

Капитова И.А., снс лаб. репродуктивной биотехнологии, кхн,

Гузеева А.А., нс лаб. репродуктивной биотехнологии

ФГБНУ ВСТИСП, Россия, Москва
spi-a@yandex.ru, alla1988.88@mail.ru

УДК: 633/635

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГМ-ЛИНИЙ ПЛОДОВО-ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР НА ОСНОВЕ ДНК.

Реферат. В статье приведена краткая оценка современных методов идентификации ГМ-линий плодово-ягодных культур. Россия является одной из основных зон промышленного производства плодово-ягодных культур, и угроза скрещивания традиционных растений с генетически-модифицированными представляет большую проблему для растениеводства. В Российской Федерации разработана и эффективно функционирует система государственного надзора за выращиванием и реализацией ГМО продукции растительного происхождения. Разработан алгоритм лабораторных исследований на наличие и количественное определение ГМО. В международной лабораторной практике наиболее распространённым и эффективным методом обнаружения ГМО в плодово-ягодных культурах является метод ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РТ). Метод ПЦР-РТ позволяет в кратчайшие сроки получить достоверные результаты на наличие ГМО, идентифицировать ГМ-линии и посчитать количество ГМО. На сегодняшний день в России имеется потребность в разработке и внедрении в лабораторную практику новых методик по определению ГМО. Для получения более достоверных результатов требуется комплексный подход (скрининг, идентификация и количество ГМО).

Ключевые слова: ГМО, ГМ линии, скрининг, идентификация, ПЦР-РТ, qRT-ПЦР, трансген, CRISPR, генетические конструкции.

Summary. The article provides a brief assessment of modern methods for identifying GM lines of fruit cultures. Russia is one of the main zones of industrial production of fruits and berries and the threat of crossing traditional plants with genetically modified ones is a big problem for crop production. The Russian Federation has developed and effectively operates a system of state supervision over the cultivation and sale of GMO products of plant origin. An algorithm for laboratory tests for the presence and quantitative determination of GMOs has been developed. In international laboratory practice, the most common and effective method for detecting GMOs in fruit and berry crops is the real-time PCR (RT-PCR) method. The PCR-RT method allows you to quickly get reliable results for the presence of GMOs, identify GM lines and calculate the number of GMOs. Today in Russia there is a need to development and implementation of new methods for determining GMOs in laboratory practice. To get more reliable results, a comprehensive approach is required (screening, identification, and the number of GMOs).

Keywords: GMO, GM lines, gene screening, RT-PCR, transgene, CRISPR, gene constructs.

Введение

Биотехнология предоставляет нам широкий спектр возможностей для получения новых видов растений. Плодово-ягодные культуры, созданные с помощью генетического редактирования и инженерии, обещают победить болезни и приобретают новые вкусы. Как пример, генетически отредактированные бананы могут быть устойчивы к заболеванию, известному как «фузариозное увядание», которое атакует плантации по всему миру. Земляника со вкусом персика уже разрабатываются американскими учеными с использованием технологии редактирования генов CRISPR. Трансгенные яблоки Arctic получили одобрение Управления по контролю за продуктами и лекарствами в США и находятся в широком доступе.

Трансгенные плодово-ягодные культуры являются многообещающим инструментом для улучшения экономического развития сельского хозяйства, в тоже время они вызывают серьезную обеспокоенность у общественного мнения с момента их появления в 90-х годах. ГМО продукция растительного происхождения разрешена к импорту и употреблению в большинстве стран мира. Если какие-либо страны по различным причинам отказываются от собственного производства или применения ГМО растений, то избежать потребления такой продукции в современных условиях развития мировой торговли и международной интеграции практически невозможно [1]. Поэтому, необходимо проводить контроль за ГМ растениями с использованием современных методов диагностики ГМО. Наиболее распространённым методом обнаружения ГМО на сегодняшний день является метод ПЦР-РВ. Данный метод является надежным, специфичным и чувствительным. Он позволяет в течение 1-2 дней получить достоверные результаты на наличие ГМ компонентов в образце, идентифицировать ГМ-линии и посчитать количество ГМО.

Обсуждение

Использовались статистические данные, нормативно-правовые материалы, международные базы данных по зарегистрированным ГМ линиям и научные статьи с описанием новых технологий создания ГМ линий плодово-ягодных культур. Основной метод- анализ данных.

Существует три основных методов определения ГМО на основе ДНК. Качественный анализ ДНК методом ПЦР.

С помощью ПЦР проводят скрининг ГМО плодово-ягодных культур. Скрининг позволяет определить ГМ вставки с применением гибридизационно-флуоресцентной детекции в режиме «реального времени» с использованием специфичных праймеров и зондов. Специфичные зонды и праймеры позволяют амплифицировать фрагменты целевых генетической конструкции ГМО (*nptII*, ген подавления *PGAS PPO*, *ppv_cp*, *uidA*, *sam-*

k, ACCD, pg (senseorantisense), *anti-efe, CryIAc* и др.). Данные генетические конструкции являются генетическими маркерами, которые искусственно помещены в растение, при создании ГМО. Данные по ГМ вставкам взяты из международного сервиса по ГМО продукции International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA)(табл.1).

Таблица 1.

Характеристика генетических конструкций и генов, входящих в состав ГМ-линий плодовых и ягодных культур

Название ГМ-конструкций, вставок	Название продукта	Функция
<i>nptII</i>	фермент неомицин-фосфотрансфераза II	позволяющий трансформированным растениям метаболизировать антибиотики неомицин и канамицин во время селекции
ген подавления <i>PGAS PPO</i>	двухцепочечная РНК (дсРНК) из супрессирующего транскрипта перерабатывается в небольшие интерферирующие РНК (миРНК)	двухцепочечная РНК (дсРНК) из супрессирующего транскрипта перерабатывается в небольшие интерферирующие РНК (миРНК), которые направляют расщепление целевой мРНК посредством комплементарности последовательности и подавляют РРО, что приводит к тому, что яблоки с фенотипом не подрумяниваются
<i>ppv_cp</i>	белок оболочки вируса оспы сливы (PPV)	придает устойчивость к вирусу оспы сливы (PPV) с помощью механизма «устойчивости к патогенам»
<i>uidA</i>	фермент бета-D-глюкуронидаза (GUS)	производит синее пятно на обработанной трансформированной ткани, что позволяет проводить визуальный отбор
<i>sam-k</i>	фермент S-аденозилметионин-гидролаза	вызывает замедленное созревание за счет уменьшения S-аденозилметионина (SAM), субстрата для производства этилена
<i>acc</i> (<i>truncated</i>)	модифицированный транскрипт гена синтазы 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (ACC)	подавляет нормальную экспрессию нативного гена синтазы ACC, что приводит к снижению выработки этилена и задержке созревания плодов
<i>CryIAc</i>	Дельта-эндотоксин <i>CryIAc</i>	придает устойчивость к чешуекрылым насекомым, избирательно повреждая слизистую оболочку средней кишки
<i>ACCD</i>	фермент деаминаза 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты	метаболизирует предшественник этилена, созревания плодов, гормон этилен,

		что приводит к задержке созревания плодов.
<i>pg</i> (<i>senseorantisense</i>)	функциональный фермент полигалактуроназы не продуцируется (транскрипция эндогенного фермента подавляется механизмом глушения гена)	ингибирует выработку фермента полигалактуроназы, ответственного за расщепление молекул пектина в клеточной стенке, и, следовательно, вызывает замедленное размягчение фруктов
<i>anti-efe</i>	антисмысловая РНК гена 1-амино-циклопропан-1-карбоксилатоксидазы (АСО) (не продуцируется функциональный фермент АСО)	вызывает замедленное созревание, подавляя выработку этилена путем подавления гена АСО, что кодирует этиленобразующий фермент
<i>cmv_cp</i>	оболочка белка огуречной мозаики <i>cucumovirus</i> (CMV)	придает устойчивость к огуречной мозаике <i>cucumovirus</i> (CMV) с помощью механизма «устойчивости от патогенов»

Качественный анализ методом ПЦР-РВ включает в себя обнаружение специфических последовательностей ДНК-мишеней в исследуемом образце. Результаты качественного анализа подтверждают определить наличие или отсутствие ГМ линий в сравнении с положительными контролями в пределах установленного порогового цикла (Ct)[2]. Метод ПЦР-РВ состоит из следующих этапов. Экстракция и очистка ДНК. На данном этапе осуществляется лизис клеток с последующей очисткой ДНК от балластных веществ (белков, полисахаридов и других соединений) для исследуемых проб и стандартных образцов, содержащих известное количество ГМО. Важно понимать, насколько важно для проведения ПЦР качество выделенной ДНК. Выделенной ДНК может быть недостаточно для анализа по причине присутствия в растении полисахаридов и полифенолов и других веществ. Данные вещества способны ингибировать ПЦР. К примеру, выделение ДНК из земляники является международной проблемой из-за содержащихся в ее составе полисахаридов и полифенолов, которые трудноотделимы от ДНК земляники. Затем, проводится ПЦР анализ с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. По завершении всех реакций проводится анализ полученных результатов. Качественный анализ методом ПЦР позволяет проводить

первичную оценку (скрининг) плодово-ягодных культур на наличие генетических вставок в исследуемом образце.

Количественный анализ методом ПЦР-РВ - это современный метод, широко известный как qRT-ПЦР. Он надежный, специфичный и чувствительный, дает хорошие количественные результаты. Процесс накопления ДНК протекает в режиме реального времени путем улавливания флуоресцентного сигнала более сложным способом. В режиме реального времени одновременно производится амплификация ДНК, анализ трансгена, его обнаружение и подсчет. [2]. Для проведения количественного определения ГМО используют сухие или жидкие сертифицированные стандартные образцы, имеющие установленное содержание ГМ линии. Для расчета массовой доли ГМ растения используются значения пороговых циклов C_t (пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией), полученные при анализе результаты амплификации анализируются с помощью программного обеспечения используемого прибора. На основании разницы значений C_t для специфической последовательности ГМ линии и эндогенного контроля (ЭК) с использованием программного обеспечения прибора, автоматически строится калибровочная прямая. На основании данной прямой рассчитывается массовая доля ГМО в исследуемых образцах.

Понимание метода идентификации и количественного определения содержания ГМ линии растительного происхождения методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени заключается в проведении двух независимых ПЦР в одной пробирке с использованием специфичных праймеров и зондов, меченных флуоресцентными красителями, с целью выявления участка эндогенной ДНК, характерной для всех ГМ линий и участка рекомбинантной ДНК, специфичной для определенных генетических линий [6].

Метод ПЦР на сегодняшний день является наиболее распространённым, т.к. модифицированная ДНК синтезируется во всех частях ГМО. Обеднённый Научный Центр Европейской комиссии объявил этот метод в качестве стандартного метода [3].

Результатом проведения качественного исследования является выяснение наличия или отсутствие ГМ линии и/или растительного компонента в исследуемом образце. Чтобы полностью понять возможности ПЦР-РТ в обнаружении и количественном определении ДНК-мишени в образцах, важно описать математический принцип этого метода. Специфичность ПЦР (качественная характеристика) подтверждается по следующим критериям:

Результат ПЦР не должен давать ложноположительных результатов, в том числе выявлять ДНК других растительных компонентов и других ГМ линий в 100% проводимых исследований [11]. Для оценки специфичности используют контрольные панели образцов. В состав панели входят образцы, содержащие целевую ДНК (идентифицируемая линия), содержащие ДНК других растительных компонентов и ГМ линии. Предел обнаружения ПЦР методики, LOD (качественная характеристика) отражает минимальное количество биологического искомого объекта в исследуемом образце, которое может достоверно обнаружить данный метод. Критерий обнаружения LOD составляет не более 0,1 %. Результаты исследований определение чувствительности методики проводится с использованием ряда модельных образцов, содержащих 1%, 0,1%, 0,01% и 0,001% ГМ линии в традиционной культуре. Необходимо подтвердить определение минимального содержания ГМО ингредиента в растительной ДНК, при котором ГМО воспроизводимо (в двух повторах) должно выявиться [10].

Эффективность ПЦР характеризует прирост матрицы на каждом цикле амплификации. Критерий эффективности ПЦР должен быть не ниже 90% (от 90 до 110%). Это требование должно соответствовать значению

наклона линейной области зависимости C_t от логарифма концентрации ДНК матрицы (slope): 3,1 - 3,6. В идеальном случае - при удвоении количества ПЦР продукта за один цикл: $E = 100\%$, (slope = - 3,32). Эффективность ПЦР оценивают по уравнению: $E = [10(-1/slope)]-1$ [5].

Затем, необходимо учесть наличие линейной зависимости аналитического сигнала в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики. Оценивается как R^2 коэффициент корреляции, определяющий верность модели линейной зависимости C_t от логарифма концентрации калибровочных образцов.

Условия достоверности количественного анализа методом ПЦР оценивается по следующим критериям:

Критерием оценки линейности является R^2 коэффициент для графика зависимости сигнала от прибора в анализируемой пробе в пределах аналитической области методики (0,1% - 5% калибровочные образцы) должен быть не менее 0,98 %.

Прецизионность, точность оценивается по степени близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных установленных условиях (внутрилабораторные испытания). Критерий, согласно которому в пределах установленной аналитической области методики (5%-0,1% ГМО) относительное стандартное отклонение (RSD) измерений не должно превышать 25% [12, 13].

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное. Значения, принимаемые за истинные, должны лежать внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов анализов, полученных экспериментально по данной методике.

Результатом проведения количественного исследования является процентное содержание компонента ГМ линии по отношению к содержанию растительного компонента. При определении количеств ГМО

вне области линейного диапазона методики (0,1-5 %) результат определяют как содержание «менее 0,9%» или «более 0,9%» для зарегистрированных ГМ линий и как содержание «менее 0,5%» или «более 0,5%» для незарегистрированных ГМ линий [14]. Если полученный результат находится в линейном диапазоне методики, то его представляют с указанием расширенной неопределенности, рассчитанной для конкретного протокола определения ГМ-линии.

Оценка международных данных по зарегистрированным ГМ линиям плодово-ягодных культур.

Взятые для оценки, данные по зарегистрированным ГМ линиям плодово-ягодных культур опубликованы на портале Продовольственной и Сельскохозяйственной Организации Объединённых Наций (FAO GM Foods Platform). Продовольственная и сельскохозяйственная организация (FAO) является специализированным учреждением Организации Объединённых Наций, деятельность которой направлена на обеспечение продовольственной безопасности и регулярного доступа к высококачественной продукции, в том числе продукции растительного происхождения, содержащей ГМО [7]. А также с портала ISSA [4], некоммерческой международной организации, которая делится преимуществами новых технологий в области биологических наук с основными заинтересованными сторонами. Однако, не смотря на все преимущества технологии CRISPR решением Высшего суда Европы, принятым ранее в 2018 году, генетически модифицированные растения, созданные с помощью технологии CRISPR должны подчиняться тем же строгим правилам, которые регулируют обычные ГМ организмы [9].

В результате анализа представленных данных в настоящее время в мире разрабатываются новые сорта генетически модифицированных плодово-ягодных культур с использованием новых технологий Crispr (табл.2).

Таблица 2.

Современные применения технологии CRISPR-Cas9 в плодово-ягодных культурах.

Виды сельскохозяйственных культур	Целевые гены	Целевые признаки
Устойчивость к биотическим стрессам		
Помидор	<i>CP</i> и <i>Rep</i> вируса	Устойчивость к вирусу скручивания листьев желтого томата
Помидор	<i>DCL2</i>	Невосприимчивость к вирусу картофеля X, вирусу табачной мозаики и вирусу томатной мозаики
Помидор	<i>DMR6</i>	Устойчивость к ложной мучнистой росе
Помидор	<i>LO1</i>	Устойчивость к мучнистой росе
Помидор	<i>PMR4</i>	Устойчивость к мучнистой росе
Помидор	<i>Solyc08g075770</i>	Невосприимчивость к болезни фузариозных увяданий
Помидор	<i>MAPK3</i>	Невосприимчивость к болезни серой плесени
Помидор	<i>JAZ2</i>	Устойчивость к бактериальным крапинкам
Банан	<i>ORF</i> область вируса	Устойчивость к вирусу банановой полоски
Огурец	<i>eIF4E</i>	Устойчивость к вирусу пожелтения огуречной вены, вирусу желтой мозаики цуккини и вирусу мозаики пятна папайи
Виноград	<i>MLO7</i>	Устойчивость к мучнистой росе
Виноград	<i>WRKY52</i>	Устойчивость к болезням серой плесени
Какао	<i>NPR3</i>	Устойчивость к <i>Phytophthora tropicalis</i>
Папайя	<i>alEPIC8</i>	Устойчивость к <i>Phytophthora palmivora</i>
Цитрусовые	<i>LOB1</i> промоутер	Устойчивость к язве цитрусовых
Яблоко	<i>DIPM1, 2, 4</i>	Устойчивость к болезням огненного ожога
Устойчивость к абиотическим стрессам		
Помидор	<i>BZR1</i>	Снижение устойчивости к тепловому стрессу
Помидор	<i>CBF1</i>	Снижение толерантности к охлаждающим стрессам
Помидор	<i>MAPK3</i>	Снижение стрессоустойчивости к засухе
Арбуз	<i>ALS</i>	Устойчивость к гербицидам
Улучшение качества фруктов		
Помидор	<i>CLV3, lc</i>	Плоды с увеличением количества локусов
Помидор	<i>PSY1</i>	Желтый помидор
Помидор	<i>MYB12</i>	Розовый помидор
Помидор	<i>ANT2</i> (вставка гена)	Фиолетовый помидор
Помидор	<i>PL</i>	Томат с длительным сроком хранения
Помидор	<i>ALC</i>	Томат с длительным сроком хранения
Помидор	<i>MPK20</i>	Репрессия генов, контролирующих метаболизм сахара
Помидор	<i>ANT2</i> (вставка гена)	Увеличение содержания антоцианов
Помидор	<i>GAD2, GAD3</i>	Увеличение содержания ГАМК

Помидор	<i>GABA-TP1, GABA-TP2, GABA-TP3, CAT9, SSADH</i>	Увеличение содержания ГАМК
Помидор	<i>SGR1, LCY-E, B1c, LCY-B1, LCY-B2</i>	Увеличение содержания ликопена
Помидор	<i>ALMT9</i>	Снижение содержания малата
Одомашнивание плодовых культур		
Помидор	<i>AGL6</i>	Производство партенокарпических плодов
Помидор	<i>IAA9</i>	Производство партенокарпических плодов
Помидор	<i>ARF7</i>	Производство партенокарпических плодов
Помидор	<i>MBP21</i>	Поклоение "без суставов" плодоножки
Помидор	<i>BOP1, BOP2, BOP3</i>	Раннее цветение с упрощенными соцветиями
Помидор	<i>SP, SP5G, CLV3, WUS, GGP1</i>	Введение признаков, связанных с морфологией, производством цветов и фруктов и синтезом аскорбиновой кислоты
Помидор	<i>SP, OVATE, MULT, FAS, SycB</i>	Введение признаков, связанных с морфологией, количеством цветов, размером и количеством томатов, а также синтезом ликопена
Помидор	<i>SP5G</i>	Генерация гибели чувствительных к длине дня растений томата
Огурец	<i>WIP1</i>	Поклоение гинекологических растений
Groundcherry	<i>SP, SP5G, CLV1</i>	Внедрение признаков, связанных с морфологией, производством цветов и размером плодов
Киви	<i>CEN4, CEN</i>	Создание компактного растения с быстрым терминальным развитием цветов и плодов

Примечание: CRISPR-Cas - кластеризованный регулярно перемежающийся короткий палиндромный повтор, связанный с CRISPR [8].

По данным ISSA в мире более 17 ГМ линий плодово-ягодных культур, которые являются зарегистрированными с целью выращивания и реализации в качестве пищевой продукции (табл. 3).

Таблица 3.

Перечень зарегистрированных в международной базе данных ГМ линий плодово-ягодных культур

Виды сельскохозяйственных культур	Название ГМ-линий	Страна производитель	Наличие ГМ- вставок
Яблони Arctic "Golden Delicious" (пониженная экспрессия полифенолоксидазы (<i>PPO</i>), не происходит потемнения при воздействии механических повреждений, таких как нарезка или образование синяков)	<i>GD743</i>	Канада, Соединенные штаты 2015	<i>nptII</i> , ген подавления <i>PGAS PPO</i>
Яблони Arctic (пониженная экспрессия полифенолоксидазы (<i>PPO</i>), не происходит потемнения при воздействии механических повреждений, таких как нарезка или образование синяков)	<i>GS784</i>	Канада, Соединенные штаты 2015	<i>nptII</i> , ген подавления <i>PGAS PPO</i>

Яблони ArcticFuji (пониженная экспрессия полифенолоксидазы (<i>PPO</i>), не происходит потемнения при воздействии механических повреждений, таких как нарезка или образование синяков)	<i>NF872</i>	Канада (2018, Соединенные штаты (2019))	<i>nptII</i> , ген подавления <i>PGAS PPO</i>
Сливы <i>Prunusdomestica</i> (устойчивость к вирусу оспы сливы)	<i>C-5</i>	Соединенные штаты (2009)	<i>nptII</i> , <i>ppv_cp</i> , <i>uidA</i>
Мускусная дыня канталупа (отложенное созревание)	Линия А	Соединенные штаты (1999)	<i>nptII</i> , <i>sam-k</i>
Мускусная дыня канталупа (отложенное созревание)	Линия В	Соединенные штаты (1999)	<i>nptII</i> , <i>sam-k</i>
Помидоры	<i>1345-4</i>	Канада, Мексика, США	<i>nptII</i> , <i>acc (truncated)</i>
Помидоры с замедленным созреванием	<i>35-1-H</i>	Соединенные штаты	<i>nptII</i> , <i>sam-k</i>
Помидоры устойчивые к чешуекрылым насекомым	<i>5345</i>	Канада, Соединенные штаты	<i>nptII</i> , <i>CryIAc</i>
Помидоры устойчивые к канамицину, со сниженным синтезом этилена	<i>8338</i>	Соединенные штаты	<i>nptII</i> , <i>ACCD</i>
Помидоры с замедленным созреванием	<i>B</i>	Мексика, Соединенные штаты	<i>nptII</i> , <i>pg (sense or antisense)</i>
Помидоры с замедленным созреванием	<i>Da</i>	Мексика, Соединенные штаты	<i>nptII</i> , <i>pg (sense or antisense)</i>
Помидоры с замедленным созреванием	<i>Da Dong No 9</i>	Китай	<i>Нет информации</i>
Помидоры с замедленным созреванием	<i>F (1401F, h38F, 11013F, 7913F)</i>	Канада, Мексика, США	<i>nptII</i> , <i>pg (sense or antisense)</i>
Помидоры с замедленным созреванием	<i>FLAVR SAVR</i>	Канада, Мексика, США	<i>nptII</i> , <i>pg (sense or antisense)</i>
Помидоры с замедленным созреванием	<i>Huafan No 1</i>	Китай	<i>anti-efe</i>
Помидоры (устойчивые к вирусным заболеваниям)	<i>PK-TM8805R (8805R)</i>	Китай	<i>cmv_cp</i>

Заключение

В данной статье приведена краткая оценка современных методов идентификации ГМ линий плодово-ягодных культур. На сегодняшний день современным и надежным методом определения ГМ линий плодово-ягодных культур является метод ПЦР-РТ. Основные преимущества метода ПЦР-РТ является его дешевизна, специфичность и чувствительность. Метод позволяет в кратчайшие сроки получить достоверные результаты на

наличие ГМО, идентифицировать ГМ линии и посчитать количество ГМО. Для получения более достоверных результатов о наличии ГМО, требуется применять комплексный подход (скрининг, идентификация и количество ГМО).

В условиях постоянного совершенствования технологий по созданию трансгенных растений необходимо улучшать научно-методическую базу, разрабатывать и внедрять в практику эффективные методы обнаружения ГМО, применять комплексный подход при лабораторной диагностике ГМО.

Список использованной литературы

1. **Bertille Duthoit**, The five: genetically modified fruit, International edition // Gene editing, Sun 13 Jan 2019, url:<https://www.theguardian.com/science/2019/jan/13/the-five-genetically-modified-fruit-edited-bananas-tomatoes>.
2. **Shahid Nazir, Muhammad Zaffar**, Molecular Identification of Genetically Modified Crops for Biosafety and Legitimacy of Transgenes // Gene Editing - Technologies and Applications, April 30th 2019.
3. **Комаров С.Г., Тигранян Т.С.**, Правовое регулирование генетически модифицированных продуктов в России // Успехи химии и химической технологии, том 110 №2 - 2016 -. С. 56-57.
4. International service for the acquisition of agri-biotech applications (ISAAA), url:<http://www.isaaa.org>.
5. Приказ Минсельхоза России от 04.04.2019 N 169«Об утверждении Методики производства молекулярно-генетического исследования генно-инженерно-модифицированных организмов, используемых для производства лекарственных средств для ветеринарного применения». url: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/72155308>.
6. ГОСТ Р 53244–2008 (ИСО 21570:2005) Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически-модифицированных организмов и

полученных из них продуктов. Методы, основанные на количественном определении нуклеиновых кислот.

url: <http://docs.cntd.ru/document/1200073607>. Ссылка активна на 30.07.2020.

7. The Food and Agriculture Organization (FAO),
url: [http://www.fao.org/food/food-safety-quality/gm-foods-platform/browse-information-by/oecd-unique-identifier/en/?page=14&ipp=30&tx_dynalist_pi1\[par\]=YToxOntzOjE6IkwiO3M6MDoiIjt9](http://www.fao.org/food/food-safety-quality/gm-foods-platform/browse-information-by/oecd-unique-identifier/en/?page=14&ipp=30&tx_dynalist_pi1[par]=YToxOntzOjE6IkwiO3M6MDoiIjt9).

8. **Karkute SG, Singh AK**, CRISPR/Cas9 Mediated Genome Engineering for Improvement of Horticultural Crops. *Front. Plant Sci.* 8:1635, 2017.

9. **Wang, T., Zhang, H. & Zhu, H.**, CRISPR technology is revolutionizing the improvement of tomato and other fruit crops. *Hortic Res* 6, 77 (2019). DOI: 10.1038 / s41438-019-0159-x.

10. **Broeders, Sylvia et al.**, Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods // *Trends in Food Science and Technology*, 2014. - №37 - С: 115-126.

11. **Kralik P, Ricchi M.**, A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything // *Front Microbiol* №8, 2017 – С. 108.

12. **Gerdes, Lars et al.**, A statistical approach to quantification of genetically modified organisms (GMO) using frequency distributions // *BMC Bioinformatics* №15, 2014 – С. 407.

13. Commission regulation (EU) No 619/2011 of 24 June 2011. Url:<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R0619&from=EN>.

14. TP TC 021/2011 Технический регламент Таможенного союза "О безопасности пищевой продукции" (с изменениями на 8 августа 2019 года).url:<http://docs.cntd.ru/document/902320560>.

I.A. Kapitova

A.A. Guzeeva

All-Russian Horticultural Institute for Breeding, Agrotechnology and Nursery,
Russia, Moscow

**MODERN METHODS OF IDENTIFICATION OF GM FRUIT CULTURES,
BASED IN DNA REPLICATION**