

Geenivirtatutkimus ristipölytteisillä kasveilla pelto-olosuhteissa

Maria Erkkilä¹⁾, Ruslan Kalendar²⁾ ja Alan Schulman^{1,2)}

¹⁾MTT Biotekniikka- ja elintarviketutkimus, Kasvigenomiikka 31600 Jokioinen, etunimi.sukunimi@mtt.fi

²⁾MTT/BI Kasvigenomiikan laboratorio, 00014 Helsingin yliopisto, etunimi.sukunimi@helsinki.fi

Tiivistelmä

Geenimuunneltujen (GM) lajikkeiden mahdollinen viljely Suomessa edellyttää ennakoivaa tutkimusta, jotta tavanomaisten, luonnonmukaisten ja geenimuunneltujen lajikkeiden rinnakkaiselo onnistuu eikä muunneltua geeniaainesta siirry tai GM-lajike sekaannu GM-vapaaseen materiaaliin tuotantoprosessin aikana. Sekoittumista voi tapahtua tuotantoketjun joka vaiheessa aina pellolta lopputuotteen pakkaamiseen ja merkintään asti. Kuitenkin ongelmallisempaa on pidettävä alkutuotannossa tapahtuvaa sekoittumista, koska se muodostaa tuotantoketjun ensimmäisen vaiheen. Siitepölyn leviämisen kautta tapahtuva geeniaineksen siirtyminen on erityinen riski ristipölytteisillä kasveilla (*Brassica*-suku).

Hankkeessa tutkittiin sekoittumisriskin todennäköisyyttä Suomen kasvuoloissa sekä kehitettiin menetelmäratkaisuja tilanteen hallitsemiseksi. Sekoittumisen seuraamiseksi kehitettiin herkkiä ja spesifisiä geenimerkkejä rypsin ja rapsin tunnistamiseen. Kokeet toteutettiin maksimaalisen riskin periaatteella käyttämättä kuitenkaan GM-lajikkeita, vaan riskejä arvioitiin tavanomaisten viljelyssä olevien lajikkeiden avulla. Geenimerkkejä käytettiin tutkittaessa geeniaineksen siirtymistä eri etäisyyksillä pelto-olosuhteissa kolmena perättäisenä kasvukautena 2004–2006.

Peltokokeissa noin 1 ha:n rapsi- ja 2 ha:n rypsi-pelto kylvettiin aivan rinnakkain. Lisäksi kylvettiin rypsiä näyteruutuja 100 m välein aina kilometrin päähän rapsipellosta. Pellolta kerättiin kasvukausien lopussa siemennäytteet, joista eristettiin DNA. Geenivirran tutkimiseksi kehitettiin retrotransposonipohjaiset geenimerkit sekä rapsin että rypsin genomille. Tässä tutkimuksessa käytetyt retrotransposonit eli toistojaksot esiintyvät genomissa monena kopiona ja oletettavasti useassa eri kromosomissa, joten ne ovat herkempiä kuin yhtenä kopiona genomissa olevat merkit. Geenimerkeillä tutkittiin mille etäisyydelle rapsin siitepöly voi kulkeutua eli kuinka kaukaa löydetään rypsin ja rapsin risteymiä.

Risteymiä, joissa näytteen sekoittumisaste oli yli 0,9 % löytyi runsaasti 275 m:iin asti ja alle 0,4 % sekoittumisasteella satunnaisesti aina kilometrin päästä rapsipellosta. Siitepölyn siirtymisen lajista toiseen mahdollisti rypsin ja rapsin osittain samanaikainen kukinta. Tuloksiin vaikuttivat myös käytetyt geenimerkit, kasvukausien sääolosuhteet ja muut ulkoiset tekijät, kuten mehiläisten, eläinten ja ihmisten aiheuttama siitepölyn leviäminen. Käytännössä ristisiittoisten kasvien kohdalla on mahdotonta välttää ristipölytystä, mutta EU:n säännösten mukainen alle 0,9 %:n sekoittumistaso voidaan saavuttaa. Geenivirtatutkimuksen perusteella voidaan todeta, että tavanomaisten, luonnonmukaisten ja geenimuunneltujen lajikkeiden rinnakkaiselon onnistumiseksi on huolehdittava riittävästä suojavyöhykkeistä, joiden leveyksiin vaikuttavat maaston muoto, tuulen suunta ja muiden lähellä olevien peltolohkojen kasvit.

Asiasanat: geenivirta, rapsi, rypsi, rinnakkaiselo

Johdanto

EU:n lainsäädännön mukaan viljelijällä on oikeus valita viljeleekö hän tavanomaisia, luonnonmukaisia tai geenimuunneltuja kasveja. Kuitenkin viljelijä voi valita vain EU:ssa hyväksytyjä GM-lajikkeita. Geenimuunneltujen (GM) lajikkeiden mahdollinen viljely Suomessa edellyttää ennakoivaa tutkimusta, jotta tavanomaisten, luonnonmukaisten ja geenimuunneltujen lajikkeiden rinnakkaiselo onnistuu eikä muunneltua geeniaainesta siirry tai GM-lajike sekaannu GM-vapaaseen materiaaliin tuotantoprosessin aikana. Sekoittumista voi tapahtua tuotantoketjun joka vaiheessa aina pellolta lopputuotteen pakkaamiseen ja merkintään asti. Lopputuote on merkittävä, jos GM:n osuus on 0,9 %. Kuitenkin ongelmallisimpana on pidettävä alkutuotannossa tapahtuvaa sekoittumista, koska se muodostaa tuotantoketjun ensimmäisen vaiheen. Siitepölyn leviämisen kautta tapahtuva geeniaineksen siirtyminen on erityinen riski ristipölytteillä kasveilla (esimerkiksi *Brassica*-suku).

Tunnetun GM-sovelluksen ollessa kyseessä voidaan sekoittuminen tavanomaiseen tai luomulajikkeeseen todeta monistamalla genomiin siirretty DNA PCR:llä (polymerase chain reaction). Sekoittumisen osoittaminen vaikeutuu, jos ei tiedetä, mikä sovellus on kyseessä. Vaihtoehtona tällöin on tutkia kaikki ko. kasvin tunnetut GM-sovellukset, mikä on varsin työlästä tai käyttää muita geenimerkkejä geenivirran toteamiseksi.

Hankkeessa tutkittiin riskien todennäköisyyttä Suomen kasvuoloissa sekä kehitettiin menetelmäratkaisuja tilanteen hallitsemiseksi. Sekoittumisen seuraamiseksi kehitettiin herkkiä ja spesifisiä geenimerkkejä lajikkeiden tunnistamiseen. Tutkimuksessa käytettiin rypsiä ja rapsia GM-riskien arvioinnin mallikasveina. Kokeet toteutettiin maksimaalisen riskin periaatteella käyttämättä kuitenkaan GM-lajikkeita, vaan riskejä arvioitiin tavanomaisten viljelyssä olevien lajikkeiden avulla. Geenimerkkejä käytettiin tutkittaessa geeniaineksen siirtymistä eri etäisyyksillä pelto-olosuhteissa kolmena perättäisenä kasvukautena 2004–2006.

Aineisto ja menetelmät

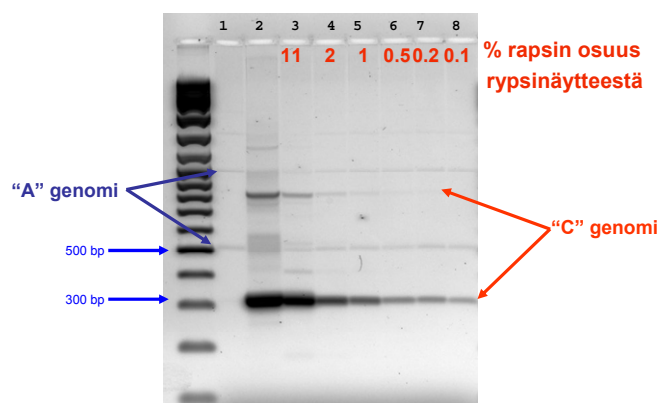
Tutkimuksessa käytetyt lajikkeet olivat Wildcat-rapsi sekä Hohto- ja Kulta-rypsi. Peltokokeissa noin 1 ha rapsi- ja 2 ha rypsi-pelto kylvettiin aivan rinnakkain vuosina 2004, 2005 ja 2006. Lisäksi kylvettiin rypsiä näyteruutuja 100 m välein aina kilometrin päähän rapsipellosta tuulen alapuolelle. Isosta pellosta kerättiin kasvukausien lopussa siemennäytteet 100 m²:n alalta rapsipellosta pois päin metrin välein 5 m:n asti ja 10 m:n välein 100 m:iin asti sekä rapsipellon suuntaisesti 20 m:n välein. Jokaisesta kerätyistä näytteistä laskettiin 3000 siementä, joista eristettiin DNA.

Geenivirran tutkimiseksi kehitettiin retrotransposonipohjaiset geenimerkit sekä rapsin (AACC) että rypsin (AA) genomille (kuva 1). Peltonäytteet tutkittiin tavallisella PCR:llä käyttäen 4 rapsi-spesifistä ja 2 rypsi-spesifistä geenimerkkiä. Lisäksi yhdestä rapsi-spesifisestä geenimerkistä tehtiin kvantitatiivinen PCR -sovellus. Tässä tutkimuksessa käytetyt retrotransposonit eli toistojaksot esiintyvät genomissa monena kopiona ja oletettavasti useassa eri kromosomissa, joten ne ovat herkempiä kuin yhtenä kopiona genomissa olevat merkit. Geenimerkeillä tutkittiin mille etäisyydelle rapsin siitepöly voi kulkeutua eli kuinka kaukaa löydetään rapsin ja rypsin risteymiä.

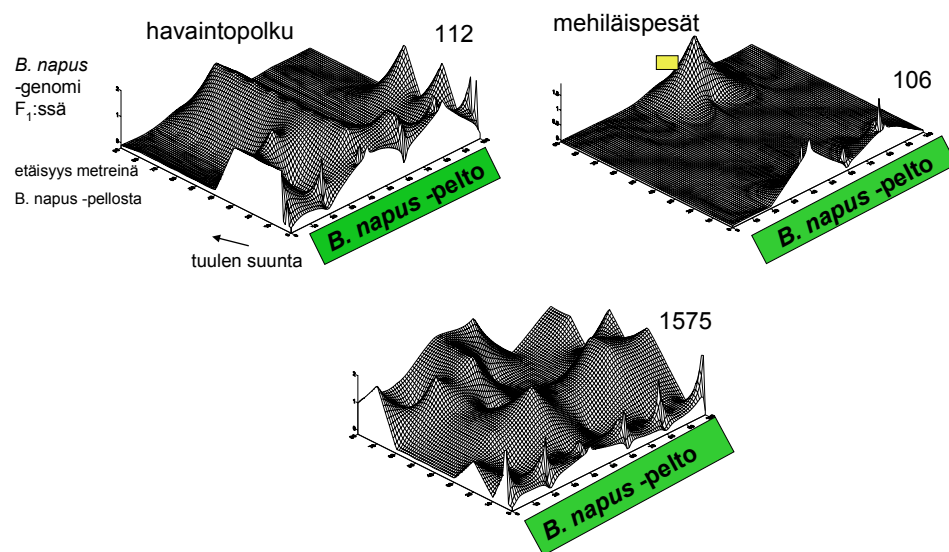
Tulokset ja tulosten tarkastelu

Ensinnäkin havaittiin, että tulosten toistettavuuteen vaikuttaa suuresti DNA:n laatu, koska huonosti puhdistettu DNA hajoaa säilytettäessä. Toiseksi havaittiin, että käytettäessä tavallista PCR-menetelmää käytetty geenimerkki vaikuttaa sekoittumisasteeseen. Tutkittaessa saman vuoden peltonäytteitä eri geenimerkeillä havaittiin hyvinkin poikkeavia esiintymiä risteymissä (kuva 2). Kolmanneksi havaittiin kasvukauden olosuhteiden vaikutus geenivirtaan. Verrattaessa eri vuosien tuloksia huomattiin, että v. 2004 todennäköisesti sateinen ja viileä kasvukausi aiheutti siitepölyn laskeutumisen lähelle rapsipeltoa. Vähemmän herkällä geenimerkillä 106 saatiin eniten risteymiä vuoden 2004 näytteillä myös kauemmaksi rapsipellosta. Muina vuosina tämä merkki antoi vain muutaman positiivisen tuloksen hyvin lähelle rapsipellon reunaa. Geenimerkillä 106 saatiin selvä vaste mehiläisistä kun taas herkemällä merkillä 112 tämä mehiläisten vaikutus jäi ihmisen vaikutuksen varjoon (kuva 2). Kaikkein herkimällä merkillä koko alue oli lähes täynnä risteymiä.

Tavallisella PCR:llä löydettiin risteymiä aina kilometrin päästä siitepölynlähteenä olleesta rapsipellosta. Tavallisella PCR:llä tulos on kvantitatiivinen eli nähdään onko rypsi-pellosta kerätyssä näytteessä rapsi-DNA:ta vai ei. Kvantitatiivisella PCR:llä saadaan selville mikä on rapsi-DNA:n suhteellinen osuus koko näytteen DNA-pitoisuudesta.



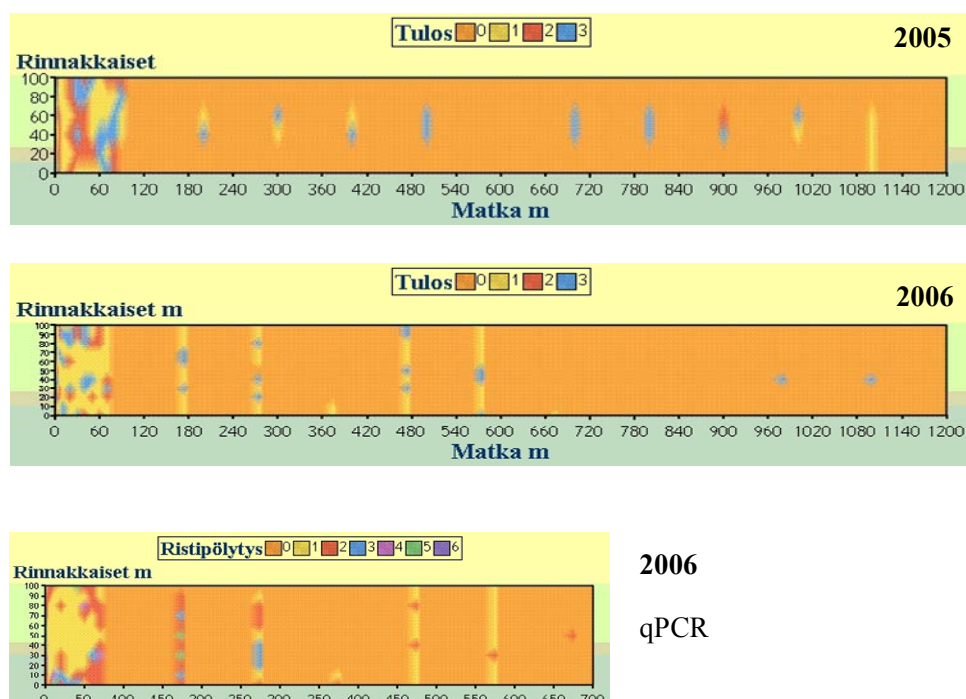
Kuva 1. Retrotransposonipohjaisen geenimerkin 106 herkkyys. EtBr-värjätty PCR-näytteet ajettuna agarosigeelillä. Näyte 1) 100 % rypsi-DNA, 2) 100 % rapsi-DNA, 3) – 8) 11 - 0,1 % rapsi-DNA:ta rypsinäytteessä.



Kuva 2. Geenimerkkien herkkyysien vertailu sekä olosuhteiden vaikutus geenivirtaan. Vuoden 2005 peltokokeen geenivirtatulokset 100 m² alalta. Vihreä alue merkitsee rapsipellon reunaan. Piikkien huiput osoittavat rypsellostä löytyneiden risteymien kohdat.

Kaikkein herkimmälle geenimerkille tehtiin myös kvantitatiivinen PCR -sovellus. Tällä menetelmällä löydettiin risteymiä, joissa näytteen sekoittumisaste oli yli 0,9 % runsaasti 275 m:n asti ja satunnaisesti alle 0,4 % sekoittumisasteella v. 2005 kilometrin ja v. 2006 noin 700 m:n päästä rapsipellosta (kuva 3).

Geenimerkki (1574 + 1575)



Kuva 3. Vuosien 2005 ja 2006 peltokokeiden geenivirtatulokset geenimerkillä (1574 + 1575). Kuvassa rypsi-pelto ja koeruudut on merkitty 1 keltaisella, koeruutujen välissä kasvanut vilja on merkitty 0 oranssilla. Siitepölyn lähteenä ollut rapsipelto ei näy kuvassa, mutta se sijaitsi aivan rypsi-pellon vieressä 0-linjan vasemmalla puolella. Ylempissä kuvissa punainen ja sininen väri osoittavat kyseisen kohdan rypsiemennäytteestä löytyneen rapsi-DNA:ta. Alimmissa qPCR-kuvassa värit osoittavat sekoittumisasteen eli sen montako % rapsi-DNA:ta löytyi rypsi-pellosta kerätyistä näytteistä: 2 punainen 0,1 - 0,40 %; 3 sininen 0,41 – 0,90 %; 4 pinkki 0,91 – 1,80 %; 5 vihreä 1,81 - 3,70 %; 6 violetti > 3,71 %. qPCR = quantitative PCR.

Johtopäätökset

Siitepölyn siirtymisen lajista toiseen mahdollisesti rypsin ja rapsin osittain samanaikainen kukinta. Tuloksiin vaikuttivat myös käytetyt geenimerkit, kasvukausien sääolosuhteet ja muut ulkoiset tekijät, kuten mehiläisten ja ihmisten aiheuttama siitepölyn leviäminen. Käytännössä ristisiittoisten kasvien kohdalla on mahdotonta välttää ristipölytystä, mutta alle 0,9 %:n sekoittumistaso voidaan saavuttaa.

Geenivirtatutkimuksen perusteella voidaan todeta, että tavanomaisten, luonnonmukaisten ja geenimuunneltujen lajikkeiden rinnakkaiselon onnistumiseksi on huolehdittava riittävästä suojavyöhykkeistä, joiden leveyteen vaikuttavat maaston muoto, tuulen suunta ja muiden lähellä olevien peltolohkojen kasvit.