods“. *Environmental Health Perspect.* 111(8): 1114–1121. doi: 10.1289/ehp.5811
12. Bonfini Laura, Heinze Petra, Kay Simon, Van den Eede Guy. 2001. „REVIEW OF GMO DETECTION AND QUANTIFICATION TECHNIQUES“. Food Products and Consumer Goods Unit, I-21020
13. Bordoni R., Germini A., Mezzelani A., Marchelli R. and De Bellis G. 2005. „A Microarray Platform for Parallel Detection of Five Transgenic Events in Foods: A Combined Polymerase Chain Reaction–Ligation Detection Reaction–Universal Array Method“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:912–918. DOI: 10.1021/jf0486949.
14. Brake J, Vlachos D. 1998. „Evaluation of transgenic Event 176 “Bt” corn in broiler chicken“. *Poult Sci* 77:648–653. DOI: 10.1093/ps/77.5.648.
15. Broeders S. R. M., De Keersmaecker S.C. and Roosens N. H. C. 2012. „How to deal with the upcoming challenges in GMO detection in food and feed“. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Accessed September 13, 2012. doi: 10.1155/ 2012/402418.
16. Celec P., Kukučková M., Renczésová V., Natarajan S., Pálffy R., Gardlík R., Hodosy j., Behuliak M., Vlková B., Minárik G., Szemes T., Stuchlík S., Turňa J. 2005. „Biological and biomedical aspects of genetically modified food“. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Volume 59, Issue 10, Pages 531–540
17. Chen Y., Wang Y., Ge Y, Xu B. 2005. „Degradation of Endogenous and Exogenous Genes of Roundup-Ready Soybean during Food Processing“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(26):10239–43. DOI: 10.1021/jf0519820.

18. Chen Y., Ge Y. and Wang Y. 2007. „Effect of critical processing procedures on transgenic components in quality and quantity level during soymilk processing of Roundup Ready soybean“. *European Food Research and Technology*, vol. 225, no. 1, pp. 119–126.
19. Codex Alimentarius „Foods derived from Biotechnology“. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. 2009. <http://www.fao.org/3/a-a1554e.pdf>
20. Datukishvili N., Karseladze M., Zaalishvili T., Kutateladze T. 2007. „Seed testing by CaMV 35S promoter-specific PCR for detection of genetically modified organisms“. *Proceedings of the Georgian Academy of Sciences, Biological Series*, vol.5, N2, pp. 21-25.
21. Datukishvili N., Kutateladze T., Karseladze M., Gabriadze I. 2009. „Comparison of screening methods for reliable detection of genetically modified organisms“. *Proceedings of the Georgian Academy of Sciences, Biological Series*, vol.7, N3, pp. 4-8
22. Datukishvili N., Gabriadze I., Kutateladze T., Karseladze M., Vishnepolsky B. 2010. „Comparative evaluation of DNA extraction methods for food crops“. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 45, 1316-1320
23. Datukishvili N., Kutateladze T., Gabriadze I., Bitskinashvili K. and Vishnepolsky B. 2015. „New multiplex PCR methods for rapid screening of genetically modified organisms in food“. *Frontiers in Microbiology* 6:757. doi: 10.3389/fmicb.2015.00757.
24. Datukishvili N., Kutateladze T., Gabriadze I. Bitskinashvili K., Karseladze M. 2018. „DNA-based approaches for reliable detection of genetically modified ingredients in processed foods“. © 2018 Nova Science Publishers, Inc. Chapter 4; ISBN: 978-1-53614-395-9
25. Debode F., Janssen E., Bragard C. and Berben G. 2017. „Detection by real-time PCR and pyrosequencing of the *CryIA(b)* and *CryIA(b)* genes introduced in genetically modified (GM) constructs“, *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 34, no. 8, pp. 1398–1409.
26. DIRECTIVE 2001/18/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL „on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms“, 12 March 2001; https://www.international-food-safety.com/pdf/2001_18.pdf
27. Dong W., Yang L., Shen K., Kim B., Kleter G. A., Marvin H. J. P., Guo R., Liang W. and Zhang D. 2008. „GMDD: a database of GMO detection methods“. *BMC Bioinformatics* 9:260. doi: 10.1186/1471-2105-9-260.

28. Dougherty J. 2006. „National Competitive advantage in agricultural biotechnology“. Abstracts of international symposium „Biosafety issues in implementation of GMOs: new research approaches, regulation and public perception“. Yalta, Ukraine, p.17.
29. Ehlers B., Strauch E., Goltz M. 1997. „Nachweis gen-technischer veränderungen in mais mittels PCR“. Bundesgesundheitsblatt, vol. 40, issue 4, pp. 118–121. DOI: 10.1007/BF03044156.
30. European Commission. Regulation (EC) No 882/2004. „On official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules“. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2004/882/oj>
31. European Union reference laboratory for GM food and feed, Joint Research Centre. 2011. „Compendium of reference methods for GMO analysis“. Luxemburg: Publication office of the European Union.
32. Fares N.H., El-Sayed A.K. 1998. „Fine structural changes in the ileum of mice fed on delta-endotoxin-treated potatoes and transgenic potatoes“. Nat Toxins 6:219–233
33. Fernandes T. J. R., Oliveira M. B. P. P. and Mafra I. 2013. „Tracing transgenic maize as affected by breadmaking process and raw material for the production of a traditional maize bread, broa“. Food Chemistry, vol. 138, no. 1, pp. 687–692, 2013.
34. Fraley R. T., Rogers S. G., Horsch R. B., Sanders P. R., Flick J. S., Adams S. P., Bittner M. L., Brand L. A., Fink C. L., Fry J. S., Galluppi G. R., Goldberg S. B., Hoffmann N. L. and Woo S. C. 1983. „Expression of bacterial genes in plant cells“. Proc. Natl Acad. Sci. USA, Vol. 80, pp. 4803–4807. doi: 10.1073/pnas.80.15.4803.
35. Gabriadze I., Kutateladze T., Vishnepolsky B., Karseladze M. and Datukishvili N. 2014. „Application of PCR-based methods for rapid detection of corn ingredients in processed foods“. International Journal of Nutrition and Food Science, vol. 3. no. 3. pp. 199–202. DOI: 10.11648/j.ijnfs.20140303.21.
36. Godalova Z., Bergerova E. and Siekel p. 2013. „Effect of high temperature and pressure on quantification of MON810 maize“. Czech Journal of Food Sciences, vol. 31, no. 4, pp. 376–381. DOI: 10.17221/205/2012-CJFS
37. Germini A., Zanetti A., Salati C., Rossi S., Forre C., Schmid S. and Marchelli R. 2004. „Development of a seven-target multiplex PCR for the simultaneous detection of

- transgenic soybean and maize in feeds and foods“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:3275-3280.
38. Gewin Virginia. 2003. „Genetically Modified Corn-Environmental Benefits and Risks“. *Plos Biology* 1(1): e8 (Oct). doi: 10.1371/journal.pbio.0000008. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC212689/>
 39. Guide to U.S. Regulation of Genetically Modified Food and Agricultural Biotechnology Products. 2001. Pew initiative on food and biotechnology. https://www.pewtrusts.org/~media/legacy/uploadedfiles/wwwpewtrustsorg/reports/food_and_biotechnology/hhsbiotech0901pdf.pdf
 40. Gryson N. „Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR based GMO analysis“. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 2010, pp. 2003–2022. DOI: 10.1007/s00216-009-3343-2.
 41. Hammond B.G., Vicini J.L., Hartnell G.F., Naylor M.W., Knight C.D., Robinson E.H., Fuchs R.L., Padgett S.R. 1996. „The feeding value of soybeans fed to rats, chickens, catfish and dairy cattle is not altered by genetic incorporation of glyphosate tolerance. *Journal of Nutrition* 126:717–727. DOI: 10.1093/jn/126.3.717.
 42. Harrison L.A., Bailey M.R., Naylor M.W., Ream J.E., Hammond B.G., Nida D.L., Burnette B.L., Nickson T.E., Mitsky T.A., Taylor M.L., Fuchs R.L., Padgett S.R. 1996. „The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice“. *Journal of Nutrition* 126:728–740. DOI: 10.1093/jn/126.3.728
 43. Heide B. R., Heir E. and Holck A. L. 2008. „Detection of eight GMO maize events by qualitative, multiplex PCR and Xurorescence capillary gel electrophoresis,. *European Food Research and Technology* 227:527–535. DOI: 10.1007/s00217-007-0751-4.
 44. Hernández M., Pla M., Esteve T., Prat S., Puigdomenech P. and Ferrando A. 2003. „A specific real-time quantitative PCR system for event MON810 in Maize YieldGard® based on the 3'-transgene integration sequence“. *Transgenic Research* 12:179-189. DOI: 10.1023/A:1022979624333

45. Hernández M., Duplan M-N., Berthier G., Vaitilingom M., Hauser W., Freyer R., Pla M. and Bertheau Y. 2004. „Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:4632-4637. DOI: 10.1021/jf049789d.
46. Hernández M., Esteve T. and Pla M. 2005. „Real-time polymerase chain reaction based assays for quantitative detection of barley, rice, sunflower, and wheat“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:7003-7009. DOI: 10.1021/jf050797j.
47. Herrera-Estrella L., Van den Broeck G., Maenhaut R., Van Montagu M., Schell J. 1984. „Light-inducible and chloroplast-associated expression of a chimaeric gene introduced into *Nicotiana tabacum* using a Ti plasmid vector“. *Nature* 310:115-20.
48. Homrich M.S., Wiebke-Strohm B., Weber R.L.M, Bodanese-Zanettin M.H. 2012. „Soybean genetic transformation: a valuable tool for the functional study of genes and the production of agronomically improved plants“. *Genetics and Molecular Biology*. 35(4 (suppl)):998-1010. DOI: 10.1590/S1415-47572012000600015.
49. Hrnčířová Z., Bergerova, E., Siekel, P. 2008. „Effects of technological treatment on DNA degradation in selected food matrices of plant origin“. *Journal of Food and Nutrition Research*, v. 47, N1, pp. 23-28
50. Hupfer C., Hotzel H., Sachse K. and Engel K. H. „Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction“. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, vol. 206, no. 3, pp. 203–207, 1998.
51. ISAAA Brief 54-2018: Executive Summary. Biotech Crops Continue to Help Meet the Challenges of Increased Population and Climate Change
<https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/54/executivesummary/default.asp>
52. James D., Schmidt A-M., Wall E., Green M. and Masri S. 2003. „Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:5829-5834. DOI: 10.1021/jf0341159
53. Johnston S. A., Tang DC. 1994. „Gene gun transfection of animal cells and genetic immunization“. *Methods in Cell Biology*. 43 Pt A: 353–365.

54. Key S., Ma J. K., Drake P. M. 2008. „Genetically modified plants and human health“. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 101 (6): 290–8. doi: 10.1258/jrsm.2008.070372.
55. Kutateladze T., Karseladze M., Datukishvili N. 2007. „Detection of biotechnological crops in Georgia“. *Journal of Biotechnology*, vol. 131S, pp. 37–38. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2007.07.063
56. Kutateladze T., Karseladze M., Gabriadze I., Datukishvili N. 2009. „Optimisation of DNA-based Screening Methods for Genetically Modified Organisms“. *Journal of Biological Physics and Chemistry*, V. 9 (2), 73–76.
57. Kutateladze T., Gabriadze I., Vishnepolsky B., Karseladze M. and Datukishvili N. 2013. „Development of triplex PCR for simultaneous detection of maize, wheat and soybean“. *Food Control*, vol. 34, no. 2, pp. 698–702.
58. Leimanis S., Hernandez M., Fernandez S., Boyer F., Burns M., Bruderer S., Glouden T., Harris N., Kaeppli O., Philipp P., Pla M., Puigdomenech P., Vaitilingom M., Bertheau Y. and Remacle J. 2006. „A microarray-based detection system for genetically modified (GM) food ingredients“. *Plant Molecular Biology* 61:123–139.
59. Lipp M., Brodmann P., Pietsch K., Pauwels J., Anklam E., Borchers T., Braunschweiger G., Busch, U., Eklund E., Eriksen FD., Fagan J., Fellingner A. 1999. „IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder“. *Journal of AOAC International*. 82, 923–8.
60. Lipp M., Bluth A., Eyquem F., Kruse L., Schimmel H., Van den Eede G., Anklam E. 2001. „Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs“. *European Food Research and Technology*, 212, 497–504. DOI: 10.1007/s002170000274.
61. Louda S.M. 1999. „Insect Limitation of weedy plants and its ecological implications“. In: Traynor PL, Westwood J H (eds) „Proceedings of a workshop on ecological effects of pest resistance genes in managed ecosystems“. *Information Systems for Biotechnology*. Blacksburg, Virginia, pp 43–48.

62. Marmiroli N, Maestri E, Gullì M, Malcevschi A, Peano C, Bordoni R, De Bellis G. 2008. „Methods for detection of GMOs in food and feed“. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. V. 392, N. 3. pp. 369-384. DOI: 10.1007/s00216-008-2303-6.
63. Masataka U., Tomohiro N., Katsumi T. 2004. „Thermostability of DNA from wheat in heated food products“. *Food preservation science* V. 30, N. 4, pp. 195-98.
64. Michelini E., Simoni P., Cevenini L., Mezzanotte L., Roda A. 2008. „New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: an update“. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, pp. 355–367. DOI: 10.1007/s00216-008-2193-7.
65. Moreano F., Busch U., Engel K. 2005. „Distortion of genetically modified organism quantification in processed foods: Influence of particle size compositions and heat-induced DNA degradation“. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 53, n26, pp. 9971-9979. DOI: 10.1021/jf051894f.
66. Noguchi A., Akiyama H., Nakamura K. 2015. „A novel, trait-specific real-time PCR method enables quantification of ge-netically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize“, *European Food Research and Technology*, vol. 240, no. 2, pp. 413–422. DOI: 10.1007/s00217-014-2340-7.
67. Nordlee J. A., Taylor S.L., Townsend J.A., Thomas L.A, Bush R.K. 1996. „Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans“. *The New England Jurnal of Medicine*. Vol. 334. pp. 688-692. DOI: 10.1056/NEJM199603143341103
68. Noteborn H.P.J.M., Bienenmann-Ploum M.E., van den Berg J.H.J., Alink G.M., Zolla L, Raynaerts A, Pensa M, Kuiper H.A. 1995. „Safety assessment of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein *Cry1A(b)* expressed in transgenic tomatoes. In: Engel K.H., Takeoka G.R., Teranishi R. (eds) „ACS Symp series 605 Genetically modified foods-safety issues“. American Chemical Society, Washington, D.C, pp 135–147, Chapter 12.
69. Onishi M., Matsuoka T., Kodama T., Kashiwaba K., Futo S., Akiyama H., Maitani T., Furui S., Oguchi T. and Hino A. 2005. „Development of a multiplex polymerase chain reaction method for simultaneous detection of eight events of genetically modified

- maize“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:9713–9721. DOI: 10.1021/jf0515476
70. Padgett S.R., Kolacz K.H., Delannay X., Re D.B., LaVallee B.J., Tinius C.N, Rhodes W.K. et al. 1995. „Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line“. *Crop science*. 35, 1451–1461.
 71. Placido A., Amaral J. S., Costa J., Fernandes T. J. R., Oliveira M. B. P. P., Delerue-Matos, C. and Mafra, I. 2016. „Novel Strategies for genetically modified organism detection“. In book: *Genetically Modified Organisms in Food - Production, Safety, Regulation and Public Health*, Chapter: 12, Publisher: Elsevier, Editors: Ronald Ross Watson, Victor R. Preedy, pp.119-131. DOI: 10.1016/B978-0-12-802259-7.00012-9
 72. Pietsch K., Waiblinger H. U., Brodmann P. and Wurz A. 1997. „Screening procedures for identification of genetically modified plants in food“. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 93:35-38.
 73. Querci M. and M. Mazzara. „The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms“. Session 7. (WHO)
 74. Querci M, and Mazzara M. „The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms“. Session 8. (WHO)
 75. Randhawa G., Singh M. and Sood P. 2016 „DNA-based methods for detection of genetically modified events in food and supply chain“. *Current Science* 110:1000 - 1009. doi: 10.18520/cs/v110/i6/1000-1009.
 76. Redenbaugh K., Hiatt W., Martineau B, Kramer M., Sheehy R., Sanders R., Houck C., Emlay D. 1992. „Safety assessment of genetically engineered fruits and vegetables: a case study of the Flavr Savr Tomato“. CRC Press. ISBN 9780849348037 - CAT# 4803.
 77. Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. Off. J. Eur. Union, L 268, 1-23. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:268:0001:0023:EN:PDF>
 78. Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of September 2003 concerning the traceability and labeling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. Off. J. Eur. Union, L 268, 24-

28. <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/f298e6b4-796e-4d81-bfeb-7ffb728c194f/language-en>
79. Samson M. C., Gullı M., and Marmiroli N. 2013. „Multiplex real-time PCR assays for simultaneous detection of maize MON810 and GA21 in food samples“. *Food Control*, vol. 30, no. 2, pp. 518–525.
80. Sharma R., Damgaard D., Alexander T.W., Dugan M.E, Aalhus J.L., Stanford K., McAllister T.A. 2006. „Detection of Transgenic and Endogenous Plant DNA in Digesta and Tissues of Sheep and Pigs Fed Roundup Ready Canola Meal“. *Journal of Agriculture and Chemistry*. 54, 1699-1709. DOI: 10.1021/jf052459o.
81. Shrestha H. K., Hwu K. K., Wang S. J., Liu L. F. and Chang M. C. 2008. „Simultaneous detection of eight genetically modified maize lines using a combination of event- and construct-specific multiplex-PCR technique“. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 56:8962-8968. DOI: 10.1021/jf800501z.
82. Siekel P. 2008. „Effects of technological treatment on DNA degradation in selected food matrices of plant origin“. *Journal of Food and Nutrition Research*, v. 47, N1, pp. 23-28
83. Siekel P., Bergerova E., Hmoirova Z., Lopasovska M. 2008. “Effect of heat on DNA degradation in food plant matrices“. *(Poster) 1st Global Conference on GMO Analysis, Como, Italy*, Book of Abstracts, P. 68.
84. Somma M. and Querci M. 2006. „The polymerase chain reaction. In: The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms“. Session 6, Ed. Querci, M., Jermini, M., Eede G., Publication of the European Communities, pp.3-31
85. Somma M. and Querci M. „The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms“. Session 6. (WHO)
86. Souza A. C. M. F., Souza D. R. V., Sanabani S. S., Giorgi R. R., Bendit I. 2009. „The performance of semiquantitative differential PCR is similar to that of real-time PCR for the detection of the MYCN gene in neuroblastomas“. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42, pp. 791–795. DOI: 10.1590/S0100-879X2009000900004
87. Steinbrecher R.A. 1996. „From green to gene evolution: The environmental risks of genetically engineered crops“. *Ecologist* 26:273–281.

88. Stevens L.J., Kuczek T., Burgess J.R., Hurt E. and Arnold L.E. 2011. „Dietary sensitivities and ADHD symptoms: thirty-five years of research“. *Clinical Pediatrics*. vol. 50, pp. 279-93. DOI: 10.1177/000992281038472.
89. Studer E., Dahinden I., Luthy J. and Hubner P. 1997. „Detection of genetically modified Maximizer maize by polymerase chain reaction (PCR)“. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmittel-untersuchung un Hygiene* 88:515-524.
90. Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. 1991. „Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA“. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105-1109.
91. Taverniers I., Windels P., Van Bockstaele E. and De Loose M. 2001. „Use of cloned DNA fragments for event-specific quantification of genetically modified organisms in pure and mixed food products“. *European Food Research and Technology* 213:417-424.
92. Terry C. and Harris N. 2001. „Event-specific detection of Roundup Ready Soya using two different real time PCR detection chemistries“. *European Food Research and Technology* 213:425-431. DOI: 10.1007/s002170100404.
93. Terzi V., Ferrari B., Finocchiaro F., Di Fonzo N., Stanca A. M., Lamacchia C., Napier J., Shewry P. R., Faccioli P. 2003. „TaqMan PCR for detection of genetically modified durum wheat“. *Journal of Cereal Science*, 37, pp. 157–163. DOI: 10.1006/jcrs.2002.0489.
94. Vijayakumar K. R., Martin A., Gowda L. R., and Prakash V. 2009. „Detection of genetically modified soya and maize: impact of heat processing“. *Food Chemistry*, vol. 117, no. 3, pp. 514–521. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.04.028.
95. Wei S., Wang C., Zhu P., Zhou G., Fu W. and Wu X. 2018. „A high-throughput multiplex tandem PCR assay for the screening of genetically modified maize“. *LWT*, vol. 87, pp. 169–176.
96. Windels P., Bertrand S., Depicker A., Moens W., Bockstaele E. and De Loose M. 2003. „Qualitative and event-specific PCR real-time detection methods for Star Link maize“. *European Food Research and Technology*. 216, 259-263.
97. Xing F., Zhang W., Selvaraj J. N. and Liu Y. 2015. „DNA degradation in genetically modified rice with *Cry1A(b)* by food processing methods: implications for the quantification of genetically modified organisms“. *Food Chemistry*, vol. 174, pp. 132–138. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.10.130.

98. Xu J., Miao H., Wu H., Huang W., Tang R., Qiu M., Wen J., Zhu S. and Li Y. 2006. „Screening genetically modified organisms using multiplex-PCR coupled with oligonucleotide microarray“. Biosensors and Bioelectronics. 22:71–77.
99. Xu J., Zhu S., Miao H., Huang W., Qiu M., Huang Y., Fu X. and Li Y. 2007. „Event-specific detection of seven genetically modified soybean and maize using multiplex-PCR coupled with oligonucleotide microarray“. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 5575–5579.
100. Zhang C., Wohlhueter R., Zhang H. 2016. „Genetically modified foods: A critical review of their promise and problems“. Food Science and Human Wellness. Vol. 5. pp. 116–123.
101. ბიოლოგიური მრავალფეროვნების კონვენციის ბიოუსაფრთხოების კარტახენას ოქმი. 2000. <https://www.cbd.int/doc/legal/cartagena-protocol-en.pdf>
102. კონვენცია ბიოლოგიური მრავალფეროვნების შესახებ. 1994. [http://eiec.gov.ge/NavMenu/Documents/International-Convention/კონვენცია-ბიოლოგიური-მრავალფეროვნების-შესახებ-\(1\).aspx](http://eiec.gov.ge/NavMenu/Documents/International-Convention/კონვენცია-ბიოლოგიური-მრავალფეროვნების-შესახებ-(1).aspx)
103. საქართველოს კანონი „სურსათად/ცხოველის საკვებად განკუთვნილი გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმებისა და მათგან წარმოებული გენმოდიფიცირებული პროდუქტების ეტიკეტირების შესახებ“; საქართველოს საკანონმდებლო მაცნე. 2014. <https://matsne.gov.ge/ka/document/view/2634028>
104. საქართველოს კანონი ცოცხალი გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების შესახებ; საქართველოს საკანონმდებლო მაცნე. 2014. <https://matsne.gov.ge/ka/document/view/2516880?publication=2>