



YMPÄRISTÖN-
SUOJELU

Katileena Lohtander-Buckbee, Kirsi Törmäkangas
ja Marja Ruohonen-Lehto

Menetelmien valinta muuntogeenisten kasvien ympäristövaikutusten arviointiin ja seurantaan



Katileena Lohtander-Buckbee, Kirsi Törmäkangas
ja Marja Ruohonen-Lehto

Menetelmien valinta
muuntogeenisten kasvien
ympäristövaikutusten
arviointiin ja seurantaan

HELSINKI 2004

Julkaisu on saatavana myös Internetissä
www.ymparisto.fi/julkaisut

ISBN 952-11-1889-X
ISBN 952-11-1890-3
ISSN 1238-7312

Kannen valokuva: Ilkka Toivonen
Taitto: Callide/Terttu Halme

Edita Print Oy
Helsinki 2004

Alkusanat

Uudistetussa, tarkoituksellista muuntogeenisten organismien ympäristöön leviämistä säätelevässä EU:n direktiivissä 2001/18/EY on kirjattu ensi kertaa ympäristöriskien arvioinnin periaatteet. Ala on kuitenkin niin uusi, ettei vakiintuneita tutkimusmenetelmiä muuntogeenisten, eli geenitekniikalla muunnettujen kasvien (GM-kasvien) ympäristövaikutusten tutkimiseen ja seurantaan vielä ole.

Riskien arvioinnin perustana on kasviin siirretty uusi ominaisuus (esim. herbisidikestävyys tai hyönteiskestävyys) ja sen toiminta uudessa ympäristössä (uudessa kasvissa). Siksi eri GM-kasvien mahdolliset ympäristövaikutukset voivatkin olla hyvin erilaisia, riippuen siirretystä ominaisuudesta ja käytetystä kasvista. Tästä syystä GM-kasvien ympäristövaikutusten tutkimiseen on mahdotonta tarjota valmista menetelmäpakettia. Tämän raportin tarkoituksena onkin listata sellaisia tutkimusmenetelmiä, joiden toivomme soveltuvan riskinarvioinnissa esiin tulleiden tietotarpeiden täyttämiseen. Raportissa tarkastellaan viimeaikaisia GM-kasvien ympäristövaikutuksista tehtyjä tutkimuksia ja esitellään niissä käytettyjä menetelmiä.

Raportissa käsitellään yksinomaan GM-kasvien ympäristövaikutuksia; terveysvaikutuksia tai mahdollisia taloudellisia tai sosiaalisia vaikutuksia ei käsitellä lainkaan. Raportissa tarkastellaan myös jonkin verran GM-kasveihin liittyvää kansallista ja EU:n lainsäädäntöä, sekä käsitellään lyhyesti GM-kasvien viljelyn seurantaan ja riskienhallintamenetelmiin liittyviä kysymyksiä.

Raportti on kirjoitettu ympäristöministeriön rahoituksella. Tahdomme kiittää ympäristöministeriön ylitarkastajaa Jyrki Pitkäjärveä projektin ideoinnista. Hanna Pasosta Helsingin yliopistosta ja Irma Saloniemeä Turun yliopistosta kiitämme lämpimästi käsikirjoituksen tarkastamisesta. Lisäksi kiitämme Leena Myllystä Turun yliopistosta molekyyli- ja geenitekniikan osaston ja erityisesti fylogeniaa käsittelevän osuuden asiantuntevasta kommentoinnista sekä Magnus Nyströmiä SYKEstä kuvailulehden ruotsinnoksesta.

Helsingissä lokakuussa 2004

Tekijät



Sisällys

Alkusanat	3
Sanasto	7
1 Johdanto	9
2 GM-kasvien viljelyn mahdolliset positiiviset ympäristövaikutukset	
3 GM-kasveihin yleisesti liitetyt ympäristöriskejä	13
3.1 Invaasiokyky	14
3.2 Geenivirta	15
3.2.1 Hybridisaatio ja introgressio	15
3.2.2 Horisontaalinen geenin siirtyminen	17
3.3 Vaikutukset muihin kuin kohde-eliöihin (nontarget effects)	19
3.3.1 Vaikutukset maaperän mikrobeihin	20
3.3.2 Vaikutukset muihin kuin kohde-eläimiin	20
3.3.3 Välilliset vaikutukset	21
3.4 Muut vaikutukset	22
4 Suomen luonnon erityispiirteet ja täällä mahdollisesti käyttöön otettavat GM-sovellukset	24
5 Riskinarviointi	26
6 Seuranta	31
7 Tutkimusmenetelmät	33
7.1 Invaasiokyky	35
7.2 Geenivirta	45
7.2.1 Hybridisaatio ja introgressio	45
7.2.2 Horisontaalinen geenin siirtyminen (HGT)	57
7.3 Vaikutukset muihin kuin kohde-eliöihin	62
7.3.1 Vaikutukset maaperän mikrobeihin	62
7.3.2 Vaikutukset eläimiin	68
8 Riskinhallinta	77
9 Viranomaisten kannalta merkittäviä tekijöitä GM-kasvien ympäristövaikutusten tutkimuksessa	79
10 Yhteenveto	82
Lähteet	86
Liite 1. Valikoituja menetelmiä	112
Liite 2. Esimerkki herbisidikestävien GM-kasvien viljelyn välillisistä ympäristövaikutuksista (FSE:t)	123
Kuvailulehdet	128



Sanasto

agrobakteeri	maabakteeri, joka pystyy siirtämään DNA:ta plasmidistaan kasvin genomiin
aitotumallinen eli eukaryootti	yksi- tai monisoluinen eliö, jolla on solun tumaa ympäröivä tumakalvo
alkeistumallinen eli prokaryootti	eliö, jolla ei ole solun tumaa ympäröivää tumakalvoa; bakteerit ja arkkibakteerit
allelopatia	kasvi ehkäisee toisen kasvin kasvua haitallisten sekundääriyhdisteiden avulla
biodiversiteetti	luonnon monimuotoisuus, joka sisältää lajien välisen ja lajien sisäisen monimuotoisuuden ja erilaisten elinympäristöjen vaihtelun
bioremediaatio	saastuneen maaperän tai veden puhdistaminen mikrobien tai kasvien avulla
Bt-toksiini	<i>Bacillus thuringiensis</i> -bakteerin tuottama proteiini, joka on myrkyllinen tietyille eläimille (yleensä perhosille tai kova-kuoriaisille). Bt-toksiinia käytetään hyönteistorjunta-aineena
detritus	kuollut eloperäinen materiaali
detrivori	eläin, joka käyttää ravintonaan kuollutta eloperäistä materiaalia
DNA	deoksiribonukleiinihappo; deoksiribonukleotideista koostuva polymeeri, solun perinnöllinen aines
dormanssi	esim. siemenen tai itiön lepovaihe
ekosysteemi	eliöyhteiskunnan ja sen elottoman ympäristön välinen järjestelmä
endoparasiitti	sisälöinen
entsyymi	kemiallista reaktiota nopeuttava proteiini
geeni	perintötekijä; nukleiinihapon osa, joka sisältää informaation proteiinien valmistamiseksi
genomi	eliön kromosomisto perintötekijöineen
herbisidi	rikkakasvien torjunta-aine
herbivori	kasviravintoa käyttävä eläin
HGT	horisontaalinen geeninsiirtyminen, geneettisen materiaalin siirtymistä muuten kuin suvullisen lisääntymisen yhteydessä
homologinen	samansyntyinen ominaisuus
homoplasia	konvergenttisen (samankaltaisten ympäristötekijöiden aiheuttamat samankaltaiset ominaisuudet eliöillä, joilla ei yhteistä kantamuotoa) evoluution tuloksena syntynyt samankaltaisuus
hybridi	kahden perimältään erilaisen vanhemman jälkeläinen
hybridisaatio	risteytyminen (tai myös toisiaan vastaavien yksijuosteisten nukleiinihappojen pariutumisen emäspariutumisen kautta)
ilmentyminen	ekspressio; esim. DNA:n koodaaman proteiinin tuottaminen
integroituminen	DNA-jakson liittyminen isäntäsolun DNA:han
introgressio	geenien siirtyminen genomien pysyväksi osaksi toiseen saman lajin populaatioon tai toiseen lajiin risteytymisen ja takaisin risteytymisen kautta
introni	geenin koodaavien jaksojen välissä olevat DNA-alueet, jotka silmukoidaan pois lähetti-RNA:sta
invasiivinen	leviävä, tehokkaasti levittäytyvä

jääntikasvi	viljelyn loppumisen jälkeen viljelyalalla kasvava kasvi
kallussolukko	esim. soluviljelystä saatuja erilaistumattomia kasvisoluja
kelpoisuus	<i>fitness</i> ; esitetään yleensä yksilön elinikäisenä jälkeläis- tuotannon menestyksenä
kodominanssi	molemmat alleelit ilmenevät eliön ulkoasussa
koirassteriili	yksilö, joka ei tuota toimivia koiraspuolisia sukusoluja
konjugaatio	bakteerisolun perimä siirtyy luovuttajabakteerista vastaan- ottajabakteeriin, tapahtuma vaatii solujen kosketusyhteyttä
konstruktio	geenitekniikalla aikaansaatu nukleiinihapporakenne, joka sisältää halutut geenit ja säätelyalueet
maternaalinen	äidinpuoleinen merkkigeeni, jota koodaamiensa ominai- suuksien (esim. väri) ansiosta voidaan käyttää siirtogeenisen eliön tunnistamiseen
mykorritsa	kasvin juuren ja mykorritsasienten muodostama sienijuuri
naarassteriili	yksilö, joka ei tuota toimivia naaraspuolisia sukusoluja
nukleiinihappo	yksi- tai kaksijuosteinen DNA tai RNA
parasiitti	loinen
patogeeni	eliö, joka aiheuttaa sairautta muille eliöille
pleiotrooppinen	geenin vaikutus useampaan kuin yhteen ominaisuuteen
promoottori	RNA-synteesin aloituskohtaa edeltävä DNA-alue geenin säätelyalueella
rekombinaatio	erillisten genomien perintöaineksen yhdistyminen
retrovirus	virus, joka tuottaa DNA:ta RNA-juosteen mallin mukaan käänteiskopioijaentsyymien avulla
ritsosfääri	kasvin juuristo
RNA	ribonukleiinihappo, ribonukleotideista koostuva polymeeri, joka vie DNA:n informaation tuman ulkopuolelle ja toimii proteiinisynteesin mallina
säätelyalue	DNA-jakso, joka ohjaa geenin toimintaa esim. ohjaamalla geenin ilmentymään vain tietyssä solukossa
terminaattori	RNA-synteesin lopetuskohdan jälkeinen DNA-alue
toksisuus	myrkyllisyys
transduktio	DNA:n siirtyminen bakteerista toiseen bakteriofagien (bakteereja infektoivien virusten) välityksellä
transformaatio	DNA:n siirtyminen eliöiden välillä vapaan DNA:n välityk- sellä; tarkoittaa myös geenien siirtämistä eliöstä toiseen geenitekniikan avulla
transposoni	DNA-jakso, joka voi itsenäisesti muuttaa paikkaa kromo- someissa tai plasmideissa
tulokaslaji	lajit, jotka eivät varsinaisesti kuulu jonkin alueen alku- peräiseen eliöstöön vaan ne ovat kulkeutuneet alueelle esim. ihmisen mukana
valintaetu	ominaisuus, jonka ansiosta yksilö voi tuottaa enemmän jälke- läisiä kuin sellainen yksilö, jolla ei kyseistä ominaisuutta ole

Johdanto

Kasvien geeniteknisessä muuntamisessa vieras DNA-pätkä, joka voi olla peräisin mistä tahansa eliöstä (tai joka voi periaatteessa olla synteettinen rakennelma), siirretään kasvin soluun niin, että se jää genomin pysyväksi osaksi ja periytyy jälkeläisille. Haluttuja geenejä voidaan siirtää kasviin joko suoraan partikkelipommituksen avulla (Klein ym. 1987) tai käyttäen hyväksi agrobakteerin (*Agrobacterium tumefaciens* tai *A. rhizogenes*) geeninsiirtokykyä (Bevan ym. 1983; Fraley ym. 1983). Useita muitakin geeninsiirtomenetelmiä on kehitetty, mutta kaksi edellämainittua ovat yleisimmin käytettyjä. Partikkelipommituksessa metallihiukkasia päällystetään siirrettävällä DNA:lla, ja hiukkaset ammutaan suoraan kasvisolukokoon, jolloin DNA integroituu kasvin genomiin. Agrobakteeri on bakteeri, joka luontaisestikin siirtää osan DNA:staan (T-DNA) kasvisoluun aiheuttaen kasvissa aitosyövän. Agrobakteerin T-DNA:n geenejä voidaan korvata halutuilla siirrettävillä geeneillä, jotka agrobakteeri-infektion ansiosta siirtyvät kasvin genomiin (ks. esim. Shaw ym. 1983). Agrobakteerimenetelmä tuottaa alhaisemman kopiomäärän siirtogeenejä solussa verrattuna suoraan (partikkelipommitus) menetelmään, ja lisäksi siirretyt geenit integroituvat yleensä aktiivisesti toimivaan genomiin osaan, mikä lisää siirtogeenin ilmentymistodennäköisyyttä (Wisniewski ym. 2002). Toisaalta menetelmä ei sovellu kaikkien kasvien (esim. useimmat yksisirkkaiset) geenitekniiseen muuntamiseen. Joidenkin kasvien, kuten esim. lituruohon (*Arabidopsis thaliana*) kohdalla GM-kasvien tuottamiseen riittää, että kasvi kastetaan agrobakteereita sisältävään liuokseen, jolloin osasta kasvin tuottamia siemeniä kasvaa siirtogeenisiä kasveja. Toisten kasvien kohdalla muuntaminen onnistuu ainoastaan kallussolukkoviljelmiä käyttämällä.

Halutun geenin lisäksi siirrettävässä DNA-yhdistelmässä on erilaisia merkki-geenejä (esim. antibioottiresistenssigeeni) sekä säätelyalueita (promoottorit, terminaattorit), jotka ovat yleensä peräisin viruksista tai kasveista. Siirtogeenin ajallista ja/tai paikallista ilmentymistä voidaan säädellä valitsemalla GM-yhdistelmään erilaisia geenin säätelyosia. Esimerkiksi yleisesti käytetty kukkakaalin mosaiikkiviruksen (CaMV) 35S-promoottori ilmentää (DNA → RNA → proteiini) säätelimiään geenejä jatkuvasti kasvin kaikissa solukoissa. Käyttämällä muita promootto-reita geeni voidaan saada ilmentymään esim. ainoastaan haavoittumisen yhteydessä tai vaikkapa pelkästään siitepölyn muodostumisen yhteydessä (katso esim. Kyojuka ym. 1991; Su ym. 1998). Kasvin tietyn oman geenin ilmentyminen voidaan myös estää siirtämällä kasviin käänteinen kopio samasta geenistä (antisense-teknologia). Siirretyt geenit ilmentyminen voi toisinaan vaimentua tai muuten muuttua GM-kasvissa ja sen suvullisissa jälkeläisissä, johtuen homologiasta eri siirtogeenien tai siirtogeenin ja perimässä ennestään olleiden geenien välillä (Meyer 1995; Baulcombe ym. 1996; Matzke 2002). Yksi ensimmäisistä kaupalliseen leviytykseen hyväksytyistä geenitekniikalla muunnetuista kasveista oli tomaatti, jonka soluseinää hajottavan entsyymin geeni oli vaimennettu siten, että GM-tomaatti oli pidempään säilyvä kuin muuntamattomat tomaatit (ks. Henkel 1995).

Suurin osa kaupallisesti hyödynnettävistä siirtogeenisistä kasveista kuuluu muutamaan viljelykasvilajiin ja GM-kasvien tuotanto keskittyy muutamaan maahan. GM Science Review'n (2003) mukaan vuonna 2002 GM-kasveja viljeltiin noin 59 miljoonan hehtaarin alueella, mistä suurin osa (99 %) neljässä maassa: Yhdys-

valloissa (66 %), Argentiinassa (23 %), Kanadassa (6 %) ja Kiinassa (4 %). GM-kasvien viljelyssä käytetystä maa-alasta 95 % oli käytössä kolmen kasvilajin, eli soijapavun (*Glycine max*; 62 %), maissin (*Zea mays*; 21 %) ja puuvillan (*Gossypium hirsutum*; 12 %) viljelyssä. Myös rapsi (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) ja juurikkaat (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*) ovat jokseenkin yleisesti viljeltyjä GM-kasveja. Vuonna 2003 GM-kasvien viljelyala oli kasvanut 15 % edellisestä vuodesta (ks. [www-sivu http://www.afa.com.au/biotechpdf/05_2004_World_GM_Crop_Statistics.pdf](http://www.afa.com.au/biotechpdf/05_2004_World_GM_Crop_Statistics.pdf)) ja oli 67,7 miljoonaa hehtaaria.

Kasvien geeniteknisessä muuntamisessa käytetään yleensä yksittäisiä ominaisuuksia (merkkigeenien ja säätelyalueiden lisäksi). Tähän asti suurimpaan osaan, eli 75 %:iin viljeltävistä GM-kasveista on lisätty herbisidikestävyuden (vastustuskyky rikkakasvihävitteille) aikaansaava geeni. Toinen yleinen viljelykasveihin siirretty ominaisuus on hyönteiskestävyys (Bt-toksiinin tuotto; 15 %), joka on peräisin *Bacillus thuringiensis* -bakteerista. Nimensä mukaisesti hyönteiskestävyysominaisuus suojaa kasvia hyönteisiä (etenkin perhosia; *Lepidoptera* ja kovakuoriaisia; *Coleoptera*) vastaan. Joissakin tapauksissa sekä herbisidi- että hyönteiskestävyys on siirretty samaan kasviin (GM Science Review 2003). Tulevaisuudessa käytettävien enemmän kasvien laadullisiin ominaisuuksiin (esim. muunnellut proteiini-, tärkkelys-, rasva- tai vitamiinikoostumukset) sekä stressinsietoon (esim. kylmän ja kuivuudenkestävyys) vaikuttavia geenejä. Lisäksi GM-kasvien käyttö biomasan, teollisten yhdisteiden ja lääkkeiden sekä rokotteiden valmistuksessa tulee luultavasti yleistymään (Moire ym. 2003; Warchescha & Mason 2003). Jonkin verran on myös tehty tutkimusta GM-kasvien käytöstä saastuneen maa-aineksen puhdistamisessa (fytoimediaatio; katso esim. Pilon-Smits & Pilon 2002).

Vuodesta 1996 vuoteen 1999 GM-kasvien viljelyala kasvoi koko maailmassa kaksikymmenkertaisesti (James 1999). Viljelyn lisäksi muuntogeenisiä kasveja oli vuoteen 2001 mennessä testattu 1726 kenttäkokeessa EU:n jäsenvaltioissa ja 7815 kenttäkokeessa Yhdysvalloissa. EU:n jäsenvaltioiden viljely kattaa maailanlaajuisesta GM-kasvien viljelyalasta muutaman tuhat hehtaaria ja oli vuoden 2002 tuotannosta ainoastaan noin 0,03 % (Brandt 2003). Suomessa on vuoteen 2003 mennessä raportoitu 17 GM-kasvikenttakoetta (+ kaksi muuta GM-organismia). Vertailun vuoksi Ruotsissa GM-kasvien kenttäkokeita raportoitiin vuoteen 2003 mennessä 65 kappaletta, näistä suurimmassa osassa kasvatettiin muuntogeenista perunaa.

Geenitekniikan käytön yleistymisen myötä on alettu kiinnittää entistä enemmän huomiota GM-kasvien viljelystä mahdollisesti aiheutuviin ympäristövaikutuksiin. Geenitekniikan ympäristöriskien arviointi pohjautuu biologiseen, ekologiseen, populaatiogeneettiseen ja molekyylibiologiseen tutkimustietoon. Riskinarvioinnin vaativuus kasvaa sovellusten laajuuden ja pitkäaikaisuuden myötä. Riskinarviointijärjestelmien ja niissä sovellettavien tutkimusmenetelmien kehittäminen on ollut toistaiseksi varsin vähäistä. Ongelmallisia asioita ovat mm. riskinarviointia palvelevan tutkimuksen niukkuus, ekologisten vaikutusten vaikea ennustettavuus ja soveltuvien tutkimusmenetelmien valinta. Aivan hiljattain on kuitenkin ilmestynyt laajoja, GM-kasvien viljelyn ympäristövaikutuksia arvioivia tutkimuksia (esim. Field Scale Evaluations; katso Perry ym. 2003; Squire ym. 2003), jotka voivat auttaa GMO:ien ympäristövaikutusten tutkimusmenetelmien suunnittelussa ja valinnassa.

GM-kasvien viljelyn mahdolliset positiiviset ympäristövaikutukset

2

Geenitekniikan käytöllä saattaa joissakin tapauksissa olla ympäristön kannalta edullisia vaikutuksia. Esimerkiksi jos kasvi tuottaa siirretyn ominaisuuden (esim. viruskestävyyden) seurauksena suuremman sadon pienemmällä alueella, voi uusien viljelyalojen tarve periaatteessa pienentyä.

Myös herbisidien määrän vähenemisellä voi olla edullisia ympäristövaikutuksia. Toisaalta Martinez-Ghersa ym. (2003) mukaan vielä ei ole saatu näyttöä siitä, että herbisidikestävien GM-kasvien käyttöönoton myötä viljelyn kustannukset olisivat laskeneet tai sadot suurentuneet. Champion ym. (2003) vertasivat herbisidien käyttömääriä ja käytettyjen tehoaineiden (AI; active ingredient) käyttömääriä herbisidikestävien GM-kasvien (maissi, sokerijuurikas, rapsi) ja muuntamattomien verrokkien välillä. Tutkimuksen mukaan herbisidikestävät GM-juurikkaat (*Beta vulgaris*) ja -rapsi (*Brassica napus ssp. oleifera*) selvisivät huomattavasti harvemmillä herbisidikäsittelyillä kuin vastaavat perinteisesti viljellyt kasvit. Maissilla taas tarvittiin sekä GM- että perinteisessä viljelyssä jokseenkin yhtä monta käsittelyä. Kokeessa tehoaineiden käyttömäärät olivat lähes kaikilla tutkituilla GM-kasveilla merkittävästi pienemmät kuin verrokeilla. Ainoastaan rapsin viljelyssä käytettyjen tehoaineiden määrä ei eronnut merkittävästi GM-kasvien ja verrokkien välillä (Champion ym. 2003). Toisaalta tutkimuksessa havaittiin biodiversiteetin pienenemistä GM-kasvialoilla verrattuna perinteisillä herbisideillä käsiteltäviin viljelyksiin, johtuen käytetyistä rikkakasvikäsittelyistä.

Joidenkin tietojen mukaan (katso GM Science Review 2003) herbisidikestäviä GM-kasveja kasvatettaessa tarve maanmuokkaukseen vähenee. Tämä voi puolestaan vähentää viljelyn ympäristöhaittoja mm. vähentyneen eroosion ja lisääntyneen hiilensidonnan myötä.

Perinteiset hyönteistorjunta-aineet tuhoavat kaikki hyönteiset, niin pölyttäjät kuin tuholaisetkin. Maaperäbakteereista (*Bacillus thuringiensis*) peräisin olevien Bt-toksiinien vaikutus on sen sijaan jokseenkin valikoivaa ja mm. luomuviljelijät ovat perinteisesti käyttäneet Bt-toksiineja luonnonmukaisina hyönteistorjunta-aineina (ks. esim. Gatehouse ym. 2002). Hilbeck ym. (1998a) mukaan Bt-toksiini ja niitä ilmentävät kasvit ovat ympäristöystävällisempiä kuin yksikään muista käytössä olevista hyönteistorjuntamenetelmistä ja Bt-toksiinien ilmentyminen itse kasveissa voi periaatteessa vähentää hyönteistorjunta-aineiden käyttömääriä. Kuitenkin GM Science Review'n (2003) mukaan Bt-kasvien viljelystä ei välttämättä koidu lainkaan ympäristöhyötyä verrattuna perinteiseen viljelyyn (tai hyötyä syntyy rajallisesti) tilanteissa, jossa Bt-kasvit tarvitsevat ylimääräisiä hyönteistorjunta-aineruiskutuksia kohdehyönteisten kontrollointiin tai sekundaaristen tuhoilaisten (joita Bt-toksiini ei pidä kurissa) kontrollointiin.

Eräs perunassa kasvaimia aiheuttava ankeroinen (*Globodera pallida*) on merkittävä tuholainen perunaviljelyksillä Britanniassa. Perinteisesti ankeroisen torjuntaan käytetään yhdisteitä (oksimikarbamaatti), jotka ovat myrkyllisiä useimmille eläimille. Britanniassa on kuitenkin kehitetty ankeroiskestävä GM-peruna, johon on siirretty riisin kystatiinia (proteinaasi-inhibiittori) tuottava geeni. Alustavien kokeiden mukaan GM-kystatiiniperunan viljely on vaaratonta maaperämikroobeille sekä tutkituille niveljalkaisille, mutta ehkäisee tehokkaasti anke-

roisten lisääntymistä (Urwin ym. 2001). Kystatiinia ilmentävän GM-perunan viljely voi siis aiheuttaa vähemmän ympäristövaikutuksia kuin perinteinen viljely, jossa käytetään torjunta-aineita.

Sieni- ja bakteeritauteja kestävien lajikkeiden kehittäminen ja viljeleminen voi vähentää torjunta-aineiden käyttömääriä ja niiden jäämiä maaperässä ja sadossa (ks. Häikiö & Kangasjärvi 1999). Myös esim. homeista peräisin olevat myrkylliset aineet voisivat vähentyä ravintokasveissa. Kuivuuden- ja/tai suolankestävien GM-kasvien viljelyllä voisi periaatteessa vähentää/hidastaa aavikoitumista (Huang ym. 2002). Toisaalta kuivissa ja suolaisissa oloissa voidaan kasvattaa myös muuntamattomia kasveja.

Teollisuuden, kaivostoiminnan ja maanviljelykemikaalien saastuttamien maiden puhdistaminen perinteisillä menetelmillä on kallista ja työlästä. Kasvien käyttö esim. raskasmetallien poistamiseen maaperästä toimii aurinkoenergialla ja käsittely voidaan tehdä paikan päällä muiden menetelmien ohella (Pilon-Smits & Pilon 2002). Maaperää tavallisia kasveja tehokkaammin puhdistavia GM-sovelluksia voisivat olla esim. nopeakasvuiset sareptansinappi (*Brassica juncea*) tai erilaiset poppelit (*Populus spp.*), joiden metallikestävyyttä ja -kertyvyttä on geeniteknisin menetelmin paranneltu (Pilon-Smits & Pilon 2002). Hiljattain on myös kehitetty lituruoho (*Arabidopsis thaliana*), jonka avulla voidaan etsiä maamiinoja. Muuntogeeninen lituruoho muuttuu punaiseksi kun sen juuret joutuvat kosketuksiin tiettyjen miinoista liukenevien aineiden kanssa (ks. <http://www.gene.ch/genet/2004/Jan/msg00117.html>).

GM-kasveihin yleisesti liitettyjä ympäristöriskejä

Mielipiteet muuntogeenisten kasvien ympäristövaikutuksista vaihtelevat. Esim. brittiläisen GM Science Review (2003) -raportin mukaan vielä ei ole saatu pitävää näyttöä siitä, että GM-viljelystä olisi koitunut ympäristölle suurempaa haittaa kuin perinteisestä maanviljelystä huolimatta siitä, että GM-kasvisatoa on jo tuotettu ja kulutettu monta miljoonaa tonnia. Vielä ei ole kuitenkaan saavutettu yksimielisyyttä siitä, kuinka paljon ja kuinka kauan GM-kasveja tulisi viljellä, ennen kuin niiden hyväksyttävästä turvallisuudesta voidaan tehdä yleisiä johtopäätöksiä. Dale ym. (2002) mukaan nykyisen tietämyksen perusteella ei ole vakuuttavaa näyttöä siitä, että GM-kasvit olisivat pohjimmiltaan erilaisia kuin muuntamattomat kasvit ja että niiden viljelyn mahdolliset ympäristövaikutukset ovat verrattavissa perinteisessä maanviljelyssä ilmeneviin haittoihin (esim. kasvien leviämiskyky, rikkamaisuus, toksisuus, vaikutukset biodiversiteettiin).

GM-kasvien mahdolliset ympäristövaikutukset riippuvat sekä siirretystä ominaisuudesta että kasvilajista, johon ominaisuus/ominaisuudet on siirretty. Muuntogeenisten kasvien käytössä on uutta se, että kasvissa voi olla ominaisuus, joka on siirretty siihen hyvin erilaisesta organismista. Tällaisissa tapauksissa ei voida olla varmoja siitä, vaikuttaako geeni uudessa geneettisessä ympäristössä arvaamattomalla tavalla, esim. vaikuttamalla haitallisesti eliöiden (symbiontit, loiset) väliseen vuorovaikutukseen. Näihin kysymyksiin ei löytyne yksiselitteisiä vastauksia, vaan jokainen tapaus on tutkittava erikseen.

Seidler ja Levin (1994) mukaan riskinarvioinnin kannalta olennaisia tutkimusaiheita ovat

- siitepölyvirran monitorointi,
- hybridien jäljittäminen,
- muuntogeenisten kasvien siementen maaperässä säilymisen tutkiminen ja
- maaperän eliöyhdyskuntiin kohdistuvien (muihin kuin kohdeorganismeihin kohdistuvien) vaikutusten tutkiminen.

Giovannetti ym. (2003) mukaan tähänastisen tutkimuksen perusteella merkittävimmiksi osoittautuneet GM-kasvien viljelyn ympäristöriskit ovat

- siirtogeenien leviäminen ympäristöön GM-kasvien siitepölyn tai siementen mukana sekä leviämistä seuranneen introgression ympäristövaikutukset
- horisontaalinen geenien siirtyminen GM-kasveista maaperäbakteereihin
- sekä maaperään GM-kasveista siirtyneiden hyönteiskestävyysproteiinien (etenkin Bt-toksiinit) vaikutukset maaperän mikrobiyhdyskuntiin.

Edellä mainittujen kaltaisten suorien ympäristövaikutusten lisäksi GM-kasvien viljelyllä voi olla välillisiä ympäristövaikutuksia, esim. muuttuneiden viljelymenetelmien (tuholais- ja rikkakasvikäsittelyt) seurauksena.

Seuraavassa on esitetty kirjallisuudessa yleisimmin GM-kasvien viljelyn yhteydessä mainittuja mahdollisia suoria ja välillisiä ympäristövaikutuksia. Kehystetyissä tietolaatikoissa esitellään aiheeseen liittyviä tutkimuksia. GM-kasvien allergeenisuutta ja terveysvaikutuksia ei käsitellä, koska niitä ei lueta varsinaisiin ympäristövaikutuksiin. GM-kasvien viljelyn ympäristövaikutuksia ovat käsitelleet laajasti myös Häikiö ja Kangasjärvi (1999) ja Kemppinen ym. (2003).

3.1 Invaasiokyky

Invaasiokyvyllä tarkoitetaan kasvin kykyä runsastua ja levitä uusille alueille mahdollisesti alkuperäisten kasvien kustannuksella. Siirtogeenit, jotka aiheuttavat muutoksia esim. kasvin siemenissä (koossa, painossa, muodossa), stressinsiedossa tai taudinkestävyydessä voivat vaikuttaa kasvin kelpoisuuteen ja siten myös invaasiokykyyn. Veltman ym. (1996) mukaan ainoa luotettava ennuste sille, onko uusi kasvi invaasiokykyinen vai ei, on tieto siitä, onko se ollut sitä muilla esiintymisalueillaan. GM-kasveja verrataan usein tulokaslajeihin. GM Science Review'n (2003) mukaan Britanniassa uuden GM-viljelykasvin leviämiskyvyn todennäköisyyden määrittämiseen sovelletaan kahta mallia. Ensimmäinen näistä on *vieraskasvimalli* (alien species model), jonka mukaan noin 0,1 % kasvatettavista muualta peräisin olevista kasveista osoittautuu haitallisiksi ympäristölle. Lukuun on päädytty sen perusteella, että Britanniaan tuoduista 15 000:sta kasvista 15 on aiheuttanut ympäristöongelmia. Toinen malli on *viljelykasvimalli* (crop model), jonka mukaan GM-kasvit eivät muuten eroa perinteisistä viljelykasveista, paitsi että niihin siirretty ominaisuus voi muuttaa kasvin kelpoisuutta (fitness). GM Science Review'n (2003) mukaan tunnetusti leviämiskykyisten kasvien (puuvartistet kasvit, monivuotiset heinät) kohdalla on tutkittava muuttaako siirretty ominaisuus kasvin kelpoisuuteen vaikuttavia ominaisuuksia (lisääntymisominaisuudet ja niihin vaikuttavat tekijät, esim. kasvunopeus, koko, pitkäikäisyys, selviytymiskyky). Yleisesti on oletettu, että siirtogeenin ilmentyminen kasvissa voi lisätä sen energeettisiä kustannuksia ja siten mahdollisesti vaikuttaa heikentävästi kasvin kasvuun ja lisääntymiseen, vaikka varsinainen kohdeominaisuus paranisikin (ks. esim. Bergelson ym. 1996; Pilate ym. 2003; Burdon & Thrall 2003). Tämä luultavasti pätee vain joidenkin kasvien ja joidenkin ominaisuuksien kohdalla, sillä esim. Hails (2000) ei tutkimuksessaan havainnut eroja glufosinaattikestävän GM-rypsin (*Brassica rapa*) ja muuntamattoman rypsin kelpoisuuksissa.

Rikkamaisille kasveille yhteisiä ominaisuuksia ovat monivuotisuus, suuri siementuotanto, syvä/leviävä juuristo, suolankestävyys, kuivankestävyys ja niittämisen sieto. Rikkamaiset kasvit eivät ole levinneet metsiin, vaan enimmäkseen erilaisille häirityille kasvupaikoille, kuten tienvarsille, joutomaille ja peltojen reunoille. Suomessa tulokaslajeista mm. jättipalsami (*Impatiens glandulifera*), jättiputket (*Heracleum mantegazzianum*, *H. persicum*), kurtttulehtiruusu (*Rosa rugosa*) ja lupiinit (*Lupinus* spp.) ovat levinneet luontoon tehokkaasti.

Suurin osa viljelykasveista on niin pitkälle jalostettuja, että ne tuskin muuntogeenisinäkään leviäisivät ympäröivään luontoon (Häikiö & Kangasjärvi 1999). Lisäksi useimmat viljelykasvit eivät selviä ilman ihmisen apua. Toisaalta esim. rapsi (*Brassica napus*) on selvinnyt tiettävästi ainakin kahdeksan vuotta tienvarsikasvina Ranskassa (Pessel ym. 2001). De Kathen (1996) mukaan rapsi onkin ainoa tähän asti invaasiokykyiseksi osoittautunut viljelykasvi. Britanniassa peruna (*Solanum tuberosum*) säilyy viljelyksillä itsestään kasvukaudesta toiseen (jäätikasvi) ja sitä kontrolloidaan glyfosaatilla (herbisidi). On siis mahdollista, että glyfosaattikestävän GM-perunan viljely voisi tulevaisuudessa aiheuttaa rikkakasviongelman Britanniassa (Riches & Valverde 2002).

Leviämiskykyä voidaan tutkia esim. selvittämällä siirtogeenien vaikutusta

GM-kasvien kelpoisuuteen. Siemenen ominaisuudet, kuten tuotettujen ja itävien siementen määrä, sekä siementen koko ja paino sekä leviämiskyky ovat monien tutkijoiden mukaan merkittävimpiä kasvin leviämistiheyteen ja siementen selviytymiseen, ja siten myös kelpoisuuteen vaikuttavista tekijöistä. Esim. rypsi leviää helposti pienten siementensä ansiosta etenkin teiden varsille ja tuulilevitteiset siemenet voivat aiheuttaa massiivisia invaasioita etenkin häirityillä kasvupaikoilla (tienvarret, joutomaat). Lisäksi pienikokoiset siemenet omaavat yleensä parhaan dormanssikyvyn. Ellstrand ja Schierenbeck (2000) mukaan risteytyminen lähilajien kanssa voi lisätä kasvin leviämiskykyä. Aiemmin Britanniassa tehdyissä kokeissa havaittiin, että ainakaan siirretty herbisidikestävyysominaisuus ei lisännyt yhdenkään tutkitun kasvin (kuusi eri lajia) leviämiskykyä (Crawley ym. 2001).

3.2 Geenivirta

Siirtogeenien leviäminen muuntogeenisistä kasveista ympäröivään luontoon on herättänyt pelkoa geenivirran mahdollisesta köyhdyttävästä vaikutuksista ekosysteemeihin sekä pelkoa entistä pahempien tuholaisten ja rikkakasvien kehittymisestä. Geenien siirtymistä kasvista toiseen ristipölytyksen avulla sanotaan vertikaaliseksi geeninsiirtymiseksi. Horisontaalinen geeninsiirtyminen taas on geneettisen materiaalin siirtymistä sellaisten organismien välillä, jotka eivät pysty lisääntymään keskenään suvullisesti. Horisontaalista geeninsiirtymistä voi siis tapahtua varsin erilaisten organismien välillä, kun taas vertikaalinen geeninsiirtyminen on mahdollista ainoastaan toisilleen läheistä sukua olevien kasvien välillä.

3.2.1 Hybridisaatio ja introgressio

Introgressio on geneettisen materiaalin siirtymistä keskenään lisääntymiskykyisistä kasveista risteytymisen ja takaisinristeytymisen seurauksena ja muodostumista genomiksi pysyväksi osaksi. Ellstrand ym. (1999) ja Ellstrand (2001) mukaan siirtogeenisistä kasveista luonnonpopulaatioihin kohdistuva geenivirta saattaa olla merkittävä kasvien evoluutioon vaikuttava tekijä ja johtaa jopa harvinaisten lajien häviämiseen. Lisäksi Ellstrand ja Schierenbeck (2000) mukaan hybridisaatio saattaa johtaa invaasiokykyisten kasvien kehittymiseen. Erityisen tuhoisaa geenivirta viljelykasveista niiden luonnonvaraisiin sukulaisiin voisi olla lajien erilaistumiskeskuksissa. Esimerkiksi Meksikossa, joka on maissin erilaistumiskeskus, on GM-maissin viljely tästä syystä kielletty toistaiseksi kokonaan (Quist & Chapela 2001). Lajinsisäistä geenivirtaa viljelykasveista niiden luonnonvaraisiin kantoihin tapahtuu jatkuvasti (ks. Ellstrand 2001, 2003a), samoin kuin myös lähisukuisten lajien välillä (Arriola & Ellstrand 1996). Risteytymistä on joissain tapauksissa osoitettu tapahtuneen esim. rapsin (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) ja peltokaalin (*B. campestris*) välillä (Jørgensen & Andersen 1994; Chèvre ym. 2000). Jalostuksen seurauksena viljelykasveilla on kuitenkin usein ominaisuuksia (esim. itsepölytykset), jotka vaikeuttavat niiden risteytymistä luonnonvaraisten lajien kanssa (Kemppinen ym. 2003). On joitakin viitteitä siitä, että perinteisellä jalostuksella paranneltujen viljelykasvien geenejä voi säilyä luonnossa. Esimerkkejä tästä ovat durra (*Sorghum vulgare*) sekä luonnonvaraiset auringonkukat (*Helianthus* spp.), joiden luonnonpopulaatioista on löytynyt viljeltyjen sukulaisten geenejä (Harlan ym. 1992; Linder ym. 1998).

Introgressiosta aiheutuvia mahdollisia ympäristövaikutuksia ovat mm. hybridien invaasiokyvyn lisääntyminen (esim. siirtyneen herbisidikestävyuden myötä), luonnonpopulaatioiden häviäminen tai niiden geneettisen monimuotoisuuden väheneminen. Esim. Majumder ym. (1997) ja Akimoto ym. (1999) ovat raportoineet viljellyn riisin (*Oryza sativa*) introgressiosta johtuvaa *Oryza rufipogonin*

geneettistä eroosiota'. Suomessa esiintyvistä kasveista esim. keltamatara (*Galium verum*) on alkanut harvinaistua. Tähän on ketojen vähenemisen lisäksi syynä esteetön risteytyminen paimenmataran (*G. album*) kanssa (ks. <http://www.yrttitarha.com/kanta/keltamatara/>). Muita mahdollisia geenivirran ympäristövaikutuksia ovat esim. uusien, herbisidejä kestävien rikkakasvien synty. Toisaalta herbisidien käyttö itsessäänkin aikaansaa resistenttejä kasveja (Pratley ym. 1999). Chilcutt ja Tabaschnik (2004) mukaan geenivirta Bt-toksiineja ilmentävistä GM-kasveista niitä ympäröiviin muuntamattomista saman lajin kasveista koostuvaan turvareunukseen voi nopeuttaa Bt-toksiineja kestävien hyönteiskantojen kehittymistä. Tämä johtuu siitä, että GM-siitepölyn pölyttämät muuntamattoman kasvin siemenet voivat ilmentää Bt-toksiinia. Tästä syystä turvareunus ei enää koostukaan kokonaan toksiiittomista kasveista (Chilcutt & Tabaschnik 2004). Keeler ym. (1996) mukaan herbisidikestävyyden siirtymisellä GM-kasveista niiden luonnonvaraisiin kantoihin tai sukulaisiin ei ole kilpailuetua lisäävää vaikutusta oloissa, joissa herbisidejä ei käytetä. Kuitenkin Gliddon (1994) ja Haygood ym. (2003) mukaan jokin uusi ominaisuus saattaa vakiintua populaatiossa, vaikka se ei olisikaan kilpailukykyä lisäävä.

GM-kasvien introgressiomahdollisuutta tutkittaessa olisi kiinnitettävä huomiota ominaisuuksiin, jotka vaikuttavat kasvin leviämiskykyyn ja siementen dormanssikykyyn. Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että siitepölyn leviäminen on tärkein tekijä kasvien välisessä geenivirrassa (Loveless & Hamrick 1984; Fenster 1991; Nason & Hamrick 1997). Lisäksi siemenen ominaisuuksia muuttavat luonnonkasvigeenit saattavat vaikuttaa siementen dormanssiin ja itämiseen (Linder ym. 1998) ja siten myös geenivirtaan pidemmän ajan kuluessa. Viljelykasveilla ei yleensä ole dormanssia, mutta kyky saattaa siirtyä niihin risteytymisen kautta. Siemenen ominaisuudet (kuten dormanssikyky) periytyvät yleensä maternaalisesti, joten GM-kasvi pölyttäjänä ja dormanssikykyinen luonnonvarainen emokasvi mahdollistavat uuden ominaisuuden esiintymisen dormanssikykyisessä kasvissa (Linder & Schmitt 1994).

Joidenkin tutkijoiden mukaan (ks. esim. Hails 2000) geenivirtaa GM-kasveista ei itsessään pitäisi pitää riskinä vaan olisi tutkittava, onko siirtogeenin omaavalla kasvilla negatiivista vaikutusta ekosysteemiin verrattuna vallitsevaan tilanteeseen. Esimerkiksi geenivirran kohteena olleet juurikkaan luonnonvaraiset populaatiot olivat Bartsch ym. (1999) tutkimuksen mukaan geneettisesti jopa monimuotoisempia kuin populaatiot, jotka eivät olleet vastaanottaneet genejä viljelykasveilta. Kasvin kilpailukykyä parantavan ominaisuuden yleistymisen (esim. geenit, jotka lisäävät kasvin vastustuskykyä tuholaisia ja tauteja vastaan) populaatiossa on todennäköisempää kuin neutraalin ominaisuuden. Toisaalta, kun geenivirta siirtogeenisestä kasvista luonnonpopulaatioon kasvaa tarpeeksi suureksi, hybridin kelpoisuudella ei ole enää vaikutusta geenin runsastumiseen (Häikiö & Kangasjärvi 1999). Viljelyn rapsin sekä villiintyneiden *Brassica* -lajien kokeelliset ja teoreettiset tutkimukset osoittavat, että isot siitepölylähteet, kuten laajat viljelyalueet, lisäävät geenivirtaa (Squire ym. 1999). Myös korjuun jälkeen maahan jääneet siemenet voivat vaikuttaa geenivirtaan. Dormanssikykyisistä siemenistä itäneet GM-kasvit voivat toimia siitepölylähteinä vielä pitkien aikojen kuluttua varsinaisesta viljelystä. GM-kasvien siemenet voivat myös sekoittua perinteisesti viljeltyjen tai luonnonvaraisten kasvien siementen kanssa sadonkorjuun tai varastoinnin aikana. Esimerkiksi sokerijuurikkaan (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*) siemenen mukana saattaa olla luonnonvaraisten juurikkaan (merijuurikas; *B. vulgaris* ssp. *maritima*) tai risteymien siemeniä, joista itäneet kasvit voivat risteytyä GM-juurikkaan kanssa. Ellstrand ja Schierenbeck (2000) mukaan viljelyn ja luonnonvaraisten juurikkaan siemenet sekoittuvat Välimeren alueella, jossa tuotetaan siemenet Pohjois-Euroopan juurikasviljelyksille. Ainakin Ranskassa ja Britanniassa on tavattu rikkajuurikasta, joka on sokerijuurikkaan ja luonnonvaraisten juurikkaan

risteymä. Näissä tapauksissa siitepölyn lähteenä on kuitenkin ollut luonnonvarainen juurikas (Boudry ym. 1993). Myös Suomessa juurikaspelloilla kasvaa viljellyn juurikkaan lisäksi luonnonvaraisen ja viljellyn juurikkaan hybridejä, joilla on mahdollisuus risteytyä viljellyn juurikkaan kanssa (ks. http://www.sjt.fi/Villijuurikkaat_ ja_kukkavarret.htm). Tämä kuitenkin edellyttää useamman yksilön kukkimista ensimmäisen kasvukauden aikana tai (kukkimiskykyisten) jääntikasvien esiintymistä viljelyalalla.

Esimerkki geenivirrasta

Maissin (*Zea mays*) genetiikka on erittäin hyvin tunnettu, ja maissia on suhteellisen helppo transformoida. Maissin siitepöly on kuitenkin osoittautunut helposti leviäväksi, ja siemenerät voivat sekoittua varastoinnin ja kuljetuksen aikana. Vaikka Suomessa maissia viljellään vain pienessä mittakaavassa, on StarLink GM-maissi (sisältää Cry9C-proteiinin geenin *Bacillus thuringiensis* -bakteerista; ks. esim. Bucchini & Goldman 2002) hyvä esimerkki laajasta geenivirrasta GM-kasveista muuntamattomiin kasveihin. StarLink-maissia alettiin kasvattaa Yhdysvalloissa ennen kuin sen sopivuus ihmisten tai eläinten ravinnoksi oli varmistettu, ja myöhemmin heräsivät epäilykset sen allergeenisuudesta. Maissin leviäminen ympäristöön yritettiin estää kasvatusvaiheessa. Siitä huolimatta viranomaisten myöhemmin testaa- masta 110 000:sta ravintokäyttöön tarkoitettua maissierästä jopa joka kymmenennestä näytteestä löytyi StarLink- maissia. StarLink-maissin leviämistapa on edelleen ratkaisematta, mutta tapaus osoittaa, että ainakin maissin kohdal- la GM- ja muuntamattomat lajikkeet sekoittuvat helposti (Ellstrand 2003b).

Quist ja Chapela (2001) mukaan Meksikossa, jossa GM-maissin viljely on ollut kiellettyä vuodesta 1998 lähtien, maissin maataiskannoista on löytynyt siirtogeneeni-DNA:ta. Meksiko on maissin erilaistumiskeskus ja GM-introgressio voi uhata maataiskantojen geneettistä monimuotoisuutta. Tosin esim. Kaplinsky ym. (2002) ja Wisniewski ym. (2002) mukaan tutkimuksen tulokset eivät ole luotettavia menetelmällisten virheiden takia.

Herbisidikestävyys

Kasvit voivat kehittää herbisidikestävyden myös spontaanisti, tästä on esimerkkinä tankearaiheinä (*Lolium rigidum*) Australiassa (ks. Pratley ym. 1999). Useiden tutkimusten mukaan triatsiinikestävien rikkakasvien kelpoisuus on huom- nampi kuin luonnonvaraisten tyyppien ympäristössä, jossa herbisidejä ei käytetä, mutta sama ei välttämättä päde muihin herbisidikestävyystyyppeihin (Keeler ym. 1996). Bergelson ym. (1996) osoittivat tutkimuksessaan, että herbi- sidikestävän lituruohon (*Arabidopsis thaliana*) siementuotanto oli alentunut 34% kestävyysgeenin tähden. Toisaalta Snow ym. (1999) mukaan rikkamaiseen rypsiin (*Brassica rapa*) GM-rapsista introgressoitunut glufosinaattikestävyysge- eni ei vähentänyt rypsin kelpoisuutta. Samassa tutkimuksessa osoitettiin, että herbisidikestävyys säilyi rypsisä ilman herbisidien käytön aiheuttamaa valintapainettakin. Herbisidikestävyysominaisuus ei siis välttämättä lisää kasvin ener- geettisiä kustannuksia ja saattaa siten jäädä pysyväksi ominaisuudeksi luonnonvaraisiin populaatioihin (Hails 2000).

3.2.2 Horisontaalinen geenin siirtyminen

Horisontaalinen geenin siirtyminen (horizontal gene transfer; HGT) on geneettisen materiaalin siirtymistä ei-lähisukuisten organismien välillä joko eliökunnan sisällä (esim. bakteerien välillä) tai eri eliökuntien välillä (esim. kasvista bakteeriin). Bakteereilla tunnettuja HGT:n mekanismeja ovat DNA:n siirtyminen konju- gaation, transduktion tai transformaation välityksellä yksilöstä toiseen. Esimer- kiksi antibioottiresistenssigeenit voivat siirtyä kaukaistakin sukua olevien bak- teerien välillä ja yleistyä etenkin olosuhteissa, missä runsas antibioottien käyttö antaa resistenssin omaaville bakteereille valintaedun. Geenien tiedetään siis siir- tyvän yleisesti bakteerien välillä, mikä yleensä otetaan huomioon geenimuun- neltujen mikro-organismien ympäristövaikutusten arvioinnissa (Pitkäjärvi 1997).

On kuitenkin esitetty, että siirtogeenejä voisi siirtyä myös GM-kasveista muihin organismeihin, esim. maaperän bakteereihin tai patogeenisiin mikro-organismeihin. Tutkimustietoa horisontaalisesta geenien siirtymisestä muihin organismeihin kuin bakteereihin on olemassa hyvin vähän. Koska esim. sienet ovat aitotumallisia kuten GM-kasvitkin, geenin ilmentyminen niissä mahdollisen horisontaalisen siirtymisen jälkeen voi olla todennäköisempää kuin bakteereissa (GM Science Review 2003).

Simonet (2000) mukaan transformaatio (vapaan kasvi-DNA:n ottaminen bakteerisolun) on ainoa mahdollinen mekanismi, minkä avulla kasvin DNA:ta voisi siirtyä bakteeriin. Joillakin bakteereilla (katso esim. Paget & Simonet 1994; Nielsen ym. 2000) onkin kyky tähän. Vaikka vain muutamien bakteerilajien tiedetään olevan transformaatiokykyisiä, edellytykset siihen ovat olemassa useimmissa bakteeriryhmissä, myös arkkibakteereilla (Lorenz & Wackernagel 1994; Demaneche ym. 2001). DNA:n siirtymisen edellytyksenä kuitenkin on, että transformaatiokykyisen bakteerin genomissa on jo olemassa tietyn pituinen (n. 20 emäsparia) vastaava homologinen DNA-fragmentti (de Vries ym. 2001). Lisäksi tarjolla on oltava riittävän pitkä fragmentti vapaata kasvin DNA:ta (de Vries ym. 2001; Conner ym. 2003). Transgeenejä onkin pystytty jäljittämään maaperästä (laboratorio-olosuhteissa) vielä kahden vuoden kuluttua niiden maaperään joutumisesta (Paget & Simonet 1994; Widmer ym. 1996; Gebhard & Smalla 1999, mutta katso myös Hay ym. 2002). Geenien siirtymisen mahdollisuutta voi lisätä se, että GM-konstruktit sisältävät usein elementtejä, kuten esimerkiksi merkkigeenejä, jotka ovat peräisin bakteereista. Toinen geenin siirtymisen mahdollisuutta lisäävä tekijä voi olla siirtogeenin liittäminen viherhiukkasen genomiin, sillä sen rakenne vastaa bakteerien genomia tuman rakennetta paremmin. Lisäksi viherhiukkasten suuri määrä soluissa (useita satoja/solu) lisää saatavilla olevien siirtogeenien lukumäärää (GM Science Review 2003).

Joidenkin tutkijoiden mukaan (ks. esim. Kurland ym. 2003) horisontaalinen geenin siirtyminen kasveista bakteereihin ei ole yhtä todennäköistä kuin geenin siirtyminen yksinkertaisen genomien omaavien eliöiden (eli bakteerien) välillä. Vieraan DNA:n integroitumiselle bakteerin genomiin, sekä myös geenin ilmentymiselle on biologisia esteitä. Aitotumallisten eliöiden geneeissä olevat intronit estävät kyseisten geenien ilmentymisen alkeistumallisissa soluissa. Lisäksi geenin siirtyminen on Kurland ym. (2003) mukaan merkityksetöntä, mikäli bakteerisolu ei pysty hyödyntämään geenin ilmentämää informaatiota. Lisäksi uudella geenillä pitäisi olla valintaetua lisääviä ominaisuuksia, jotta sen omaavien bakteerien osuus populaatiossa lisääntyisi. Dale ym. (2002) mukaan siirtogeenisen vapaan DNA:n osuus verrattuna totaaliseen vapaan DNA:n määrään luonnossa on niin pieni, että sen vaikutukset ovat jokseenkin merkityksettömiä. Tämä onkin varsin luultavaa silloin, kun kyseessä on siirtogeeni, jota on ympäristössä runsaasti saatavilla ennestään. On kuitenkin mahdollista, että tulevaisuudessa kasvien geeniteknisessä muuntamisessa käytetään muunneltuja tai kokonaan uudenlaisia geenejä, tai geenejä, jotka ovat peräisin täysin toisenlaisista ekosysteemeistä kuin se ekosysteemi, jossa GM-kasvia kasvatetaan. Tällöin uuden geenin aiheuttamalla ominaisuudella saattaa ilmetä arvaamattomia ympäristövaikutuksia.

Kasvien ja bakteerien välistä geenin siirtymää on vaikea monitoroida ja esim. Bertolla ja Simonet (1999), Gebhard ja Smalla (1999), Nielsen ym. (1997), Nielsen ym. (1998) tutkimuksissa ei kyetty osoittamaan geenivirtaa kasveista bakteereihin. Aivan viime aikoina on kuitenkin saatu suoraa näyttöä siirtogeenien siirtymisestä GM-kasveista bakteereihin (Nielsen ym. 2000; Tepfer ym. 2003; ks. tutkimusmenetelmät-osio).

Antibioottiresistenssigeenien (merkkigeeni) käyttö kasvien muuntamisen yhteydessä on herättänyt arveluja, että resistenssiominaisuus voisi edelleen siir-

tyä GM-kasveista edelleen (patogeenisiin) bakteereihin, minkä seurauksena bakteerit muuttuisivat vastustuskykyisiksi kyseisille antibiooteille. Myös resistenssi-geenien siirtyminen kasvinsyöjien ruoansulatuskanavan bakteeriflooraan GM-rehun mukana on mahdollista (Duggan ym. 2003). On kuitenkin eri asia, olisiko resistenssi-geeneistä ylimääräistä etua kyseisille bakteereille. Merkkigeeninä yleisesti käytetty *nptII* (kanamysiini/neomysiiniresistenssi) -geeni on peräisin bakteerista (*Escherichia coli*) ja maaperässä on ennestään runsaasti bakteereita, jotka omaavat hyvin samankaltaisen geenin. Kliinisesti merkityksellisten antibioottiresistenssi-geenien käyttö merkkigeeninä on EU-alueilla varovaisuussyistä kielletty GM-tuotteissa vuoden 2004 lopusta lähtien, ja tutkimus- ja kehittämiskokeissa vuoden 2008 lopusta lähtien. Kanamysiini/neomysiiniresistenssi ei kuitenkaan kuulu kiellettäviin ominaisuuksiin.

HGT viruksiin

Virusgeenien käyttö viruskestävien kasvien tuottamisessa on herättänyt pelkoa siitä, että kasvin virusperäiset siirtogeenit rekombinoituvat viruksen omien geenien kanssa ja sitten siirtyvät viruksiin, mikä aikaansaisi (teoriassa) uuden virustyyppin muodostumisen (katso Häikiö & Kangasjärvi 1999; Tepfer 2002). Viruskestävyyden lisäämiseksi kasviin siirretään yleensä viruksen kuoriproteiini- tai rakenneproteiinigeeni. Jos kasvi tuottaa toimivaa kuoriproteiinia, jonkin toisen kasvia infektioivan viruksen perintöaines saattaa teoriassa pakkautua tähän kuoreen (transkapsidaatio, mitä ei luonnossa ole kuitenkaan havaittu), ja näin muuttaa hetkellisesti viruksen isäntäspesifisyyttä tai leviämistä, sillä kuoriproteiini saa aikaan viruksen isäntäspesifisyyden. Koska viruksen perimä ei muutu, uuteen isäntään siirtyvä transkapsidoitu virus tuottaisi taas alkuperäisen kaltaisia jälkeläisiä, joiden isäntäspesifisyys on myös alkuperäisen kaltainen. Uuden isännän infektoiminen voi siis tapahtua vain kerran, ellei transkapsidaatiota tapahdu joka infektiokierroksella.

Kasvia infektioivan viruksen perintöaines voi periaatteessa rekombinoitua kasvin genomissa olevan siirtogeenisen materiaalin kanssa, mikä voisi olla (ainoastaan) retrovirusten kohdalla periytyvää. Mikäli horisontaalinen geenien siirtyminen on mahdollista GM-kasvin ja virusten välillä, voi herätä pelkoa sen aiheuttamista uudenaikaisista, ekosysteemeille vahingollisista viruksista.

3.3 Vaikutukset muihin kuin kohde-eliöihin (nontarget effects)

Jotkut kasvien geeniteknisessä muuntamisessa käytetyt ominaisuudet (esim. Bt-toksiinin tai kitinaasin tuotto) toimivat torjunta-aineina tiettyjä tuholaisia (kasvinsyöjähyönteisiä tai patogeenisiä sieniä) vastaan. Tällaisilla ominaisuuksilla voi olla vaikutuksia myös muihin kuin kohde-eliöihin. Tällaisia ovat viljelykasvin ohessa elävät eliöt, jotka eivät aiheuta merkittäviä (esim. taloudellisia) tuhoja viljelyksellä (esim. saalistajat, loiset, pölyttäjät tai maaperän mikrobit). Vaikutukset voivat olla suoria, esim. tiettyä hyönteistä vastaan tarkoitettu Bt-toksiini voi vaikuttaa muihin kuin kohde-eläimiin tai vaikutus voi kohdistua maaperän mikroorganismeihin. Vaikutukset voivat olla myös välillisiä, esim. herbisidikestävän GM-kasvin viljelyn yhteydessä muuttuneet herbisidikäsittelyt voivat vaikuttaa koko ekosysteemiin. GM Science Review'n (2003) mukaan muihin kuin kohdeorganismeihin kohdistuvia vaikutuksia voi ilmetä kaikilla sellaisilla viljelykasveilla, joihin on siirretty toksiineja kontrolloimaan tauteja tai tuholaisia.

3.3.1 Vaikutukset maaperän mikrobeihin

Kasvit vaikuttavat maaperän mikrobiyhdyskuntien runsauteen, koostumukseen ja aktiivisuuteen ja mikrobit taas puolestaan vaikuttavat kasveihin ja koko ekosysteemiin (mykorritsat, tyypeä sitovat bakteerit, hajottajat, patogeenit jne.). Kowalchuk ym. (2003) mukaan GM-kasvien viljely voi muuttaa näitä vuorovaikutuksia. Mikrobit edustavat 80 %:a maaperän biomassasta ja vastaavat ekosysteemin toiminnasta, kuten ravinteiden kierrosta ja hajottamisesta. Esimerkiksi sienien kitiiniä hajottavat kitinaasit (joita siirretään kasveihin sienitautikestävyuden lisäämiseksi) voivat vaikuttaa myös sienijuuria muodostaviin symbionttisiin sieniin. Hyönteiskestävyyttä lisäävillä Bt-toksiineilla voi olla joko suoria tai välillisiä vaikutuksia maaperän eliöstöön. Bt-toksiinien altistumisreitti maaperäeliöillä on suora kontakti GM-kasvin juuriin, kosketus juurten erittämiin toksiineihin ja kuolleen GM-kasviaineksen joutuminen maaperään sadonkorjuun yhteydessä (Saxena ym. 1999, 2002; Saxena & Stotzky 2000). Joissain maatyypeissä Bt-toksiinit voivat säilyä toimintakykyisinä pitkiä aikoja (Tapp & Stotzky 1998; Crecchio & Stotzky 2001). Kuitenkaan GM-kasvien Cry1Ab-toksiinia sisältävien juurieritteiden ei ole osoitettu vaikuttavan merkittävästi lieroihin, sukkulamatoihin, alkueläimiin tai bakteereihin (Saxena & Stotzky 2001). Vaikka useimmat tutkimukset eivät ole pystyneet osoittamaan GM-kasvien viljelyn haitallisia vaikutuksia maaperän bakteereihin (Heuer & Smalla 1999; Donegan & Seidler 1999; Cowgill ym. 2002), jonkin verran on myös raportoitu muutoksista bakteeriyhdyskuntien rakenteessa kasvien ritsosfäärissä (ks. esim. Lottmann ym. 1999).

Ei-toivottuja GM-kasvien maaperään kohdistuvia vaikutuksia ovat http://www.defra.gov.uk/environment/acre/soilecology/acre_soilecology_interim.pdf mukaan mm.

- siirtogeenin itsensä tuottamista aineista (esim. Bt-toksiinit) aiheutuvat haitalliset vaikutukset maaperän eliöihin
- GM-kasvin viljelyssä käytettävien maatalouskemikaalien haitalliset vaikutukset maaperän organismeihin
- maaperän biodiversiteetin ja fertiiliteetin pienentyminen GM-kasvien viljelyn seurauksena
- GM-kasvien hidastunut hajoaminen maaperässä

GM Science Review'n (2003) mukaan GM-kasvien viljelyn yhteydessä havaitut maaperän mikrobiyhdyskuntien rakenteen muutokset eivät poikkea oleellisesti niistä muutoksista, joita on havaittu perinteisessä viljelyssä. Toisaalta GM Science Review'n (2003) mukaan suurin osa tähänastisesta muihin kuin kohde-eliöihin kohdistuvasta tutkimustiedosta on saatu pienimuotoisista ja lyhytaikaisista kokeista. Pitkäaikaisemmista kokeista saisi varmasti kattavampia tuloksia.

3.3.2 Vaikutukset muihin kuin kohde-eläimiin

GM-kasvien vaikutukset voivat kohdistua suoraan herbivoreihin, detrivoreihin, pölyttäjiin ja petoihin (mikäli sen jokin elinvaihe käyttää kasvia ravintonaan) tai vaikutukset voivat siirtyä ravintoketjussa eteenpäin esim. petoniveljalkaisiin, lintuihin ja nisäkkäisiin. Vaikka suuressa osassa kasvitutkimuksia ei ole pystytty osoittamaan GM-kasvien (etenkin Bt-kasvien) haitallisia vaikutuksia muihin kuin kohde-eläimiin (Riddick ym. 2000; Wraight ym. 2000; Schuler ym. 2001; Duan ym. 2002, 2004; Romeis ym. 2003; Dutton ym. 2003a, 2003b), on myös

saatu toisenlaisia tuloksia. Esim. Hilbeck ym. (1998b) tutkivat Bt-maissilla (Cry1Ab) syötetyn saaliseläimen vaikutusta erääseen harsokorentoon (*Chrysoperla carnea*) ja yrittivät arvioida, johtuiko Bt-toksiinille altistuneita eläimiä syöneen harsokorenon korkea kuolleisuus suoraan Bt-toksiinista vai välillisesti huonokuntoisista saaliseläimistä. Kokeen tulosten mukaan vaikutukset näyttivät johtuvan kummas-takin tekijästä. Myöhemmän tutkimuksen (Romeis ym. 2004) mukaan Hilbeck ym. (1998b) havaitsemat vaikutukset johtuivat pikemminkin saaliseläinten laadusta kuin Bt-toksiinin suorista myrkyvaikutuksista. Ponsard ym. (2002) tutkivat Bt-puuvillalla syötettyjen saaliseläinten vaikutuksia niiden saalistajiin. Kahden lutei-siin kuuluvan hyönteisen (*Orius tristicolor* ja *Geocoris punctipes*) elinikä oli merkittä-västi lyhentynyt niiden käytettyä ravintonaan Bt-puuvillaa syöneitä saaliseläi-miä. GM-kasvien mahdollisella haitallisella vaikutuksella kohdelajien saalistajiin ja loisiin saattaa olla merkittäviä ekologisia seurauksia.

3.3.3 Välilliset vaikutukset

Herbisidikestävien viljelykasvien viljelyllä voi olla välillisiä vaikutuksia viljely-alueen kasvillisuudesta riippuvaisiin eläimiin (katso esim. Heard ym. 2003a, 2003b). Field Scale Evaluations (FSE) Britanniassa osoitti, että muuttuneet rikka-kasvikäsittelymenetelmät herbisidikestävien GM-kasvien viljelyssä vaikuttivat merkittävästi rikkakasvien biomassaan. Viljelyalojen kasvinsyöjät sekä detrituk-sen (kuolleen kasvimateriaalin) syöjät ja monet niiden saalistajista ja loisista oli-vat puolestaan herkkiä rikkakasvibiomassan muutoksille. Hawes ym. (2003) mukaan tutkimustulokset ennakoivat, että mikäli herbisidikestävät GM-viljely-kasvit otettaisiin Britanniassa laajaan käyttöön, monen toiminnallisen eliöryhmän runsauksissa voisi ajan kuluessa tapahtua merkittäviä muutoksia. Toisaalta maan-viljelijöillä voi olla täysin eri käsitys rikkakasvilajiston- ja biomassan merkityksel-lisyydestä kuin ekologeilla, sillä torjuntamenetelmien tarkoituksena on juuri vä-hentää rikkakasveja.

Bt-toksiinit

Bacillus thuringiensis on bakteeri, joka tuottaa hyönteistorjuntaproteiineja (Bt-proteiinit tai δ -endotoksiinit; Vaeck ym. 1987). Bt-toksiinit ovat suhteellisen spesifejä ja ne vaikuttavat ainoastaan sellaisiin hyönteisiin (lähinnä kovakuoriaisiin; Coleoptera ja perhosiin; Lepidoptera), joilla on suolistossaan näille myrkyille sopivat reseptorit (Schuler ym. 1999). Eri bakteerikannat vaikuttavat eri hyönteisryhmiin, ja tietty Bt-toksiini vaikuttaa vain yhteen (tai muutamaan) hyönteislajiin. *Cry1*- ja *Cry2* -ryhmien Bt-toksiinit ovat spesifejä perhosille kun taas *Cry3* -toksiinit vaikuttavat kovakuoriaisiin. Bt-toksiineja on jo monta vuotta käytetty hyönteistorjunnassa ruiskuttamalla niitä viljelyk-sille. Kasvien geenitekniiseen muuntamiseen Bt-toksiineja ilmentäviä geenejä on käytetty laajalti (ks. esim. van Aarssen ym. 1995). Geenejä on tosin jouduttu muokkaamaan ennen siirtoa, jotta proteiinit toimisivat kunnolla kasveis-sa (Koziel ym. 1993). Promootorina Bt-toksiinia koodaavien geenien kanssa käytetään yleensä CaMV (kukkakaalin mosaiikkiviruksen) 35S -promootoria, joka ilmentää proteiinia jatkuvasti kasvin kaikissa solukoissa.

Bt-maissin viljelyn vaikutuksista monarkkiperhoseen on kiistelty ankarasti viime vuosina. Monarkkiperhonen käyttää ravintonaan enimmäkseen eräitä silkkiyrttejä (sukuun *Asclepias* kuuluvia kasveja), jotka Yhdysvalloissa kasvavat etenkin maissipelloilla ja niiden lähituntumassa. Losey ym. (1999) tutkivat Bt-maissin vaikutusta monarkkiperhosen toukkiin syöttämällä niille silkkiyrttiä, jonka päälle oli ripoteltu Bt-maissin siitepölyä. Tällaista ravintoa syöneiden toukkien kuolleisuus osoittautui tutkimuksessa 44 % korkeammaksi kuin vertailuryhmän toukkien, joiden ravintokasvin päällä oli Bt-siitepölyn sijasta muuntamattoman maissin siitepölyä. Tutkimusta on kuitenkin kritisoitu muun muassa siitä, että menetelmästä on annettu niin ylimalkainen kuvaus, että tutkimusta on joiltakin osin vaikea toistaa (ks. esim. Wisniewski ym. 2002). Myöhempien tutkimusten (esim. Hellmich ym. 2001; Stanley-Horn ym. 2001) mukaan maissin geenitekniisessä muuntamisessa käytetty *Cry*-geeni (joita on monta vaihtoehtoa), promootori (ilmentyykö Bt-toksiini jatkuvasti ja kaikkialla vai esim. vain siitepölyssä) sekä siitepölyn määrä vaikuttavat Bt-maissin siitepölyn haitallisuu-teen monarkkiperhosen toukille.

3.4 Muut vaikutukset

Edellämainittujen vaikutusten lisäksi GM-kasvia viljeltäessä voi ilmetä myös täysin odottamattomia vaikutuksia. Odottamattomat vaikutukset tulevat todennäköisimmin ilmi seurantatutkimuksissa ja pitkän ajan kuluessa. Ennalta arvaamattomia vaikutuksia voi syntyä esim. siirtogeenien pleiotrooppisista ominaisuuksista, eli siitä, että siirtogeeni vaikuttaa useampaan kuin yhteen ominaisuuteen. Tietty siirtogeeni voi vaikuttaa toivotun ominaisuuden ohella myös esim. kasvin risteytymiskykyyn. Normaalisti itsepölytteiseen lituruohoon (*Arabidopsis thaliana*) siirretty herbisidikestävyysgeeni vaikutti kasviin ristipölytteisyyttä lisäävästi (Bergelson ym. 1998). Khattak ym. (2002) havaitsivat, että viruksen kuoriproteiinin tuottaminen rokotetta varten tupakassa ja perunassa vaikutti edellisen lehtiä heikentävästi ja jälkimmäisen kasvin mukuloita pienentävästi. Alla ym. (2003) julkaisivat hiljattain yllättävän tutkimustuloksen, jonka mukaan runsaasti GUS (beta-glukuronidaasi) –proteiinia tuottavaa siirtogeenistä perunaa ravintonaan käyttävän kirvan (*Myzus persicae*) kelpoisuus oli merkittävästi parempi kuin muuntamattomalla perunaa ravintonaan käyttävän kirvan. Sama ilmiö oli havaittu aiemmin koloradokuoriaisia (*Leptinotarsa decemlineata*) tutkittaessa (Lecardonnell ym. 1999). Cherqui ym. (2003) osoittivat sittemmin tutkimuksessaan, että GUS-proteiinin edullinen vaikutus hyönteisten kelpoisuuteen johtui sen probioottisista vaikutuksista. GUS-proteiinia koodaava *uidA*-geeni on geenitekniikassa yleisesti käytetty merkkigeeni.

Siirtogeenien vaikutus kasvin omaan genomiin

Siirtogeenit voivat sijoittua genomissa satunnaisesti, estäen siten jonkin tärkeän geenin toiminnan. Martienssen ja Springer (1998) ja Jeon ym. (2000) ovat tutkimuksissaan saaneet näyttöä siitä, että siirtogeenikonstruktioiden insertio genomiin aiheuttaa mutaatioita genomissa omilla geneeilla. Luultavasti myös luonnollisesti viljelykasveissa esiintyvät liikkuvat elementit (esim. transposonit) voivat aiheuttaa samankaltaisia vaikutuksia. Siirtogeenin satunnainen sijoittuminen genomissa voi teoriassa esim. muuttaa kasvin ravinto-ominaisuuksia ja vaikuttaa siten sitä syöviin hyönteisiin sekä näiden saalistajiin ja loisiin (Schuler ym. 1999; Dutton ym. 2002). Schuler ym. (1999) painottaa erityisesti kasveista herbivorien seurauksena haihtuvien yhdisteiden merkitystä. Haihtuvien yhdisteiden määrässä tai laadussa tapahtuva muutos voi aiheuttaa käyttäytymisen muuttumista koko ravintoketjussa, sillä monet herbivorien luontaisista vihollisista paikantavat saaliinsa näiden yhdisteiden avulla. Vaihtoehtoisesti siirtogeenit voivat integroitua jonkin erittäin aktiivisen säätelyalueen viereen ja ilmentyä aiottua enemmän.

Kestävien tuholaiskantojen kehittyminen

GM Science Review'n (2003) mukaan laaja ja yhdenmukainen GM-kasvien viljely yhdessä niiden kanssa käytettävien tauteja tai rikkakasveja torjuvien maanviljelyskemikaalien kanssa aiheuttaa kohdetuholaisille vahvan valintapaineen. Aika, joka resistenttien kohdeorganismien kehittymiseen kuluu, on riippuvainen käytetyistä toksiineista ja niiden ilmentymistavasta, sekä kohdeorganismien ekologiasista, genetiikasta ja lisääntymisestä (erityisesti sukupolvien välisestä ajasta). Hyönteiset kehittävät kestävyuden Bt-toksiineja vastaan melko helposti (Ferré & Van Rie 2002). Groot & Dicke (2002) mukaan Bt-kasvien viljely voi nopeuttaa Bt-kestävien hyönteisten kehittymistä, sillä hyönteiset ovat tekemisissä GM-kasvin ilmentämän Bt-toksiinin kanssa pidempään kuin jos toksiinia ruiskutettaisiin pellolle. Lisäksi Groot ja Dicke (2002) otaksuvat, että kohdeherbivorien luontaiset viholliset (pedot ja loiset) hyödyntävät useammin (Bt-toksiinin vaikutuksesta) hitaasti kehittyviä saaliseläimiä, jolloin kestävämmät kohdehyönteiset jäävät useammin henkiin ja siirtävät kestävyysominaisuutensa eteenpäin seuraaviin sukupolviin.

Muita ennustamattomia vaikutuksia on mm. kokonaan uusien tuholaisten kehittyminen GM-kasvien viljelyn seurauksena. Groot & Dicke (2002) ennustavat, että GM-kasvien negatiivinen vaikutus lihansyöjäniveljalkaisiin voi aiheuttaa niiden aiemmin (eli ennen hyönteiskestävien GM-kasvien käyttöönottoa) suhteellisen harmittomina pidettyjen saalislajien populaatioiden kasvua ja siten mahdollisesti uusien tuholaisten syntymistä.

4

Suomen luonnon erityispiirteet ja täällä mahdollisesti käytettävät GM-sovellukset

Suomi kuuluu ilmastonsa ja muun luontonsa puolesta boreaaliseen vyöhykkeeseen. Ilmasto ja kasvillisuus ovat vuorovaikutuksessa keskenään siten, että kasvillisuusvyöhykkeiden rajoilla keskeiset ilmastomuuttujat muuttuvat jyrkästi rinnan kasvillisuuden kanssa (ks. <http://www.tsv.fi/ttapaht/013/solantie.htm>). Suomessa vallitsee ns. väli-ilmasto, jossa on sekä mereisen, että mantereisen ilmaston piirteitä. Talvet ovat kylmiä ja suurimmassa osassa maata on talvella lumipeite. Kesät ovat lämpimiä, mutta lämpötilaerot eivät ole niin suuria kuin mantereisen ilmaston alueella. Kesällä päivät ovat pitkiä, mutta kasvukausi on kuitenkin lyhyt, niin että monet kasvit kukkivat samanaikaisesti. Metsätyypit poikkeavat Etelä- ja Keski-Euroopan metsätyypeistä. Maaperä on ohutmultainen, hapan ja ravinnepöyhä. Useimmat tärkeät viljelykasvit eivät Suomessa metsäpuita lukuunottamatta pysty leviämään ja muodostamaan luonnonpopulaatioita tai hybridejä kotimaisten sukulaisten kanssa. Poikkeuksia tästä ovat kuitenkin mm. jotkut ristikkukaiset (Brassicaceae), ja metsäpuut, esim. koivu (*Betula* spp.), kuusi (*Picea abies*) ja mänty (*Pinus sylvestris*). Lisäksi Suomessa kehiteltyjä GM-kasveja (puita ja joitakin marjoja lukuunottamatta) tuskin tullaan siirtämään lajien leviämiskeskuksiin, sillä suomalaiset kasvit on jalostettu kestävämmän nimenomaan tšekäläisiä pohjoisia olosuhteita.

Periaatteessa esim. muuntogeenisillä rypsilä tai rapsilla (*Brassica rapa*, *B. napus*) sekä lisäksi sokerijuurikkaalla (*Beta vulgaris*) on mahdollisuus kehittyä GM-rikkakasveiksi Suomen olosuhteissa, sillä ne voivat muutenkin esiintyä rikkoina viljelysmailla. Stressinsieto-ominaisuudet (esim. kylmänkestävyys) ovat tärkeitä Suomen karuissa ympäristöoloissa ja taudit (bakteeri- virus- ja sienitaudit, sekä ankeroiset ja muut selkärangattomat) voivat joillain kasveilla (esim. jalava, mänty, jotkut ristikkukaiset) olla populaation kokoa rajoittavia tekijöitä, joten GM-tekniikan avulla parannettu stressin- tai taudinkestävyys voi lisätä merkittävästi kasvin kilpailukykyä. Sen määrittämiseksi, onko tietty GM-kasvi mahdollisesti leviämiskykyinen, voi sitä verrata Suomessa aggressiivisiksi tulokaslajeiksi tai menestyviksi rikkakasveiksi osoittautuneisiin kasveihin. Tällaisia ovat mm. jättipalsami (*Impatiens glandulifera*), jättiputket (*Heracleum mantegazzianum*, *Heracleum persicum*), kurtitulehtiruusu (*Rosa rugosa*) ja lupiini (*Lupinus* spp.). On siis selvitettävä onko kyseisillä lajeilla yhteisiä leviämiskykyyn ja selviytymiseen vaikuttavia ominaisuuksia. Lisäksi kelpoisuuteen vaikuttavia ominaisuuksia (siemenen ja siitepölyn ominaisuudet, kasvin stressinsietokyky, taudinkestävyys, kasvunopeus, koko, pitkäikäisyys) tulisi vertailla GM-kasvin, muuntamattoman kasvin ja mikäli Suomessa esiintyy sukulaislajeja, joiden kanssa GM-kasvi on risteytymiskelpoinen) näiden hybridien välillä.

Suomessa mm. muuntogeeniset metsäpuut voivat pölyttää luonnonkantoja. Lisäksi esim. rypsilä (*Brassica rapa* ssp. *oleifera*) ja rapsilla (*B. napus* ssp. *oleifera*) on mahdollisuus risteytyä luonnonvaraisen lähisukulaisensa peltokaalin (*B. campestris*) kanssa (Häikiö & Kangasjärvi 1999). Myös kaura (*Avena sativa*) saattaa risteytyä pahana rikkakasvina pidetyn hukkakauran (*A. fatua*) kanssa ja sokerijuurikas rikkamaisena kasvavien juurikkaiden kanssa. Bartsch ym. (1999) ovat tutkineet geenivirtaa viljellyistä juurikkaista (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*) luonnonvaraisiin juurikkaisiin (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*). Tutkimuksessa viljellyille juurikkaille tyy-

pillisiä alleeleja löytyi etenkin juurikasviljelmien lähellä kasvavista luonnonvaraisista populaatioista, mikä osoitti, että geenivirtaa todella tapahtuu eri kantojen välillä. Merijuurikasta on tavattu viime vuosisadalla myös Suomessa. Tosin merijuurikasyksilöitä on Suomessa tavattu vain muutamalla kasvupaikalla satunnaislajina (ks. esim. www-sivu: <http://www.jncc.gov.uk/ProtectedSites/SACselection/habitat.asp?FeatureIntCode=H1210>), joten introgressiomahdollisuus viljellyistä luonnonvaraisiin juurikkaisiin on lähinnä teoreettinen. Sen sijaan sokerijuurikkaan siementen seassa on yleensä rikkamaisen juurikkaan (viljellyn ja luonnonvaraisen juurikkaan risteymä) siemeniä (ks. http://www.sjt.fi/Villijuurikkaat_ja_kukka-varret.htm), joten on mahdollista, että GM-juurikkaat voisivat risteytyä niiden kanssa.

Tähän asti tehdyistä kenttäkokeista ja niissä käytetyistä GM-sovelluksista voi saada käsityksen siitä, minkälaisia kaupallisia GM-kasveja Suomessa tullaan mahdollisesti viljelemään.

Taulukko 1. Kenttäkokeet Suomessa vuoteen 2004 mennessä:

Kasvi	Geeni	Ominaisuus	
Ohra	merkkigeeni	geenivirran monitorointi	B/FI/96/4MB
	“	“	B/FI/97/3MB
Parsakaali	Bt-resistenssi	lysiinisynt.	B/FI/99/1MB
Kaali	Bt-resistenssi	lysiinisynt.	geeniekspressiotesti ja
Kukkakaali	Bt-resistenssi	lysiinisynt.	parann. varastoproteiini
Rypsi	Bt-resistenssi	lysiinisynt.	“
Kuusi	merkkigeeni		B/FI/96/1MB
Mänty	“		“
Koivu	“		“
Kuusi	merkkigeeni		B/FI/97/2MB
Mänty	“		“
Koivu	“		“
Rapsi	glyfosaattikestävyys	herbisidikestävyys	B/FI/97/6MB
“	lisätty stearaattipitoisuus	rasvahappomuunnos	B/FI/96/2MB
Peruna		sienenkestävyys (Phytophthora)	B/FI/97/1MB
“		viruskestävyys (Y virus)	“
Peruna	koirassteriliteetti/fertiliteetin palauttaminen	kukkiminen	B/FI/01/1MB
Peruna	virusresistenssi	viruskestävyys (X virus)	B/FI/96/3MB
Peruna	lisätty tärkkelyspitoisuus	tärkkelysmuutos	B/FI/04/1MB
Koivu	kitinaasisynteesi sieni- ja		B/FI/00/1MB
“	glukanaasisynteesi	hyönteiskestävyys	
Koivu	nitraattireduktaasisynt. + Rubisco	kasvuominaisuudet sekä hiili- ja typpiainevaihdunta	B/FI/00/1MB
Sokerijuur.	glufosinaattikestävyys	herbisidikestävyys	B/FI/98/1MB
“	glyfosaattikestävyys	herbisidikestävyys	B/FI/99/2MB
“	“	herbisidikestävyys	B/FI/96/5MB
“	“	herbisidikestävyys	B/FI/97/4MB
“	“	herbisidikestävyys	B/FI/97/5MB
Tupakka	arginiinidekarboksylaasi-ekspressio	stressinsieto	B/FI/99/3MB
Muut			
<i>Rhizobium</i> sp.		merkkigeeni	B/FI/00/1MA
<i>Streptococcus</i> sp.	bioluminesenssi markkeri		B/FI/95/1M

5

Riskinarviointi

Suomen kansallinen lainsäädäntö, joka pohjautuu EU:n lainsäädäntöön, edellyttää kattavaa riskien arviointia ennen GMO:ien tarkoituksellista ympäristöön leviämistä tai suljettua käyttöä. GMO:ien ympäristöriskien arvioinnissa tarkastellaan suoria ja välillisiä, välittömästi tai viipeellä ilmeneviä ympäristövaikutuksia. Riskinarvioinnin perusteena on vaaratekijöiden tunnistaminen sekä niiden todennäköisyyden ja haitan suuruuden arviointi. Mikäli GM-eliön käyttäytymisestä ei ole riittävästi tietoa, tarvitaan lisää tutkimusta. Kun riski on tunnistettu, erilaiset toiminnanharjoittajan toimet voivat auttaa vähentämään vaaratekijän vaikutuksia (riskinhallinta). Kun GM-eliön vaikutuksista ei ole olemassa riittävästi tietoa, sovelletaan yleensä varovaisuusperiaatetta. Riskien vakavuuden määrittelemineen on kuitenkin hyvin tulkinnanvaraista ja yleensä geenitekniikan ympäristöriskien arviointi on mahdollista suorittaa vain kvalitatiivisesti. Damgaard ja Løkke (2002) jakavat riskinarvioinnin kahteen luokkaan. Ensimmäinen on tietystä GM-kasvista intuitiivisesti tehty riskien kartoitus ('the concept of familiarity'), joka perustuu kerättyyn tietoon, toinen (kirjoittajien mielestä oikea ekologinen riskinarviointi) perustuu todennäköisyyksien arviointiin ('scientific risk assessment'). Ohjeita riskinarvioinnin järjestelmälliseen suorittamiseen löytyy mm. www-sivulta: <http://www.geenitekniikanlautakunta.fi/lomakkee.htm>.

Tärkeimmät GM-kasvien ympäristövaikutusten riskinarviointiin vaikuttavat tekijät

- Kasvilaji
- Siirrettävä ominaisuus
- Ympäristötekijät, jotka vaikuttavat kasvin käyttäytymiseen

Riskinarviointikäytäntöjä

- Tiedjen (1989) riskinarvioinnissa GM-kasveja verrataan muuntamattomiin kasveihin ja keskitytään fenotyypin muutoksiin. Menetelmä perustuu siihen, kuinka hyvin muutokset tunnetaan ja kuinka paljon ne poikkeavat alkuperäisistä ominaisuuksista. Häikiö & Kangasjärvi (1999) mukaan menetelmä ei ole kovin hyvä, mutta se on kuitenkin ensimmäinen riskinarviointimalli.
- Gaugitsch ja Tørgensen (1995) mukaan riskinarviointi perustuu jo olemassa olevaan tietoon, ja he painottavat kokeen huolellista suunnittelua.
- Goy ja Duesing (1996) mukaan *geenin siirtymisen todennäköisyys x geenin siirtymisen seuraukset = mahdolliset ympäristövaikutukset*.
- Zurich Hazard Analysis-malli (Jank ym. 1997)
- Gmhazid (Koivisto ym. 2001) on arviointikäytäntö, joka on peräisin prosessiteollisuuden riskien arvioinnista.

Kansallinen lainsäädäntö

Suomessa GM-kasveilla tehtävää tutkimusta ja kenttäkokeita säätelee geeniteknikkalaki ja -asetus. Suomen uudistettu geeniteknikkalaki (847/2004) astui voimaan 15.9.2004. Tärkeimmät muutokset vanhaan lakiin verrattuna ovat tarkennetut riskinarviointiohjeet, velvollisuus kuulla yleisöä kenttäkokeista, tuotteisiin liittyvä seurantavelvoite, tuotteiden lupa-ajan rajoittaminen maksimissaan 10 vuoteen ja julkinen geeniteknikkarekisteri. Lisäksi valvontavelvoite siirretään kolmelle eri ministeriön alaiselle virastolle: Suomen ympäristökeskukselle (SYKE), Kasvintuotannon tarkastuskeskukselle (KTTK) ja Sosiaali- ja terveydenhuollon tuotevalvontakeskukselle (STTV). SYKE valvoo avointa käyttöä ympäristökysymyksissä, KTTK avointa käyttöä maa- ja metsätalouden alalla, ja STTV valvoo sekä suljettua käyttöä kokonaisuudessaan että avointa käyttöä terveystieteissä. Kaikkien GM-kasvien parissa työskentelevien toiminnanharjoittajien tulee tehdä ilmoitus käyttöön tarkoitettuun tilaan ja käytön aloittamisesta; ilmoituksessa kuvataan mm. henkilöstö, käytettävät GM-organismit, toiminta ja sen tarkoitus ja laajuus, tilat, erilaiset eristämistoimet, jätehuolto ja suunnitelmat vaaratilanteiden varalle. Lisäksi tulee arvioida muunnettujen organismien käytöstä mahdollisesti ympäristölle tai ihmisen terveydelle aiheutuvat haitalliset vaikutukset.

Kenttäkoetta varten tehdään edellisten selvitysten lisäksi ilmoitus tarkoituksesta levittämisestä ympäristöön muussa kuin markkinoillesaattamistarkoituksessa Geeniteknikan lautakunnan tulee hyväksyä ilmoitus ennen kokeen aloittamista. Arvioidessaan ilmoitusta geeniteknikan lautakunta käyttää apunaan ympäristöasiantuntijoiden antamia lausuntoja. Em. kenttäkokeen riskinarvioinnissa selvitetään mm. vastaanottajakasvin

- levinneisyys
- lisääntymistapa
- lisääntymiseen vaikuttavat tekijät
- sukupolvien välinen aika
- risteytymismahdollisuudet
- elinkyky
- leviämiskyky

Riskinarvioinnissa selvitetään myös GM-tekniikassa käytetyt menetelmät ja mm.

- käytetyn sekvenssin koko, alkuperä ja tehtävät, sekä GM- ja kohdekasvin
- lisääntymisen sekä leviämisen ja elinkyvyn erot ja tutkitaan siirretyn/muunnetun geenin
- muuntumattomuus
- mahdollisuus siirtyä GM-kasveista muihin eliöihin

Lisäksi arvioidaan mahdolliset **toksiset tai haitalliset vaikutukset** ihmisen terveydelle tai ympäristölle, **vuorovaikutus kohdeorganismien ja muiden eliöiden kanssa**, tunnistus- ja havaitsemismenetelmät, sekä aiemmat tutkimus- ja kehittämiskokeet. Myös koalueen sijainti, koko ja ekosysteemi kuvataan ja tehdään arvio mahdollisista **ympäristövaikutuksista**, kuten **muunnettujen kasvien invaasiosta luonnollisiin elinympäristöihin**, mahdollisista **valintaeduista tai -haitoista**, sekä **vuorovaikutuksesta** kohdeorganismien ja muiden eliöiden kanssa.

EU:n lainsäädäntö

EU:n direktiivi 90/220:n mukaan geneettisesti muunnettuja organismeja ei saa päästää ympäristöön ilman kunnollista riskinarviointia ja viranomaisten lupaa. Uudistetussa, tarkoituksellisista GMO:ien ympäristöön levittämistä säätelevässä direktiivissä 2001/18/EY on kirjattu ensi kertaa ympäristöriskien arvioinnin periaatteet. Tämä asettaa lisävaatimuksia riskien arvioinnin järjestelmällisyydelle, toistettavuudelle, aukottomuudelle ja teoreettiselle perustalle. Direktiivin mukaan suora

ympäristövaikutus on sellainen joka johtuu itsestään GMO:sta eikä ilmene syy-suhteisen tapahtumaketjun seurauksena. Välillinen ympäristövaikutus taas on syy-suhteisen tapahtumaketjun seurauksena ympäristöön kohdistuva vaikutus, joka tapahtuu erilaisten mekanismien, kuten muiden organismien kanssa tapahtuvan vuorovaikutuksen, perintöaineuksen siirtymisen tai käytössä tapahtuvien muutosten seurauksena. Välittömästi ilmenevät ympäristövaikutukset havaitaan jo GMO:n levittämisen aikana, ja ne voivat olla suoria tai välillisiä. Viipeellä ilmeneviä vaikutuksia taas ei välttämättä havaita GMO:n levittämisen aikana, mutta ne voivat ilmetä suorina tai välillisinä vaikutuksina joko myöhemmässä vaiheessa, tai jopa vasta levittämisen lopettamisen jälkeen.

Jos GMO:niin liittyy vaaratekijä (Vaihe 1), se on aina olemassa ja sitä voidaan pitää luontaisena ominaisuutena. Vaaratekijät voivat tietyllä todennäköisyydellä (Vaihe 3) johtaa (haitallisiin) seurauksiin, ja näiden seurausten laajuus (Vaihe 2) voi vaihdella.

Vaihe 1. Sellaisten ominaisuuksien tunnistaminen, joilla voi olla haitallisia vaikutuksia

Vaikutukset vaihtelevat tapauksittain ja niitä voivat olla:

- ihmiselle aiheutuvat taudit, allergeeniset ja toksiset vaikutukset
- eläimille tai kasveille aiheutuvat taudit, mukaan luettuina toksiset, ja kun siihen on aihetta, allergeeniset vaikutukset
- vastaanottavan ympäristön lajien populaatioiden dynamiikkaan sekä näiden populaatioiden geneettiseen monimuotoisuuteen kohdistuvat vaikutukset
- muuttunut alttius patogeeneille siten, että tarttuvat taudit leviävät helpommin ja/tai syntyy uusia reservoaareja (varastoja) tai vektoreita
- ehkäisevien tai terapeuttisten lääketieteellisten, eläinlääketieteellisten tai kasvinsuojeluun liittyvien hoitojen vaarantuminen esim. siten, että siirretään geenejä, jotka aiheuttavat resistenssin ihmisten tai eläinten hoidossa käytettäville antibiooteille
- biogeokemialliset vaikutukset (biogeokemialliset syklit), erityisesti hiilen ja typen kiertoon maaperässä orgaanisen aineen hajotessa.

Vaihe 2. Kunkin haitallisen vaikutuksen mahdollisten seurausten arviointi, jos tällaisia vaikutuksia ilmenee

Kunkin mahdollisesti ilmenevän haitallisen vaikutuksen seurausten laajuus olisi arvioitava.

Riskinarvioinnissa on tärkeä arvioida paitsi todennäköisyyttä, jolla mahdolliset haitalliset ominaisuudet ilmenevät, myös seurausten laajuutta. Laajuuteen vaikuttavat todennäköisesti:

- geenikonstruktio
- kaikki tunnistetut haitalliset vaikutukset
- levitettyjen GMO:ien määrä (laajuus)
- ympäristö, johon GMO:t on tarkoitus levittää
- levitysolosuhteet, myös valvontatoimet
- edellä mainittujen tekijöiden yhdistelmät

Seurausten laajuus:

- **'Suuret seuraukset'** esim. yhden tai useamman lajin määrässä tapahtuvia merkittäviä muutoksia (häviäminen, väheneminen), jotka eivät ole palautuvia, tai ovat erittäin hitaasti palautuvia.
- **'Kohtalaiset seuraukset'** esim. organismien populaatiotiheyksissä tapahtuvia merkittäviä muutoksia, jotka eivät kuitenkaan johda lajin täydelliseen häviämiseen tai joilla olisi merkittävä vaikutus uhanalaisiin tai hyötylajeihin.

- ‘**Vähäiset seuraukset**’ voivat olla organismien populaatioiheyksissä tapahtuvia vähäisiä muutoksia, jotka eivät johda minkään muiden organismien populaation tai lajin täydelliseen häviämiseen ja jotka eivät vaikuta kielteisesti ekosysteemin toimintaan. Muutokset voivat vaikuttaa lyhyellä tai pitkällä aikavälillä ainoastaan sellaisiin lajeihin, jotka eivät ole uhanalaisia tai kuulu hyötylajeihin.
- ‘**Erittäin pienillä seurauksilla**’ tarkoitetaan sitä, että kyseisen ympäristön populaatioissa tai ekosysteemin toiminnassa ei tapahdu merkittäviä muutoksia.

Mahdollisista seurauksista voidaan tehdä tiivistelmä tavalla, joka käsittää kaikki ekologiset yksiköt (lajit, populaatiot, trofiatasot ja ekosysteemit), joihin vaikutus voi kohdistua, sekä varotoimet ja epävarmuusasteen.

Vaihe 3. Kunkin tunnistetun mahdollisen haitallisen vaikutuksen ilmenemistodennäköisyyden arviointi

Myös haitallisten vaikutusten ilmenemistodennäköisyyden arviointi on tärkeää. Arvioidaan, kuinka todennäköistä on, että haitallisia vaikutuksia todella ilmenee. Joissakin tapauksissa on käsiteltävä sekä ilmenemisen todennäköisyyttä, että sen taajuutta.

Arvioitaessa elossasäilyvyyttä on tarpeen arvioida, kuinka suuri osa GMO:ista todennäköisesti säilyy elossa levittämistä varten ehdotetuista riskinhallintatoimista huolimatta. Jos geenivirta on todennäköinen, olisi otettava huomioon tällaisten tapausten todennäköinen määrä tai yleisyys. Jos GMO:illa on patogeenisiä tai toksisia ominaisuuksia, olisi arvioitava, kuinka suureen osaan kohdeorganismeja ne todennäköisesti vaikuttavat ympäristössä. Jokaisen tunnistetun haitallisen vaikutuksen osalta on mahdotonta arvioida kvantitatiivisesti, millä suhteellisella todennäköisyydellä se ilmenee. Ilmenemistodennäköisyydestä voidaan kuitenkin käyttää ilmaisuja ‘suuri’, ‘kohtalainen’, ‘vähäinen’ ja ‘erittäin pieni’.

Vaihe 4. GMO:ien kunkin tunnistetun ominaisuuden aiheuttaman riskin arviointi

Kunkin tunnistetun ominaisuuden, jolla mahdollisesti on haitallisia vaikutuksia ihmisten terveyteen tai ympäristöön, aiheuttaman riskin arviointi olisi tehtävä mahdollisimman perusteellisesti alan uusimman tiedon pohjalta yhdistämällä haitallisen vaikutuksen ilmenemisen todennäköisyys sekä seurauksien laajuus, mikäli vaikutus ilmenee.

Vaiheissa 2 ja 3 tehtyjen päätelmien perusteella olisi arvioitava haitallisten vaikutusten riski kunkin vaiheessa 1 tunnistetun vaaran osalta. Kvantitatiivinen arviointi on luultavasti mahdotonta. Kunkin vaaran arvioinnissa olisi otettava huomioon vaaratekijän

- seurausten laajuus (suuret, kohtalaiset jne.)
- haitallisen vaikutuksen todennäköisyys (suuri, kohtalainen jne.)
- jokaisen yksittäisen haitallisen vaikutuksen laajuus ja todennäköisyys, jos vaaratekijällä on useampi kuin yksi haitallinen vaikutus.

Jokaista GMO:a on käsiteltävä tapauskohtaisesti. Jos esim. jonkin haitallisen vaikutuksen seuraukset arvioidaan jossakin tapauksessa suuriksi ja ilmenemistodennäköisyys erittäin pieneksi, riski voi asettua minne tahansa asteikolla suuresta erittäin pieneen. Tulos riippuu kyseisistä olosuhteista sekä siitä, miten ilmoittaja painottaa tiettyjä tekijöitä, jotka olisi kaikki kuvattava selvästi ja perusteltava ympäristöriskien arvioinnissa.

Vaikka ympäristöriskien arvioinnin on perustuttava kvantifioitaviin tuloksiin, monet arvioinnin lopullisista tuloksista ovat todennäköisesti laadullisia.

Vaikka tulokset ovatkin laadullisia, niiden on mahdollisuuksien mukaan oltava myös vertailukelpoisia (tietojen vertaaminen esim. muita kuin GMO:ia koskeviin tietoihin).

Vaihe 5. GMO:ien tarkoitukselliseen levittämiseen tai markkinoille saattamiseen liittyvien riskien hallintastrategioiden soveltaminen

Riskien arvioinnilla voidaan tunnistaa mahdolliset hallintaa vaativat riskit. Olisi valvottava tunnistettuja riskejä ja otettava huomioon kaikki epävarmuustekijät. Varotoimet olisi suhteutettava riskin suuruuteen ja epävarmuusasteeseen. Riskinhallintatoimien olisi oltava sellaisia, että riskiä voidaan vähentää merkittävästi. Hallintastrategioihin voi kuulua eristämistoimien toteuttaminen jokaisessa olennaisessa GMO:ien käsittelyn ja käytön vaiheessa. Strategioihin voi kuulua monenlaisia toimia, kuten erilaisia keinoja lisääntymisprosessin eristämiseksi, fyysisiä tai biologisia esteitä sekä GMO:ien kanssa kosketuksissa olleiden koneiden ja säiliöiden puhdistamista.

Vaihe 6. GMO:ien kokonaisriskin määrittäminen

GMO:ien kokonaisriskin arviointi olisi tehtävä ottaen huomioon kaikki ehdotetut riskien hallintastrategiat.

Seuranta

Seuranta on joko sellaisten ympäristövaikutusten tarkastelua, jotka on tunnistettu GMO:ien riskinarvioinnissa tai odottamattomien vaikutusten seuraamista. EU:n direktiivi 2001/18/EY velvoittaa ilmoittajan laatimaan seurantasuunnitelman osana GMO:n tarkoituksellista levittämistä ympäristöön koskevaa ilmoitusta. Korkeammilla kasveilla ja muilla kuin korkeammilla kasveilla on eri ilmoitukset, jälkimmäisille tulee ilmoittaa GMO:ien jäljitykseen ja niiden vaikutusten seuraamiseksi aiotut menetelmät, niiden herkkyys ja luotettavuus, tekniikat geenivirran havaitsemiseksi, sekä seurannan kesto ja taajuus. Korkeammilla kasveilla vaaditaan lisäksi kuvaus seurantasuunnitelmista ja tekniikoista. Direktiivissä (2001/18/EY) on mainittu sekä tapauskohtainen että yleinen seuranta.

- Tapauskohtainen seuranta (case specific monitoring) – käsittää riskinarvioinnissa havaitut riskit (esim. lajien ja geenien leviäminen ympäristöön, suorat ja välittömät vaikutukset). Tapauskohtaisen seurannan taustalla on yleensä selvästi tunnistettu riski (esim. geenivirta GM-kasvin ja luonnonvaraisen sukulaisen välillä). Tapauskohtainen seuranta on ilmoittajan tehtävä.
- Yleinen seuranta (general surveillance) – käsittää riskinarvioinnissa havaittujen vaikutusten lisäksi mahdolliset odottamattomat vaikutukset. Yleinen seuranta on pitkäaikaista ekologista ja monitieteellistä tutkimusta. Seuranta voi käsittää välillisiä, odottamattomia ja viipeellä ilmeneviä vaikutuksia ja saattaa vaatia pysyviä, laaja-alaisia testialueita.

Vaikka seuranta on (todennäköisesti) kallista, aikavievää, ja menetit vielä suurelta osin määrittelemättä, se voi kuitenkin olla ainoa keino saada tietoa esim. riskinarvioinnissa esitetyistä vaaroista, sekä tunnistamattomista ja ennustamattomista vaaroista. Seurannan avulla voidaan mahdollisesti myös ehkäistä havaittuja haittoja sekä hankkia yleistä tietoa GMO:ien ympäristövaikutuksista (seurannasta enemmän; ks. Kempainen ym. 2003).

Seurannan vielä jokseenkin avoimia kysymyksiä ovat Kempainen ym. (2003) mukaan mm. seuraavat

- Kuinka suurella todennäköisyydellä haitat tulee voida havaita (menetelmien herkkyys)?
- Kuinka pitkään seurantaa tulee jatkaa, jotta kaikki vaikutukset voitaisiin havaita?
- Mikä on riittävän suuri alue ja seurantapaikkojen tiheys/näytteiden otanta kussakin tapauksessa? Nämä määräytyvät tapauskohtaisesti.

Esimerkkejä seurattavista vaikutuksista

- GMO:ien invaasiopotentiaali, risteytyminen luonnonvaraisten tai perinteisesti viljeltävien yksilöiden kanssa, kilpailukyky muuntamattomiin kasveihin verrattuna, leviäinpankki, leviäinten levinneisyyden laajuus/runsaus, itämisnopeus, itämisekologia.
- Selkärangattomia tutkittaessa voidaan keskittyä mahdollisiin kohdelajeihin, niiden saalistajiin/symbiontteihin/loisiin ja alueen indikaattorilajeihin
- GM-kasvien käyttöönoton myötä mahdollisesti muuttuneiden viljelymenetelmien ympäristövaikutusten seuraaminen
- Kowalchuk ym. (2003) mukaan seurantaan tulisi ottaa mukaan horisontaalisen geenien siirtymisen (HGT; kasvi → bakteeri) seuraaminen, sillä sitä todennäköisesti tapahtuu äärimmäisen harvoin ja se on havaittavissa ainoastaan pitkäaikaisissa kokeissa. HGT:n seuraaminen on kuitenkin hyvin vaikeaa juuri harvinaisuutensa ja kehittymättömien testimenetelmien takia. Lisäksi nykytietämyksen valossa HGT:n ympäristövaikutukset jäänevät vähäisiksi, joten sen seuranta ei välttämättä ole tarkoituksenmukaista kuin harvoissa tapauksissa.

Tutkimusmenetelmät

Luvussa 3. mainittuja mahdollisia GM-kasvien ympäristövaikutuksia ovat:

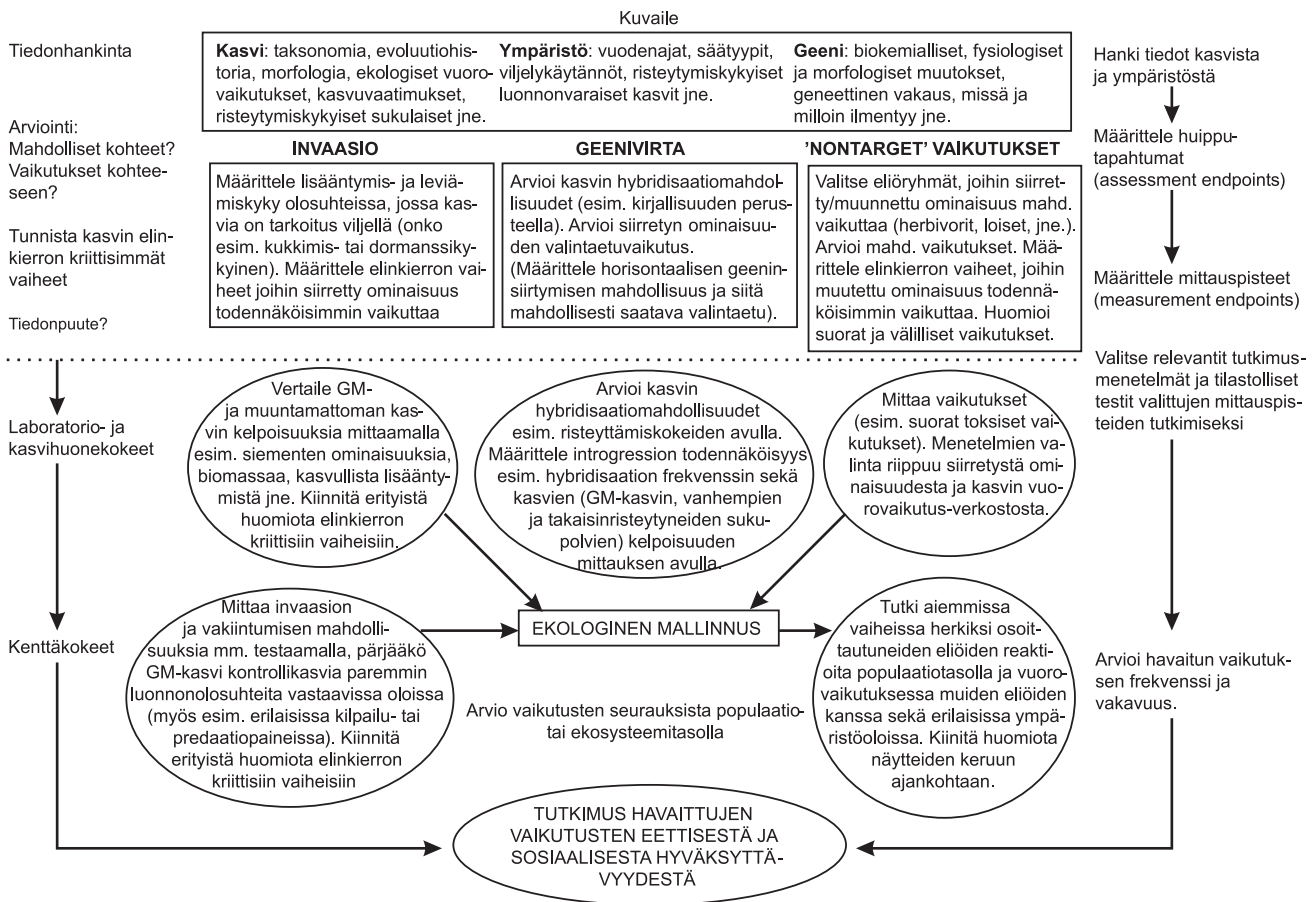
- parantunut leviämiskyky (invaasio)
- hybridisaatio ja introgressio
- horisontaalinen geenin siirtyminen
- vaikutukset muihin kuin kohde-eliöihin
- muut (odottamattomat vaikutukset)

Näihin sisältyvät EU:n direktiivissä 2001/18/EY mainitut ympäristövaikutukset, sekä kirjallisuudessa mainitut mahdolliset ympäristövaikutukset:

- vastaanottavan ympäristön lajien populaatioiden dynamiikkaan sekä näiden populaatioiden geneettiseen monimuotoisuuteen kohdistuvat vaikutukset
- muuttunut alttius patogeneille siten, että tarttuvat taudit leviävät helpommin ja/tai syntyy uusia reservoaareja (varastoja) tai vektoreita
- ehkäisevien tai terapeuttisten lääketieteellisten, eläinlääketieteellisten tai kasvinsuojeluun liittyvien hoitojen vaarantuminen esim. siten, että siirretään geneejiä, jotka aiheuttavat resistenssin ihmisten tai eläinten hoidossa käytettäville antibiooteille
- biogeokemialliset vaikutukset (biogeokemialliset syklit), erityisesti hiilen ja typen kiertoon maaperässä orgaanisen aineen hajotessa.

Edellä mainitut vaikutukset tulisi huomioida riskinarvioinnissa (kuva 1). Toisaalta mikäli kasvilla ei esim. tiedetä viljelyalueella olevan luonnonvaraisia kantoja tai risteytymiskykyisiä sukulaisia, ei introgression mahdollisuuttakaan ole. Lisäksi esim. horisontaalisen geenin siirtymisen tutkiminen voi osoittautua liian kalliiksi tai vaikeaksi tehtäväksi, jotta se voitaisiin toteuttaa.

Riskinarvioinnissa keskitytään niihin seikkoihin, jotka erottavat GM-kasvin vastaavasta muuntamattomasta kasvista (kuva 1). GM-kasvien viljelyn ympäristövaikutusten arviointi tai oikeiden tutkimusmenetelmien valinta voi olla vaikeaa ekosysteemien monimuotoisuuden takia (Wolfenbarger & Phifer 2000). On epätoimennäköistä, että esim. pelkän merkkigeenin siirtäminen muuttaisi kasvin ekologiaa tai sen vuorovaikutusta ympäristönsä kanssa (katso kuitenkin esim. Alla ym. 2003), kun taas esim. siirretyllä taudinkestävyydellä saattaa olla merkittäviäkin ympäristövaikutuksia. Gaugitsch (2002) mukaan GM-kasvin täydellisestä elinkierron arvioinnista voisi olla apua muuntogeenisten kasvien riskinarvioinnissa. Elinkierron arviointi pitäisi sisällään kasvin vaiheet siemenestä sadonkorjuuseen ja sisällyttäisi mukaan myös viljelymenetelmät (käytetyn polttoaineen, lannoitteiden, pestisidien ym. määrät) ja muut ympäristön kannalta tärkeät tekijät. Elinkierron arviointia olisi kehitettävä niin, että siihen voitaisiin sisällyttää sekä laskennalliset parametrit (energiankulutus, lannoitteiden määrä jne.), että myös laadulliset tekijät, kuten esim. geeninsiirtymisen ja invaasion ympäristövaikutukset (Gaugitsch 2002). Toisaalta elinkierron arvioinnista saatavat tulokset riippuvat valituista viljelymenetelmistä ja voivat olla erilaisia eri kasvuympäristöissä esim. erilaisista rikkaruohopaineista johtuen.



Kuva 1. GM-kasvin ympäristövaikutusten arvioinnin vaiheet. Tutkittavien ominaisuuksien ja tutkimusmenetelmien lisäksi tulee kokeen suunnittelussa kiinnittää huomiota mm. tutkimuksen riittävään kestoan ja toistojen määrään, sekä siihen, että koasetelma vastaa käytettävää tilastollista mallia.

GM-kasveilla voi olla erilainen vaste erilaisissa ympäristöissä, esim. erilaisista stressitekijöistä riippuen. Vaikka kasveja olisikin tutkittu jossain tietyssä ympäristössä, ei ole varmaa, että tulokset pätsivät muualla, esim. muissa maissa viljeltäessä. Mahdollisten pitkäaikaisten tai viipeellä ilmenevien ympäristövaikutusten selvittämiseen tarvitaan laajoja, pitkäaikaisia, tapauskohtaisia tutkimuksia (Riches & Vallverde 2002). Useissa yhteenvedoissa (esim. Kowalchuk ym. 2003) suositellaan tehtäväksi monivaiheisia tutkimuksia GM-kasvien ympäristövaikutusten arvioinnissa.

Ensimmäisessä vaiheessa määritellään indikaattorieliöt ja tutkitaan erilaisia altistumismahdollisuuksia, seuraavassa vaiheessa tehdään pienimuotoisia laboratorionkokeita jne. Mikäli vaikutuksia huomataan aiemmissa kokeissa, jatketaan tutkimusta seuraavaan vaiheeseen aina kenttäkokeisiin asti. Toisaalta vaikka laboratorio- tai kasvihuonekokeissa ei GM-kasvilla vaikutuksia havaitakaan, voivat vaikutukset ilmetä kenttäkokeissa. Kenttäkokeissa GM-kasvi on luonnollisessa vuorovaikutuksessa muiden eliöiden kanssa ja tulokset saattavat poiketa kontrolloiduissa kasvihuoneolosuhteissa tehtyjen kokeiden tuloksista (Pasonen ym. 2004). Kowalchuk ym. (2003) mukaan tutkimuksissa saatujen tulosten merkitystä tulisi arvioida myös esim. ekosysteemin toiminnan kannalta.

Ympäristövaikutusten määrittämiseen ja ennakoimiseen (riskinarviointi) soveltuvia lähestymistapoja ovat

- vertailu muuntamattomiin kasveihin
- kokemukset muista kasveista, joihin siirretty sama ominaisuus
- laboratorio- ja kenttäkokeet,
- ekologinen mallintaminen sekä
- kaikkien näiden yhdistelmä.

Alustava arvio siitä, onko siirretty/muutettu ominaisuus vaikuttanut jollakin tavalla GM-kasvin kelpoisuuteen saadaan yksinkertaisesti vertailemalla GM-kasvin ja muuntamattoman verrokin kasvu- ja lisääntymisominaisuuksia kasvihuoneolosuhteissa. Kuitenkin mm. muihin kuin kohde-eliöihin kohdistuvien vaikutusten selvittäminen vaatii monimutkaisempia koejärjestelyjä. Pitkäaikaiset tai odottamattomat vaikutukset saattavat ilmetä vasta kenttäolosuhteissa pitkän ajan kuluessa. Lisäksi esim. GM Science Review'n (2003) mukaan olisi varomatonta yleistää herbisidikestävien GM-kasvien ympäristövaikutuksia mittaavasta kenttäkokeista saatuja tuloksia koskemaan myös muunlaisia GM-kasveja. Esimerkiksi lisääntyneen invaasiokyvyn mahdollisuus onkin selvitettävä erikseen kunkin kasvilajin ja kunkin siirretyn ominaisuuden kohdalla sekä mahdollisesti myös erilaisissa ympäristöolosuhteissa.

Kareiva ym. (1996) mukaan GM-kasvitutkimusten tulokset viittaavat siihen, että alle kolme vuotta kestävät tutkimukset antavat riittämättömän arvion kasvien lisääntymisen/leviämisen nopeuden/laajuuden muutoksesta, huolimatta tutkittujen alueiden laajuudesta tai määrästä. Esim. Crawley ym. (2001) seurasivat GM-viljelykasvien selviytymistä (verrattuna muuntamattomiin kasveihin) peräti kymmenen vuoden ajan, kun taas GM-tuotekokeissa tehtävien tutkimusten kesto saattaa olla ainoastaan muutamia kuukausia.

Linder ja Schmitt (1994) mukaan nollasegreganttilinjan kasvit, jotka ovat samaa sukupolvea kuin siirtogeeniset kasvit, ovat parhaita kontrollikasveja GM-kasvitutkimuksissa. Nollasegreganttilinjan kasvit ovat sellaisten kasvien jälkeläisiä, joilla siirtogeeni on vain toisessa vastinkromosomissa (hemitsygootti), ja jotka ovat menettäneet siirtogeenin mendelistisen eroamisen seurauksena. Linder ja Schmitt (1994) pitävät solukkoviljelyn avulla saatuja kontrollikasveja nollasegregantteja huonompana vaihtoehtona mahdollisen somaklonaalisen variaation (ks. Walden & Schell 1990) takia. Solukkoviljelyn avulla saadut muuntamattomat kasvit ovat kuitenkin yleisesti käytettyjä kontrolleja GM-tuotekokeissa.

Yleinen argumentti laboratorio-olosuhteista saatuun näyttöön siirtogeenisten kasvien ympäristövaikutuksista on, että laboratoriotutkimusten tuloksia ei voida suoraan verrata luonnossa tapahtuviin mekanismeihin. Tulevaisuudessa olisiikin saatava tietoa GM-kasvien ympäristövaikutuksista kenttäolosuhteista, laajemmilta alueilta sekä pidemmältä ajalta kuin tähänastisista tutkimuksista. Mahdollisesti erilaiset mallintamismenetelmät voivat tulevaisuudessa osin korvata GM-kasveilla tehtävät laaja-alaiset ja mahdollisesti riskialttiit tutkimukset.

7.1 Invaasiokyky

Hyvän leviämiskyvyn omaava kasvi pystyy valtaamaan kasvupaikkoja, joissa se ei aiemmin ole esiintynyt, sekä myös vakiintumaan uusille kasvupaikoille (Ellstrand & Schierenbeck 2000). Kasvin leviämisessä uudelle kasvupaikalle on useita vaiheita: siementen tai muiden diasporien leviäminen, itäminen sekä populaation

selviytyminen (survival) ja vakiintuminen (persistence), sekä vielä mahdollisesti hybridisaatio luonnonvaraisten kasvien kanssa. Uuden GM-kasvin leviämiskyvyn muutos muuntamattomaan kasviin verrattuna tulisi selvittää mikäli uusi ominaisuus on siirretty potentiaalisesti hyvän leviämiskyvyn omaavaan kasviin, tai mikäli ominaisuus itsessään parantaa merkittävästi kasvin selviytymistä viljelyalueen ulkopuolella. Erityisesti sellaiset siirtogeenit, jotka antavat GM-kasville selvän valintaedun (esim. stressinsieto) voivat parantaa kasvin mahdollisuuksia runsastua muiden (alkuperäisten) kasvien kustannuksella (Crawley ym. 2001). GM-kasvien invaasiokykyä voidaan kenties jossain määrin ennakoita vertaamalla niiden ominaisuuksia aggressiiviseksi tiedettyjen tulokaslajien ominaisuuksiin. Joly (2000) on ehdottanut tietopankin perustamista mahdollisesti aggressiivisiksi leviäjiksi osoittautuvista lajeista. Tällainen tietopankki sisältäisi eliöistä monenlaisia tietoja (fylogenia, leviämisstrategia, rooli ekosysteemissä) ja siitä voisi olla hyötyä GM-kasvien ympäristövaikutuksia arvioitaessa.

Minkä kasvilajien/siirretyn ominaisuuden kohdalla riskinarvioinnissa kannattaa huomioida parantunut leviämiskyky?

Suomessa mahdollisesti leviämiskykyisiksi osoittautuvia GM-kasveja ovat esim. rapsi (*Brassica napus* ssp. *oleifera*), rypsi (*B. rapa* ssp. *oleifera*), jotkut metsäpuut, ja mahdollisesti vadelma (*Rubus idaeus*), sokerijuurikas (*Beta vulgaris*) ja kaura (*Avena sativa*). Rapsi leviää helposti, ja siinä on muitakin rikkamaisia piirteitä, kuten suuri siementuotanto, siementen pieni massa ja hyvä dormanssikyky. Myös tuulilevitteiset GM-metsäpuut, kuten koivu (*Betula* spp.), kuusi (*Picea abies*), leppä (*Alnus* spp.) ja mänty (*Pinus sylvestris*), joilla on parannettu taudin- tai stressinkestävyysominaisuus, voivat osoittautua hyvin leviäviksi. Puut ovat paitsi avainlajeja metsäekosysteemeissä, myös pitkäikäisiä. Häikiö & Kangasjärvi (1999) mukaan taudinkestävyuden siirtäminen puihin on erityisen riskialtista, sillä se voi parantaa kasvin kilpailukykyä huomattavasti. Tämä tosin edellyttää sitä, että jokin patogeeni on merkittävä leviämistä rajoittava tekijä. Voidaan myös ajatella, että sellaisen luonnonvaraisen kasvin kohdalla, jolla on takanaan pitkä evoluutiohistoria (esim. koivu), yhden geenin siirtäminen ei välttämättä lisää kilpailukykyä niissä olosuhteissa, joihin laji on pitkän ajanjakson aikana sopeutunut. Monet sellaiset Suomessa yleisesti viljeltävät kasvit (kuten esim. kurkku, peruna, tomaatti), joille on jo olemassa GM-sovelluksia, eivät todennäköisesti pysty leviämään Suomen olosuhteissa, eikä niillä ole täällä risteytymiskykyisiä luonnonvaraisia populaatioita tai lähisukulaisia.

Mikä on leviämiskyvyn paras indikaattori?

Teoriassa GM-kasvi voi muuttua hyvin leviämiskykyiseksi mikäli siihen siirretty ominaisuus on kelpoisuutta parantava. Kelpoisuuden määritelmä on yksilön kyky tuottaa lisääntymiskykyisiä jälkeläisiä. Tähän kykyyn voivat vaikuttaa monet ominaisuudet, esim. kasvunopeus ja taudinkestävyys, joita voidaan pitää epäsuorina kelpoisuuden mittareina (components of fitness; ks. Kjellsson ym. 1997). Kasvin kelpoisuutta arvioitaessa joudutaan tekemään oletuksia, sillä kelpoisuutta on vaikea mitata (ks. Kjellsson ym. 1997 sekä Ouborg ym. 1991; Wolfe 1993; Hauser & Loeschcke 1995; Stratton 1995). Elinikäinen kelpoisuus käsitetään yleensä yksilön tuottamien jälkeläisten määränä. Erityisesti pitkäikäisten kasvien elinikäisen kelpoisuuden määrittäminen voi olla hyvin vaikeaa. Elinikäisen kelpoisuuden sijasta käytetäänkin usein sellaisia kelpoisuuden osatekijöitä, joiden arvellaan vaikuttavan kasvin kelpoisuuteen (Kjellsson 1997). Tällaisia tekijöitä ovat elossa säilyminen, siitepölyn kunto ja kilpailukyky, sekä siementen laatu. Kelpoisuuden kanssa korreloivia tekijöitä taas ovat kasvunopeus, kukintaan liittyvät ominaisuudet (tuotanto, ajankohta) ja pölyttäjien vierailutiheys. Kjellsson ym. (1997) mukaan kel-

poisuuden osatekijät eivät kuitenkaan välttämättä anna kuvaa elinikäisestä kelpoisuudesta, sillä muut elinvaiheet voivat olla tutkittuja tekijöitä enemmän valintapaineen alaisena. Kelpoisuuden osatekijöitä ja kelpoisuuden kanssa korreloivia ominaisuuksia voidaan käyttää yhdessä kelpoisuuden mittarina (Hauser & Loeschcke 1995; Kjellsson ym. 1997).

Kirjallisuudessa on mainittu lukuisia kasvien leviämiskykyyn mahdollisesti vaikuttavia ominaisuuksia. Näistä yleisimmin mainittuja ovat

- abioottiset tekijät
- siementen runsaus, koko ja leviämiskyky
- kasvin kyky erittää ympäristöön muita kasveja haittaavia kemiallisia yhdisteitä (allelopatia)
- siitepölyn ominaisuudet ja kukinnan runsaus
- hyvä tuholaisten/tautien kestävyys
- stressinsieto (kuivuus, kylmyys, suolaisuus)
- iso koko ja parantunut kasvunopeus
- nopea lisääntymiskierto
- tehokas suvuton lisääntyminen.

Myös ympäristö, erityisesti kilpailuolosuhteet vaikuttavat kasvien leviämispotentialiin. Invaasiokykyiset kasvit valtaavatkin yleensä häirittyjä kasvupaikkoja, kuten pellonreunoja ja tienvarsia (esim. lupiini).

Miten leviämiskykyä voidaan tutkia?

Tieto siitä, onko kyseinen kasvi ollut invaasiokykyinen jossakin muualla, sekä siitä, onko siirretty ominaisuus lisännyt jonkin toisen kasvin leviämiskykyä voi olla lähtökohtana leviämiskyvyn arvioinnissa. GM-kasvin ominaisuuksia voidaan myös verrata aggressiivisiksi tiedettyjen tulokaslajien, esim. lupiinien (*Lupinus* spp.), jättiputkien (*Heracleum mantegazzianum* ja *H. persicum*) ja kurtullehtiruusun (*Rosa rugosa*) ominaisuuksiin. Kjellsson ja Simonsen (1994) mukaan GM-kasvien leviämiskyvyn arviointiin tarvitaan lisää tutkimustietoa viljelykasvien leviämiskyvystä luonnonolosuhteissa sekä erityisesti niistä tekijöitä, jotka estävät kasvien leviämistä ympäristöön. Lisäksi tarvitaan tietoa sekä uusista geneettisistä ja ekologisia tutkimusmenetelmiä esim. taimivalinnan (seedling selection) merkityksen selvittämiseksi kasvien leviämisessä. GM-kasvin ja muuntamattoman kasvin kelpoisuuksien vertailu esim. eri kelpoisuuden osatekijöitä käyttämällä voi olla hyödyllistä leviämiskykyä arvioitaessa. Seuraavassa luetellaan leviämiskyvyn tutkimiseen mahdollisesti soveltuvia menetelmiä, joista suuri osa on peräisin Kjellsson ja Simonsen (1994) esittämästä ekologisten tutkimusmenetelmien listasta. Menetelmä on kirjoitettu **lihavoituna** kun se esiintyy tekstissä ensimmäistä kertaa.

Siemenen ominaisuudet

Etenkin siementen kokoa, runsautta, leviämisen- ja dormanssikykyä on perinteisesti pidetty kasvien leviämiskyvyn indikaattoreina. Siemeniin voivat vaikuttaa sekä itse siirretty ominaisuus, että myös sen kanssa käytetty promoottori (ilmentyykö uusi geeni koko kasvissa). Kjellsson & Simonsen (1994) mukaan kasvien (ja kasvi populaatioiden) siementuotanto on ratkaiseva tekijä kasvin leviämistiheyden ja taimien eloonjäämisen kannalta. Siementen leviämismatka vaikuttaa kasvin leviämistehokkuuteen. Tiedot siemenpankin koosta ja siementen selviytymiskyvystä ovat tärkeitä arvioitaessa GM-kasvien pitkäaikaista eloonjäämistä uusilla kasvu-

paikoilla. Siemenen koon ja muodon perusteella voidaan ennakoida sen säilymistä maaperässä (Thompson ym. 1993). Siemenpankkien avulla voidaan siten tutkia myös GM-kasvin ajallisen leviämisen potentiaalia.

Siementen koko vaikutti Turnbull ym. (1999) tutkimuksessa selvästi tutkittujen seitsemän yksivuotisen kasvin leviämiskykyyn. Suuret siemenet paransivat kasvien kilpailukykyä niiden asettautuessa alueille, joilla oli jo ennestään tiheä kasvillisuus. Suuria siemeniä tuottavilla kasveilla on toisaalta pienisiemenisiä kasveja pienempi siementuotanto (Turnbull ym. 1999).

Tuotettujen siemenaiheiden määrä voidaan yksinkertaisesti laskea. Toisaalta kaikista siemenaiheista ei välttämättä kehity eläviä siemeniä mikäli esimerkiksi pölytys ei ole riittävän tehokas. Siementuotannon suuruutta voidaan mitata suoraan **laskemalla** siemeniä (ks. esim. Legere & Deschenes 1989; Herrera 1991) tai välillisesti **siemenkeräimiä** käyttämällä (sopivat erityisesti tuulilevitteisten siementen tutkimiseen; ks. Werner 1975; Kjellsson 1992). Elinkykyisten siementen lukumäärä saadaan selville **idättämiskokeen** avulla. Siementen idättämiskoe (ks. Thompson & Grime 1979; Dalrymple & Rogers 1983; Ballegaard & Warncke 1985; Granström & Fries 1985; Blum ym. 1992; Kjellsson 1992; Aliotta ym. 1993; Agarwal ym. 2002) on menetelmä, jossa siemenet idätetään ja taimien kasvua seurataan esim. agar-alustalla tai suodatinpaperilla. Idättämiskoe voidaan tehdä myös maa-alustalla esim. siemenpankkeja tutkittaessa (ks. Heard ym. 2003a, 2003b). Idättämiskokeiden valo- ja lämpöolosuhteita voidaan vaihdella tutkittaessa ympäristöolosuhteiden vaikutuksia siementen itämiskykyyn. Siementen itämiskoetta on käytetty lisäksi mm. hybridisaation tutkimisessa (Seavey & Carter 1994) sekä risti-pölytyksen määrän arvioinnissa (Eckert & Barrett 1994).

Siementen leviämismatkan ja -tiheyden kartoittamiseen voidaan käyttää esim. **fluoresoivaa väriä** tai **radionuklidileimausta** (Jensen & Nielsen 1986; McEvoy & Cox 1987; Primack & Levy 1988) sekä siemenkeräimiä (Werner 1975; Kjellsson 1992). Tietystä lähteestä (esim. GM-kasvista) peräisin olevia elinkykyisiä siemeniä voidaan jäljittää välillisesti etsimällä itäneistä taimista spesifejä DNA-markkereita esim. **PCR:n*** ja **sekvensoinnin*** avulla. Markkeritutkimuksissa on suunniteltava tarkkaan näytteiden lukumäärä ja tutkimusalueen laajuus, jotta leviämisestä saataisiin mahdollisimman luotettava kuva. Sama menetelmä soveltuu sekä siitepölyn että siementen tutkimiseen. Tämä tosin edellyttää sopivan markkerin olemassaoloa ja tulee kalliimmaksi kuin edellä mainitut menetelmät. Siementen leviämistä voidaan myös ennakoida erilaisten **tietokonesimulaatioiden** avulla. Esimerkiksi Rouget ja Richardson (2003) ovat selvittäneet missä määrin kasvin leviäinten määrällä (propagule pressure) voidaan selittää tulokaspuiden leviämiskykyä Etelä-Afrikan tasangoilla. Tulosten mukaan leviäinten määrä indikoi tulokaspuiden yleisyyttä (mitattu latvusten peittävyuden avulla) paremmin kuin kokeeseen sisällytetyt ympäristötekijät. Mallit, jotka yhdistivät sekä ympäristötekijät, että leviäinten lukumäärän pystyivät ennakoimaan latvusten peittävyuden muutoksia yli 70 % tarkkuudella (Rouget & Richardson 2003).

Siemenpankkeja voidaan tutkia kerättyjen maanäytteiden idättämiskokeilla (keräysmenetelmät: ks. Roberts 1981; Bigwood & Inouye 1988; Kjellsson 1992), jolloin elinkykyisten siementen määrä siemenpankista voidaan määrittää. Esim. Aikio ym. (2002) ovat vertailleet kahden eri siemenpankkistrategian omaavien yksivuotisten kasvien lisääntymistehokkuuksia. Lisäksi Heard ym. (2003a, 2003b) tutkimuksissa on kuvattu siemenpankkien tutkimista vaihe vaiheelta sekä käsitelty kerätyn aineiston analysointiin soveltuvia tilastollisia menetelmiä.

Kjellsson ja Simonsen (1994) mukaan GM-kasveja tutkittaessa olisi hyvä arvioida myös ympäristötekijöiden, kuten kasvipeitteen, häirinnän ja ympäristöstressin vaikutuksia siemenen itämiseen.

Pienalakokeiden (microsite tests; ks. Kjellsson & Simonsen 1994) avulla saadaan tietoa siementen itämisestä ja taimettumisesta esim. eri asteisesti häirityillä

kasvualoilla. Pienalakokeita voidaan käyttää yhdessä **pysyvien koealojen ja siementen hautauskokeen** kanssa, tai vaihtoehtoisesti **siirtoistutuskokeita** käyttämällä. Pysyvät koealat (permanent quadrats) -järjestelyn (ks. Kjellsson & Simonsen 1994 sekä Peart 1984; Klemow & Raynal 1985; Schmid & Harper 1985; Winn 1985; Eriksson 1987; Fernandez-Quintanilla ym. 1986; Hendrix & Trapp 1992; Gustine & Sanderson 2001; Hirst ym. 2003) avulla mitataan demografisia muutoksia ennalta tarkasti kartoitetuissa populaatioissa. Esim. 50 cm x 50 cm koealat valitaan satunnaisotannalla. Mukana tulee olla riittävän monta toistoa. Kjellsson ja Simonsen (1994) mukaan koealojen laidoille kannattaa jättää noin 20 cm:n puskurivyöhyke, jonka käsittely ei eroa itse koealan käsittelystä. Näin pystytään estämään reunavaikutus itse koealoilla. Koejärjestelyn avulla voidaan esim. seurata invaasiotapahtumia ja populaatioiden geneettisen monimuotoisuuden muutoksia (ks. esim. Gustine & Sanderson 2001). Muutoksia voidaan seurata myös pitkällä aikavälillä. Maaperän siemenpankin häviämiseen kuluvaa aikaa voidaan mitata kasvihuoneissa erilaisissa olosuhteissa. Siementen hautauskoetta voidaan käyttää kasvien sekä lyhyt- että pitkäaikaisen selviytymisen tutkimiseen erilaisilla kasvupaikoilla, sekä esim. lämpötilan, kosteuden ja maaperän typpipitoisuuden vaihtelun vaikutusten selvittämiseen (ks. Kjellsson & Simonsen 1994 sekä Toole & Brown 1946; Rampton & Ching 1970; Roberts & Neilson 1980; Kivilaan & Bandurski 1981; Rice 1985; Froud-Williams & Chancellor 1986; Granström 1987; Zhang & Maun 1990; Osman ym. 1991). Hautausmenetelmän potentiaalinen kesto on useita vuosia esim. siemenpankin siementen pitkäikäisyyden ja dormanssin parametreja selvittäessä. Menetelmän avulla voidaan esim. vertailla GM-kasvien, muuntamattomien kasvien, sekä niiden hybridien siementen elinkykyä. Tulosten perusteella voidaan laskea hajoamis/lahoamiskäyrä kullekin kasvityypille (Linder & Schmitt 1994). Siirtoistutuskoejärjestelyssä tutkittavien kasvien siemenet kylvetään (tai taimet istutetaan) kentälle noin 50 cm x 50 cm kasvualustoille. Koejärjestelyä käytetään seurattaessa muualta tai toisenlaisilta biotyypeiltä peräisin olevien kasvilajien selviytymistä ja vakiintumista (Kjellsson & Simonsen 1994). Taimien selviytymistä erilaisissa kilpailu- tai predaatiopaineissa tai erilaisissa kasvuolosuhteissa tutkitaan mittaamalla yksilöiden (tai populaatioiden) kasvunopeuksia tietyn pituisina ajanjaksona (katso esim. Hartnett & Bazzaz 1985; Rice 1985; Krannitz & Carey 1988; Hazebroek & Metzger 1990; Wilson & Tilman 1991; van Tiendren 1992; Brewster & Sutherland 1993; Dorken & Barrett 2003). Koejärjestelyssä käytetään yleensä pysyviä koealoja tai pienalakoejärjestelyä.

Allelopatian vaikutus

Hiljattain julkaistujen tutkimusten mukaan (ks. Bais ym. 2003; Baldwin 2003) allelopattia saattaa olla merkittävä tekijä invaasiokykyisten tulokaslajien levittäytymisessä vakiintuneisiin ekosysteemeihin. Eräs Itä-Euroopasta levittäytynyt kaunokkilaji (*Centaurea maculosa*; engl. spotted knapweed) on osoittautunut invaasiokykyiseksi läntisessä Pohjois-Amerikassa (Bais ym. 2003). Kaunokin leviämisen syyksi uudella kasvualueella havaittiin sen erittämien fytotoksiinien (eräs katekiini) myrkkyyvaikutus kilpaileviin eliöihin. Myrkkyy vaikuttaa sille herkkien kasvien, kuten esim. lituruohon (*Arabidopsis thaliana*) geeniekspressioon, johtaen lopulta kasvin juuriston kuolemaan. Bais ym. (2003) mukaan tutkimuksen tulokset tukevat ns. 'uusi ase -hypoteesia', jonka mukaan invaasiokykyisten tulokaskasvien levittäytymistä vakiintuneisiin yhdyskuntiin edistää uuden alueen alkuperäisten lajien puuttuva vastustuskyky tulokkaan fytotoksiineille. Uuden GM-kasvin leviämiskykyä voidaan siis mahdollisesti ennakoida tutkimalla sitä, onko siirretyllä ominaisuudella muiden kasvien kasvua estäviä ominaisuuksia.

Allelopatian kilpailuvaikutuksia voidaan tutkia laboratoriossa käyttämällä siementen idättämiskoetta, jossa alustaan lisätään tutkittavasta kasvista saatuja uutteita eri pitoisuuksina. Esim. Bertin ym. (2003) ovat käyttäneet siementen idät-

tämistä erilaisia kasviuutteita sisältävillä agarmaljoilla allelopation tutkimiseksi. Menetelmän avulla voidaan selvittää esim. täysikasvuisten kasvien ja taimien kilpailua. Kjellsson & Simonsen (1994) mukaan allelopation tutkimiseen soveltuvia kenttäkokeita olisi kehitettävä lisää.

Luonnolliset viholliset

Erään teorian (*'the enemy release hypothesis'*; ks. Keane & Crawley 2002) mukaan aggressiivisten tulokaskasvien menestyksen syynä uudella kasvualueella on kasvin vapautuminen sen tärkeimmistä luonnollisista vihollisista. Luonnollisia vihollisia voi myös esiintyä uudella kasvualueella vähemmän kuin kasvin alkuperäisellä levinneisyysalueella. Toisen hypoteesin (*'the biotic resistance hypothesis'*) mukaan tulokaslajien kanssakäyminen uuden kasvualueen alkuperäisten lajien (myös vihollisten) kanssa rajoittaa tulokaslajien haitallisia ympäristövaikutuksia. Mitchell ja Power (2003) testasivat näitä hypoteeseja tutkimalla viruksia, sekä noki-, härmä- ja ruostesieniä, jotka infektoivat eurooppalaisia tulokaskasveja Pohjois-Amerikassa. Tulokset osoittivat, että huomattavasti harvemmat sienet ja viruslajit infektoivat kasvia sen uudella kasvualueella verrattuna infektoivien lajien lukumäärään kasvin alkuperäisellä levinneisyysalueella. Sienilajeja oli Pohjois-Amerikassa 24%, ja viruslajeja 84% vähemmän. Lisäksi Mitchell ja Power (2003) mukaan invaasiokykyiset tulokaskasvit, jotka olivat kokonaan vapautuneet luonnollisista vihollisistaan osoittautuivat usein ympäristölleen haitallisemmaksi kuin lajit, joilla oli tuholaisia myös uudella kasvupaikalla. Mitchell ja Power (2003) saavat tulokset tukivat kumpaakin hypoteesia (*'the enemy release hypothesis'* ja *'the biotic resistance hypothesis'*). Myös Wolfe (2002) on testannut *'the enemy release'* -hypoteesia käyttämällä esimerkkinä Euroopasta Pohjois-Amerikkaan 1800-luvulla levinnyttä valkoailakia (*Silene latifolia*). Tutkimuksessa tarkasteltiin 86 populaatiota. Tulokset osoittivat, että eurooppalaiset valkoailakit vahingoittuivat 17 kertaa todennäköisemmin kuin pohjoisamerikkalaiset populaatiot. Vahingoittumisen syynä olivat Wolfe (2002) mukaan sellaiset kasvinsyöjät ja sienet (erityisesti eräs siemensyöjä sekä nokisieni), joita tavataan enimmäkseen Euroopassa. Tutkimuksen tulos siinä tuki *'the enemy release'* -hypoteesia. Mahdollinen luontaisista vihollisista vapautumisen vaikutus kasvin leviämiskykyyn tulisi ottaa huomioon arvioitaessa GM-kasveja, joilla on parannettu taudinkestävyys bakteereita, sieniiä ja viruksia vastaan (tai myrkyvaikutus kasvinsyöjiä vastaan). Sitä ennen tulisi selvittää, onko joku tauti/tuholainen GM-kasvin leviämistä rajoittava tekijä ja millä tavalla siirretty ominaisuus vaikuttaa kyseisiin eliöihin.

Kjellsson ja Simonsen (1994) suosittelevat satunnaistetulla palstoilla tehtäviä siirtoistutuskokeita erilaisissa olosuhteissa GM-kasvien taimien selviytymisen ja kasvun tutkimiseksi, sekä vertailuun muuntamattomien kasvien kanssa. Taimien selviytymistä erilaisissa kilpailu- tai saalistuspaineissa tai erilaisilla kasvualustoilla voidaan tutkia mittaamalla yksilöiden (tai populaatioiden) kasvunopeuksia tietyn pituisina ajanjaksona sekä tutkimalla esim. lehtien pinta-alan muutoksia (ks. esim. Khan & Tripathi 1989). Kjellsson ja Simonsen (1994) mukaan menetelmän käyttö voi hyödyistään huolimatta olla mahdotonta turvallisuussyistä (mikäli GM-kasvilla on ominaisuuksia, jotka estävät sen testaamisen kenttäkokeissa). Taimien kehitystä voidaan myös tutkia simuloimalla luonnonolosuhteita suljetussa tilassa **mesokosmos**-järjestelyssä. Mesokosmos-koejärjestelyssä tutkittavat kasvit kasvatetaan kasvihuoneessa luonnosta kerätyillä kasvualustoilla, joissa on mukana myös muuta kasvillisuutta (ks. Kjellsson & Simonsen 1994; Kercher & Zedler 2004). Mesokosmos-koesuunnittelun avulla voidaan simuloida luonnonolosuhteita, tutkia esim. häirinnän vaikutuksia ja seurata GM-kasvien vaikutuksia muihin kuin kohde-eliöihin paremmin kuin sellaisissa koejärjestelyissä, joissa on mukana ainostaan tutkittava kasvilaji.

Herbivorian vaikutusten mittaamiseksi Kjellsson ja Simonsen (1994) ehdottavat **kemiallisia poissulkemiskokeita** (chemical exclusion experiments; ks. Brown & Gange 1989; Gange ym. 1989; Hanley 2004), joissa erilaisia torjunta-aineita käyttämällä rajataan pois tiettyjen selkärangattomien eläinten vaikutus kasvin kasvuun. Kemialliset poissulkemiskokeet voidaan yhdistää siirtoistutusmenetelmän käyttöön.

Stressinsieto (kuivuus, kylmyys, suolaisuus)

Eroja GM- ja muuntamattomien kasvien kuivuuden-, kylmän- tai suolansiedossa voidaan testata esim. siirtoistutuskokeissa eri asteisilla kuivuuden/kylmyyden/suolaisuuden gradienteilla joko kentällä tai kasvihuoneessa. Taimien selviytymistä erilaisissa stressiolosuhteissa voidaan tutkia mittaamalla yksilöiden (tai populaatioiden) **kasvunopeuksia** tietyn pituisina ajanjaksona sekä tutkimalla esim. lehtien **pinta-alan muutoksia** (muutosten mittaukset: ks. esim. Khan & Tripathi 1989).

Kasvin koko ja kasvuominaisuudet

Kokoon ja kasvunopeuteen vaikuttavat ominaisuudet voivat parantaa GM-kasvin leviämiskykyä. Kjellsson ja Simonsen (1994) mukaan taimen selviytyminen ja kasvunopeus ovat tärkeimpiä tekijöitä yksittäisen kasvin lisääntymismenestyksen (siementuotannon ja klonaalisen kasvun), ja siten myös koko populaation kilpailukyvyn kannalta. Myös täysikasvuisen kasvin koko vaikuttaa kasvin kilpailukykyyn ja lisääntymismenestykseen. Pattison ym. (1998) osoittivat tutkimuksessaan Havaijilla, että hyvin leviämiskykyiset kasvit olivat nopeakasvuisempia kuin heikomman leviämiskyvyn omaavat lajit. Myös Grotkopp ym. (2002) havaitsivat, että männyn taimen suhteellinen kasvunopeus oli suoraan yhteydessä sen leviämiskykyyn. Kasvin kasvunopeus riippuu resurssien (valo, ravinteet) saatavuudesta, mutta Kjellsson ja Simonsen (1994) mukaan erityisesti muiden kasvien kilpailuvaikutuksesta.

Biomassan (erityisesti kuivapainon) mittaaminen on paras keino tutkittavien kasvien koon selvittämiseen. Biomassan mittaamisen haittapuoli on se, että tutkittavat kasvit on poistettava kokeesta. Biomassan lisäksi voidaan mitata kasvin kasvunopeutta (Choe ym. 1988; Brewster & Sutherland 1993), lehtipinta-alaa, sekä **lehtien demografiaa** (ks. esim. Hartnett & Bazzaz 1985; Doust & Doust 1987). Viimeksi mainitussa menetelmässä käytetään lehtien määrää, kuolleisuutta ja fenologiaa kasvin elinvoimaisuuden selittäjänä. Grotkopp ym. (2002) tutkimuksessa esitetään erilaisia kasvunopeuden, lehtipinta-alan, **siemenen massan** ym. **mittausmenetelmiä**, sekä tilastollisia menetelmiä näistä saatujen tulosten analysointiin ja potentiaalisen/todellisen invaasiokyvyn mittaamiseen. **Ekologisten mallien** käyttö kilpailuvaikutusten arvioinnissa tulee luultavasti tulevaisuudessa lisääntymään.

Lisääntymiskierto

Nopea lisääntymiskierto voi vaikuttaa olennaisesti kasvien leviämiskykyyn. Rejmánek ja Richardson (1996) mukaan lyhyt nuoruusvaihe ja lyhyt väli suurten siementuotantovuosien välillä olivat pienen siemenmassan ohella männynillä leviämiskykyä ennakoivia piirteitä. GM-kasvien ja kontrollien eroja taimivaiheen kasvunopeudessa voidaan vertailla **kasvihuone- tai kenttäkokeissa**. Sen sijaan siementuotannon määrän mittaaminen vaatii pidempiaikaista seuranta.

Suvuton lisääntyminen

Fladung ym. (2003) mukaan myös suvuttoman lisääntymisen mahdollisuus on otettava huomioon GM-kasvien ympäristövaikutuksia arvioitaessa. Mikäli GM-kasvilla on parempi kyky suvuttomaan lisääntymiseen kuin muuntamattomalla

kasvilla, voi myös sen leviämiskyky parantua. (Lisäksi koirassteriilien kasvien käyttö ei estä geenivirtaa, mikäli kasvi lisääntyy myös suvuttomasti.)

Kasvullisen lisääntymisen potentiaalia voidaan Kjellsson ja Simonsen (1994) mukaan tutkia esim. **mittaamalla juurakoiden ja maanpäällisten osien suhdetta** (ks. Hartnett 1990). GM-kasvin ja muuntamattoman kasvin suvuttomien leviäinten (esim. itusilmut, mukulat, rönsyt) tuotannon eroja voidaan tarkastella kasvihuoneessa tai kenttäkokeissa. Lisäksi **keskimääräistä eliniän ennustetta** (half-life; ks. Pyke & Thompson 1986; Briske & Butler 1989; Kjellsson 1991; Snaydon & Satorre 1989) voidaan Kjellsson ja Simonsen (1994) mukaan käyttää kasvullisen lisääntymisen tehokkuuden epäsuoraan mittaamiseen. Edellämainittu menetelmä sopii lähinnä eksponentiaalisesti lisääntyvien populaatioiden eliniän arviointiin.

Kilpailu

Tiheydestä riippuvat prosessit, eli esim. kilpailu tilasta/valosta/ravinteista, ovat merkittäviä tekijöitä populaatioiden koon säätelyssä. Ne vaikuttavat erityisesti kasvun alkuvaiheeseen sekä kasvuyksilöiden jakautumiseen populaatioiden sisällä (ks. Kjellsson & Simonsen 1994). Kasvutiheyden ja ravinteiden saatavuuden vaikutusta lajien tai genotyyppien kilpailukykyyn voidaan mitata seuraavien koejärjestelyiden avulla.

Tiheysvaikutusten tutkimiseen voidaan käyttää kasvihuoneolosuhteissa ns. **kennomallia** (honeycomb design) tai **addition series design** -menetelmää. Kennomallissa kasvit istutetaan kennomuodostelmaan niin, että kullakin kasvilla on aina kuusi yhtä kaukana olevaa naapurikasvia (ks. Rowe 1989). Elossa selviytymisen ja kasvun/kuolleisuuden mittareina voidaan käyttää siementuotannon määrää, biomassaa tai lehtien pinta-alaa. Addition series design (ks. Kjellsson & Simonsen 1994) on menetelmä, jossa kasvihuonekokeeseen sisällytetään yhdestä kahteen kasvilajia satunnaistetuilla palstoilla, joilla kasvutiheys kaksinkertaistetaan alkaen harvasta (esim. kaksi kasvia/palsta, neljä kasvia/palsta) aina tiheämpään (kahdeksan kasvia/palsta jne.). Menetelmän avulla voidaan tutkia eri asteisen kilpailun vaikutuksia kasveihin mittaamalla niiden selviytymistä ja sadon suuruutta (ks. esim. Nickelym. 1990; Snaydon 1991).

Kilpailu on merkittävä tekijä kasvin koon kannalta. Kilpailun merkityksen tutkiminen on hyödyllistä GM-kasvien leviämiskykyä arvioitaessa, sillä esim. villiintyneiden *Brassica*-lajien populaatioiden vakiintumista eivät Raybould ja Moyes (2001) tutkimuksessa rajoittaneet niinkään selkärangattomat herbivorit kuin kilpailu paikallisten lajien kanssa. Yksinkertaisia (lajinsisäisiä ja lajien välisiä) kilpailuvuorovaikutuksia voidaan tutkia käyttämällä esim. addition series design (ks. edellä) -koejärjestelyä. Esimerkiksi Bergelson (1994) on käyttänyt samantapaista menetelmää tutkiessaan eroja muuntogeenisten ja muuntamattomien lituruohojen (*Arabidopsis thaliana*) invaasiokyvyissä. Erilaisissa kilpailupaineissa (0, 2, 10, 15 tai 25 eri lajiin kuuluvaa kilpailijaa/palsta) kasvatettujen kasvien elinkykyä mitattiin vertailemalla siementen määrää/litu keskimääräiseen siemenmäärään/litu (Bergelson 1994).

Vanhempien ja jälkeläisten välistä kilpailua voidaan tutkia laboratoriossa idätämiskokeilla kuten allelopatiaa tutkittaessa, tai selvittää muunlaisten ympäristötekijöiden (esim. lämpötila, valo) vaikutuksia siementen itämiseen (ks. Grime ym. 1981; Baskin & Baskin 1986, 1990b; Froud-Williams & Chancellor 1986; Hazebroek & Metzger 1990). Tutkittavan kasvin varhaisvaiheiden vakiintumista uudella kasvupaikalla voidaan tutkia kenttäkokeissa (ks. Sheldon 1974, Roberts 1981, 1986, Roberts & Boddrell 1985, Stanton 1985, Hongo 1989). Pienympäristön ympäristötekijöiden vaihtelun (esim. ihmisen aiheuttaman häirinnän) vaikutuksia siementen itämiseen ja taimien vakiintumiseen voidaan selvittää **pienalakokeilla ja manipulaatiolla**. Pienalakokeet ja manipulaatio ovat menetelmiä, jossa tarkas-

tellaan pienalaolosuhteiden (esim. häirinnän, kasvualustan tai ilmasto-olosuhteiden) vaikutuksia siementen itämiseen ja taimien kasvuun (ks. esim. Gross 1984; Hartgernik & Bazzaz 1984; Rice 1985; Fowler 1988; Rowe 1989; Baskin & Baskin 1990a). Koejärjestelyyn voidaan sisällyttää esim. kasvillisuuden aukkojen koosta, maankäsittelystä, sekä kasvien poistosta aiheutuneita vaikutuksia. Pienalakokeen ja manipulaation avulla voidaan tutkia esim. uusien kasvilajien tai uusien genotyyppien levittäytymistä uusille kasvupaikoille (Kjellsson & Simonsen 1994). Lisäksi Kjellsson & Simonsen (1994) mukaan menetelmän avulla voidaan analysoida satunnaisten tapahtumien vaikutuksia kasvipopulaation geneettiseen monimuotoisuuteen (ks. esim. Hartgernik & Bazzaz 1984).

Sisarusten välistä kilpailua voidaan tutkia tarkastelemalla **siementen leviämisenopeutta** tai käyttämällä ns. **lähin naapuri -menetelmää** (ks. Franklin ym. 1985; Sinclair 1985; Cox 1987; Goldberg & Barton 1992). Jäljempänä mainitussa menetelmässä koealan kaikki kasviyksilöt kartoitetaan ja jaetaan eri elinvaiheisiin (taimi, lisääntymisvaihe jne.). Seuraavaksi lasketaan yksilöiden frekvenssijakautuminen ja verrataan saatua tulosta satunnaisjakaumaan (esim. Poisson-jakaumaan). Menetelmän avulla saadaan tietoa esim. kasvien leviämiskyvystä. Kjellsson ja Simonsen (1994) mukaan valitulla tilastollisella käsittelyllä on menetelmässä tulosten kannalta huomattava merkitys.

Lisäksi voidaan käyttää kasvun analysointimenetelmiä ja biomassan tai pinta-alan mittaamista. Leviämisenopeutta mitataan etenkin tuulilevitteisten siementen **vajoamisen nopeutta mittaamalla** (ks. Matlack 1987, Grime ym. 1988, Greene & Johnson 1989, Andersen 1993). Lisäksi Kjellsson ym. (1997) mukaan kasvien välistä kilpailua voidaan tutkia mittaamalla niiden **fotosynteesin tehokkuutta** (ks. esim. Bults ym. 1982; Poulet ym. 1983; Jansen ym. 1989; Perl ym. 1993). Kilpailun tutkimiseksi on suunniteltu myös **matemaattisia malleja** (ks. Mazer 1987, Perry ym. 2003, Damgaard 2004).

**Menetelmiä GM-kasvien leviämiskyvyn muutosten tutkimiseen.
Tähdellä merkityt menetelmät on kuvattu tarkemmin liitteessä.**

Addition series design, biomassan mittaaminen, ekologiset mallit, fotosynteesin tehokkuuden mittaaminen, juurakoiden ja maanpäällisten osien suhteen mittaaminen, kasvunopeuden mittaaminen, kemialliset poissulkemiskokeet, kennomalli, keskimääräinen eliniän ennuste, lehtien pinta-alan muutosten mittaaminen, lähin naapuri -menetelmä, matemaattiset mallit, mesokosmos-järjestely, mikroalatesti ja manipulaatio, PCR*, pienalakokeet, pysyvät koealat, sekvensointi*, siemenkeräimet, siementen idättämiskoe, siementen hautauskoe, siemenen massan mittaaminen, siementen leviämisenopeuden mittaaminen, siementuotannon mittaaminen, siirtoistutuskoe, siitepölyn merkitseminen

Miten invaasion seurauksia voidaan tutkia?

Vaikutukset geneettiseen monimuotoisuuteen
Uusien lajien invaasiolla voi olla huomattavia ekosysteemivaikutuksia, kuten esim. luonnonvaraisten populaatioiden geneettinen köyhtyminen, tai peräti häviäminen tulokkaiden tieltä. Invaasion seurausten tarkasteluun sopivia menetelmiä ovat siemenkeräinten ja **geneettisten markkereiden*** käyttö ensinnäkin kohdekasvin tunnistamiseen ja lisäksi populaation geneettisen muuntelun määrän selvittämiseen. Geneettisen muuntelun määrän selvittämiseksi geneettiset markerit analysoidaan käyttämällä esim. **diversiteetti-indeksiä***, **F-statistiikka*** tai **fylogeneet-**

tistä analyysia*. Tutkimus voidaan tehdä siten, että ensin tunnistetaan esim. markeritekniikalla kuinka paljon GM-kasveja on integroitunut eri populaatioihin ja sitten verrataan erilaisia määriä GM-kasveja sisältäviä kasvipopulaatioita tai kasvivyhteisöjä laskemalla näille diversiteetti-indeksejä ja F-statistiikkaa.

Ekosysteemivaikutuksia voidaan määrittää mm. **kasvillisuusanalyysin** (ks. jäljempänä) ja idättämiskokeiden, sekä geneettisten markkerien* ja **Leslien matriisin** (ks. esim. Hansen 1989) avulla. Lisäksi aiemmin mainittuja pienalakokeita ja manipulaatiota voidaan käyttää tähän tarkoitukseen.

Pienillä ympäristötekijöiden muutoksilla voi olla huomattava vaikutus genotyyppiin ja ympäristön vuorovaikutukseen (Kjellsson & Simonsen 1994). Ympäristötekijöiden muutokset voivat johtaa myös populaatioiden genotyyppikoostumusten muutoksiin. Genotyyppiin ja ympäristön vuorovaikutuksia voidaan tutkia selvittämällä genotyyppikoostumuksen muutoksia geneettisten markkerien* sekä pienalakokeiden ja manipulaation tai siirtoistutuskokeiden avulla.

Biodiversiteettiä voidaan mitata diversiteetti-indeksillä*, **Wrightin indeksillä*** tai F-statistiikan* avulla, taikka sitten muita samankaltaisia indeksejä käyttämällä (ks. esim. Ekelund ym. 2001; Chen & Li 2003).

Yhteisön rakennetta voidaan kuvata diversiteetti-indeksillä* sekä **spatiaalisen autokorrelaatiomenetelmän** (spatial autocorrelation analysis) avulla, mitä varten tarvitaan ainakin yksi vaihteleva geneettinen markkeri (ks. Epperson & Allard 1989; Nevo & Beiles 1989; Gonzales-Martinez ym. 2002; Brennan ym. 2003). Eri koealojen kasvikoostumusten vertailuun voidaan käyttää kasvillisuusanalyysiä, joka sisältää tiedon (%) siitä, kuinka monella näytealalla kasvi esiintyy, tiheysanalyysin (kasvien lukumäärä/pinta-ala), sekä peittävyuden (ks. Kjellsson & Simonsen 1994). Myös kasvien **tilajakautumisen analyysi** (spatial pattern analysis; ks. Kjellsson & Simonsen 1994 ja esim. McCanny & Cavers 1989; Dessaint ym. 1991 ja Hardy & Vekemans 2002) voi antaa tietoa kasvivyhteisön rakenteesta.

Esimerkki kasvien selviytymiskyvyn tutkimuksesta

Crawley ym. (1993; 2001) testasivat vuonna 1990 saatavilla olleiden GM-viljelykasvien selviytymistä verrattuna muuntamattomiin kasveihin. Tutkittuja GM-kasveja olivat glufosinaattikestävä rapsi ja maissi, glyfosaattikestävä sokerijuurikas, Bt-toksiinia ilmentävä peruna sekä peruna, johon oli siirretty herneen lektiini (vaikuttaa hyönteiskestävyyteen). Tutkimuksessa seurattiin kahtatoista koealaa Britanniassa vuosina 1990-2000. Kullekin tutkittavalle kasvilajille tehtiin kaikille kahdelletoista koealalle neljä 25 m x 25 m palstaa, joista (palstoista) puolet turvattiin kasvinsyöjiltä aitaamalla. Siemeniä ja mukuloita kylvettiin eri tiheyksille ja eri syvyyksille. Pienempiä osia koealoista käsiteltiin insektisideillä, molluskisideillä ja fungisideillä erilaisina kombinaatioina. Kaikki palstat tutkittiin heinä-elokuussa kymmenen vuoden ajan. Kasvien kasvu, kuolleisuus, kukkiminen ja siementen määrä mitattiin. Lisäksi kiinnitettiin huomiota erityisesti aiemmin maahan kynnetyjen kasvien siemenistä itäneisiin uusiin sukupolviin. Eri geneettisten linjojen suoriutumista mitattiin binomiaalisen poikkeavuusanalyysin (deviance analysis; ks. Crawley ym. 2001) avulla.

Ensimmäisen tutkimusvuoden jälkeen kaikkien kasvien populaatiokoot pienenivät, johtuen viljelyalueen alkuperäisten monivuotisten kasvien kilpailuvaikutuksesta. GM-kasvilinjat eivät missään tapauksista selviytyneet kauemmin kuin vastaavat muuntamattomat kasvit. Rapsilla GM-linjat menestyivät mahdollisesti jopa hiukan huonommin kuin muuntamattomat linjat. Tulokset osoittivat lisäksi, että viljelykasvit eivät selviä viljelysten ulkopuolella pitkiä aikoja. Tutkijat kuitenkin painottivat, että tutkimuksessa oli käytetty sellaisen uuden ominaisuuden (herbisidikestävyys, hyönteiskestävyys) omaavia kasveja, joiden ei voida odottaa lisäävän kasvin kelpoisuutta. Edelleen tutkijat painottivat, etteivät tutkimuksen tulokset tarkoita sitä, etteikö geenitekniikalla muuntaminen voisi lisätä kasvin rikkamaisuutta tai leviämiskykyä.

Menetelmiä parantuneen leviämiskyvyn seurausten (invaasiomahdollisuus) tutkimiseen. Tähdellä merkityt menetelmät on kuvattu tarkemmin liitteissä.

Diversiteetti-indeksi*, F-statistiikka*, fylogeneettinen analyysi*, geneettiset markkerit*, idättämiskokeet, kasvillisuusanalyysi, Leslien matriisi, pienalakokeet ja manipulaatio, poikkeavuusanalyysi, siemenansat, siirtoistutus-kokeet, spatiaalinen autokorrelaatioanalyysi, tilajakautumisen analyysi, Wrightin indeksi*

7.2 Geenivirta

7.2.1 Hybridisaatio ja introgressio

Ellstrand (2003a) mukaan monilla viljelykasveilla on mahdollisuus risteytyä luonnonvaraisten kasvien kanssa. Risteytymistä voi seurata siirtogeenin introgressio luonnonvaraisiin kasveihin takaisinristeytymisten seurauksena. Siirretystä/muunnetusta geenistä ja populaatiosta riippuen geenivirralla voi olla sama negatiivinen vaikutus luonnonvaraisiin populaatioihin kuin perinteisillä viljellyillä kasveilla. Tällaisia vaikutuksia voivat olla mm. aggressiivisempien invasiivisten lajien kehittyminen ja harvinaisten lajien häviäminen (ks. Ellstrand 2003a). Esim. Al Mazyad ja Amman (1999) mukaan geenivirta sinimailasesta (*Medicago sativa*) luonnonvaraiseen sirppimailaseen (*M. falcata*) on merkittävästi vähentänyt jälkimmäisen kasvin yleisyyttä. Geenivirta on mahdollista jopa pitkän ajan kuluttua viljelyn lopettamisesta siemenpankissa säilyneiden dormanssikykyisten siementen avulla (Linder & Schmitt 1994).

Raybould ja Clarke (1999) mukaan kasvipopulaatioiden välinen geenivirta voidaan jakaa potentiaaliseen geenivirtaan (mittaa siementen ja siitepölyn leviämistä), sekä varsinaiseen (tapahtuneeseen) geenivirtaan (mittaa tapahtunutta hedelmöitystä tai itävien siementen määrää suhteessa etäisyyteen lähdepopulaatiosta). Ensimmäinen varsinainen askel geenivirran tutkimisessa on GM-kasvin ja sen luonnonvaraisten sukulaisten **hybridisaation mahdollisuuden arvioiminen** (Kareiva ym. 1994), mikä voidaan aloittaa kartoittamalla GM-kasvin aiotulta viljelyalueelta risteytymiskykyiset luonnonvaraiset kasvit. Lisäksi on saatava käsitys siitä, millä tavalla siirtogeeni vaikuttaa kasvin fenotyyppiin (vertailu muuntamattoman kasvin kanssa), siirtogeenin vakaudesta sekä ajallisista ja paikallisista ilmentymisominaisuuksista. Siitepölyn ja jo aiemmin mainittujen siemenen ominaisuuksien (määrä, laatu) tutkimisesta, sekä hybridien kelpoisuuden (ks. esim. Crawley ym. 1993) sekä takaisinristeytymisen tarkastelusta voi myös olla hyötyä. Tutkijoiden mukaan siirtogeenisten kasvien luonnonvaraisten populaatioiden muodostumisen todennäköisyyden lisäksi on tarpeellista tarkastella GM-kasvien ja luonnonvaraisten kasvien hybridien ekologisia vaikutuksia.

Kysymyksiä

- Minkä kasvilajien/siirretyn ominaisuuden kohdalla kannattaa selvittää hybridisaation ja introgression mahdollisuus?
- Mikä on tärkein hybridisaatiokykyyn (ja siten introgressioon) vaikuttava tekijä/mekanismi?
- Millä menetelmillä introgressiota voidaan tutkia?
- Mitä seurauksia introgressiolla voi olla?

Kasvilajit

Suomessa metsäpuut (koivun siitepöly voi kulkeutua yli tuhannen kilometrin päähän lähtöpaikastaan; Hjelmroos 1991), ristikukkaiset (Brassicaceae), ehkä kaura (*Avena sativa*) ja hukkakaura (*A. fatua*), lisäksi jotkut marjat, kuten esim. vadelma (*Rubus idaeus*) ja mesimarja (*R. arcticus*), sekä omena (*Malus domestica*), (ristipölytteiset) nurmiheinät, apilat (*Trifolium* spp.) ja mailaset (*Medicago* spp.) voivat risteytyä luonnonvaraisten kasvien kanssa.

Ominaisuudet

Stressin/tuholaisten/tautien sietokyky (esim. Bt-toksiinit, lektiinit, kitinaasit), siementen lukumäärään/säilymiseen liittyvät geenit, lehtimuotoon/lehden pinta-alaan liittyvät geenit, lisääntymistapaan vaikuttavat ominaisuudet, kukkien morfologiaan liittyvät geenit, kasvutapaan ja sukupolvien väliseen aikaan vaikuttavat geenit ja toksiset tuotteet saattavat lisätä risteytymiskykyä/mahdollisuutta tai antaa kasville valintaedun ja siten säilyä ja yleistyä populaatiossa. Dale (1994) mukaan kasvien, joihin on siirretty stressinsieto-ominaisuus (kuumuuden-, kylmän-, suolaisuuden-, metallipitoisuuden sieto) riskinarviointi on kaikkein haastavinta: lisääntynyt stressinsieto voi lisätä kasvin invaasiokykyä sekä muuttaa populaatioiden levinneisyyttä. Sen sijaan geneeillä, jotka vaikuttavat kasvin ravinto-ominaisuuksiin tai öljyn koostumukseen ei todennäköisesti ole suurta vaikutusta hybrideihin, ellei kasvin houkuttelevuus tuholaisille, taudeille tai saalistajille muutu ominaisuuden myötä (Dale 1994). Toisaalta esim. siemenen öljyn koostumuksen muutokset saattavat teoriassa vaikuttaa mm. siemenen kylmänkestävyyteen.

Hybridisaatioon ja introgressioon vaikuttavat tekijät

- Sijainti
- Ympäristön risteytymiskykyiset (lähisukuiset) populaatiot, kotoperäisyys
- kromosomiluku
- Kukinnan samanaikaisuus
- Tuulipölytteisyys, hyönteispölytteisyys
- Muut kukintaan liittyvät ominaisuudet, kuten itsepölytys, ristipölytys, itsekompatibiliteetti
- Pölyttäjähyönteisten esiintyminen
- Siitepölyn leviämiskyky, elinaika, itäminen, siitepölykilpailu
- Siementen runsaus/dormanssikyky
- Hybridin elinkyky/kilpailukyky ja kelpoisuus
- Toistuva migraatio (recurrent migration). Mitä suurempi siirtogeeninen populaatio on, sitä suurempi on mahdollisuus geenien toistuvaan siirtymiseen populaation ulkopuolelle (Gliddon 1994). Toistuvan migraation laajuus riippuu hybridisaation todennäköisyydestä, sekä siitä, miten paljon GM-kasvia kasvatetaan vastaanottajapopulaation kokoon nähden. Kun viljelykasvien määrä lisääntyy, lisääntyy myös geenivirta luonnonpopulaatioihin. Kun geenivirta luonnonpopulaatioon kasvaa riittävän suureksi, viljelykasvien geenit lisääntyvät siinä huolimatta siitä, onko niillä vaikutusta kasvin kelpoisuuteen (Gliddon 1994). Haygood ym. (2003) mukaan toistuva migraatio voi johtaa jopa epäsuotuisan alleelin vakiintumiseen pienessä populaatiossa.
- Gliddon (1994) mukaan kelpoisuus on vain yksi niistä tekijöistä, jotka vaikuttavat geenien frekvensseihin populaatioissa. Satunnainen ajautuminen (random genetic drift) on ensimmäinen voima, joka vaikuttaa (todennäköisesti pienellä frekvenssillä esiintyvien) hybridien kohtaloon. Hybridin varhaiset suvulliset lisääntymiset ovat Gliddon (1994) mukaan todennäköisesti takaisinristeymiä luonnonvaraisten populaatioiden kanssa.

Tutkimusmenetelmät

Hybridisaatiomahdollisuuden arviointi ja testaus

Tietoa tapahtuneesta geenivirrasta eri maantieteellisillä alueilla saadaan **arvioinnin ja seurannan** avulla. Ennen GM-kasvin viljelyä voidaan selvittää, onko alueella risteytymiskykyisiä lähisukuisia kasveja. Lähisukulaisten läsnäolo voidaan selvittää esim. lajien **levinneisyyskarttoja** tutkimalla. Mikäli alueella esiintyy lähisukuisia kasveja, niiden risteytymismahdollisuus viljeltävän kasvin kanssa tulee selvittää. Apuna voidaan käyttää mm. alueelta kerättyjä **herbaarionäytteitä**, joista etsitään mahdollisia aiempia hybridejä. Mikäli viljelyalueen kasvillisuustiedot ovat riittämättömät, voidaan lisäksi tehdä kenttätutkimuksia (mahdollisten hybridien keräys ja niiden geneettisten markkerien analysointi*). Suomessa eri alueiden kasvillisuus on kuitenkin hyvin kartoitettu, joten tiedot lähisukulaisten läsnäolosta näkyvät kirjoissa tai tietokannoissa (ks. esim. http://www.fmn.helsinki.fi/map/afe/E_afe.htm). Introgression arviointia ja seuranta ovat tehneet mm. Savova ym. (1996). Wilkinson ym. (2000) käyttivät **kaukokartoitusmenetelmiä** rapsin ja kaalin (*B. oleracea*) sympatristen (päällekkäisten) esiintymisalueiden, ja siten myös mahdollisten hybridien jäljittämiseen. Lisäksi mm. Bartsch ja Ellstrand (1999), sekä monet muut (ks. tietoruudut) ovat tutkineet, onko eri kasvilajien välillä joskus tapahtunut introgressiota.

Esimerkkejä hybridisaation ja introgression tutkimuksesta

Marchelli ja Gallo (2001) tutkivat yhdentoista argentiinalaisen etelänpyökkipopulaation (*Nothofagus nervosa*) geneettistä diversiteettiä ja erilaistumista **isotsyymimarkkereita*** käyttämällä. Markkereiden avulla tutkittiin lisäksi heterotsygotia-astetta, keskimääräistä alleelien lukumäärää/lokus, sekä geneettistä etäisyyttä (**Gregorius' genetic distance**). Lisäksi Marchelli ja Gallo (2001) tutkivat *Nothofagus obliqua* -pyökin introgressiota *N. nervosa* -populaatioissa kahta lajispesifiiä isotsyymimarkkeria käyttämällä. Tutkijat pystyivät käytettyjen markkereiden avulla osoittamaan introgressiota tapahtuneeksi.

Broyles (2002) tutki eräiden sanikkaiden (*Asclepias exaltata* ja *A. syriaca*) välisiä hybridejä Pohjois-Amerikassa analysoimalla **allotsyymi***-dataa fylogeniamenetelmällä* populaatioiden genotyyppifrekvenssien (vanhemmat, F1, F2 ja takaisinristeytymät) selvittämiseksi. Luonnollista hybridisaatiota tavattiin kaikkialla, missä lajit esiintyivät päällekkäisillä alueilla. F1-hybridisienten muodostuminen oli kuitenkin harvinaista. Lajien välisen geenivirran ja introgression suunta oli riippuvainen hybridien lisääntymisbiologisista tekijöistä, ympäröivän populaation koostumuksesta ja joidenkin risteymien kyvyttömyydestä muodostaa siemeniä. Broyles (2002) mukaan introgressiivinen hybridisaatio on merkittävä evolutiivinen tekijä siinäkin tapauksessa, että F1-hybridien muodostuminen luonnonpopulaatioissa on (aluksi) harvinaista.

Moyes ym. (2002) tutkivat geenivirtaa sekä rapsista (*Brassica napus*) rikkasinappiin (*Sinapis arvensis*), että myös rikkasinapista rapsiin. Tutkimusta varten rikkasinapin siemeniä kerättiin eri puolilta Britanniaa (lisäksi saatiin siemeniä ranskalaisista populaatioista). Siemenistä itäneet kasvit pölytettiin käsin *nptII* (antibioottiresistenssi) ja *bar* (herbisidikestävyys) –siirtogeenin omaavan rapsin siitepölyllä. Syntyneet hybridit seulottiin käyttämällä siirtogeenille spesifisiä alukkeita PCR-analyysissä*, sekä mahdollisia **väreaktioita** (*bar*-geenin läsnäolo; *bar*-color assay, ks. D'Halluin ym. 1992) seuraamalla. Geenivirtaa rikkasinapista rapsiin tutkittiin käyttämällä kuutta eri rapsilajiketta ja kuudesta (rikkasinappi-) populaatiosta peräisin olevia yksilöitä. Rikkasinapin siitepölyllä pölytettyjen rapsiyskilöiden siemenet kerättiin, ja niistä itäneet kasvit tutkittiin **virtaussyptomietrian*** avulla kromosomiluvun selvittämiseksi (katso Eber ym. 1997 sekä Wilkinson ym. 2000). Lisäksi osa itäneistä kasveista seulottiin käyttämällä **RAPD**:eja* virtaussyptomietriasta saatujen tulosten vahvistamiseksi. Tutkijat testasivat myös kenttäkokeissa tapahtuvaa rikkasinapin ja rapsin välistä geenivirtaa istuttamalla koealalle kummankin lajin edustajia. Syntyneistä siemenistä idätetyt kasvit tutkittiin jälleen virtaussyptomietrian ja RAPD:ien avulla. Hybridejä saatiin aikaiseksi **käsinpölytyksellä*** ilman keinotekoista (esim. **alkionpelastusmenetelmä**¹, **munasoluviljely**) apua kun rapsi oli emokasvina, mutta

erittäin pienellä frekvenssillä. Huolimatta siitä, että näiden lajien välillä voidaan todeta geenivirtaa laboratorio-olosuhteissa, tutkijat eivät pystyneet osoittamaan vastaavaa tapahtuvaksi kenttäkokeissa. Moyes ym. (2002) mukaan kenttäkoe tulokset kuitenkin vahvistivat kasvihuonekokeissa saadut tulokset, joiden mukaan geenivirta rapsin ja rikkasinapin välillä on erittäin vähäistä. Lisäksi koe paljasti, että kasvihuoneista saadut tulokset eivät välttämättä päde kenttäolosuhteissa.

Warwick ym. (2003) tutkivat siirtogeenisen rapsin (*Brassica napus*) ja sen luonnonvaraisten sukulaisten peltokaalin (*Brassica rapa*), peltoretikan (*Raphanus raphanistrum*), rikkasinapin (*Sinapis arvensis*) ja kaalisinapin (tai rantasinapin; *Erucastrum gallicum*) välistä hybridisaatiota sekä kasvihuone- että kenttäkokeissa (myös kaupallisilla viljelyaloilla) useita erilaisia **markkereita** käyttäen. Näitä olivat herbisidikestävyysominaisuus, vihreä fluoresoiva proteiini-markkeri (GFP), lajispesifit **AFLP:t***, sekä ploidiataso. Rapsin ja rypsin välistä hybridisaatiota osoitettiin tapahtuneeksi noin seitsemällä prosentilla tutkituista kasveista kenttäkokeissa ja noin 14 prosentilla tutkituista kasveista kaupallisilla viljelyaloilla. Hybridikasvien siitepölyn kunto (viability) oli kuitenkin yli puolessa tapauksista huonompi kuin ei-hybridikasveilla. Rapsin ja peltoretikan välinen hybridisaatio oli tutkimuksessa erittäin harvinainen tapahtuma (yksi hybridi 32821 taimesta koealalla). Rikkasinapin tai kaalisinapin ja rapsin välisiä hybridejä ei tutkimuksessa tavattu kaupallisilta viljelyaloilta lainkaan. Warwick ym. (2003) mukaan tulokset indikoivat, että mahdollisuus geenivirtaan rapsista peltoretikkaan, rikkasinappiin tai kaalisinappiin on erittäin pieni. Siirtogeenien leviäminen ympäristöön on kuitenkin mahdollista luonnonvaraisen peltokaalin kautta itäisessä Kanadassa ja kaupallisesti viljellyn rypsin kautta läntisessä Kanadassa.

Hansen ym. (2001) tutkivat introgressiota rypsin (*Brassica napus*) ja rapsin (*B. rapa*) muodostamassa sekarikkakasvistossa käyttämällä lajispesifisiä AFLP*-markkereita. Tutkijat keräsivät 102 *Brassican* näköistä kasvia kolmen neliometrin alalta. Näistä yksi oli ensimmäisen sukupolven hybridi (F1) ja noin puolessa oli tapahtunut introgressiota, eli niistä löytyi kummankin kasvilajin geneettisiä markkereita. Loput kasvit olivat lajipuhtaita; 50 kasvista löytyi ainoastaan *B. rapa* -spesifejä, ja seitsemästä kasvista *B. napus* -spesifejä markkereita. Tutkijat vertailivat markkereiden lukumääriä sellaisiin lukumääriin, joita oli havaittu kontrolloidusti takaisinristeytetyissä sukupolvissa (BC1 ja BC2). Rikkamaisen populaation markkereiden jakauma vastasi parhaiten toisen takaisinristeytys sukupolven markkereiden jakautumista. Introgressioprosessi oli siten tulosten mukaan ollut käynnissä jo pidemmän aikaa. Tutkimus oli ensimmäinen, joka osoitti näiden lajien välistä introgressiota luonnonolosuhteissa.

Hansen ym. (2003) tekivät myös jatkotutkimuksia introgression etenemisen selvittämiseksi. Kahdentoista sellaisen populaation, jossa oli tapahtunut introgressiota, maternaalisen kasvin 117 jälkeläistä tutkittiin ALFP:ien ja **kromosomilaskennan** avulla. Myös jälkeläisten lajispesifiset kloroplastimarkkerit tutkittiin ja niiden perusteella arvioitiin valittujen emokasvien lisääntymismalleja. Tulokset osoittivat, että introgressoituneet emokasvit pölytyivät korkealla frekvenssillä. Lisäksi useimmiten *Brassica rapa* näytti toimivan hybrideissä emokasvina introgressioprosessissa. Rapsin (*B. napus*) DNA:n osuus jälkeläisissä väheni huomattavasti verrattuna niiden introgressoituneisiin emokasveihin. Tulosten mukaan introgressio voi johtaa viherhiukkasten vaihtumiseen (eli rypsimäisillä kasveilla voi olla rapsin viherhiukkanen) näiden lajien välillä. Tästä syystä tutkijat pohtivatkin voidaanko siirtogeenin siirtämistä viherhiukkasen genomiin pitää riskinhallintana. Suurin osa tähänastisista introgressiotutkimuksista on tehty käyttämällä rapsia esimerkiksi kikasvina. Suomessa viljellään lähinnä rypsiä (*B. rapa*), kun taas rapsia (*B. napus*) käytetään erittäin vähän edelliseen verrattuna. Näiden lajien pölytys on jossain määrin erilainen.

¹ Alkionpelastusmenetelmässä (embryo rescue; ks. esim. van Tuyl ym. 1991; Nimura ym. 2003) alkio, joka ei pysty kehittymään normaalisti siemenessä, eristetään ja kasvatetaan taimeksi solukkoviljelyalustalla.

Arvioitaessa introgression mahdollisuutta GM-kasveista luonnonvaraisiin kasveihin on siis esiintymisalueiden lisäksi tiedettävä voiko hybridisaatiota ylipäättensä tapahtua (tähän vaikuttavia tekijöitä ovat mm. itsepölytys/ristipölytys, kukinnan samanaikaisuus, siitepölyn ominaisuudet, gameettien yhteensopivuus). Ellstrand ym. (1996) ovat selvittäneet, missä kasviheimoissa ja -suvuissa tapahtuu eniten luonnollista hybridisaatiota eri maantieteellisillä alueilla. Skandinaviassa

tällaisia heimoja ovat sarakasvit (Cyperaceae), heinäkasvit (Poaceae), asterikasvit (Asteraceae), pajukasvit (Salicaceae; sis. esim. haavat, poppelit), ruusukasvit (Rosaceae) ja alvejuurikasvit (Dryopteridaceae; kuuluu sanikkaisiin). Näistä ryhmistä kaupallisessa viljelyssä Suomessa käytetään lähinnä heimojen Poaceae (mm. viljat), Asteraceae (esim. salaattit) ja Rosaceae (esim. monet koristekasvit kuten ruusut, ja hedelmäpuut, kuten esim. omena, luumu, vadelma, mesimarja) edustajia.

Mikäli hybridisaatiokyky ei ole ennestään tiedossa, Kjellsson ym. (1997) suosittelee testimenetelmäksi **kokeellista pölytystä***, jossa samat kasvit toimivat sekä siitepölyn luovuttajina että vastaanottajina (diallel cross; ks. Schou & Philipp 1984; Morse & Schmitt 1991; Lamb ym. 1994; Schmid & Dolt 1994) tai muunlaista kokeellista pölytystä. Kokeellinen pölytys (ks. Kjellsson ym. 1997 sekä Marshall & Ellstrand 1988; Robert ym. 1991; Eckhart 1992; Caruso 1999; Routley ym. 1999; Sime & Baldwin 2003) on tutkimusmenetelmä, jonka avulla voidaan tutkia eri kasvien kykyä lisääntyä keskenään tai hede- ja emikasvien (tai itsepölytyksen) vaikutuksia kasvien jälkeläisten siementuotantoon. Esim. Preston (1991) sekä McKone ym. (1995) ovat käyttäneet menetelmää selvittääkseen itsepölytyksen vaikutusta emin vastaanottavuuteen. Jonsson ym. (1991) puolestaan vertailivat itse- ja ristipölytyksen vaikutuksista siiteputken kasvuun kokeellisen pölytyksen avulla. Myös Pasonen ym. (2001; 2002) käyttivät kokeellista pölytystä osana siitepölyn kilpailukykyä selvittävässä tutkimuksessaan (ks. edellä). Hybridisaation mahdollisuuden tutkimisessa voidaan käyttää myös **siitepölyn merkitsemistä, autettua hedelmöitystä** (ks. Taylor 1982, van Tuyl ym. 1991) ja **siitepölyn itämistä**. Mikäli tutkittavan kasvin siitepölyssä ei itsessään ole ominaispiirteitä, joiden avulla tunnistus on mahdollista, voidaan tutkittava siitepöly leimata fluoresoivalla merkkiaineella (tai vaihtoehtoisesti käyttää itse merkkiainepartikkeleita siitepölyn tilalla; ks. Kjellsson ym. 1997), jolloin se voidaan jäljittää UV-valon avulla (ks. Waser 1982; Jong ym. 1992; Petterson 1992). Vaihtoehtoisesti siitepöly voidaan merkitä metallihiukkakasilla, ja jäljittää elektronimikroskoopin avulla (Wolfe ym. 1991). Siitepölyn merkitsemisen avulla voidaan tutkia siitepölyn liikkeitä, mutta kaukolevinnän tutkiminen voi olla vaikeaa. Menetelmä on vaikea ja sopii yleensä vain pieniin, kontrolloidussa oloissa tehtäviin tutkimuksiin. Siitepölyn itämistä (ks. Kjellsson ym. 1997) on menetelmä, jossa itämistä testataan joko erilaisilla keinotekoisilla alustoilla tai suoraan emin luotilla (Schribailo & Barrett 1994; Seavey & Carter 1994). Menetelmää on käytetty erilaisten kokeellisten pölytysten tulosten testaamisessa, sekä elinkykyisten siitepölyhiukkasten määrän arvioinnissa (Groose & Bingham 1991; Jonsson ym. 1991; Carney ym. 1994; Weiss ym. 1994) sekä selvittäessä siitepölyn ominaisuuksien vaikutusta itämiseen (Cruzan 1990; Groose & Bingham 1991). Tosin siitepölyn itämistä ei keinotekoisella alustalla kerro hybridisaation mahdollisuudesta, eikä laboratoriossa tehty autettu hedelmöitys välttämättä anna oikeaa kuvaa luonnossa tapahtuvan pölytyksen onnistumisesta. Hybridit voidaan tunnistaa geneettisten markkereiden* tai mahdollisesti kromosomiluvun perusteella (virtaussytometria*). Kjellsson ym. (1997) mukaan myös luotettavan kelpoisuuden mittausten avulla voidaan ennakoida siirtogeenien introgressiota GM-kasveista luonnonvaraisiin populaatioihin. Esim. Arias ja Rieseberg (1994), Arriola ja Ellstrand (1996) ja Darmency ym. (1998) ovat tutkineet geenivirtaa viljellyistä kasveista luonnonvaraisiin kasveihin kenttäolosuhteissa. Darmency ym. (1998) käyttivät **silmämääräisen arvioinnin** ja **herbisidikestävyysominaisuuden** ohella **proteiinimarkkereita*** ja virtaussytometriaa* tunnistakseen rapsin ja peltoretikan hybridit kenttäkokeissa. Tulosten mukaan peltoretikkahybrideiksi osoittautui kolme yksilöä sadasta tutkitussa rapsipellosa. Tulosten perusteella Darmency ym. (1998) päättelivät, että koko siemensadon odotettu hybridifrekvenssi vaihtelee 0,06 promillesta 0,2 prosenttiin.

Siitepölyn leviäminen

Hybridisaation edellytyksenä on siitepölyn (tai ensin siementen tai suvuttomien leviäinten) leviäminen populaatiosta toiseen. Pölytyksen kannalta tärkeitä tekijöitä ovat sekä siitepölyn leviämismatka että siitepölyn elinaika. Lisäksi ympäristön olosuhteet (tuulen suunta, pölyttäjien määrä) vaikuttavat siitepölyn leviämismatkaan ja –tiheyteen. Tuulipölytteisillä kasveilla on yleensä suuri siitepölyntuotanto ja pitkä potentiaalinen siitepölyn leviämismatka, kun taas hyönteispölytteisten kasvien siitepöly leviää yleensä pienemmälle alalle.

Hybridien muodostumisen todennäköisyyttä voidaan ennakoida tarkastelemalla tutkittavan kasvin siitepölyn leviämistä (ks. esim. Jørgensen & Andersen 1994; Kareiva ym. 1994; Rogers & Parkers 1995; Scheffler ym. 1993; Timmons ym. 1996). Siitepölyn leviämistä voidaan tutkia sekä suorilla että epäsuorilla menetelmillä. Suorien menetelmien avulla saadaan kuva senhetkisestä potentiaalisesta leviämisestä, kun taas epäsuorien menetelmien avulla voidaan selvittää myös siitepölyn aiempaa leviämistä. Suoria menetelmiä ovat mm. siitepölyn merkitseminen, **siitepölyn laskeminen** (lukuisia eri menetelmiä riippuen pölytystavasta, ks. Kjellsson ym. 1997 sekä Fairley & Batchelder 1986; Mazer & Schick 1991; Asmussen 1993; Savolainen ym. 1993; Carré ym. 1994) ja **siitepölykeräinten** käyttö. Siitepölykeräimiä voidaan käyttää tuulipölytteisillä kasveilla siitepölyn kulkeman matkan ja siitepölytuotannon mittaamiseen (menetelmät; ks. Fairley & Batchelder 1986; Dafni 1992). Epäsuoria menetelmiä on mm. geneettisten markkereiden käyttö siementen tai itäneiden taimien vanhempien alkuperää selvittäessä (ks. esim. Ritala ym. 2002). Ajallisesti kattavan kuvan onnistuneista pölytystapahtumista saa käyttämällä geneettisiä markkereita* yhdessä **isyysanalyysin*** kanssa. Hyönteispölytteisten kasvien hybridisaatiomahdollisuutta tutkittaessa tulee selvittää, onko alueella oikeanlaisia pölyttäjiä. Lisäksi voidaan tutkia, vaikuttaako kasviin siirretty geeni sellaisiin ominaisuuksiin (esim. haihtuvat yhdisteet, väri), jotka vaikuttavat **pölyttäjien pölytyskäyttämiseen** (menetelmät; ks. esim. Inouye 1978; Best & Bierzychudek 1982; Ginsberg 1983; Galen & Plowright 1985; Olesen & Warncke 1989; Jones & Reithel 2001; Klinkhamer ym. 2001; Campbell ym. 2002; Goubara & Takasaki 2004). GM-kasvin ja muuntamattoman kasvin pölyttäjien pölytyskäyttämisen muutoksia voidaan seurata esim. kasvihuoneolosuhteissa.

Monet tutkimukset (esim. St Amand ym. 2000; de Marchis ym. 2003) ovat osoittaneet, että mitä suurempi viljelyala on, sitä laajemmalle alueelle siitepöly leviää. Yksittäisen siitepölyhiukkasen kulkema matka tuskin lisääntyy viljelyalan koon kasvaessa, mutta laajalle levinneitä hiukkasia todennäköisesti löytyy enemmän/helpommin suurten siitepölylähteiden ympäriltä.

Lavigne ym. (2002) esittävät, että siitepölyn kautta tapahtuneen geenivirran määrää voitaisiin arvioida käyttämällä **siementen puhtauden määrittystä**. Tämä on tutkijoiden mukaan relevantti lähestymistapa mikäli sekä viljellyn että luonnonvaraisen kasvin siitepölyn liikkuvuus on samanlaista. Lavigne ym. (2002) käyttivät esimerkikasvinaan sokerijuurikasta. Luonnonvaraisten juurikaspopulaatioiden tutkimustulokset osoittivat, että Ranskassa, missä eristysmatka on 1000m, suuri osa luonnonvaraisten juurikkaitten tuottamista siemenistä oli pölyttynyt viljeltyjen juurikkaitten siitepölystä.

Siitepölyn kestävyys vaikuttaa pölytyksen onnistumisen ja siten myös geenivirtaan. Luna ym. (2001) tutkivat siitepölyn ajallista säilyvyyttä sekä eristysmatkan pituuden tehoa pölytyksen estämisessä maissilla (*Zea mays*). Kypsiä siitepölyhiukkasia altistettiin ulkoilmalle ja auringon valolle eripituisia aikoja. Siitepölyn kunto arvioitiin sen jälkeen silmämääräisesti ja siitepöly käytettiin sitten pölytykseen. Siitepölyn elinkyky arvioitiin siementuotannon perusteella. Elinkyky säilyi noin kaksi tuntia siitepölyn varisemisesta. (Kokeessa käytettiin maissia, jolla on

erityisen suuret siitepölyhiukkaset. Muiden kasvien kohdalla siitepölyn kunnan silmämääräinen arviointi voi olla vaikeaa). GM-kasvin ja muuntamattoman kasvin siitepölyn eliniän arvioiminen voi olla hyödyllistä arvioitaessa sellaisten tuulipölytteisten (siirtogeenisten) kasvien ympäristövaikutuksia, joiden siitepöly leviää kauas (esim. koivu). Siitepölyn kunnan arviointiin voidaan myös käyttää siitepölyn itämistestiä ja **siitepölyn elinkyvyn testiä** (ks. Kellogg 1987; Asmussen 1993; Carré ym. 1994; Robertson ym. 1994; Luna ym. 2001), tai siitepölyn elinkykyä voidaan arvioida välillisesti **tuotettujen siementen määrän** perusteella.

Siitepölyvälitteisen geenivirran tutkiminen

St. Amand ym. (2000) tutkivat siitepölyvälitteistä geenivirtaa eri kokoisilta sinimailasen (*Medicago sativa*) viljelyaloilta. Markkerina käytettiin joissakin sinimailasissa luontaisesti esiintyvää glutamiinisyntetaasin (GS) intronissa olevaa insertiota, sekä RAPD:eja* tapahtuneen ristipölytyksen havaitsemiseen. Siitepölyn lähteenä käytettiin GS-markkerin omaavia yksilöitä, kun taas (istutetuilta) kohdekasveilta tämä puuttui. Insertion jäljittämiseen kohdekasveista käytettiin sitä varten erityisesti suunniteltuja PCR-alkukkeita. Geenivirtaa tutkittiin etsimällä markkeria 6 000 kasvista sekä itse sinimailaspellosta (jonne oli siirretty mehiläispesä; sinimailanen on hyönteispölytteinen) että sen ulkopuolelta. Siitepölyn liikkeen satunnaisuuden määrittämiseen käytettiin **Rayleighin testiä** (ks. Batschelet 1981). GS-markkeri löytyi noin kolmelta prosentilta analysoiduista kasveista. Merkkigeenejä löytyi vielä 1 000:n metrin päästä, kun viljelyalan koko oli 1 200m², kun taas 2 m²:n alalta tutkijoiden havaitsema geenivirta ulottui ainoastaan 200 metrin etäisyydelle.

- Vastaavanlaisen markkerin löytäminen muista kasvilajeista voi olla vaikeaa.

- Koe vaatii suuren viljelyalan ja on aikaavievä, toisaalta tämänkaltaisen markkerin läsnäolon pystyy varmistamaan pelkästään PCR-fragmentin pituuden määrittämisen avulla, eli menetelmä on suhteellisen vaivaton sopivan markkerin löytymisen jälkeen.

Rieger ym. (2002) tutkivat herbisidikestävän (klorosulfonikestävyys) rapsin (*Brassica napus*) siitepölyn leviämistä ympäröiville viljelyksille kaupallisilta viljelmiltä Australiassa, missä GM-rapsia on kasvatettu vuodesta 2000. Näytteitä kerättiin 63:lta perinteisesti viljellyltä rapsipelloilta (kaikkien tutkittujen peltojen koko oli 251-100 ha). Kultakin tutkittavalta perinteisesti viljellyltä alalta kerättiin vähintään 100 000 siementä kolmesta eri paikasta. Kerätyt siemenet siirrettiin erillisille pelloille, joilla niitä kasvatettiin kontrollikasvikantojen (kaksi herbisidikestävää ja kaksi -herkkää kantaa) kanssa. Alueet käsiteltiin herbisidillä (klorosulfoni) tapahtuneen geenivirran toteamiseksi. Eloojääneet kasvit käsiteltiin vielä uudelleen kahden viikon kuluttua ensimmäisestä käsittelystä. Käsittelyjen jälkeen 30 %:ssa tutkituista näytteistä todettiin herbisidikestävyttä (frekvenssi suurimmillaan 0,197 %). Tulokset osoittivat, että rapsipeltojen välillä on tapahtunut geenivirtaa (kuitenkin enimmilläänkin alle 1 %). Kestävyttä ei kyetty osoittamaan pelloilta, jotka olivat yli 3 km:n päässä GM-pelloista. Tutkimuksessa testattiin yhteensä yli 48 miljoonaa yksilöä.

De Marchis ym. (2003) tutkivat geenivirtaa siirtogeenisestä (*asnA* tai *uidA*) keltamaitteesta (*Lotus corniculatus*) sekä saman lajin, että lähisukuisten lajien (hentomaite; *L. tenuis* ja isomaite; *L. pedunculatus*) yksilöihin. Tutkimuksessa seurattiin siirtogeenien leviämistä siitepölyn ja ristipölytyksen välityksellä. Siirtogeenien läsnäolo tutkittiin siirtogeenispesifien alukkeiden ja PCR-menetelmän* avulla eri etäisyyksille istutettujen vastaanottajakasvien jälkeläisistä. Siirtogeeniä havaittiin siirtyneen ainoastaan saman lajin yksilöihin. Tulokset osoittivat, että mitä suurempi siitepölylähte on, sitä laajemmalla alueella siitepölyä voidaan löytää. Isomaite pystyy helposti pölyttämään itse itsensä ja hentomaitteella taas on eri kromosomiluku kuin keltamaitteella. Nämä tekijät selittänevät miksi lajien välistä ristipölytystä ei kyetty osoittamaan (De Marchis ym. 2003).

Arnaud ym. (2003) tutkivat geenivirtaa juurikkaiden (*Beta vulgaris*) välillä kloroplastin markkereita ja **mikrosatelliitteja*** käyttämällä. Tulokset eivät osoittaneet laajaa siitepölyn leviämistä rikkajuurikkaasta (luonnonvaraisen ja viljellyn juurikkaan jälkeläinen) luonnonvaraisiin juurikkaisiin. Rikkamaiset linjat kuitenkin karkasivat pelloilta siemenlevinnän mukana. Artikkelista löytyy tarkat materiaalin keruun, molekyyli-markkereiden tutkimisen ja niiden tilastollisen käsittelyn kuvaukset.

Siitepölykilpailu

Leviämisen jälkeen siitepölyn täytyy itää emin luotilla ja kilpailla pölytyksessä muiden siitepölyhiukkasten kanssa (siitepölykilpailu) ennen kuin hybridisaatiota voi tapahtua. Siitepölyn määrä emin luotilla on yleensä paljon suurempi kuin vastaavien munasolujen määrä (Willson 1994). Tästä syystä vain osa siitepölystä voi hedelmöittää siemenaiheen, minkä seurauksena emin luotilla olevien siitepölyhiukkasten on kilpailtava keskenään hedelmöityksestä. Mikäli siirretty ominaisuus vaikuttaa kasvin siitepölyn kilpailukykyä parantavasti, voi tästä olla GM-kasville valintaetua verrattuna luonnonvaraisiin kasveihin. Valintaetu voi puolestaan edistää introgressoituneen siirtogeenin vakiintumista luonnonvaraisissa populaatioissa. Siitepölyn itämisen onnistumiseen vaikuttavat sekä siiteputken, siitepölyhiukkasen että emikasvin vartalon genotyypit. Tutkittaessa siitepölyn itämistä ja kilpailukykyä emin luotilla voidaan hyödyntää **kukkien pussittamista** (ks. esim. Owens ym. 1990; Guitián ym. 1993; Roy 1995), **siitepölylaskentaa** (lukuisia eri menetelmiä riippuen esim. pölytystavasta, ks. Kjellsson ym. 1997 sekä Fairley & Batchelder 1986; Mazer & Schick 1991; Asmussen 1993; Savolainen ym. 1993; Carré ym. 1994), siitepölyn itämistestiä, siitepölyn elinkyvyn testiä (ks. Kellogg 1987; Asmussen 1993; Carré ym. 1994; Robertson ym. 1994; Luna ym. 2001) sekä **luotin vastaanottavuuden testiä** (McCarthy & Quinn 1990; Jonsson ym. 1991; Preston 1991). Siitepölykilpailua voidaan lisäksi edelleen tutkia kasvin kelpoisuuden arvioinnin (Kelpoisuus; ks. edellä) avulla. Koska suurin osa siitepölyhiukkasessa ilmentyneenä olevista geeneistä ilmentyy myös sporofyytissä (aikuinen kasvi, 2n), on siitepölyn hyvän itämiskyvyn oletettu korreloivan positiivisesti sporofyytin kelpoisuuden kanssa. Tästä on tehty lukuisia tutkimuksia (ks. esim. Ottaviano & Mulcachy 1989). Pasonen ym. (2001) tutkivat rauduskoivun (*Betula pendula*) siitepölyn laadun vaikutusta tuotettujen siementen ja taimien ominaisuuksiin mittaamalla **siiteputken kasvunopeutta** kontrolloiduissa pölytyksissä. Tutkijat havaitsivat siiteputken kasvunopeuden korreloivan tuotettujen siementen massan kanssa, kun taas maternaaliset ominaisuudet vaikuttivat muihin siementen ja taimien ominaisuuksiin (tuotettujen siementen määrä, aikainen taimen kasvu). Pasonen ym. (2002) tutkivat myös siitepölyn kilpailukykyyn (esim. siiteputken kasvunopeus) vaikuttavia genotyypin ja ympäristön vuorovaikutuksia sekä kasvihuoneessa että kenttäolosuhteissa (menetelmät: ks. Pasonen ym. 2002). Tutkimuksessa ympäristöolosuhteilla havaittiin olevan suuri vaikutus koivun siitepölyn kilpailukykyyn.

Williams ym. (1999) käyttivät hyväkseen eri koivulajien erilaisia ploidiatasoja tutkiessaan koivun (*Betula*) siiteputkien menestymistä lajinsisäisessä ja lajien välisissä pölytyksissä. Menetelmää voidaan käyttää GM-kasvien ja muuntamattomien kasvien pölytyksen jälkeisen jälkeläistuotannon tehokkuuden arviointiin, edellyttäen, että tutkittavien kasvien ploidiatasot ovat erilaiset. Tutkimuksessa Williams ym. (1999) havaitsivat aikaista pölytystä estäviä mekanismeja (esim. siiteputken yhteensopimattomuus, hitaampi siiteputken kasvu, hidastunut generatiivisten solujen mitoosi). Tutkimuksessa itäneistä siemenistä 98 % oli peräisin lajinsisäisestä pölytystapahtumasta.

Siemenvälitteinen geenivirta

Siirtogeenit voivat introgressoitua luonnonvaraisiin kasveihin vielä GM-kasvien viljelyn loputtua siemenpankissa säilyvien siementen ja niistä itävien kasvien välityksellä. Siirtogeenien ajallisen leviämisen potentiaali riippuu maassa olevien GM-kasvin siementen määrästä, dormanssista sekä siitä, millaiset ympäristötekijät vaikuttavat siementen itämiseen. Riskinarviointiin on siis saatava tietoa GM-kasvin, muuntamattoman kasvin sekä näiden hybridien siementen dormanssista, pitkäikäisyydestä ja itämisominaisuuksista, mikäli halutaan arvioida siirtogeenien

leviämisen mahdollisuutta siemenpankin välityksellä (Linder & Schmitt 1994). Vaikka viljelykasvien siementen dormanssikyky on yleensä huono, voi viljelykasvin ja luonnonvaraisen kasvin hybridi olla hyvinkin dormanssikykyinen (etenkin jos emikasvina on luonnonvarainen yksilö ja pölyttäjänä viljelykasvi).

Hybridisaation tuloksena syntyneiden siementen elinkykyä voidaan testata käyttämällä esim. **siementen itämistestiä*** ja **siementen elinkyvyn testiä** (väritesti, ks. esim. Nakamura & Stanton 1987; Sage & Webster 1990). Siemenvälitteisen geenivirran arviointiin voidaan käyttää **assignment-menetelmää***. Menetelmän luotettavuus heikkenee populaatioiden geneettisen samankaltaisuuden lisääntyessä (Kemppinen ym. 2003). Tero ym. (2003) käyttivät assignment-menetelmää tataarikohokki (*Silene tatarica*) -populaatioiden välisen geenivirran tutkimiseen.

Gonzalez-Martinez ym. (2002) tutkivat rannikkomännyn (*Pinus pinaster*) siemenvälitteistä geenivirtaa markkereiden spatiaalisen autokorrelaatio -analyysin (ks. Gonzalez-Martinez ym. 2002; Vekemans & Hardy 2004) avulla.

Menetelmiä hybridisaation ja introgression mahdollisuuksien tutkimiseen. Tähdellä merkityt menetelmät on kuvattu tarkemmin liitteissä.

AFLP*, alkionpelastusmenetelmä*, allotsyymimarkkerit*, assignment-menetelmä*, fylogeniamenetelmät*, geneettinen etäisyys*, geneettiset markkerit*, herbaarionäytteiden tutkiminen, hybridisaation mahdollisuuden arviointi, idättämiskokeet*, isotsyymimarkkerit ja muut proteiinimarkkerit*, kaukokarvoitus, kelpoisuuden arviointi*, kokeellinen pölytys*, kukkien pussittaminen, levinneisyyskartat, luotin vastaanottavuuden testi, mikrosatelliitit*, PCR*, pölyttäjien pölytyskäyttötutkiminen, RAPD*, Rayleighin testi, siementen elinkyvyn testi, siementen puhtauden määrittäminen, siiteputken kasvunopeuden mittaaminen, siitepölykeräimet, siitepölyn elinkyvyn testi, siitepölyn itämistesti*, siitepölyn laskeminen, siitepölyn merkitseminen*, spatiaalinen autokorrelaatioanalyysi, virtausytometria*

Introgression seurausten arviointi

Siitepölyn (ja sen mukana geenien) leviäminen GM-kasveista ympäröivään luontoon on hyvin todennäköistä. Kareiva ym. (1994) mukaan geenivirran ympäristövaikutusten kannalta oleellinen kysymys onkin, mitä seurauksia siitepölyn/geenien leviämisellä voi olla. Dale (1994) mukaan hybridin ympäristövaikutukset riippuvat siirtogeenin luonteesta ja sen ilmentymisestä uudessa geneettisessä taustassa.

Hybridisaation seurausten tutkiminen

- Hybridien vakiintuminen.
- Hybridien kelpoisuus.
- Resistenttien (herbisidi/hyönteis-) luonnonvaraisten kantojen muodostuminen.
- Geenifrekvenssien muutos ja geneettisen monimuotoisuuden väheneminen.
- Populaatioiden tai lajien häviäminen.
- Leviämiskyvyn muutos hybridisaation seurauksena (ks. leviämiskyky)

Hybridien vakiintuminen

Hybridisaatiota on osoitettu tapahtuneeksi useiden kasvilajien kohdalla, mutta introgressoituneiden geenien hybridisaation jälkeinen kohtalo on jäänyt tutkimuksissa vähemmälle huomiolle. **Pitkäaikainen seuranta** on luultavasti tehokkain selvityskeino hybridien vakiintumisen selvittämiseen. Esim. Whitton ym. (1997) ovat tutkineet viljeltyjen ja luonnonvaraisten auringonkukkien (*Helianthus annuus*) hybridien vakiintumista viiden sukupolven ajan käyttäen apunaan RAPD-markkereita*. Tutkimuksessa peltojen reunoilla kasvavista ensimmäisen sukupolven auringonkukista 42 % havaittiin olevan hybridejä. Ensimmäisen hybridisukupolven viljelykasviallelien frekvenssit eivät juuri pienentyneet seuraavan viiden sukupolven aikana. Whitton ym. (1997) mukaan tulosten perusteella voidaan olettaa, että neutraalit tai hyödylliset siirtogeenit voivat vakiintua luonnonvaraisiin auringonkukkapopulaatioihin. Tutkittaessa vertikaalista (suvullisen lisääntymisen kautta tapahtunutta) geenivirtaa viljelykasvista sen luonnonvaraisiin sukulaisiin voi **real-time PCR –menetelmästä*** (RT-PCR) olla hyötyä. Menetelmän avulla saadaan tietoa tutkittavan DNA-sekvenssin määrästä alkuperäisessä näytteessä. RT-PCR mahdollistaa siten useiden näytteiden/yksilöiden yhdistämisen yhdeksi suureksi näytteeksi (pooling). RT-PCR:n avulla voidaan helposti ja halvalla havaita siirtogeenin läsnäolo esim. jonkin tietyn alueen kasveissa.

Hybridien kelpoisuus

Mikäli hybridien kelpoisuus on luonnonvaraisten kasvien kelpoisuutta parempi, on todennäköisempää, että introgressoitunut geeni vakiintuu populaatiossa (Malkamäki 1997). Toisaalta Gliddon (1994) mukaan satunnaisajautuminen voi vaikuttaa geenin vakiintumiseen ilman parantunutta kelpoisuuttakin ja Haygood ym. (2003) mukaan jopa epäsuotuisa alleeli voi vakiintua pienessä populaatiossa toistuvan migraation seurauksena. Hybridien kelpoisuutta voidaan tutkia kelpoisuuden arvioinnin avulla.

Hauser ym. (1998), Snow ym. (1998, 2001, 2003) ja Van Gaal ym. (1998) ovat tutkineet (GM-, tai perinteisten) viljelykasvien ja niiden luonnonvaraisten sukulaisten välisten risteymien (F1-hybridien) kelpoisuutta. Joissain tapauksissa F1-hybridien ja takaisinristeytyneiden sukupolvien kelpoisuus on ollut yhtä hyvä (Hauser ym. 1998; Klinger & Ellstrand 1994; Van Gaal ym. 1998; Snow ym. 2001), tai jopa parempi (Snow ym. 2003; ks. alla) kuin luonnonvaraisten yksilöiden. Hybridien kelpoisuuden tutkimiseen saattavat osin soveltua myös menetelmät, joita käytetään GM-kasvien ja muuntamattomien kasvien leviämiskykyjen vertailuun (esim. tuotettujen siementen määrä, elinkyky ja dormanssikyky; ks. Leviämiskyky).

Kelpoisuuden muutoksen tutkiminen

Snow ym. (1999) testasivat aiheuttaako introgressoitunut glufosinaattiresistenssin aikaansaava siirtogeeni mitattavan kustannuslisän rikkamaiselle rypsille (*Brassica rapa*). Aluksi risteytettiin siirtogeeninen rapsi (*Brassica napus*) ja luonnonvarainen rypsi (*B. rapa*) keskenään. F1-yksilöt takaisinristeytettiin rypsin kanssa ja jälkeläisistä valittiin ne, joilla oli rypsin kromosomiluku. Kun valitut yksilöt edelleen takaisinristeytettiin, saatiin tulokseksi sukupolvi (BC₂), joka oli resistenssigeenin suhteen hemitsygoottinen. Kun seuraavan sukupolven (BC₃) lisääntymismenestystä seurattiin, havaittiin, ettei siirtogeenin omaavien yksilöiden siitepölyn fertiliteetti tai tuotettujen siementen määrä poikennut kasveista, joilla ei siirtogeeniä ollut. Snow ym. (1999) mukaan tulokset osoittivat, ettei kyseinen geeni aiheuta kasveille kustannuslisää, joten glufosinaattiresistenssi voi introgressoitua rypsiin ja vakiintua ilman herbisidien käytön aiheuttamaa valintapainettakin.

Snow ym. (2003) käyttivät siementuotannon suuruutta auringonkukkapopulaatioiden kelpoisuuden mittarina. He osoittivat tutkimuksessaan ensimmäisinä, että Bt-hyönteiskestävyysominaisuus (*cryIAc*) voi hyödyttää myös luonnonvaraisia kasvipopulaatioita luonnonolosuhteissa. Tutkimuksessa käytettiin viljeltyjen ja luonnonvaraisten auringonkukkien (*Helianthus annuus*) takaisinristeytettyjä luonnonvaraisia populaatioita, joihin oli introgressoitunut *cryIAc*-siirtogeeni. Perhosten, kärpäskäiden ja karpästen aiheuttamia tuhoja seurattiin sekä siirtogeenin omaavista, että kontrollikasveista. Siirtogeenin omaavien kasvien siementuotanto oli ensimmäisellä koealalla 55 % kontrollikasvien siementuotantoa suurempi. Samanlainen suuntaus havaittiin toisellakin koealalla, mutta siinä kasvien välinen ero oli ainoastaan 14 %. Erot siementuotannon määrissä johtuivat siirtogeenisten kasvien paremmasta hyönteiskestävyydestä (erityisesti perhoskestävyydestä). Kasvihuonekokeissa siirtogeenillä ei havaittu olevan kustannuslisää kasville. Tutkijoiden mukaan tulokset indikoivat, että mikäli Bt-aurionkukat otetaan kaupalliseen viljelyyn, siirtogeenin introgressoituvat luonnonvaraisiin populaatioihin. Siirtogeenin omaavien yksilöiden (ja populaatioiden) siementuotanto tulee kasvamaan (verratuna Bt-ominaisuutta vailla oleviin kasveihin) niillä alueilla, joilla perhosherbivorit ovat yleisiä.

Geneettinen monimuotoisuus

Geneettinen monimuotoisuus auttaa populaatioita sopeutumaan muuttuviin ympäristöolosuhteisiin. Monimuotoisuuden kaventuessa myös sopeutumiskyky saattaa heikentyä. Ellstrand (2003) ja Wolf ym. (2001) mukaan hybridisaatio saattaa joissakin tapauksissa johtaa jopa uhanalaisten kasvilajien sukupuuttoon kuolemiseen tai geneettiseen köyhtymiseen (mikä pätee siis myös muuntamattomiin kasveihin). Populaatioiden geneettisen rakenteen muutoksia voidaan tutkia geneettisiä markkereita* ja niiden analyysimenetelmiä käyttämällä. Kjellsson ym. (1997) mukaan GM-kasvien vaikutuksia geneettiseen diversiteettiin voidaan mitata esim. kelpoisuuden arvioinnin avulla. Gustine ja Sanderson (2001) käyttivät RAPD-markkereita* ja pysyviä koealoja tarkastellessaan valkoapilan (*Trifolium repens*) populaatioiden ajallisia ja paikallisia geneettisen diversiteetin muutoksia. Muita menetelmiä ovat geenivirran arviointi yksittäisten merkkialleelien avulla (sekvensointi*) ja isyyssanalyysi*. Käyttökelpoisia geneettisiä markkereita ja geneettisten markkereiden analyysiohjelmiä (molekyyliosiossa mainittujen lisäksi) ovat mm. **haplotyyppistatistiikka** (ks. esim. McCauley ym. 2003), spatiaalinen autokorrelaatioanalyysi ja **Moran's I** (ks. Gonzalez-Martinez ym. 2002).

Esimerkki geneettisen monimuotoisuuden mittaamisesta

Bartsch ym. (1999) tutkivat viljellyistä juurikkaista (*Beta vulgaris*) villijuurikkaisiin kohdistuvan geenivirran vaikutusta luonnonvaraisten kasvien geneettiseen monimuotoisuuteen. Tutkimuksessa mitattiin isotyyppi*-alleelifrekvenssejä (II polymorfista lokusta) useista juurikkapopulaatioista. Tulosten avulla arvioitiin juurikkaiden geneettistä polymorfismia ja populaatioiden geneettistä rakennetta standardimenetelmiä käyttäen (Nein geneettinen diversiteetti*, sekä **geneettinen etäisyys***). Bartsch ym. (1999) tulokset osoittivat, että geenivirta viljellyistä juurikkaista villijuurikkaisiin itse asiassa hiukan lisäsi jälkimmäisten geneettistä monimuotoisuutta verrattuna sellaisiin populaatioihin, jotka kasvoivat kauempana viljellyistä juurikkaista (30 % Nein arvioitu heterotsygotismi). Bartsch ym. (1999) mukaan tulosten perusteella ei kuitenkaan voida päätellä geenivirran määrää tai sen vaikutuksia luonnonvaraisten kasvien kelpoisuuteen.

Populaatioiden/lajien häviäminen

Wolf ym. (2001) mukaan hybridisaatio voi johtaa erityisesti sellaisten populaatioiden tai lajien häviämiseen, jotka ovat harvinaisia, heikkoja kilpailijoita ja joilla ei ole kunnollisia lisääntymisesteitä viljelykasvien kanssa. Ilman **mallinnuksia** GM-kasvien viljelyn vaikutuksia luonnonvaraisten populaatioiden/lajien häviämiseen voi olla vaikeaa tutkia.

Ekosysteemien köyhtymisen (esim. lajimäärien pieneneminen) kohdalla on epäselvää, mikä on merkittävää monimuotoisuuden vähenemistä. Brittiläisissä Field Scale Evaluations -tutkimuksissa (FSE; ks. esim. Perry ym. 2003) kysymystä selvitettiin siemenpankin avulla saaduilla aiemmilla runsauksilla, mutta siinäkin vähenemistä voitiin arvioida vain karkeasti.

Lajien häviämisen tutkiminen simulaation avulla

Wolf ym. (2001) ovat selvittäneet lajien häviämistä sukupuuttoon luonnollisen hybridisaation kautta simuloimalla kahden yksivuotisen lajin risteymän elinkiertoa. Simulaatiossa (individual-based model simulating) käytettiin lukuisia ekologisia parametreja (mm. populaatiokoko, siitepölytuotanto, siiteputken kasvunopeus), jotka kaikki vaikuttivat lajien häviämisiin. Luonnonvaraisella kasvilla kilpailukyky, alkuperäinen (kasvu)tiheys, ja itsepölytysaste vaikuttivat häviämiseen eniten. Pretsygoottisilla (ennen hedelmöitystä ilmenevillä) lisääntymisesteillä oli posttsygoottisia (hedelmöityksen jälkeen ilmeneviä) esteitä voimakkaampi vaikutus häviämisenopeuteen. Simulaatiossa hybridisaatio johti toisen vanhemmaislaajan häviämiseen jopa viiden sukupolven aikana tietyissä olosuhteissa. Wolf ym. (2001) mukaan simulaatioita voidaan käyttää mm. tietotarpeiden selvittämiseen.

Mallintaminen

Ekologinen mallintaminen tulee luultavasti yleistymään GM-kasvien ympäristövaikutusten, erityisesti leviämisen, siitepölyn liikkumisen ja introgression arvioinnissa. Erilaisiin malleihin voidaan sisällyttää kenttäkokeista saatua dataa esim. siitepölyn tai siementen leviämisestä (esimerkkimallit: ks. ekol. menetelmät). Esim. Loos ym. (2003) ovat kehittäneet kaksi eri mallia simuloimaan maissipelloilta tulevan siitepölyn aikaansaamaa ristipölytystä. Malleja on käytetty kenttäkokeista saatuihin ristipölytysaineistoihin. Thompson ym. (2003) ovat puolestaan kehittäneet mallin ristikukkaisten kasvien sekä puuvillan geenien introgressiolle lähisuokuisiin kasveihin.

Esimerkkejä tehdyistä mallinuksista

Kasvien leviämisen simulointi – Ault & Coote (1990).
Siitepölyn (ja/tai siementen) leviämisen laajuuden matemaattinen arviointi – Kareiva ym. (1994), Ennos (1994), Meagher ym. (2003), Dyer ym. (2004).
Invaasio – Lewis (2000), Cannas ym. (2003).
Siemenpankkien arviointiin vaikuttavat tekijät – Benoit ym. (1989).
Uuden geenin introgressoituminen luonnonvaraiseen populaatioon – Soboleva ym. (2003).
Klonaalisen kasvun (stokastinen) simulointi - Cain ym. (1991).
Populaatiodynamiikkaan ja -arkkitehtuuriin perustuva kasvun malli – Callaghan ym. (1990).
Populaatiodynamiikka – Bauer ym. (2003).
Kilpailun vaikutukset – Hamill ym. (1986), de Kroon ym. (1987), Miller & Weiner (1989), Kjellsson (1991), Perry ym. (2003), Damgaard (2004).
Lajien häviäminen hybridisaation seurauksena – Wolf ym. (2001).
Bt-resistenssin kehittyminen viljelykasvialoilla, esimerkkinä GM-omena (*Malus domestica*) ja -apila (*Trifolium* sp.) – Caprio & Suckling (2000).

Menetelmiä hybridisaation ja introgression seurausten tutkimiseen.
Tähdellä merkityt menetelmät on kuvattu tarkemmin liitteissä.

Diversiteetti-indeksi*, ekologiset mallit, geneettinen etäisyys*, geneettiset markkerit*, geneettisten markkereiden analysointimenetelmät*, haplotyyppistatistiikka, Moran's I, pysyvät koealat*, QTL*, RAPD*, RFLP*, RT-PCR*, sekvensointi*, spatiaalinen autokorrelaatioanalyysi

7.2.2 Horisontaalinen geenin siirtyminen (HGT)

Horisontaalinen geenin siirtyminen (HGT) aitotumallisten eliöiden välillä, tai siirtyminen aitotumallisista eliöistä alkeistumallisiin on nykytietämyksen mukaan mahdollinen, mutta niin harvinainen tapahtuma, että sen osoittaminen on vaikeaa kehittyneistä molekyyliomenetelmistä huolimatta (ks. esim. Conner ym. 2003). Geenien, erityisesti siirtogeenien siirtyminen kasveista muihin eliöihin on GM-kasvien riskinarvioinnin kannalta merkittävin HGT-tapahtuma. Sellaiset eliöt, jotka ovat lähikontaktissa kasvin kanssa (esim. symbionttiset ja patogeeniset mikrobit, sekä maaperän bakteerit; ks. esim. van Elsas ym. 1989), lienevät todennäköisimpiä horisontaalisen geenivirran kohteita. Erityisesti jotkut bakteerit, kuten esim. *Acinetobacter calcoaceticus*, pystyvät ottamaan sisäänsä kasvien DNA:ta yhtä hyvin kuin alkeistumallistenkin eliöiden DNA:ta (Beringer 2003). Horisontaalisen geenien siirtymisen edellytyksenä on siirtogeenisen DNA:n säilyminen maaperässä. Esim. Widmer ym. (1996) pystyivät laboratorio-olosuhteissa jäljittämään GM-kasvista peräisin olevaa siirtogeenistä DNA:ta maanäytteistä 130 päivän kuluttua kasvimateriaalin joutumisesta maaperään. Lisäksi Paget ja Simonet (1994), sekä Gebhard ja Smalla (1999) löysivät kasvi-DNA:ta maaperästä vielä kahden vuoden kuluttua kyseisten kasvien viljelystä. De Vries ym. (2003) löysivät siirtogeenistä DNA:ta neljä vuotta vanhoista +4°C lämpötilassa varastoiduista maanäytteistä. DNA oli tutkijoiden mukaan todennäköisesti peräisin siirtogeenisen kasvin (peruna) siitepölystä. Tutkimuksessaan De Vries ym. (2003) osoittivat, että myös elävien kasvien juuret (eikä pelkästään lahoava kasviaines) ja siitepöly voivat olla siirtogeenien lähteenä bakteereille. Periaatteessa bakteerit voivat siirtää kasveilta saamiaan siirtogeeniä edelleen bakteeripopulaatioissa yksilöstä toiseen. Esim. Van Elsas ym. (1989), Lilley ym. (1994) ja Troxler ym. (1997) ovat osoittaneet, että kasvien ritsosfääri on erityisen edullinen paikka bakteerien väliselle HGT:lle. Myös kasvien fylloosfäärissä (lehtien pinnalla) on osoitettu tapahtuvan bakteerien välistä HGT:tä (Björklöf ym. 1995). Sellaiset siirtogeenikonstruktit, joissa on bakteereista peräisin olevia elementtejä (esim. promoottorit) voivat periaatteessa lisätä horisontaalisen geeninsiirtymisen mahdollisuutta (ks. Nielsen ym. 1998).

Luonnossa on jo ennestään valtavasti DNA:ta, eivätkä siirtogeenit esim. Beringer ym. (2003) mukaan siirry eliöstä toiseen sen helpommin kuin eliön omatkaan geenit. Edelleen Dale ym. (2002) mukaan siirtogeenisen DNA:n osuus on luultavasti olematon verrattuna totaalisen, maaperässä esiintyvän DNA:n määrään. Myös esim. Gebhard ja Smalla (1999) ja Hay ym. (2002) toteavat DNA:n säilymistä koskevilla tutkimuksillaan siirtogeenisen DNA:n määrän olevan maaperässä niin pieni, että horisontaalisen geeninsiirtymisen todennäköisyys on vähäinen. Toisaalta Tepfer ym. (2003) mukaan alle 2 g ehjää kasvin juurta tai vähemmän kuin 0,1 g murskattua lehteä riitti *Acinetobacterin* transformaatioon laboratorio-

olosuhteissa, kun vastaanottajabakteeri sisälsi siirtogeenin kanssa homologisen DNA-alueen. Siirtogeenien integroituminen bakteerin perimään näyttää lähes aina tapahtuvan homologisen rekombinaation avulla, jolloin bakteerilla on jo ennestään oltava ainakin osittain identtinen sekvenssi. De Vries ym. (2003) eivät tutkimuksessaan pystyneet havaitsemaan HGT:ta tapahtuneeksi sellaisissa tapauksissa, kun homologiaa ei ollut.

HGT:n frekvenssi ei Dröge ym. (1998) mukaan ole ratkaiseva tekijä riskejä arvioitaessa, sillä hyvin harvinaisellakin tapahtumalla voi olla ekologisia seurauksia mikäli siirtynyt geeni parantaa vastaanottajaeliön kelpoisuutta. Dröge ym. (1998) mukaan riskinarvioinnissa tulisi keskittyä tällaisten geenien tunnistamiseen. Myös Simonet (2000) mukaan siirtogeenisen kasvin DNA:n integroitumisella maaperän eliöiden perimään on tuskin merkittäviä ekologisia seurauksia, mikäli uusi geeni ei paranna vastaanottajaeliön kelpoisuutta. Lisäksi Kurland ym. (2003) mukaan siirtynyt geeni häviää pian vastaanottajabakteerin perimästä, mikäli se ei tarjoa bakteerille valintaetua. Horisontaalisen geeninsiirtymisen mahdollisuus kuitenkin mainitaan lainsäädännössä GMO:iden viljelyn mahdollisena ympäristöriskinä, joten geenien siirtymisen mahdollisuudesta ja mahdollisista ekologisista seurauksista tarvitaan tutkimustietoa riskinarviointia varten. Sen sijaan HGT:n rutiininomainen seuranta voi osoittautua hyvin työlääksi tehtäväksi, sillä seurantaan ei ole (vielä) olemassa toimivia menetelmiä. Seuranta luultavasti vaatisi parhaimmillaankin valtavan näytemäärän analysointia.

Epäsuoria todisteita horisontaalisesta geenin siirtymisestä on saatu fylogeniamenetelmiä* käyttämällä. Monissa tutkimuksissa (esim. Ke ym. 2000; Royo ym. 2000) on raportoitu (tapahtuneita) geenien siirtymisiä alkeistumallisten eliöiden välillä, mutta myös alkeis- ja aitotumallisten eliöiden välillä (ks. esim. Furner ym. 1986; Buades & Moya 1996; Katz 1996; Baker 1998; Brinkman ym. 2001). Lisäksi myös virusten, aitotumallisten eliöiden ja bakteerien välillä on havaittu tapahtuneen HGT:tä (ks. Baldo & McClure 1999). Hiljattain on julkaistu laaja fylogeneettinen tutkimus (Berghthorsson ym. 2003), jonka mukaan kaukaistakin sukua olevien kasvien välillä tapahtuu horisontaalista mitokondrion geenien siirtymistä. Kasvien mitokondrioista on tavattu mm. kimeerinen geeni, jonka toinen osa on peräisin kaksisirkkaisesta kasvista ja toinen yksisirkkaisesta kasvista. Tutkimuksessa käsiteltiin lähinnä kahta mitokondrion geeniä, ja tapahtuneita geenien siirtymisiä raportoitiin useita. Tutkijoiden mukaan siirtymisiä tapahtuu kuitenkin niin pienellä taajuudella, että ne tuskin lisäävät GM-kasvien viljelyn riskejä. Lisäksi siirtyneitä geenejä havaittiin lähinnä mitokondrioissa. Berghthorsson ym. (2003) mukaan kasveilla ei juuri tiedetä tapahtuneen horisontaalista geenien siirtymistä tumasta tai viherhiukkasen genomista. Geenien siirtymisen vektoria ei Berghthorsson ym. (2003) tutkimuksessa pystytty osoittamaan. Mahdollisia vektoreita voisivat olla esim. bakteerit tai virukset. Geenien siirtyminen eri kasvilajien (tai muiden eliöiden) välillä voi teoriassa tapahtua bakteerin kautta. Esim. Tepfer ym. (2003) mukaan kasvin DNA:ta vastaanottanut transformaatiokykyinen maaperäbakteeri (esim. *Acinetobacter*) voisi välittää DNA-fragmentin edelleen kasveja infektioiville *Agrobacterium*-bakteereille.

Horisontaalisesta geenin siirtymisestä on tehty jonkin verran myös kokeellista tutkimusta. Useimmat tutkimukset (katso esim. Nielsen ym. 1997; Nielsen ym. 1998; Bertolla & Simonet 1999; Gebhard & Smalla 1999) eivät ole pystyneet osoittamaan geenien siirtymisiä kasvien ja bakteerien välillä, mutta joissakin tutkimuksissa (ks. Nielsen ym. 2000; Tepfer ym. 2003) on saatu kokeellista näyttöä kasvigeenien siirtymisestä bakteereihin. Lisäksi ainakin kahdessa aiemmassa tutkimuksessa on havaittu DNA:ta siirtyneen kasvista sieneen tai muuhun aitotumalliseen eliöön (Hoffman ym. 1994; Buhariwalla & Mithen 1995). Lisäksi tiedetään, että virukset ottavat isäntäkasvin nukleiinihappoja omaan perimäänsä

(Aaziz & Tepfer 1999), joten periaatteessa niillä voisi olla mahdollisuus siirtää gee-
nejä esim. kasviyksilöiden välillä. Suurin osa kasvivirusista on RNA-virusia, joi-
den kohdalla DNA:n siirtymisen mahdollisuus on lähinnä hypoteettinen. DNA-
virusten ja retrovirusten kohdalla DNA:n siirtoa voisi kenties tapahtuakin.

Mahdollisia horisontaaliseen geeninsiirtymiseen vaikuttavia tekijöitä

- vapaan GM-kasvi-DNA:n määrä ja säilyminen maaperässä
- transformaatiokykyisten eliöiden (esim. *Acinetobacter*) läsnäolo
- vektorit, kuten virukset, plasmidit ja transposonit
- siirtogeenien määrä (Tepfer ym. 2003)
- ympäristötekijät; esim. saatavilla olevien ravinteiden määrä voi vaikuttaa HGT:hen
- luovuttajakasvin fysiologinen tila (Tepfer ym. 2003)
- GM-konstruktin bakteeriperäiset elementit (esim. *nptII*, säätelyalueet) tai niiden muu vastaavuus vastaanottajaorganismien geenien kanssa voivat lisätä HGT:n mahdollisuutta (homologinen rekombinaatio), geenissä olevat intronit voivat puolestaan estää sen toiminnan bakteerissa. Joidenkin tutki-
joiden (ks. <http://www.i-sis.org.uk/hgt.php>) mukaan tietyt sekvenssit, kuten esim. yleisesti käytetty kukkakaalin mosaiikkiviruksen 35S-promoottori voivat itsessään lisätä HGT:n mahdollisuutta (helposti rekombinoituvat kohdat, usein/herkästi katkeavat kohdat).
- siirtogeenin hyöty sen vastaanottajalle. Esim. Tepfer ym. (2003) mukaan kanamysiiniresistenssi siirtyy kasvista bakteeriin todennäköisemmin valintapaineen alaisena (eli kanamysiiniä käytettäessä).

Lisäksi siirtynyt geeni saattaa helpommin vakiintua bakteeripopulaatioissa tai muissa eliöissä, mikäli se parantaa vastaanottajaeliön kelpoisuutta.

Tutkimusmenetelmät

Kokeelliset menetelmät

Bakteerien lajinmäärittämiseen ja tutkimiseen on perinteisesti käytetty **viljelyä**. Mikäli siirtogeenikonstruktissa on käytetty selektiivisiä merkkigeenejä, voidaan maaperän bakteereja kasvattaa tietynlaisilla alustoilla siirtogeenien omaavien bakteerien seulomiseksi. Jos seurataan antibioottiresistenssiominaisuuden (esim. *nptII*:n) siirtymistä siirtogeenisestä kasvista maaperän mikrobeihin, voidaan bakteereita kasvattaa kyseistä antibioottia sisältävällä alustalla, jolloin osa bakteereista karsiutuu (menetelmän kuvaus, ks. esim. de Vries ym. 2003). Eloönjääneiden bakteerien ei voida ilman muuta olettaa saaneen resistenssiominaisuuttaan kasvilta, sillä suurella osalla maaperäbakteereista on luonnostaan erilaisia antibiootti-resistenssigeenejä. Alustalla kasvavista bakteereista voidaan etsiä siirtogeeniperäistä DNA:ta PCR-menetelmää* käyttämällä. Mikäli jostain näytteestä löytyy sekvensoinnissa* siirtogeenikonstruktissa käytetyn *nptII*:n kanssa identtinen sekvenssi, voidaan HGT olettaa tapahtuneeksi. Esim. Gebhardt ja Smalla (1999) käyttivät viljelymenetelmää etsiessään sokerijuurikkaan siirtogeeniä bakteereista. Kanamysiiniä sisältävällä alustalla kasvavista bakteereista yritettiin löytää kasvin siirtogeeniä **DNA-hybridisaation*** ja PCR:n avulla. Tutkimuksessa ei pystytty selkeästi osoittamaan HGT:ta tapahtuneeksi, vaikka tulokset siihen osittain viittasivatkin (Gebhardt & Smalla 1999). Viljelyn avulla saadaan kuitenkin vain murto-osa mikrobilajistosta esille, ja esim. arkkiabakteereita ei lainkaan.

Esimerkki horisontaalisen geenin siirtymisen tutkimuksesta

Eräässä tutkimuksessa (Buhariwalla & Mithen 1995) havaittiin, että ristikkukaisia infektoivalla limasiiniin kuuluvalla möhöjuurisienellä (*Plasmodiophora brassicae*) on kyky ottaa sisäänsä suuria määriä DNA:ta hajoavista (ristikkukaisista) kasveista. Toisaalta Buhariwalla ja Mithen (1995) eivät tutkimuksessaan kuitenkaan löytäneet kasvi-DNA:ta tutkimaan möhöjuurisienien lepoitioista, joten he päättelivät, että tapahtuma oli hetkellinen, sillä siirtynyt DNA ei periytynyt möhöjuurisienien jälkeläisille.

Suorien PCR-menetelmien käyttöönotto on auttanut maaperän mikrobiflooran tutkimuksissa, sillä edeltävää viljelyä ei tarvita, vaan haluttu alue voidaan monistaa suoraan maanäytteestä. Esimerkiksi England (2001) on kuvannut menetelmän (virus-) DNA:n eristämiseen ja monistamiseen maaperä- ja vesinäytteistä. Gebhardt ja Smalla (1999) osoittivat sokerijuurikkaan siirtogeenien säilyvän maaperässä useita vuosia suoran PCR-menetelmän ja siirtogeenispesifien alukkeiden avulla. Toisaalta suoralla PCR-menetelmällä on heikkoutensa; esim. siirtogeeniä maaperänäytteistä etsittäessä ei voida olla varmoja, onko saatu DNA-sekvenssi peräisin esim. bakteerista, vai onko se ollut vapaana maaperässä tai lahoavassa kasviaineksessa tai maapartikkeleihin sitoutuneena. Näytteen sisältämät bakteerit voi yrittää erottaa maa-aineksesta ennen DNA:n eristystä ja PCR-monistusta erityisen **sentrifugimenetelmän** avulla (ks. Gebhardt & Smalla 1999).

Selvimmän siirtogeenisen DNA:n siirtymistä kasvien ja bakteerien välillä on pystytty osoittamaan ns. **geenitoiminnan palauttavalla menetelmällä** (ks. esim. DeVries & Wackernagel 1998; de Vries ym. 2003), jossa vastaanottajabakteerin geeniä on muokattu niin, että geeni ei toimi. Mikäli bakteeri pystyy vastaanottamaan toimivan geenin GM-kasvilta, menetetty toiminta palautuu. Esim. Tepfer ym. (2003) ovat käyttäneet menetelmää osoittaessaan kanamysiiniresistenssigeenin (*nptII*) siirtymistä GM-kasveista *Acinetobacter*-bakteeriin laboratorio-olosuhteissa. Tepfer ym. (2003) testasivat **mikrokosmosolosuhteissa** DNA:n siirtymistä monesta eri kasvista (lituruoho, *Arabidopsis thaliana*; rapsi, *Brassica napus*; karhunköynnös, *Calyptegia sepium*; porkkana *Daucus carota*; palikkamailanen, *Medicago truncatula* ja tupakka, *Nicotiana tabacum*), eri tavoilla käsitellyistä kasvinosista (ehjä ja murskattu lehti, juuri jne.), ja kasveista, joihin oli siirretty *nptII*-geeni joko tumaan tai viherhiukkasiin. Tutkimuksessa käytettiin pintasteriloituja lehtiä ja akseenisesta (steriilistä) viljelystä saatuja juuria bakteerikontaminaatioiden välttämiseksi. Tepfer ym. (2003) mukaan HGT-tutkimuksessa on huolellisesti eliminointava virhelähteet, kuten kontaminaatiot. Geenin siirtymistä pystyttiin havaitsemaan lähes kaikissa kokeissa, eniten kuitenkin niissä tapauksissa, joissa luovuttajakasvin *nptII* sijaitsi viherhiukkasissa. *NptII*:n siirtyminen perustui homologiseen rekombinaatioon eli siihen, että bakteerilla oli ennestään samankaltainen sekvenssi genomissaan. Tutkimus on tehty laboratorio-olosuhteissa, joten tulokset eivät ehkä sellaisenaan päde luonnon olosuhteissa. Esim. luonnossa esiintyvät transformaatiokyvyttömät bakteerit voivat hajottaa kasvi-DNA:n, ennen kuin transformaatiokykyiset bakteerit, kuten esim. *Acinetobacter* spp., ottavat sen sisäänsä (Tepfer ym. 2003). Bakteerien tiedetäänkin tunnistavan vieraan DNA:n sen metylaatiokuvioinnin perusteella ja hajottavan sen restriktioendonukleaseillaan.

Geenitoiminnan palauttava menetelmä

DeVries ja Wackernagel (1998) kehittivät geenitoiminnan palauttavan menetelmän, jolla voitiin havaita siirtogeenisten kasvien sisältämän *nptII*:n siirtyneen *Acinetobacter*-bakteeriin. Menetelmä tosin on keinotekoinen. Bakteerin oma *nptII*-geeni sisälsi 10 emäsparin pituisen deleetion, mikä teki geenin toimimattomaksi. Viallisen geenin korvaaminen bakteeriin siirtyneellä GM-kasvipärisellä *nptII*:lla palautti geenin toiminnan, mikä voitiin havaita kanamysiinikeskävyytenä. Geenin korjaantuminen tapahtui 6×10^6 -kertaisessa ylimääräisen kasvi-DNA:n konsentraatiassa (De Vries & Wackernagel 1998).

HGT:n yleisyyden ja seurausten arviointi

Historiallisia horisontaalisia geenien siirtymisiä ja niiden ekologisia seurauksia pystytään tutkimaan jo olemassa olevan tiedon perusteella. Tutkimuksen mahdollistavat geenipankeissa jatkuvasti lisääntyvä DNA-sekvenssimäärä sekä sellaiset tietokannat kuin esim. 'The Horizontal Gene Transfer DataBase (HGT-DB)' (Garcia-Vallve ym. 2003). HGT-DB sisältää tilastollista tietoa (GC pitoisuus, kodoni- ja aminohappojen käyttö) 89 kokonaan sekvensoidusta bakteerista (vuoteen 2002 mennessä), sekä informaatiota siitä, mitkä geenit poikkeavat mainituilta ominaisuuksiltaan bakteerin muusta genomista. Ajatuksena on, että juuri tällaiset geenit saattavat olla peräisin muista eliöistä. Tutkittavat DNA-sekvenssit voidaan alustavasti tunnistaa vertailemalla niitä geenipankissa ennestään oleviin sekvensseihin, sekä etsiä geenipankista tutkittavaa sekvenssiä eniten muistuttavat geenit (BLAST-search; ks. Altschul ym. 1997). Pelkkä **BLAST-haku** ei kuitenkaan anna luotettavaa kuvaa HGT:sta, sillä siinä ryhmittely perustuu sekvenssien pinnalliseen samankaltaisuuteen, eikä todellisiin sukulaisuussuhteisiin. Tietokannassa (geenipankki tai muu tietopankki) siirtyneeksi epäillyn geenin alkuperä onkin tarkistettava. Luotettavin keino tähän on kaikkien kyseistä geeniä edustavien geenipankissa olevien sekvenssien fylogeneettinen analyysi*. Horisontaaliset geenien siirtymiset eri eliöiden välillä näkyvät fylogeneettisessä puussa geenin 'outona ryhmittymisenä' verrattuna eliöiden fylogeniaan. Puita tulkittaessa on kuitenkin huomioitava, että myös muut ilmiöt, kuten esim. geenien häviämiset (gene loss), linjojen epätäydellinen erkautuminen (lineage sorting) tai geenien kahdentuminen voivat pinnallisesti näyttää HGT:lta. Lisäksi viherhiukkasen ja mitokondrion geenit voivat olla harhaanjohtavia tuman vastaaviin geeneihin perustuvassa fylogeneettisessä puussa.

Tulevaisuudessa, kun tietoja lukuisista analyyseistä yhdistetään, voidaan horisontaalisen geenin siirtymän yleisyyttä kasveista bakteereihin tai muihin eliöihin, sekä mahdollisesti horisontaalisen geenivirran biologisia ja ekologisia seurauksia.

Menetelmiä horisontaalisen geenin siirtymisen tutkimiseen. Tähdellä merkityt menetelmät on kuvattu tarkemmin liitteissä.

Bakteerien viljely, DNA-hybridisaatio, fylogeneettinen analyysi*, geenitoiminnan palauttavat menetelmät, mikrokosmosjärjestelyt, PCR*, sekvensointi*, sentrifugimenetelmät

7.3 Vaikutukset muihin kuin kohde-eliöihin

Muuntogeenisten kasvien mahdollinen haitallinen vaikutus muihin kuin kohde-eliöihin (nontarget effects) on yksi geenitekniikan käytöstä aiheutuneista huolenaiheista (ks. esim. Losey ym. 1999). Haitallisia vaikutuksia voidaan epäillä olevan esimerkiksi sellaisilla GM-kasveilla, joihin on siirretty jokin myrkyllisen/haitallisen aineen tuottava geeni. Tähän asti kokeiltujen GM-kasvien tuottamia toksisia tai muuten muille eliöille haitallisia aineita ovat olleet lähinnä Bt-toksiinit, kitinaasi, kolesterolioksidaasi, lektiini sekä proteinaasi- ja amylaasi-inhibiittorit (Schuler ym. 1999). Siirrettyjen ominaisuuksien haitallinen vaikutus voi olla akuutti (lyhytaikainen ja palautuva) tai pitkäaikainen. Pitkäaikaisia vaikutuksia voi ilmetä esim. pitkäikäisten GM-puiden viljelyn yhteydessä. Lisäksi haittavaikutus voi olla tappava (letaali) aiheuttaen ennen aikaisen kuoleman, tai sillä voi olla vähäisempiä (subletaali) vaikutuksia, esim. eliön hedelmällisyyden tai painon vähentyminen (mikä puolestaan voi vaikuttaa eliöiden populaatiodynamiikkaan). Vaikutukset voivat olla suoria, eli itse siirretty ominaisuus vaikuttaa ympäristön eliöihin tai prosesseihin, tai välillisiä, eli esimerkiksi GM-kasvin perinteisestä viljelystä poikkeavista viljelytavoista (herbisidi- ja pestisidikäsittelyt) johtuvia. Viimeksi mainituista vaikutuksista on tehty hiljattain laajoja, monivuotisia tutkimuksia, joissa herbisidikestävien GM-kasvien viljelymenetelmät vaikuttivat merkittävästi joidenkin selkärangattomien eläinten runsauksiin (ks. liite: FSE:t).

Tähänastisissa tutkimuksissa on lähinnä seurattu muuttuuko jonkin tietyn eliön tai eliöryhmän kuolleisuus/yleisyys/runsaus GM-kasvin viljelyn vaikutuksesta. Vaikka muutoksia tapahtuisikin jossain ryhmissä, muutosten laajempia ekologisia vaikutuksia on usein vaikeaa tai mahdotonta ennakoida. GM-kasvien viljelyn pitkäaikainen seuranta voi tuottaa lisää tietoa muihin kuin kohde-eliöihin kohdistuvien vaikutusten ekologisista seurauksista.

7.3.1 Vaikutukset maaperän mikrobeihin

Bruinsma ym. (2003) mukaan useimmissa tähänastisissa GM-kasvien maaperävaikutusten tutkimuksissa ei ole pystytty osoittamaan selkeitä negatiivisia, positiivisia tai neutraaleja GM-kasvien käyttöönotosta aiheutuneita vaikutuksia. GM-kasvien aiheuttamat muutokset mikrobiyhdyskuntien rakenteessa voivat vaikuttaa esim. orgaanisen aineksen hajoamiseen, ravinteiden mineralisaatioon ja immobilisaatioon, hapetus-pelkistysreaktioihin, biologiseen typensidontaan ja typen liukoisuuteen (ks. Motavalli ym. 2004) ja sitä kautta myös ekosysteemin muihin organismeihin. Kowalchuck ym. (2003) mukaan GM-kasvien vaikutuksia maaperän mikro-organismeihin tulee tutkia tapauskohtaisesti, ainakin siihen asti kun on saatu kerättyä riittävästi tietoa GM-kasvien vaikutuksista yleistysten tekemiseksi. Uusien GM-kasvien vaikutuksia tulee kuitenkin aina seurata, sillä tulevaisuudessa saattaa olla käytössä hyvinkin monenlaisia GM-sovelluksia (esim. teollisten yhdisteiden ja lääkeaineiden tuotto kasveissa), joiden ympäristövaikutuksista ei ole aiempaa kokemusta.

Mikrobiyhdyskuntien tutkiminen on vaikeaa niiden monimutkaisen rakenteen takia. Lisäksi vain murto-osa lajeista on viljeltävissä. Ehkä juuri siksi tähänastisissa tutkimuksissa onkin keskitytty vain muutaman toiminnallisen (tai fylogeneettisen) ryhmän tutkimiseen. Kowalchuck ym. (2003) mukaan tällaisten yksittäisiä ryhmiä tutkivien lähestymistapojen hyödyllisyys tulisi perusteellisesti selvittää. Lisäksi Kowalchuck ym. (2003) mukaan mikrobiopulaatioiden tunnistamisen ja kvantifioinnin lisäksi tutkimuksissa tulisi keskittyä populaatioiden aktiivisuuden määrittämiseen ja mahdollisesti havaittavien muutosten ekologisten seurausten tunnistamiseen.

Tällaisia tietoja yhdistämällä voitaisiin paremmin ymmärtää kasvien ja maaperän eliöiden välisiä vuorovaikutuksia ja siten myös GM-kasvien vaikutuksia koko ekosysteemiin. Lisäksi tutkimusjärjestelyissä olisi Kowalchuck ym. (2003) mukaan huomioitava itse GM-kasvista johtuvien vaikutusten lisäksi myös muutuneista maanviljelymenetelmistä aiheutuvat muutokset sekä muista abioottisista ja bioottisista ilmiöistä (vuodenaikaisvaihtelu, sää, kasvin kehitysvaihe, sijainti, kasvin genotyyppi jne.) johtuvat muutokset. Edellä mainitut ilmiöt ovat tähänastisissa tutkimuksissa vaikuttaneet mikrobien yhteisörakenteen muutoksiin enemmän kuin itse tutkitut GM-kasvit (Kowalchuck ym. 2003; ks. myös Heuer & Smalla 1999; Lukow ym. 2000; Dunfield & Germida 2001; Lottmann & Berg 2001; Gyamfi ym. 2002; Heuer ym. 2002).

Koska kaikkia eliöitä on mahdotonta sisällyttää tutkimukseen

Kowalchuck ym. (2003) listaavat ne maaperän organismit, joilla on suurin vaikutus ekosysteemin toimintaan, ja jotka tulisi siksi ottaa huomioon arvioitaessa GM-kasvien vaikutuksia mikrobeihin. Näitä ovat

- mykorritsat
- symbionttiset, tyypeä sitovat bakteerit
- orgaanista ainesta hajottavat sienet (kantasienet)
- kasvipatogeenien antagonistit (etenkin *Pseudomonas* ja *Trichoderma*)
- kasvipatogeenit
- nitrifioivat bakteerit

Siciliano ja Germida (1999) ovat raportoineet muutoksia kasvien juurten endofyyttisten bakteerien yhdyskunnissa rapsilla (*Brassica napus*), johon on siirretty glyfosaattikestävyysgeeni (herbisidikestävyys). Lisäksi Ahrenholtz ym. (2000) tutkimuksessa GM-perunoilla, jotka ilmensivät T4-lysotsyymiä, oli juurikarvoissaan erästä yleistä bakteeria (*Bacillus subtilis*) vähemmän kuin muuntamattomalla perunalla. Tutkimuksessa ei kuitenkaan pystytty osoittamaan GM-perunan vaikutuksia bakteeriyhdyskuntiin kenttäolosuhteissa. Griffiths ym. (2000) tutkivat GNA- ja ConA-lektiinejä ilmentävän perunan (*Solanum tuberosum*) vaikutuksia maaperän eliöihin ja prosesseihin. Laboratoriotutkimusten mukaan kumpikaan edellä mainituista lektiineistä ei vaikuttanut maaperän bakteereihin tai alkueläimiin, mutta erään sukkulamadon kyky löytää saalista huononi verrattuna muuntamattoman perunan alaan. Lisäksi kyseisten GM-perunoiden viljely vaikutti merkittävästi ritsosfäärin mikrobiyhdyskunnan fysiologiseen profiiliin, mutta muutoksia ei havaittu seuraavana vuonna, eli ne olivat palautuvia. Tesfaye ym. (2003) tutkimuksessa löytyi laadullisia muutoksia bakteerien fylogeneettisten ryhmien runsaudessa muuntogeenisten (lisääntynyt malaattidehydrogenaasin ilmentyminen; malaattidehydrogenaasi on eräs avainentsyymeistä mitokondrioiden energiataloudessa ja vaikuttaa myös juurinystyröiden muodostumiseen) ja muuntamattomien sinimailasten (*Medicago sativa*) ritsosfääreissä. Tässä tapauksessa mikrobien toiminnallinen diversiteetti osoittautui suuremmaksi GM-kasvin ritsosfäärissä.

Myös sienet tulisi huomioida tutkittaessa GM-kasvien vaikutuksia maaperäeliöihin. Vaikka GM-kasveilla ei useimmissa kokeissa ole ollut vaikutusta maaperän saprofyyttisiin eliöihin, ei tuloksia voida esim. Glandorf ym. (1997) mukaan yleistää. Erään tutkimuksen (Vierheilig ym. 1995) mukaan GM-kasvit, joiden omaa kitinaasintuottoa on lisätty tai jotka tuottavat siirtogeenistä kitinaasia, voivat vaikuttaa patogeenisten sienten lisäksi mykorritsasiiniin. Mykorritsojen lisäksi kitinaasilla voi olla haitallisia vaikutuksia muihinkin hyödyllisiin sieniin (esim. hajottajiin).

Maaperäeliöihin kohdistuvien vaikutusten tutkimus

Cowgill ym. (2002) tutkivat mikrobien yhdyskuntarakennetta, maaperän mikroniveljalkaisia ja karikkeen hajoamista kahden kasvukauden ajan. Tutkimuksessa vertailtiin kystatiinia ilmentävien kasvien vs. sukkulamatoja tappavan ruiskutettavan yhdisteen (engl.: oxime carbamate) vaikutuksia muihin kuin kohde-eliöihin (eli sukkulamatoihin). Ensimmäisenä vuonna GM-kasveilla ei ollut vaikutusta maaperän mikrobien runsauteen tai metaboliseen aktiivisuuteen, joita mitattiin fosfolipidirasvahappoanalyysillä (PLFA; ester-linked phospholipid fatty acid analysis). Yksi GM-linjoista kuitenkin vaikutti mikrobeihin suosimalla sienten kasvua mikrobien kustannuksella kasvukauden lopulla. Toinen GM-linja taas näytti heikentävän sienten kasvua. Toisen tutkimusvuoden aikana mikrobien runsaus väheni 15 % nematodialalla ja 23 % GM-alalla verrattuna kontrolleihin. Nematodikäsitteily vähensi mikrobiyhdyskunnan bakteeriosuutta, kun taas GM-linja vähensi sekä sienten että bakteerien osuutta. Maaperän muuttuneet eliösuhteet eivät kuitenkaan vaikuttaneet karikkeen hajoamiseen eikä GM-kasveilla ollut vaikutusta niveljalkaisiin tai vapaana eläviin sukkulamatoihin.

Donegan ym. (1999) tutkivat kolmea sinimailastyyppeä (*Medicago sativa*) joko yksin tai yhdessä tyypeä sitovien GM-bakteereiden kanssa selvittääkseen kasvien vaikutusta maaperän ekosysteemiin. Tutkitut sinimailaskannat olivat alfa-amylaasi- tai ligniini-peroksidaasimuunnettuja (peroksidaaseja käytetään teollisuudessa ligniinin hajotuksessa). GM-peroksidaasia tuottavien kasvien verson paino oli huomattavasti pienentynyt ja typpi- ja fosforipitoisuudet kohonneet. Nämä muutokset puolestaan vaikuttivat maaperän kemiaan. Maaperän pH nousi ja entsyymien (dehydrogenaasi ja alkalinen fosfataasi) määrät pienivät. Myös maaperän eliöstö muuttui: **mikrobien metaboliset sormenjäljet** näytteistä, jotka oli kerätty GM-peroksidaasikasvien ympäriltä, olivat erilaiset kuin vanhemmaisikasveilla, mikä viittasi siihen, että maan bakteerimäärä ja -koostumus olivat muuttuneet. Tutkijoiden mukaan GM-kasvien vaikutuksia maaperän eliöstöön olisi tutkittava lisää.

Menetelmät mikrobien tutkimiseen

Kowalchuck ym. (2003) esittävät artikkelissaan viitekehysten maaperän mikrobien tutkimiseksi (ks. kuva 2). Siinä tutkimus jaetaan useaan vaiheeseen pienimuotoisista laboratoriokokeista aina kenttäkokeisiin asti.

Mikrobien määrä

Nykyään käytössä olevista menetelmistä **bakteerien laskenta** tai **mikrobien kokonaisbiomassan määrittäminen** ovat helposti toteutettavia. Toisaalta menetelmät antavat ainoastaan perustietoa, eli tiedon bakteerien määristä.

Mikrobien aktiivisuus

Lisää tietoa yhteisöjen rakenteiden muutoksista saadaan mikrobien aktiivisuutta mittaamalla. Kowalchuck ym. (2003) mukaan mikrobien aktiivisuutta voidaan tutkia esim. **rRNA:n** (ribosomi-RNA:n) **yhteisöanalyysin** ja **nukleiinihappojen isotooppileimauksen** avulla, sekä menetelmällä, joka yhdistää eliöiden tunnistamisen ja arvion niiden hyödyntämistä aineista (substrate uptake). Menetelmä tämänkaltaiseen tutkimukseen on Kowalchuck ym. (2003) mukaan kuitenkin vasta kehittyneillä. Lisäksi aktiivisuutta mittaavia menetelmiä ovat mm. **hengityksen mittaaminen**, **tyypin mineralisaation mittaaminen**, **SIR** (substrate induced respiration), sekä **yhteisön fysiologinen profiili** (community-level physiological profiles; ks. esim. Dunfield & Germida 2003).

Mikrobien yhdyskuntarakenne

Edellä mainituilla menetelmillä ei kuitenkaan voida tunnistaa ryhmiä, joissa muutos on tapahtunut. Esim. Tyson ym. (2004) esittelee menetelmän, jonka avulla voidaan selvittää sekä mikrobien **yhdyskuntarakennetta** että **metabolialla** maaperästä mikrobien genomien avulla. Lisäksi mikrobiyhdyskuntien rakenteiden muutoksia

voidaan seurata mm. PCR-menetelmään* perustuvalla **profiloinnilla** sekä **fosfolipidirasvahappoanalyysin (PLFA)** avulla. Bakteeriyhdyskuntien rakennetta voidaan tutkia myös **gradienttigelielektroforeesin*** (DGGE ja TGGE) avulla. Heuer ym. (1997) käyttivät aktinobakteerien (Streptomyces) monistamiseen sopivia PCR-alukkeita aktinobakteerien yhdyskuntarakennetta tutkiessaan. Toisessa tutkimuksessa (Heuer ym. 2002) seurattiin kolmen erilaisen perunan (GM-peruna, joka sisälsi T4-lysotsyymigeenin, GM-peruna ilman T4-lysotsyymigeeniä, sekä muuntamaton peruna) ritsosfäärin mikrobijhdyskuntien rakennetta kolmen vuoden ajan. Tutkimuksessa käytettiin sekä bakteerien viljelyyn perustuvia (laskennat, **rasvahappoanalyysi, yhteisötason katabolinen profilointi**), että viljelystä riippumattomia menetelmiä (16S rRNA:n DGGE*, jossa käytetty eri bakteeriryhmille spesifejä PCR-alukkeita). Tutkimuksessa ei havaittu eroja GM- ja muuntamattoman perunan ritsosfäärin mikrobijhdyskuntien rakenteissa. Myös Gyamfi ym. (2002) käyttivät DGGE*-menetelmää tutkiessaan mahdollisia eroja GM- (glufosinaattikestävyys) ja muuntamattoman rapsin (*Brassica napus*) ritsosfäärin *Pseudomonas*-lajistossa. Tutkijat havaitsivat GM- ja muuntamattomien kasvien välillä eroja. Erot johtuivat todennäköisesti tahattomista vaikutuksista (muuttunut aineiden erityis juuristossa; ks. Gyamfi ym. 2002). Lukow ym. (2000) puolestaan käyttivät T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) –menetelmää (sormenjälkimenetelmä; perustuu ribosomigeenin pienen alayksikön sekvenssin polymorfismeihin, katso myös RFLP*) vertaillen GM- (sis. *GUS* ja *Barnase/Barstar*²) ja muuntamattoman perunan (*Solanum tuberosum*) vaikutuksia maaperän mikrobijhdyskuntiin. Tutkijoiden mukaan T-RFLP-analyysi tuotti monimutkaisia, mutta hyvin toistettavia mikrobijhdyskuntien sormenjälkiä. Lukow ym. (2000) analysoivat datansa varianssianalyysillä käyttämällä tunnistaakseen merkittäviä eroja tutkituissa yhdyskuntaprofiileissa. Tesfaye ym. (2003) puolestaan käyttivät hyväkseen fylogeneettistä analyysia* sekä **hiilenkäyttökykyprofiileja** vertaillen GM-kasvien ja muuntamattomien kasvien ritsosfäärin mikrobijhteisöjen monimuotoisuutta ja aktiivisuutta. Muita mahdollisia datan analyysimenetelmiä ovat esim. **pääkomponenttianalyysi** (PCA; principal component analysis), jota voidaan käyttää populaatiodynamiikan, tilajakautumisen (spatial pattern) sekä genotyypin ja ympäristön välisten vuorovaikutusten tutkimiseen silloin, kun käytettävissä on useampia polymorfisia geneettisiä markkereita (Hamrick ym. 1979; Westcott 1986; Collins & Good 1987; Argyes & Schmitt 1991; Ivandic ym. 2000; Banilas ym. 2003; Dunfield & Germida 2003). Markkereita ei analysoida sellaisenaan, vaan niistä saatuja varianssi/kovarianssimatriiseja (ks. tilastolliset menetelmät) käytetään analyysiin. Menetelmän avulla voidaan mm. arvioida, mikä tai mitkä muuttujat selittävät tutkimuksessa havaittua vaihtelua.

Maaperämikrobeihin kohdistuvien vaikutusten tutkimuksia

Dunfield ja Germida (2001) tutkivat GM-rapsin (herbisidikestävyys) ja muuntamattomien (perinteinen sekä herbisidikestävä) rapsilajikkeiden (*Brassica napus*) sekä yhden rypsilajikkeen (*Brassica rapa*) viljelyn vaikutuksia maaperän mikrobijhdyskuntien rakenteeseen neljällä eri maatyypillä Kanadassa. Tutkimuksessa mikrobijhdyskunnat eristettiin erikseen juuren ritsosfääristä (ulkopuolelta) sekä endoritsosfääristä, eli juuren sisäpuolelta. Näytteitä tutkittiin sekä rasvahappometyyliesterimenetelmällä (FAME), sekä hiilenkäyttökykyprofiloinnilla (BIOLOG). Sekä lajike että maatyypit vaikuttivat tutkimuksessa mikrobijhdyskunnan rakenteeseen ja toimintaan (Dunfield & Germida 2001).

Dunfield ja Germida (2003) tutkivat GM- (glyfosaattikestävyys) ja muuntamattoman rapsin (*Brassica napus*) ritsosfäärin mikrobijhdyskuntien muutoksia kahden vuoden ajan. Näytteenotto toistettiin kuusi kertaa kumpanakin tutkimusvuonna. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää mikrobijhdyskuntien muutoksia sekä tutkia, olivatko mahdollisesti

* Geenejä, jotka kontrolloivat suvullista lisääntymiskykyä.

havaitut muutokset pysyviä. Menetelminä käytettiin yhteisön fysiologista profiilia (PLFA), rasvahappometyyliesteriprofiileja (menetelmät: ks. Dunfield & Germida 2003) ja T-RFLP:tä. Tutkimuksessa vertailtiin GM-kasvien ja muuntamattomien kasvien ritsosfäärin mikrobiyhteisöjä, ja näitä verrattiin lisäksi viljelemättömän maan mikrobiyhdyskuntiin. Tulosten analysointi (pääkomponenttianalyysi) osoitti, että mikrobien yhdyskuntarakenne GM- ja muuntamattoman rapsin ritsosfääreissä oli erilainen kasvukauden aikana, mutta muuttui samankaltaiseksi talven aikana. Toisin sanoen tulokset olivat palautuvia.

Lottman ja Berg (2001) tutkivat GM- (T4-lysozyme) ja muuntamattoman (vanhemmaisluoto) perunan ritsosfäärin bakteerilajiston eroja fenotyypin (antagonistinen aktiivisuus kasvipatogeenia vastaan, aukiinin tuotanto ja herkkyys T4-lysozymille) ja genotyypin profiloimalla (**DNA-sormenjälkimenetelmä***) avulla. Sekä fenotyypiset että genotyypiset ominaisuudet analysoitiin euklidisen etäisyysryhmittelyn (Euclidian distance; sisältyy moniin ohjelmistoihin, kuten ANOVA, SAS yms.) avulla. Tulokset eivät osoittaneet eroja GM- ja muuntamattomien kasvien ritsosfäärien mikrobiyhdyskuntien rakenteissa (Lottman & Berg 2001).

Symbionttiset sienet

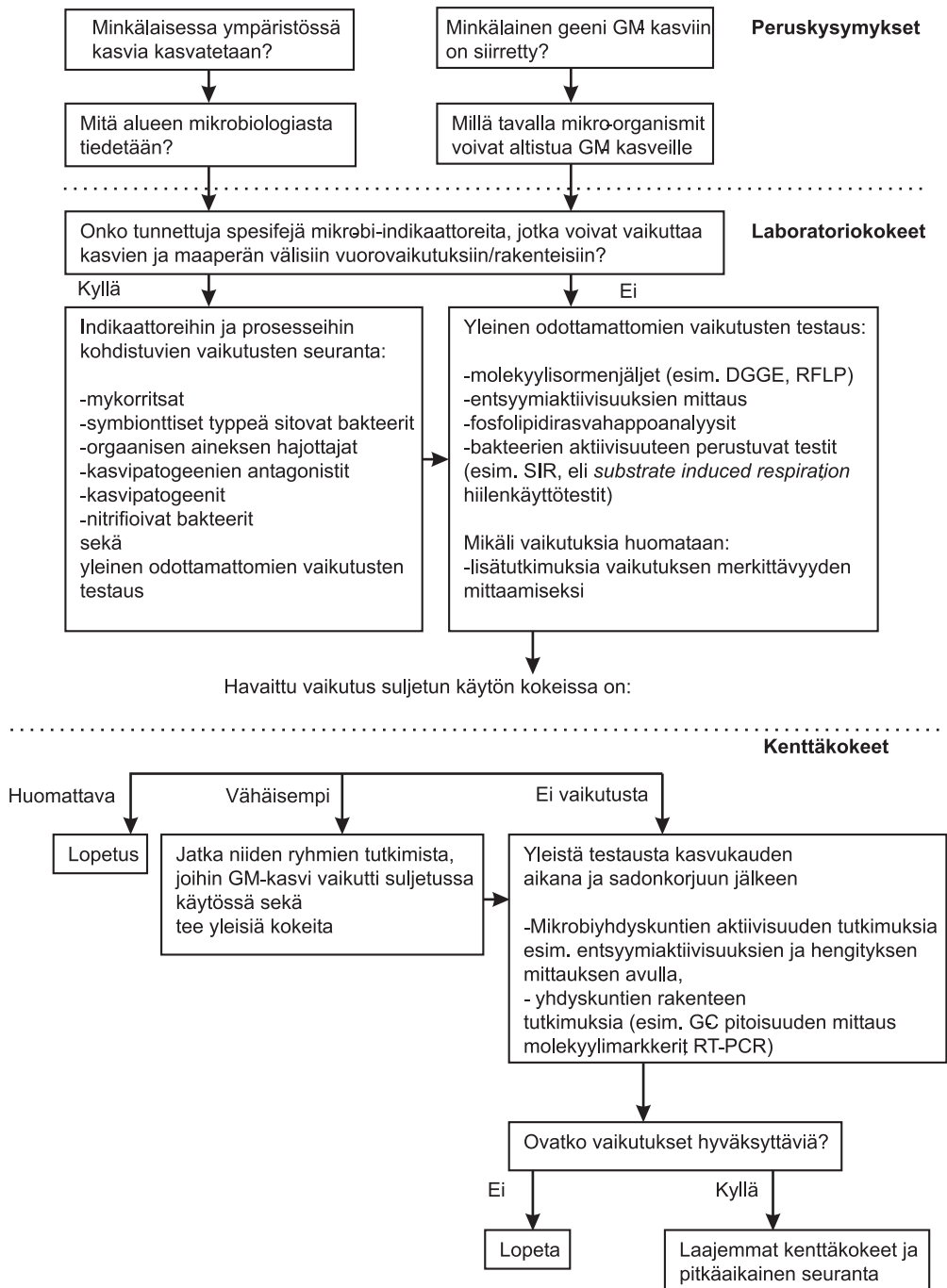
Vaikutuksia symbionttisiin sieniin voidaan tutkia mm. siirtogeenisen ja muuntamattoman kasvin mykorritsasienten laadun ja määrän vertailulla. Mykorritsasieniä voidaan myös **kasvattaa** yhdessä niiden isäntäkasvien kanssa esim. koeputkissa tai lasilevyjen välissä, jolloin eroja GM-kasvien ja muuntamattomien kasvien juurissa voidaan vertailla helposti (Finlay & Read 1986; Timonen ym. 1993; Pasonen ym. käsikirjoitus). Mykorritsojen kasvua voidaan seurata myös kenttöolosuhteissa (ks. Kaldorf ym. 2002). Koealalla tai kasvihuoneessa kasvavien kasvien juuristosta voidaan selvittää mykorritsalajiston monimuotoisuutta molekyylimarkkereita* käyttämällä. Molekyylimarkkereita voidaan edelleen analysoida esim. fylogeniamentelmien* avulla tai muilla molekyylimarkkerien analysointimenetelmillä*. Jos sieninäytteistä sekvensoidaan* jokin yleisesti käytetty geenialue, sienilajit voidaan tunnistaa (ainakin ryhmän tarkkuudella) BLAST-haun (ks. Altschul ym. 1997) avulla. Haku perustuu sekvenssien samankaltaisuuteen.

Saprofyttiset mikrobit

Sieni- tai bakteerikestävien (tai muunlaisten GM-) kasvien hajoamisen eroja muuntamattomiin kasveihin ja muita vaikutuksia maaperän hajottajiin (bakteereihin ja sieniin) voidaan tutkia **lahotuskokeilla** (ks. esim. Montavalli ym. 2004). Lahotuskokeessa pieni määrä GM- ja muuntamattoman kasvin kasviainesta voidaan esim. pussittaa hajoamattomiin pusseihin (ks. esim. Aerts ym. 2003) ja joko haudata maahan tai pitää maanpinnan tasossa. Lahotuskokeita voi tehdä myös agaralustalla (ks. esim. Seppänen ym. 2004). Lahoamisnopeutta voidaan seurata kasviaineksen kuivapainoa mittaamalla. Cabello ja Arambarri (2002) kuvaavat lisäksi menetelmiä maaperän sieniyhdyskuntien viljelyyn ja tunnistamiseen.

Kowalchuck ym. (2003) mukaan myös edellämainittujen menetelmien (kuva 2) avulla havaittujen muutosten merkitys tulisi selvittää, jotta tiedettäisiin onko muutoksilla laajempia tai pitkäaikaisia ekologisia seurauksia. Bruinsma ym. (2003) ehdottavat tehtäväksi synteisiä GM-kasvien tapauskohtaisista vaikutusten tutkimuksista. Tällainen synteesi sisältäisi arvion mahdollisista kasvi/ekosysteemi-interaktioista, käytettävissä olevia ja relevantteja indikaattoreita ja testejä ennustamattomista riskeistä. Tulevaisuudessa **DNA-mikrosirutekniikka*** saattaa Kowalchuck ym. (2003) mukaan osoittautua merkittäväksi maaperämikrobiyhteisöjen rakenteen ja aktiivisuuden seurantamenetelmäksi. Menetelmän avulla voidaan tehdä nykyistä kattavampia fylogeneettisiä ja toiminnallisia analyysejä monimutkaisista mikrobiyhteisöistä. Maaperämikrobien tutkimus tulee Kowalchuck ym. (2003) mukaan tuottamaan valtavan dataa, joka saattaa määränsä vuoksi olla erittäin vaikeasti käsiteltävissä ja siten muodostaa tutkimukselle pullonkaulan. Eko-

logisesti merkittävien muuttujien löytämiseksi tarvitaan uusia menetelmiä, erityisesti sellaisia, joiden avulla erilaista dataa voidaan helposti yhdistää ja vertailla keskenään. Tarvitaan myös perustietoa kasvien vaikutuksista riitosfäärin mikrobeihin. Lisäksi Kowalchuck ym. (2003) mukaan suurin haaste mikrobiekologeille on ymmärtää mikrobiyhdyskuntien rakenteen muutosten vaikutus toiminnallisten muutosten seurauksiin.



Kuva 2. Esimerkki GM-kasvien mikrobeihin kohdistuvien vaikutusten tutkimisjärjestyksestä. Kuva perustuu Kowalchuck ym. (2003) esittämään kaavioon. Tutkimusmenetelmiä on jonkin verran muutettu.

Menetelmiä mikrobiyhdykskuntien (sienten ja bakteerien) rakenteen ja aktiivisuuden tutkimiseen

bakteerien laskenta, bakteerien viljely, denaturoiva gradienttigeelielektroforeesi* (DGGE), DNA-mikrosirutekniikka*, DNA-sormenjälkimenetelmä*, etäisyysmenetelmät*, fosfolipidirasvahappoanalyysi (PLFA), fylogeneettinen analyysi*, hengityksen mittaus, hiilenkäyttökykyprofilointi, lahotuskokeet, lämpötilagradienttigeelielektroforeesi* (TGGE), mikrobien kokonaisbiomassan määrittäminen, nukleiinihappojen isotooppileimaus, PCR-menetelmä*, rRNA:n yhteisöanalyysi, sekvensointi*, sienten kasvatus, substraatti-indusoitu respiraatiomenetelmä (SIR), T-RFLP (ks. RFLP*), typen mineralisaation mittaus, yhteisön fysiologinen profiili, yhteisön katabolinen profilointi

7.3.2 Vaikutukset eläimiin

Muihin kuin kohde-eläimiin kohdistuneista vaikutuksista lienee tutkittu eniten Bt-toksiinien vaikutuksia selkärangattomiin eläimiin. Bt-toksiinit vaikuttavat niille sopivan reseptorin omaaviin niveljalkaisiin eläimiin (kovakuoriaisiin ja perhosiiniin) ruuansulatuskanavan kautta. Eläimellä on lisäksi oltava ruuansulatuskanavassaan toksiinin tehokkaaksi muodoksi pilkkovia proteolyttisiä entsyymejä (Groot & Dicke 2002). Vielä ei tiedetä tarkasti, mitä Bt-toksiineille tapahtuu kasvinsyöjissä, eikä esimerkiksi toksiinien mahdollisesta siirtymisestä kasvinsyöjien välityksellä ravintoketjussa eteenpäin (Groot & Dicke 2002). Bt-toksiineja on käytetty maanviljelyssä jo ennen GM-kasvien käyttöönottoa. Pelloille ruiskutettavan Bt-toksiinin ja kasvin itsensä ilmentämän Bt-toksiinin välillä on kuitenkin eroja. Torjuntaruiskutuksissa käytettävä toksiini tehoaa ainoastaan, mikäli kohdehyönteisellä on oikeanlaisia proteolyttisiä entsyymejä, kun taas GM-kasvien ilmentämä Bt-toksiini voi olla suoraan myrkyllisessä muodossa. Lisäksi GM-kasvin toksiinia esiintyy ympäristössä pidempään kuin perinteisellä tavalla insektisidinä käytettyä toksiinia. Bt-toksiinin määrä sitä ilmentävässä GM-kasvissa riippuu sekä käytetystä promoottorista että siirrettyjen geenien määrästä. Useimmissa tähän asti siirrettyissä hyönteiskestävyyttä lisäävissä siirtogeenikonstrukteissa on käytetty geeniä jatkuvasti ilmentävää promoottoria. Kasvin ilmentämä toksiini voi erittyä maaperään juurten eritteiden mukana koko kasvukauden ajan. Lisäksi kuollutta (Bt-toksiinia sisältävää) kasvimateriaalia jää maahan sadonkorjuun jälkeen. Tästä syystä lyhytaikaisten altistuskokeiden tulokset eivät ehkä ole suoraan verrattavissa Bt-kasvien viljelyn ympäristövaikutuksiin. Aiemmat lyhytaikaiset Bt-toksiinialtistuskokeet voivat kuitenkin antaa viitteitä siitä, mitkä eläimet ovat toksiinille herkimpiä (ks. esim. Malone & Pham-Delègue 2001; Raps ym. 2001).

Muutkin kuin kohde-eläimet joutuvat kosketuksiin GM-kasvien tuotteiden kanssa joko syömällä kasvia tai syömällä GM-kasvia ravintonaan käyttäviä herbivoreja. Groot ja Dicke (2002) mukaan petoniveljalkaiset joutuvat kosketuksiin Bt-toksiinien kanssa todennäköisemmin muiden kuin kohdehyönteisten (*nontarget-eli* ei-kohdehyönteisten) välityksellä. Tämä johtuu siitä, että erityisesti sellaiset herbivorit, joilla ei ole Bt-toksiinille sopivia reseptoreja (joihin toksiini sitoutuisi) ruuansulatuskanavassaan voivat siirtää toksiinin ravintoketjussa eteenpäin aktiivisessa muodossa. Bt-toksiinin myrkyllisyys voi ilmetä ainoastaan sille altistuneen eläimen tiettyssä elämänvaiheessa. Jotkut lihansyöjät tai loiset käyttävät aikuisvaiheessaan ravinnokseen myös kasveja tai niiden tuotteita, kuten mettä tai siitepölyä. Lisäksi maaperässä elävät eläimet voivat joutua tekemisiin kasvin erittämien tai hajoavasta kasviaineksesta vapautuvien tuotteiden kanssa. Tosin Groot

ja Dicke (2002) mukaan aiemmissä tutkimuksissa on osoitettu, että maaperään joutuvat Bt-toksiinit hajoavat nopeasti. Kuitenkin Tapp ja Stotzky (1998) mukaan maapartikkeleihin sitoutuneet Bt-toksiinit saattavat säilyttää myrkyllisyytensä pidempäänkin (tähänastisissa tutkimuksissa jopa 234 päivää).

Useimmissä tähänastisissa kokeissa ei ole kyetty osoittamaan Bt-toksiineja tuottavien GM-kasvien toksisia vaikutuksia muihin kuin kohde-eläimiin (ks. esim. Dogan ym. 1996; Pilcher ym. 1997; Lundgren ym. 2002; Down ym. 2003; Duan ym. 2004). Kuitenkin esim. Hilbeck ym. (1998a, 1998b) ovat raportoineet haitallisista vaikutuksista (ks. myös alempana). Myös Ponsard ym. (2002) raportoivat Bt-puuvillaa (*Gossypium hirsutum*) ravintonaan käyttäneiden saaliseläinten haitallisista vaikutuksista niiden saalistajiin. Steffey ym. (2004) taas osoittivat joidenkin tutkittujen saalistaja- tai loishyönteisten vähäisyyden Bt-maissialoilla (verrattuna muuntamattoman kasvin alaan) johtuvan yksinkertaisesti saalis- (eli kohde-) hyönteisten vähäisyydestä, eikä itse Bt-toksiinista. Tässä tapauksessa kyse oli välillisistä vaikutuksista.

Tutkimuksia eläimiin kohdistuvista vaikutuksista

Dutton ym. (2002) tutkivat Bt-maissin (sisältää lyhennetyn *CryIAb* geenin) ja vastaavan isogeenisen muuntamattoman maissin vaikutuksia harsokorentoihin (Chrysopidae) kuuluvaan *Chrysoperla carnean*, joka on merkittävä peto maissiviljelyksillä. Tutkittuja vaikutuksia olivat:

- Bt- vs. muuntamattoman maissin vaikutus kolmen *C. carnean* saaliseläimen (tuomikirva; *Rhopalosiphum padi*, *Tetranychus urticae*, *Spodoptera littoralis*) selviytymiseen. Hyönteisiä **ruokittiin** Bt- ja muuntamattomalla maissilla, minkä jälkeen niistä mitattiin eri parametreja (kuolleisuus, paino).
- Bt-toksiinin pitoisuus itse kasveissa (Bt- ja muuntamaton maissi) sekä sellaisissa kasvinsyöjähyönteisissä, jotka olivat käyttäneet ravintonaan jompaakumpaa maissityyppiä mitattiin käyttämällä **ELISA**-menetelmää*.
- Sekä Bt-maissilla että muuntamattomalla maissilla ruokittujen saaliseläinten vaikutus niitä syöviin *C. carnean* toukkiin tutkittiin syöttökokeilla. *C. carnea* -toukkien kehitys ja kuolleisuus tarkastettiin päivittäin ja eri toukka-asteiden paino kirjattiin kokeen alussa ja kunkin vaiheen lopussa. Bt- ja muuntamattomalla maissilla saadut tulokset testattiin tilastollisesti. Eroja toukka-astespesifisessä kuolleisuudessa vertailtiin käyttämällä logistista regressioanalyysiä. Muita tuloksia vertailtiin Studentin t-testillä.

Eri maisseilla ei ollut vaikutusta *R. padin* tai *T. urticaen*. Sen sijaan Bt-maissin syöminen huononsi *S. littoraliksen* selviytymistä ja hidasti aikuistumista verrattuna muuntamattoma maissia syöneisiin verrokkeihin. Bt-maissin syömisellä saattoi olla myös negatiivista vaikutusta *S. littoraliksen* toisen vaiheen toukkien painoon, mutta ero kontrolleihin ei ollut merkittävä. Suurin CryIAb-pitoisuus mitattiin *T. urticaesta* ja pienin *R. padista*. Siitä huolimatta Bt-maissia ravintonaan käyttäneiden *T. urticaen* (tai *R. padin*) syömisellä ei ollut juuri vaikutusta *C. carnean* selviytymiseen, kehitykseen tai painoon. Sen sijaan *C. carnean* vaihe-spesifinen (erityisesti toukkien kehityksen ensimmäisen ja toisen vaiheen) selviytyminen oli merkittävästi huonontunut yksilöillä, jotka olivat käyttäneet ravintonaan Bt-maissia syöneitä *S. littoraliksia*. Tulosten perusteella voidaan siis olettaa, että CryIAb-toksiinin ja saaliseläimen yhteisvaikutus voi olla saalistajalle haitallisempi kuin suuri CryIAb-toksiinipitoisuus sinänsä. Toisaalta tutkimus on tehty laboratorio-olosuhteissa. Luonnossa *C. carnean* tiedetään syövän enemmän kirvoja kuin perhostoukkia (Meier & Hilbeck 2001). Tutkijoiden mukaan tarvitaan lisää tietoa siitä, mitä toksiinille tapahtuu, kun se joutuu eri kasvinsyöjien ruoansulatukseen. Aiemmissä kenttäkokeissa ei havaittu Bt-maissin tai -puuvillan aiheuttavan haittaa *C. carnealle* (Orr & Landis 1997; Pilcher ym. 1997). *C. carnean* toukille haitallisia vaikutuksia (saaliseläinten välityksellä) on osoitettu olevan myös Dipelillä (Bt-toksiini). *C. carnean* toukat, jotka söivät Bt-saastuneita *S. littoralis*-toukkia, oli korkeampi kuolleisuus, pidentynyt kehitysaika, ja pieni painonvähennys.

Vaikka Dutton ym. (2002) tutkimus on tehty maissiviljelyksillä elävillä hyönteisillä, voidaan ruokkimiskokeissa käytettyjä menetelmiä ja tulosten tilastollista käsittelyä hyödyntää Suomenkin olosuhteissa tutkittaessa GM-kasvien vaikutuksia muihin kuin kohde-eläimiin.

Zwahlen ym. (2003) tutkivat Bt-maissin vaikutuksia kastemadon (*Lumbricus terrestris*) kuolleisuuteen ja painoon 200 päivää kestäneen tutkimuksen aikana. Tutkimuksia tehtiin sekä laboratoriossa, että kenttäolosuhteissa nuorilla ja täysikasvuisilla madoilla. Kastematojen **kasvatuslieriöissä** (ks. Zwahlen ym. 2003) oli yhtä suuri määrä Bt-maissin tai muuntamattoman maissin lehdien palasia. Kastematojen **kuolleisuus** ja **paino** mitattiin tietyin väliajoin (ks. Zwahlen ym. 2003). Tutkimuksessa kävi ilmi, että Bt-maissin läsnäolo ei vaikuttanut eläinten kuolleisuuteen, mutta Bt-maissia syöneiden matojen paino oli merkittävästi alhaisempi kuin kontrollialan matojen 200 päivän kuluttua kokeen aloituksesta. Tutkijoiden mukaan tähän saattoi olla syynä joko itse Bt-toksiini (ELISA-testillä* mitattuna toksiinia oli läsnä koko kokeen ajan sekä laboratoriossa, että kentällä tutkittujen matojen ympäristössä), tai sitten GM-kasvin viljelystä johtuvat välilliset vaikutukset. Tällaisia välillisiä vaikutuksia voivat olla esim. maaperän mikrobien runsauden muutokset (Donegan ym. 1995) tai esim. GM-kasvin ligniinipitoisuuden muutokset (Saxena & Stotzky 2001), jotka voivat puolestaan vaikuttaa matoihin.

Myös muiden GM-kasveihin siirrettyjen ominaisuuksien (kolesterolioksidaasi, lektiini, proteinaasi-inhibiittorit, amylaasi-inhibiittori, kitinaasi jne.) vaikutuksia eläimiin on tutkittu, mutta ei siinä määrin kuin Bt-toksiinien vaikutuksia. Schuler ym. (1999) mukaan GM-kasvit, joihin on siirretty esim. entsyymi-inhibiittori tai lektiini, kestävät herbivoreja Bt-kasveja heikommin, mutta niiden vaikutus kohdistuu laajempaan lajistoon kuin jälkimmäisten. Tämä puolestaan voi johtaa siihen, että kohdehyönteisistä selviytyy suurempi osuus, mutta toisaalta niiden koko ja hedelmällisyys voivat vähentyä (Schuler ym. 1999).

Myös muilla kuin hyönteiskestävyuden lisäämiseen tähtäävillä GM-kasveilla voi olla vaikutuksia eläimiin. Puterka ym. (2002) tutkimus osoitti, että GM-päärynän (*Pyrus communis*) ilmentämä synteettinen antimikrobinen proteiini (D5C1; vaikuttaa kasvipatogeeniseen *Erwinia amylovora* -bakteeriin) vaikutti myös eräseen kemppeihin (*Cacopsylla pyricola*), joka on päärynän tuholainen. Lyhytaikaisessa (7 vuorokautta kestäneessä) kokeessa kempin nuoruusvaiheet kasvoivat GM-päärynällä jopa nopeammin kuin muuntamattomalla verrokilla. Kuitenkin pitkäaikaisessa kokeessa (32 vuorokautta) GM-päärynällä kasvavien kemppeiden jälkeläistuotanto oli neljä kertaa heikompi kuin muuntamattomalla päärynällä kasvavien populaatioiden. Puterka ym. (2002) mukaan tutkimustulos oli positiivinen, sillä siinä osoitettiin bakteerikestävyttä parantavan ominaisuuden vaikuttavan myös hyönteistuholaisiin, mikä voi periaatteessa lisätä päärynän viljelyn kustannustehokkuutta.

Menetelmät eläinten tutkimiseen

Hyönteisten ja muiden selkärangattomien eläinten valtavan yksilö- ja lajimäärän takia tutkimuksessa voidaan keskittyä mahdollisiin kohdelajeihin, niiden saalistajiin/symbiontteihin/loisiin ja esim. alueen indikaattorilajeihin. Bt-toksiinit eivät Raps ym. (2001) mukaan todennäköisesti vaikuta esim. kasvin nesteitä syöviin kirvoihin (mutta katso myös Cherqui ym. 2003), eivätkä aikuisiin mehiläisiin (Malone & Pham-Delègue 2001), mutta saattavat vaikuttaa haitallisesti siitepölyä ravintonaan käyttäviin mehiläisten toukkiin (Brodsgaard ym. 2003).

Hilbeck ym. (2000), Obrycki ym. (2001), Groot ja Dicke (2002) sekä Cowgill ja Atkinson (2003) ovat pohtineet, miten parantaa GM-kasvien vaikutusten arviointia muihin kuin kohde-eläimiin.

Cowgill ja Atkinson (2003) esittävät viisivaiheisen lähestymistavan (lähinnä proteinaasi-inhibiittoria ilmentävien) GM-kasvien vaikutusten tutkimiseksi

- Ensimmäisessä vaiheessa määritellään viljelykasvin mahdollinen vaikutus selkärangattomiin.

- Toisessa vaiheessa tunnistetaan kokeellisesti toksiinille/haitalliselle aineelle alttiit herbivoriryhmät.
- Kolmannessa ja neljännessä vaiheessa käytetään yhdistelmää laboratorio (worst-case scenario) + kontrolloitu-ympäristö, tai pienimuotoisia kenttäkokeita arvioimaan GM-kasvin vaikutuksia valikoituihin (muihin kuin) kohde-eläimiin.
- Viidennessä ja viimeisessä vaiheessa käytetään kenttäkokeita GM-kasvien ja vallitsevien menetelmien (eli pestisidien) käytön vaikutusten vertailuun.

Lisäksi voidaan tarvittaessa selvittää käytetyn toksiinin säilymistä ympäristössä. Viitekehystä voitaneen soveltaa muitakin kuin proteinaasi-inhibiittoreita ilmentävien GM-kasvien vaikutusten tutkimiseen.

Muihin kuin kohde-eläimiin kohdistuvien vaikutusten tutkimuksissa on ensin määriteltävä, mitkä eläimet joutuvat välittömästi (esim. herbivorit, joissakin vaiheissa kasveja tai niiden osia syövät pedot tai parasitiitit) tai välillisesti (pedot, parasitiitit) tekemisiin GM-kasvin tai sen eritteiden kanssa. Kun tutkittavat eläimet on valittu, voidaan kasvin tuottamien toksiinien vaikutuksia arvioida syöttökokeissa.

Syöttökokeet

Syöttökokeessa tutkittavalle eläimelle annetaan ravinnoksi joko GM-kasvia, GM-kasvia syöneitä saaliseläimiä tai jopa saaliseläimiä, joihin on injektoitu samaa proteiinia, jota GM-kasvi tuottaa (Ashouri ym. 1998). GM-ravintoa käyttäneiden eläinten painoa, kuolleisuutta ja lisääntymismenestystä verrataan samanlaista, mutta toksiinia sisältämätöntä ravintoa saaneiden eläinten vastaaviin ominaisuuksiin. Joissakin tutkimuksissa on käytetty keinotekoisia ravintoa, johon on lisätty tutkittavaa toksiinia. Viimeksi mainitulla tavalla on helppoa arvioida eläimen käyttämän toksiinin määrää. Eri aineiden määriä GM-kasvissa ja eläimissä voidaan myös mitata esim. ELISA*-menetelmää käyttämällä. Groot ja Dicke (2002) mukaan syöttökokeiden tuloksista raportoidessa tulisi ilmoittaa, mikä on (Bt-) toksiinien pitoisuus käytetyssä ravinnossa (esim. toksiinin prosenttiosuus kaikista kasvin tuottamista proteiineista), jotta eri kokeista saatuja tuloksia voitaisiin vertailla keskenään. Edelleen Groot ja Dicke (2002) mukaan syöttökokeiden tulosten raportoinneissa tulisi ilmoittaa toksiinin pitoisuuden vaikutus vasteeseen graafisesti (käyränä). Romeis ym. (2004) mukaan sekä GM-kasvin, että puhtaan toksiinin (eri konsentraatioiden) myrkyllisyys tutkittavalle selkärangattomalle tulisi testata syöttökokeissa.

GM-kasvit voivat vaikuttaa petoihin joko suoraan (joidenkin petoniveljalakaisten toukat tai aikuisvaiheen yksilöt voivat käyttää myös kasviraivantoa) tai herbivorien välityksellä. Saalistajat ovat yleensä loisia liikkuvampia. Lisäksi ne ovat ravinnonkäytöltään vähemmän erikoistuneita. Tästä syystä jonkin tietyn saalispopulaation vähäisyys ei yleensä vaikuta jonkin tietyn lajin yleisyyteen/runsauteen (Schuler ym. 1999). Monet pedot ja loiset paikallistavat saaliinsa kasveista herbivorian seurauksena haihtuvista yhdisteistä (Schuler ym. 1999). Mikäli siirto geenin tuotteilla on vaikutuksia näihin yhdisteisiin, voi myös saalistajien ja loisten käyttäytyminen muuttua. Lihansyöjäniveljalkaisiin tai loisiin voi vaikuttaa myös kohdehyönteisen (saaliin) vähäisyys GM-kasvien viljelyn seurauksena. Schuler ym. (1999) mukaan saalistajat tai loiset tuskin kuitenkaan ovat häviämisvaarassa, mikäli saalista löytyy lähialueilta tai mikäli ne voivat käyttää muita eläimiä. Myrkyvaikutuksia taas voi ilmetä muiden kuin kohdehyönteisten välityksellä.

Romeis ym. (2003) tutkivat *Ustilago maydis* -sientä infektoivan viruksen KP4-proteiinia ilmentävän GM-vehnän (*Triticum aestivum*) vaikutusta hyppyhäntäisiin (*Folsomia candida*). Kyseinen proteiini ehkäisee joidenkin sienten kasvua. Tutkimuk-

nessa hyppyhäntäisille syötettiin GM-vehnän tai muuntamattoman vehnän kuivattua juurta, minkä jälkeen eläinten paino ja joitakin muita parametreja mitattiin. GM-vehnällä ei voitu osoittaa olevan vaikutusta hyppyhäntäisten populaatiokehitykseen eikä mihinkään mitatuista parametreista (Romeis ym. 2003).

Bt-toksiineilla ei ole havaittu haitallisia vaikutuksia mehiläisiin. Muilla siirtogeenisillä proteiineilla tai suuremmilla Bt-pitoisuuksilla voi haitallisia vaikutuksia kuitenkin ilmetä. GM-kasvien vaikutuksia yksittäisiin mehiläisiin on vaikeaa tutkia niiden monimutkaisen sosiaalisen käyttäytymisen takia. Tästä syystä Brodsgaard ym. (2003) kehittivät laboratoriomenetelmän testatakseen SBTI-muunnettujen (seriiniproteinaasi-inhibiittori; lisää hyönteiskestävyttä) kasvien vaikutuksia mehiläisten toukkien kehitykseen. Toukkien ruokaan oli lisätty SBTI:tä, mikä lisäsi merkittävästi toukkien kuolleisuutta, hidasti kehitystä ja vähensi merkittävästi aikuisten mehiläisten ruumiinpainoa. Tutkijoiden mielestä toukkamenetelmää voidaan käyttää GM-kasvien tuotteiden suorien vaikutusten seurantaan.

Esimerkkejä syöttökokeista

Lundgren ja Wiedenmann (2002) tutkimuksessa erälle kuoriaiselle (*Coleomegilla maculata*) syötettiin siitepölyeriä, jotka sisälsivät 0, 25, 50, 75, tai 100 % siirtogeenistä (Cry3Bb) maissin siitepölyä. Osalle kuoriaisista syötettiin kirvoja, tai niitä ei syötetty lainkaan. Kuoriaisen kunkin **elinvaiheen kesto** sekä **toukkien paino** mitattiin ja eri aineilla syötettyjä ryhmiä vertailtiin keskenään. Lisäksi vertailtiin Bt-toksiinia sisältävää siitepölyä ja keinotekoista ravintoa syöneitä kuoriaisia. Mitattuja parametreja olivat toukka- ja koteloasteen kesto, aikuisten kuoriaisten liikkuvuus ja selviytyminen, sekä naaraskuoriaisen kelpoisuus. Mikään käytetyistä Bt-toksiinia sisältävistä siitepölyistä ei vaikuttanut mitattuihin parametreihin.

De Turck ym. (2002) tutkivat siirtogeenisen (*uid A* eli GUS; beta-glukuronidaasin tuotto) perunan vaikutusta koloradokuoriaisten (*Leptinotarsa decemlineata*) kehitykseen. Kyseessä oli syöttökoe, eli kuoriaisten toukille syötettiin muunnettun ja muuntamattoman (sama lajike) perunan lehtiä. Tutkimuksessa käytettiin mm. **Western-analyysiä*** beta-glukuronidaasin (GUS) jäljittämiseen siirtogeenisistä kasveista. Proteiinien määrä siirtogeenisistä kasveista mitattiin **spektrofotometrin** avulla (ks. De Turck ym. 2002). Mitattuja biologisia parametreja olivat kuoriaisten embryovaiheen jälkeisen kehityksen kesto, ja aikuisten hyönteisten elinikä. Tulokset käsiteltiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä. Runsaasti (1,6-2,6 % kokonaisproteiinipitoisuudesta) GUS-proteiinia ilmentäviä perunan lehtiä syöneet aikuiset kuoriaiset osoittautuivat selvästi suuremmiksi kuin kontrollikasveja syöneet kuoriaiset, ja ne elivät ravinnotta keskimäärin kuusi päivää kauemmin kuin muuntamatonta perunaa syöneet kuoriaiset. Tutkimus osoitti, että neutraalina pidetyllä merkkiominaisuudella voi olla myös ekologisia vaikutuksia.

Molekyyli-tason vaikutukset

Bouchard ym. (2003a) mielestä siirtogeenisten tuotteiden vaikutuksia kohde-eläinten luontaisiin vihollisiin (saalistajiin ja loisiin) tulisi tarkastella myös molekyyli-tasolla. Molekyyli-tason vaikutuksilla Bouchard ym. (2003a) viittaavat siihen, että kokeissa havaittu GM-kasvia ravintonaan käyttäneen saaliseläimen vaarattomuus tutkittavalle pedolle voi johtua eri syistä. Joko siirtogeeninen proteiini ei vaikuta saalistajaan lainkaan, tai vaihtoehtoisesti GM-kasvin tuote voi laukaista saalistajan tai parasiitin ruoansulatuskanavassa jonkin toksiinin vaikutusta kompensoivan metabolisen mekanismin.

Esimerkkejä molekyyli-tason vaikutusten tutkimuksista

Cherqui ym. (2003) yrittivät selvittää, mistä siirtogeenistä (GUS) perunaa syöneiden hyönteisten aiemmissa kokeissa (ks. De Turck ym. 2002) havaittu parempi kelpoisuus johtui, eli johtuivatko vaikutukset itse siirtogeenisestä proteiinista.

Kirvoille (*Myzus persicae*) syötettiin GUS-proteiinia eri pitoisuuksina sisältävää keinotekoista ravintoa, vastaavaa keinotekoista ravintoa, jossa oli muita proteiineja (kontrollit) sekä siirtogeenistä perunaa. Tutkijat paikansivat GUS-proteiinin sijainnin kirvoissa syöttökokeiden jälkeen. Paikannuksessa käytettiin vasta-aineiden avulla tehtävää Western-analyysiä*. Proteiinia löytyi runsaasti sitä sisältänyttä ravintoa syöneiden kirvojen ruoansulatuskanavasta sekä lisäksi mm. rasvakudoksesta ja alkioista. Lisäksi tutkittiin eri ravintoa käyttäneiden kirvojen nuoruusvaiheiden selviytymistä. Selviytymisparametreja käsiteltiin Pearsonin χ^2 -testin ja yksisuuntaisen varianssianalyysin avulla (ks. Cherqui ym. 2003). Tulosten mukaan ravinnon suuri GUS-pitoisuus nopeutti kirvojen lisääntymiskiertoa sekä pidensi aikuisten kirvojen kuntoa ja elinikää. Tulokset osoittivat lisäksi, että proteiini läpäisee kirvan ruoansulatuskanavan seinämän aktiivisessa muodossa. Cherqui ym. (2003) mukaan tulokset viittasivat siihen, että GUS-proteiinilla on probioottisia vaikutuksia tutkittuihin hyönteisiin.

Bouchard ym. (2003b) tutkivat siirtogeenisen (riisin oryzakystatiini I:tä, eli OCI:tä tuottavan) perunan herbivorien vaikutusta niiden saalistajaan (eräs marjalude: *Perillus bioculatus*). Tutkimuksessa OCI:llä ei havaittu olevan haitallisia vaikutuksia marjaluteeseen. Bouchard ym. (2003a) halusivat kuitenkin testata, voitiinko tulos selittää luteen ruoansulatuskanavassa tapahtuneella korvaavalla mekanismilla. Tutkimus tehtiin proteiinien geielektroforeesin (SDS-PAGE; ks. Laemmli 1970) ja western-analyysin* avulla sekä GM-perunaa että muuntamatonta perunaa syöneitä herbivoreja (koloradokuoriainen; *Leptinotarsa decemlineata*) ravintonaan käyttäneistä marjaluteista. Bouchard ym. (2003a) mukaan tulokset osoittivat, että kohdehyönteisen saalistajalla oli ruoansulatuskanavassaan OCI:n (pienten pitoisuuksien) vaikutuksia kompensoiva mekanismi. Edelleen tulokset osoittavat, että mikäli tulevaisuudessa tuotetaan GM-kasveja, jotka tuottavat entistä suurempia pitoisuuksia toksiineja, voi niiden vaikutus herbivorien luontaisiin vihollisiin olla odotettua suurempi.

Kasvin omien torjunta-aineiden vaikutus

Syöttökokeet, joissa käytetään pelkkää vaikuttavaa ainetta (esim. Bt-toksiinia) eikä itse GM-kasvia eivät välttämättä anna oikeanlaista kuvaa aineen vaikutuksista testattavaan eliöön. Esim. Kleiner ym. (2003) havaitsivat, että hyönteiskestävän (Bt-toksiini) GM-poppelin (*Populus sp.*) lehtien tuottamat fenolit voimistivat cry1A(a) d-endotoksiinin (Bt-toksiini) vaikutuksia eräaseen perhoseen (lehtinunna; *Lymantria dispar*). Tutkijat päättelivät, että poppelin itsensä tuottamat allelokemikaalit olivat riittävä puolustus perhostuhoja vastaan, mutta lisätty Bt-toksiiniminäisyys antaisi puille lisäsuojan useita eri hyönteisiä vastaan.

Välilliset vaikutukset

Tutkimuksissa havaitut GM-kasvien haitalliset vaikutukset kohdehyönteisten luontaisiin vihollisiin voivat olla myös välillisiä. Cry1Ab-Bt-toksiinia tuottavaa GM-kasvia ravintonaan käyttävien hyönteisten syöttökokeissa havaittiin joissain tutkimuksissa haitallisia vaikutuksia niiden saalistajiin (ks. Hilbeck ym. 1998b). Romeis ym. (2004) halusivat selvittää, johtuivatko vaikutukset suoraan ravinnon sisältämistä toksiineista vai jostain muusta syystä. He kehittivät syöttömenetelmän, jossa pedolle (harsokorento; *Chrysoperla carnea*) syötettiin suoraan suuria määriä kyseistä Bt-toksiinia eri konsentraatioina sokeriliuoksessa. Sokeriliuosta käytettiin siksi, että saaliin puutteessa *C. carnean* toukat voivat käyttää ravintonaan myös mettä tai mesikastetta. Tulokset osoittivat, että ravinnon 10 000 kertaa suurempi määrä Bt-toksiinia kuin Hilbeck ym. (1998b) kokeessa ei vaikuttanut haitallisesti *C. carnean*, joten Hilbeck ym. (1998b) saamat aikaisemmat tulokset johtuivat luultavasti syöttökokeessa käytettyjen Bt-maissa ruokittujen saalis- hyönteisten huonosta laadusta (verrattuna muuntamatonta maissia syöneisiin saaliseläimiin). Romeis ym. (2004) eivät kuitenkaan pystyneet täysin sulkemaan pois sitä mahdollisuutta, että Bt-toksiini voi muuttua haitallisemmaksi, kun se joutuu ensin tekemisiin sille herkkien hyönteisten ruoansulatuskanavan proteiinien kanssa.

Kenttäolosuhteiden simulointi

Schuler ym. (2001) mukaan pienet syöttökokeet antavat ainoastaan rajallisen ja keinotekoisien 'worst-case scenario' -kuvan GM-kasvien vaikutuksista hyönteisiin. Syöttökokeet eivät myöskään välttämättä paljasta pitkäaikaisia vaikutuksia esim. selkärangattomien kelpoisuuden huononemista. Laaja-alaisia kenttäkokeita on taas vaikeaa ja työlästä monitoroida. Tästä syystä Schuler ym. (2001) suosittelikin menetelmää, joka on syöttökokeen ja kenttäkokeen välimuoto, eli kokeessa on kasvin lisäksi yksi tai kaksi muuta eliötä. Tällöin koe on hyvin hallittavissa, eikä se ole yhtä suppea kuin pelkkä syöttökoe.

Esimerkki kenttäolosuhteiden simuloinnista

Schuler ym. (2001) tutkivat kirvojen (*Myzus persicae*) ja niiden loisten (*Diaretiella rapae*) kehitystä ja eloonjäämistä kahdella erilaisella GM-kasvilla ja niiden verrokeilla. Toinen oli rapsi (*Brassica napus*), joka tuotti CryIAc Bt-toksiinia, toinen rapsi taas tuotti oryzakystatiini I:tä (OC-I; kysteiniiniproteinaasi-inhibiittori). Kasvien vaikutuksia kirvoihin ja niiden loisiin tutkittiin erityisten kenttäolosuhteita jäljittelevien **kasvatushäkkien** avulla (ks. Schuler ym. 2001), joissa oli sekä GM- että verrokkirapsyksilöitä, kirvoja ja niiden loisia. Kokeen lopussa häkeissä olleet kasvit kerättiin ja niiltä laskettiin sekä elävät kirvat, että loisten infektoimat muumioituneet kirvat. Osa muumioituneista kirvoista säästettiin loisten lisääntymismenestyksen vertailua varten. Elävien kirvojen määriä GM- ja verrokkikasveilla vertailtiin varianssianalyysin avulla. Samaa menetelmää käytettiin muumioituneiden eläinten määrien vertailuun. Parasitismien määriä vertailtiin logistisen regressioanalyysin avulla. GM- ja muuntamattomien kasvien välillä ei pystytty osoittamaan tilastollisesti merkitseviä eroja.

Koska suuri määrä eri tekijöitä säätelee eri eliöiden populaatiodynamiikkaa sekä viljely- että luonnonekosysteemeissä, ei laboratorio-olosuhteissa osoitettu myrkyllisyys välttämättä päde luonnonolosuhteissa. Jos esim. hyönteisille ei syöttökokeissa anneta muita ravintovaihtoehtoja kuin GM-kasvia, eivät tulokset välttämättä vastaa todellisuutta, mikäli eläin käyttää luonnossa mieluummin muita ravintokohteita (ks. esim. Schuler ym. 2001). Zwahlen ym. (2003) kastematotutkimuksessa Bt-toksiini (ELISA-menetelmällä* mitattuna) hajosi merkittävästi hitaammin kentällä kuin laboratoriossa. Tutkijoiden mukaan tähän oli syynä todennäköisesti laboratorion ulkoilmaa korkeampi lämpötila. Kasvien siirtogeenien tuotteiden hajoamista arvioitaessa on siis otettava huomioon ympäristöolosuhteiden vaikutus hajoamisnopeuteen. Tämä voi olla huomionarvoista myös arvioitaessa muualla tehtyjen kokeiden tuloksia Suomen (kylmissä) olosuhteissa. Schuler ym. (1999) mukaan hyönteiskestävien GM-kasvien ympäristövaikutuksia tulisi aina verrata synteettisten torjunta-aineiden vaikutuksiin.

Kenttäkokeet

Schuler ym. (2001) mukaan luotettavin tieto GM-kasvien muihin kuin kohde-eliöihin kohdistuvista vaikutuksista saadaan laajoista kenttäkokeista. Toisaalta kenttäkokeet voivat olla hyvin työläisiä, ja niistä saatuja tuloksia voi olla vaikeaa tulkitta vaihtelevien ympäristöolosuhteiden ja hyönteisten laikuttaisen esiintymisen takia. Erilaisten keräys- ja havainnointimenetelmien käyttö saattaa vaikuttaa tutkimuksen lopputulokseen. Linjamenetelmä (line-transect method, ks. Banaszak 1980; Pollard & Yates 1993) sopii silmämääräiseen mesipistiäisten ja perhosten runsauden arviointiin. Joidenkin hyönteisten määrää voidaan arvioida silmämääräisesti hyönteistuhojen määrän perusteella. Ansakeräysmenetelmä (ks. Spence & Niemelä 1994; Luff 1996) antaa kuvan selkärangattomien 'aktiiviteettiheydestä', ei tarkkaa lukumäärää. Imukeräysmenetelmä (ks. Arnold 1994; Haughton ym. 2001) sopii maanpinnan yläpuolella esiintyvien hyönteisten keräämiseen. Vaikka keräyste-

hokkuus on pienempi kuin 100 %, saadut näytteet edustavat vakio-osuutta populaatiotiheydestä, joten keräyksistä voidaan saada tilastollisesti päteviä tuloksia (Haughton ym. 2001).

Kenttäkokeissa voidaan vertailla GM-kasvikoealoilla ja verrokkikoealoilla esiintyvien eliöryhmien runsauksia ja monimuotoisuutta. Herbivorien runsauden arvioinnissa voidaan käyttää hyönteisvahinkojen määrää kasvillisuudessa. Kenttäkokeiden avulla voidaan myös vertailla GM-kasvien ympäristövaikutuksia valitsevien menetelmien käyttöön (pestisidien tai muiden torjunta-aineiden käyttö). Kenttäkokeita suunniteltaessa tulisi huomioida, että erilaiset menetelmät (esim. hyönteisten keräysmenetelmät) voivat tuottaa eri tuloksia (ks. esim. Jasinski ym. 2003).

Duan ym. (2004) pyydystivät kenttäkokeissa hyönteisiä tutkiakseen Cry3Aa Bt-toksiinia tuottavan GM-perunan vaikutuksia eri niveljalkaisten runsauteen. Kokeessa vertailtiin Bt-perunan ja perinteisten koloradokuoriaisia vastaan käytettävien torjunta-aineiden ympäristövaikutuksia. Eroja eri käsittelyiden välillä havaittiin ainoastaan hyppyhäntäisten (*Collembola*) runsauksissa, sekä hämähäkkien (Araneae) runsaudessa perimetriiniä torjunta-aineena käytettäessä.

Sukkulamatoja kestävien GM-kasvien ja kontrollikasvien vertailu kenttäolosuhteissa

Cowgill ym. (2004) tutkivat, millä tavalla perunaan siirretty muunneltu riisin kystatiiniominaisuus (kysteiniiproteiinaasi-inhibiittori; antaa kestävyden sukkulamadoille) vaikuttaa perunaa ravintonaan käyttävien kirvojen saalistajiin ja loisiin (mukaan lukien sekundaariset parasiitit). Kenttäkokeessa seurattiin erilaisia koealoja: GM-kasvit ja kontrollit (muuntamaton linja) sekä perinteisellä nematisidilla (aldicarb) käsitelty koeala (muuntamaton linja). Kokeessa tutkittiin:

- saalistajien saatuutta eri koealoilla kasvukauden aikana
- saalistajien laatua (koko) mainituilla koealoilla
- GM-perunoita syöviin kirvoihin kertyneen kystatiinin määrää
- saalistajien ja parasiittien yleisyyttä ja taksonomista kokoonpanoa eri koealoilla

Tutkimus tehtiin satunnaistetuilla aloilla sukkulamatojen (*Globodera pallida* ja *G. rostochiensis*) infektoimalla koealalla. Kirvojen ja niiden luontaisten vihollisten runsauksia arvioitiin **silmämääräisesti** kahdesti viikossa kokeen keston (2,5 kk) ajan. Loisten mummioimat kirvat otettiin talteen, ja niistä seurattiin aikuisten eläinten kuoriutumista. Lisäksi mitattiin aika, jossa juuri kuoriutunut aikuinen loinen kuolee ravinnon puutteeseen. Sekä kasvien, että kirvojen OCI-pitoisuus mitattiin ELISA-menetelmää* käyttäen. Tulokset hyönteisten määrien ja massan mittauksista GM- ja muuntamattomien kasvien aloilla käsiteltiin ANOVA:n avulla. GM- ja kontrollikoealojen välillä ei ollut tilastollisesti merkitseviä eroja. Sen sijaan nematisidialojen eläimistö poikkesi selvästi edellisistä; kirvojen määrä oli huomattavasti pienempi.

Hilbeck ym. (2000) mielestä tutkimusprotokollat ovat useissa Bt-kasvien vaikutuksia tutkivissa kokeissa puutteellisia: esim. ekotoksisuutta ja erityisesti pitkäaikaisia (letaaleja ja subletaaleja) vaikutuksia ei ole huomioitu riittävästi. Lisäksi testieliöiden valinta on usein kohdistunut ekologisesti epärelevantteihin lajeihin. Kuitenkin Hilbeck ym. (2000) mukaan huonostikin valitut testilajit voivat auttaa monitoroimaan Bt-kasvien vaikutuksia vähemmän herkkiin lajeihin. Sharma ym. (2004) mukaan tulevaisuuden GM-kasveissa on todennäköisesti käytettävä useaa eri torjuntaproteiinia (esim. Bt-toksiinia) koodaavaa geeniä hyönteisissä mahdollisesti kehittyvän resistenssin hidastamiseksi. Tämä voi vaikeuttaa riskien arviointia.

Marvier (2002) on selvittänyt, kuinka tilastollisesti päteviä tutkimuksia teollisuuden GM-riskinarvioinneissa on tehty. Kokeiden kesto (keskimäärin 1-4 viikkoa) osoittautui yleisesti liian lyhyeksi. Lisäksi toistoja oli useimmiten tehty liian

vähän (2-6 toistoa käsittelyä kohti), jotta tulokset kuvaisivat todellisia vaikutuksia. Marvier (2002) mielestä tilanne olisi korjattavissa suhteellisen pienillä tutkimusasetelmien muutoksilla. Tällaisia parannuksia olisivat näytemäärän lisääminen ja tulosten käsittely tilastollisten menetelmien avulla.

Menetelmiä eläinten tutkimiseen

ELISA*, kasvatushäkit, kasvatuslieriöt, keräysmenetelmät*, SDS-page, silmämääräinen arviointi, spektrofotometria, Studentin t-testi*, syöttökokeet, western-analyysi*

Välilliset vaikutukset

Herbisdikestävien GM-kasvien välillisistä (viljelymenetelmistä johtuvista) muihin kuin kohdeorganismeihin kohdistuvista vaikutuksista ja näiden tutkimusmenetelmistä löytyy tietoa brittiläisistä Field Scale Evaluation -tutkimuksista (ks. liite FSE:t).

Lisäksi kaikissa edellä mainituissa tutkimuksissa on selvitettävä

- Mikä on riittävä otos/toisto/pinta-ala/kesto vertailukokeissa?
- Millä tilastollisilla menetelmillä tutkittavista parametreista saadaan eniten hyödyllistä tietoa?
- Satunnaistaminen ja lohkotus
- Laboratoriokokeiden sekä kasvihuone- ja kenttäkokeiden yhdistäminen

Riskinhallinta

Tavoite

Riskinhallinnan tarkoituksena on minimoida GM-kasvien viljelyn haittavaikutusten todennäköisyys. Esimerkiksi GM-kasvin viljely alueella, josta lähisukuiset lajit puuttuvat, ehkäisee tehokkaasti siirtogeenien leviämisen ympäristöön introgression kautta.

Menetelmät

Monet riskinhallintamenetelmät estävät geenivirran siitepölyn välityksellä, mutta eivät estä geenivirtaa siementen tai kasvullisten leviäinten (esim. itusilmut, rönnyt) kautta. Geenitekniikalla tuotettu steriliteetti voi vähentää riskiä siirtogeenien leviämisestä viljelysiltä luonnonpopulaatioihin (ks. esim. Lemmetyinen ym. 1995). Steriliteetin murtumisen (eli hedelmällisyyden palautumisen) riskiä voidaan pienentää vaikuttamalla useampaan geeniin tai käyttämällä samanaikaisesti useita steriliteetin aiheuttavia tekniikoita. Kukkimattomuus ei kuitenkaan estä siirtogeenien leviämistä kokonaan lajeilla, jotka lisääntyvät myös kasvullisesti, kuten esim. poppelit.

Niin sanotut 'terminaattorigeenit' suojaavat siirtogeenisiin kasveihin käytettyjä patentoituja geenejä estämällä toisen sukupolven siementen itämisen. Tällaisia menetelmiä pidetään kuitenkin esim. Giovannetti (2003) mukaan vaarallisina, koska ne puuttuvat perustavaa laatua oleviin elämän mekanismeihin. Lisäksi ne estävät viljelijöitä käyttämästä omaa satoaan kylvösiemeninä.

Eräs GM-kasvien viljelyn uhkakuva on tuholaisien kehittyminen kestäväksi Bt-toksiineille, mikä rajoittaisi myös ruiskutettavien Bt-toksiinien käyttöä maataloudessa. Bt-toksiinia kestävien hyönteiskantojen kehittymistä voidaan ehkäistä esim. kasvattamalla GM-kasvien joukossa tai viljelyalan reunoilla muuntamattomia kasveja (refugio eli suojavyöhyke). Bt-toksiinia koodaava geeni voidaan myös siirtää kloroplastiin, mikä voi voimistaa toksiinin vaikutusta (kloroplasteja on paljon) sekä estää geenin leviämisen luonnonpopulaatioihin, koska plastidit periytyvät useimmiten maternaalisesti (tästä poikkeuksena esim. mänty). Myös solukko- tai kehitysvaihespesifinen ilmentymisen voisi vähentää kestävyyspainetta (Gressel 1999; Daniell 2002). Lisäksi jotkut tuottajat ovat ottaneet käyttöönsä useiden geenien 'pinoamisen' samaan siirtogeeniseen linjaan. Gatehouse ym. (2002) mukaan tämä saattaa olla kuitenkin lyhytaikainen ratkaisu, sillä yksi resistenssigeeni saattaa antaa kestävyuden useaa Bt-toksiinia vastaan. Muuntamattomista kasveista koostuvaa suojavyökettä voidaan käyttää myös viljelyalueiden ympärillä siitepölyn leviämisen estämiseksi. Seuraavassa on esitetty erilaisia riskinhallintamenetelmiä.

Riskinhallintamenetelmiä

- Kasvatusalueen eristys
- Kukinnan eriaikaisuus
- Suojavyöhyke (hyönteispölytteisten) GM-kasvipellon ympärillä.
- Siitepölynsat voivat vähentää siitepölyn leviämistä
- Kukkimattomien kasvien kehittäminen

- Koirassteriilien yksilöiden käyttö
- Kloroplastiin siirretty geeni estää geenin siirtymisen siitepölyn mukana (toisaalta plastideista tiedetään siirtyneen geenejä tumaan ja esim. männyllä mitokondriot saattavat siirtyä myös siitepölyn mukana). Kloroplastin periytymistä erilaisilla viljelykasveilla ja niiden luonnonvaraisilla sukulaisilla pitäisi tutkia lajikohtaisesti (Riches & Valverde 2002). Siirtogeenin siirto viherhiukkaseen voi kuitenkin lisätä esim. horisontaalisen geenin siirtymisen mahdollisuutta bakteereihin.
- Siirtogeenin liittäminen toiseen geeniin, joka on harmiton viljelykasvissa, mutta haitallinen risteymälle (Gressel 1999) vähentää hybridien esiintymistä
- Antibioottiresistenssin korvaavien merkkigeenien käyttö (ks. esim. Ebinuma ym. 1997; Joresbo 1998). Esim. Hood (2003) on kehittänyt valintamarkkerin, *plfp:n* (*ferredoxin-like protein*), jota on käytetty orkideoilla siirretyn taudinkestävyysgeenin yhteydessä. Tekijöiden mukaan menetelmä voisi olla käyttökelpoinen monilla muillakin viljelykasveilla. Lisäksi erilaisia mekanismeja on kehitetty selektiivisten markkereiden poistamiseen GM-kasvista muuntamisen jälkeen (esim. *cre/lox* -systeemi; ks. Dale & Ow 1991). Puchta (2003) mukaan 'homologinen rekombinaatio' on hyvä vaihtoehtoinen menetelmä markkerigeenien poistamiseen kasvin genomista. Muita menetelmiä ovat transposonit ja aluekohtaiset rekombinaasit.
- Intronit siirtogeeeneissä ehkäisevät geenin ilmentymisen, mikäli geeni siirtyisi kasvista bakteeriin (horisontaalinen geenin siirtyminen).

Esimerkkejä riskinhallintamenetelmien kehittämisestä

Tabaschnik ym. (2003a, b) mukaan vielä ei ole tavattu hyönteisiä, jotka olisivat resistenttejä kasveille, joihin on siirretty Bt-ominaisuus. Sen sijaan ainakin kaalikoi (*Plutella xylostella*) on kehittänyt kestävyuden ruiskutettavalle Bt-toksiinille. Lisäksi monet hyönteiset ovat kehittäneet resistenssin Bt-toksiinille laboratorio-olosuhteissa. Resistenssin kehittämisen viivästyttämiseksi on käytetty turvakasvustoja. Turvakasvustossa kasvatetaan kasveja, jotka eivät tuota Bt-toksiinia ja jotka siten edistävät toksiinille herkkien tuholaisten säilymistä. Tabaschnik ym. (2003b) pitävät Bt-kasveille resistenttien hyönteisten kehittymistä todennäköisenä.

Kuvshinov ym. (2001) mukaan uusi molekyyli menetelmä pysäyttää geenivirran siirtogeenisistä kasveista luonnonvaraisiin sukulaisiin käyttämällä palautuvaa, esim. jonkin kasville tärkeän fysiologisen ominaisuuden estoa (engl.: recoverable block of function; RBF). Palautuva toiminnan esto koostuu estävästä sekvenssistä, joka on liitetty haluttuun geeniin, sekä estetyn toiminnan palauttavasta geenistä (jotka kaikki ovat siirrettävässä konstruktissa). Estävä sekvenssi estää kasvin tietyn molekyyli- tai fysiologisen toiminnan. Estävän sekvenssin toiminta johtaa kasvin kuolemaan tai sen fenotyypin muuttumiseen niin, että kasvi ei pysty lisääntymään suvullisesti luonnossa. Palauttava konstrukti palauttaa tarvittaessa estetyn toiminnan.

Viranomaisten kannalta merkittäviä tekijöitä GM-kasvien ympäristövaikutusten tutkimuksessa

9

Viranomaisten kannalta keskeisiä GM-kasveihin liittyviä haasteita ovat mm. riskinarviointimenetelmien arviointi sekä valvonta. GM-kasvien viljelyyn ottaminen edellyttää hyvin suunniteltua, ennakoivaa tutkimusta mahdollisten ympäristövaikutusten selvittämiseksi. GM-kasvien ympäristövaikutuksista tehtävässä tutkimuksessa olisi varsinaisten tutkimusmenetelmien lisäksi huomioitava myös muut tutkimustulosten arvon kannalta merkittävät tekijät:

Hyvä koe- ja otossuunnittelu on tutkimustulosten hyödyntämisen kannalta ensiarvoisen tärkeää. Samasta käsittelystä on oltava riittävän monta toistoa, jotta tulokset olisivat riittävän kattavat. Mahdollisten erojen osoittamiseksi GM- ja kontrollikasvien välillä, sekä ilmenneiden erojen merkityksen selvittämiseksi tarvitaan suuria aineistomääriä ja tilastollisesti tehokkaita, usein työläitäkin koejärjestelyjä (esim. kokeiden toistoa useassa eri paikassa erilaisissa kasvuolosuhteissa). Myös **lohkottaminen** mahdollisten laatuerojen tai gradienttien vaikutusten ehkäisemiseksi, sekä **satunnaistaminen** olisi otettava huomioon koetta suunniteltaessa. Näitä tekijöitä käsitellään kaikissa tilastotieteen perusteoksissa ja oppikirjoissa.

Tilastotieteen tulee antaa vankka pohja GM-kasvien tutkimukselle. GM-kasvien ympäristövaikutuksia tutkittaessa (tai missä tahansa tutkimuksessa) käytettävä koeasetelma on suunniteltava siten, että se vastaa käytettävää tilastollista mallia. Tästä syystä olisi hyvä kääntyä tilastotieteilijän puoleen jo tutkimuksen suunnitteluvaiheessa. Koesuunnittelussa olisi huomioitava, että esim. toistoja tulee riittävä määrä hyvän merkitsevyydystason (yleensä $P < 0,05$) saavuttamiseksi. Tämä puolestaan vaatii testin voimakkuuden analysointia (testin voimakkuus määritellään kaavalla $1-b$, b :n ollessa todennäköisyys sille, että väärää nollassa hypoteesia ei hylätä; ks. Kjaær ym. 1999).

Myös tutkittavien **kasvien valinta** ja **kontrollikasvien valinta** (sekä myös lähtökohta; verrataanko tuloksia vallitsevaan tilanteeseen) vaikuttaa tutkimuksen tuloksiin. Nollasegreganttilinjan kasvit, jotka ovat samaa sukupolvea kuin siirto-geeniset kasvit, ovat Linder ja Schmitt (1994) mukaan parhaita kontrollikasveja GM-kasvitutkimuksissa, kun GM-kasvin ja muuntamattoman kasvin eroja vertaillaan (ks. sivu 35). Solukkoviljelyn avulla saadut muuntamattomat kasvit ovat kuitenkin yleisesti käytettyjä kontrolleja GM-tuotekokeissa. Kjaær ym. (1999) mukaan introgression seurauksena mahdollisesti tapahtuneen kasvin kelpoisuuden muutoksen tutkimukseen tulisi sisällyttää vanhemmaiskasvit (P1), hybridit sekä ensimmäiset ja toiset takaisinristeytyneet sukupolvet.

Koetta suunniteltaessa on myös mietittävä tarkkaan, **mitä parametreja tutkitaan/mitataan** ja **mitä muita eliöitä** tutkimukseen sisällytetään. Riskinarviointi on varsin pragmaattinen prosessi, jossa yleensä joudutaan keskittymään vain kaikkein tärkeimmiksi katsottuihin tekijöihin. Ekologisesti ja molekulaarisesti relevantit mittaukset antavat pohjan päätelmien tekemiselle.

Yksilöiden välinen geneettinen muuntelu (vaihtelu) ja ympäristön vaihtelu on huomioitava koesuunnittelussa. Eri geneettisiä taustoja tulisi mikäli mahdollista kokeilla erilaisissa olosuhteissa (esim. kuivuus, muuttunut ravinnepitoisuus,

predaatiopaine, kasvien välinen kilpailu jne.) riittävän pitkään. Eri kasvukausien väliset vaihtelut tai eri koealojen väliset vaihtelut saattavat vaikuttaa tuloksiin huomattavasti.

Laboratoriotutkimusten tuloksia ei yleensä voida suoraan verrata luonnossa tapahtuviin mekanismeihin. Tulevaisuudessa GM-kasvien ympäristövaikutuksista olisikin saatava tietoa kenttäolosuhteista, laajemmilta alueilta sekä pidemmältä ajalta kuin tähänastisista tutkimuksista. GM Science Review'n (2004) mukaan suurin osa GM-kasvien aiheuttamista mahdollisista biodiversiteettivaikutuksista tulee todennäköisesti osoittautumaan palautuviksi. Tästä syystä pienimuotoiset kenttäkokeet tutkittavien kasvien kannalta relevanteissa ekosysteemeissä tuskin tulevat aiheuttamaan pitkäaikaisia ympäristöhaittoja. Pitkäaikaisia kenttäkokeita ei kuitenkaan voida Suomessa yleensä tehdä kasveilla, joilla on täällä risteytymiskykyisiä sukulaisia. Suomessa on katsottu, että esimerkiksi tuulipölytteisillä puilla tehtävät kenttäkokeet on lopetettava ennen kuin kasvi saavuttaa kukkimisiään. Näkemys kuitenkin vaihtelee jonkin verran EU:n alueella. Joissakin maissa ollaan sitä mieltä, että esimerkiksi geenivirta itsessään ei ole ongelma, mikäli GM-kasviin siirretty ominaisuus on ympäristölle vaaraton. Toisaalta vaarattomuuden arviointi voi olla vaikeaa; esimerkiksi harmittomana markkerina pidetyn GUS-proteiinin tuotto GM-kasvissa voi merkittävästi vaikuttaa kasvia syövien eläinten kelpoisuuteen (ks. sivu 22). Hyvin suunnitellut **kasvihuonekokeet ja ekologinen mallintaminen** saattavat tulevaisuudessa osin korvata GM-kasveilla tehtävät laaja-alaiset ja mahdollisesti riskialttiit tutkimukset. Lisäksi tarvitaan lisää mm. eettisiä ja sosiologisia tutkimuksia siitä, miten suurena ympäristöriskinä kansalaiset pitävät esimerkiksi GM-siitepölyn leviämistä ympäristöön. Huolellisesti toteutettu seuranta GM-kasvin viljelyyn hyväksymisen jälkeen tulee todennäköisesti tarjoamaan arvokasta lisätietoa GM-kasvien ekologisista vaikutuksista.

Pitkäaikaiset tai odottamattomat vaikutukset saattavat ilmetä kenttäolosuhteissa vasta pitkän ajan kuluessa, esimerkiksi ympäristöolosuhteiden muuttuessa. Puilla sukupolvien väli voi olla vuosia tai jopa kymmeniä vuosia. Yksivuotisilla kasveilla tapahtuvaa hybridisaatiota ja introgressiota voi olla vaikea tutkia, mikäli tutkimusta tehdään ainoastaan yhden kasvukauden ajan. Esim. Crawley ym. (2001) seurasivat GM-viljelykasvien selviytymistä ja invaasiokyvyn muutoksia (verrattuna muuntamattomiin kasveihin) peräti kymmenen vuoden ajan, kun taas GM-tuotekokeissa tehtävien tutkimusten kesto saattaa olla ainoastaan muutamia kuuksia. Kareiva ym. (1996) mukaan GM-kasvitutkimusten tulokset viittaavat siihen, että alle kolme vuotta kestävät tutkimukset antavat riittämättömän arvion kasvien lisääntymisen/leviämisen nopeuden/laajuuden muutoksesta, huolimatta tutkittujen alueiden laajuudesta tai määrästä.

Edellä mainitut tekijät (esim. tarvittavien toistojen määrä) ovat kuitenkin tapauskohtaisia ja ne on erikseen selvitettävä kussakin tutkimuksessa. Lisäksi mm. GM Science Review'n (2003) mukaan olisi varomatonta yleistää esim. herbisidikestävien GM-kasvien ympäristövaikutuksia mittaavasta kenttäkokeista saatuja tuloksia koskemaan myös muunlaisia GM-kasveja. Lisääntyneen invaasiokyvyn, hybridisaation ja introgression, sekä muihin kuin kohde-eliöihin kohdistuvien vaikutusten mahdollisuus onkin selvitettävä erikseen kunkin kasvilajin ja kunkin siirretyn ominaisuuden kohdalla sekä myös erilaisissa ympäristöolosuhteissa.

Mikäli GM-kasveja hyväksytään Suomessa kaupalliseen viljelyyn, tarvitaan viljelyn seurannassa valtavia näytemääriä esim. geenivirran tutkimiseksi, mikä on kallista ja aikaavievää. Ratkaisuna voi olla suurten näytemäärien käsittelyä helpottavien menetelmien käyttäminen ja kehittäminen. Esim. Real-time PCR

(RT-PCR) mahdollistaa useiden näytteiden yhdistämisen, joten tietoa esim. siirto-geenien introgressiosta luonnonpopulaatioihin ja perinteisille viljelyksille voidaan saada kerralla suurelta alalta.

Valvonnassa keskeisiä asioita ovat introgressiomahdollisuuden ja GM-kasvien leviämisen seuraaminen sekä seurannan kesto (kuinka monta vuotta viljelyn aloittamisesta seurannan on jatkettava). Vaikka GMO-lainsäädännössä ei vaadita viljelyssä käytettävien tehoaineiden raportointia, tieto GM-kasvien käytön vaikutuksista tehoaineiden käytön määrään olisi viranomaisille arvokas lisä GM-kasvien viljelyn kokonaisvaltaiseen ympäristövaikutusten arviointiin.

10

Yhteenveto

Uudistetussa, tarkoituksellista muuntogeenisten organismien (GMO:ien) ympäristöön levittämistä säätelevässä EU:n direktiivissä 2001/18/EY on kirjattu ensi kertaa ympäristöriskien arvioinnin periaatteet. Sekä Suomen kansallinen lainsäädäntö, että EU:n lainsäädäntö edellyttävät kattavaa riskien arviointia ennen GMO:ien tarkoituksellista ympäristöön levittämistä tai suljettua käyttöä. GMO:ien ympäristöriskien arvioinnissa tarkastellaan suoria ja välillisiä, välittömästi tai viipeellä ilmeneviä ympäristövaikutuksia. Riskinarvioinnin perusteena on riskien tunnistaminen sekä riskin todennäköisyyden ja haitan suuruuden arviointi. Mikäli GM-organismien käyttäytymisestä ei ole riittävästi tietoa, tarvitaan lisää tutkimusta. Ala on kuitenkin niin uusi, että vakiintuneita tutkimusmenetelmiä GM-kasvien ympäristövaikutusten tutkimiseen ja seurantaan ei vielä ole. Tämän raportin tarkoituksena on kerätä menetelmiä GM-kasvien ympäristövaikutusten tutkimiseen, sekä koota mahdollisimman laaja kirjallisuusluettelo, josta saa yksityiskohtaisempaa tietoa erilaisista tutkimusjärjestelyistä.

Raportissa käsitellään GM-kasvien käyttöönottoon liittyviä mahdollisia ympäristöriskejä, sekä tutkimusmenetelmiä, joista voi olla hyötyä GM-kasvien riskinarvioinnissa esiin tulleiden tietotarpeiden täyttämiseen. Lisäksi käsitellään lyhyesti GM-kasvien viljelyyn liittyviä ympäristön kannalta edullisia vaikutuksia, GM-kasvien riskinarviointia ja viljelyn seuranta, sekä riskien hallintamenetelmiä.

Geenitekniikan käyttö, eli GM-tekniikka itsessään tuskin lisää kasvin haitallisia ympäristövaikutuksia. Sen sijaan siirretyn geenin ilmentyminen uudessa ympäristössä voi aiheuttaa yllättäviä vaikutuksia. GM-kasvien käytöllä saattaa olla ympäristön kannalta myös edullisia vaikutuksia, kuten esim. torjunta-aineiden vähentynyt käyttö tai maanmuokkaukseen tarpeen (ja siten myös eroosion) väheneminen. Muita ympäristön kannalta edullisia vaikutuksia voi olla myös tarvittavan viljelyalan pieneneminen, mikäli kasvi tuottaa aikaisempaa paremman sadon siihen siirretyn ominaisuuden seurauksena tai aavikoitumisen hidastuminen kiuuden- ja/tai suolankestävien GM-kasvien viljelyllä.

GM-kasvien mahdolliset haitalliset ympäristövaikutukset riippuvat sekä siirretystä ominaisuudesta että kasvilajista, johon uusi ominaisuus on siirretty, ja lisäksi ympäröivistä olosuhteista. GM-kasvien käytössä perinteiseen viljelyyn verrattuna on uutta se, että kasvissa voi olla täysin uusi, toisesta organismista peräisin oleva ominaisuus. Uusi geeni voi vaikuttaa uudessa geneettisessä ympäristössä arvaamattomalla tavalla, esim. vaikuttamalla haitallisesti eliöiden väliseen geneettiseen vuorovaikutukseen. Esim. siirretyllä taudinkestävyysominaisuudella saattaa olla merkittäviäkin ympäristövaikutuksia. Riskinarvioinnissa keskitytään niihin seikkoihin, jotka erottavat GM-kasvin vastaavasta muuntamattomasta kasvista. Alustava arvio siitä, onko siirretty/muutettu ominaisuus vaikuttanut jollakin tavalla esim. kasvin kelpoisuuteen, saadaan yksinkertaisesti vertailemalla GM-kasvin ja muuntamattoman verrokin kasvu- ja lisääntymisominaisuuksia kasvihuoneolosuhteissa ja myöhemmin (mahdollisesti) kenttäkokeissa. Tässä raportissa on käsitelty seuraavia kirjallisuudessa yleisimmin mainittuja ympäristövaikutuksia, sekä niiden tutkimusmenetelmiä:

1. Parantunut leviämiskyky (invaasiokyky)

Invaasiokyvyllä tarkoitetaan kasvin kykyä runsastua ja levitä uusille alueille mahdollisesti alkuperäisten kasvien kustannuksella. Ominaisuudet, jotka aiheuttavat muutoksia esim. kasvin siemenissä (koossa, painossa, muodossa) tai taudinkestävyydessä voivat vaikuttaa kasvin kelpoisuuteen ja siten myös invaasiokykyyn. Suurin osa viljelykasveista on kuitenkin niin pitkälle jalostettuja, että ne tuskin muuntogeenisinäkään leviäisivät ympäröivään luontoon. Suomessa mahdollisesti rypsi, rapsi sekä jotkut metsäpuut voivat osoittautua helposti leviäviksi.

Leviämiskyvyn muutoksista saadaan tietoa vertailemalla GM-kasvin ja muuntamattoman verrokin siementen ominaisuuksia (koko, määrä, leviämismatka), stressinsietoa, kasvin kokoa ja kasvuominaisuuksia, lisääntymiskiertoa ja kilpailukykyä.

2. Geenivirta

Geenien siirtymistä kasvista toiseen ristipölytyksen avulla sanotaan vertikaaliseksi geeninsiirtymiseksi. Horisontaalinen geeninsiirtyminen taas on geneettisen materiaalin siirtymistä sellaisten organismien välillä, jotka eivät pysty lisääntymään keskenään suvullisesti.

Introgressio

Siirtogeenin mahdollinen introgressio (esim. herbisidiä tai kuivuutta kestävästä) GM-viljelykasvista hyvän dormanssikyvyn omaavaan luonnonvaraiseen kasviin on herättänyt huolta uusien, kestävämpien rikkakasvikantojen syntymisestä ja lajien geneettisestä köyhtymisestä. Viljelykasveista luonnonvaraisiin populaatioihin kohdistuva geenivirta saattaa olla merkittävä kasvien evoluutioon vaikuttava tekijä ja voi johtaa jopa harvinaisten lajien häviämiseen. Lajinsisäistä geenivirtaa muuntamattomistakin viljelykasveista niiden luonnonvaraisiin kantoihin ja lähisukulaisiin tapahtuu kuitenkin jatkuvasti. Herbisidien käyttö itsessäänkin saa aikaan resistenttejä kasveja, eikä herbisidikestävyyden siirtymisellä GM-kasveista niiden luonnonvaraisiin kantoihin tai sukulaisiin ole kilpailuetua lisäävää vaikutusta oloissa, joissa herbisidejä ei käytetä. Useimmat tärkeät viljelykasvit eivät Suomessa metsäpuita lukuunottamatta pysty leviämään ja muodostamaan luonnonpopulaatioita tai hybridejä kotimaisten sukulaisten kanssa. Poikkeuksia tästä ovat kuitenkin mm. jotkut ristikukkaiset (*Brassicaceae*) ja jotkut metsäpuut. Lisäksi Suomessa kehiteltyjä GM-kasveja (puita ja ehkä joitakin marjoja lukuunottamatta) tuskin tullaan siirtämään lajien leviämiskeskukseen, sillä suomalaiset kasvit on jalostettu kestäväksi nimenomaan tärkeitä pohjoisia olosuhteita. Siirtogeenien introgression mahdollisuutta GM-kasveista luonnonvaraisiin kasveihin tutkittaessa olisi kiinnitettävä huomiota ominaisuuksiin, jotka vaikuttavat kasvin leviämiskykyyn ja siementen dormanssikykyyn. Introgressiomahdollisuuteen vaikuttavat mm. risteytymiskykyisten kasvien läheisyys, siitepölyn kilpailukyky ja leviämismatka, sekä siementen säilyvyys (siemenvälitteinen geenivirta). Introgression laajuutta ja seurauksia tutkittaessa voidaan hyödyntää esim. ekologisia mallinnusta ja mahdollisesti kaukokartoitusmenetelmiä.

Horisontaalinen geenin siirtyminen (HGT)

Siirtogeeniä (esim. antibioottiresistenssigeenejä) voi periaatteessa siirtyä GM-kasveista myös muihin organismeihin, esim. maaperän bakteereihin tai patogeenisiin bakteereihin tai sieniin, tai peräti viruksiin. Vieraan DNA:n integroitumiselle bakteerin genomiin on kuitenkin biologisia esteitä. Lisäk-

si aitotumallisten eliöiden geeneissä olevat intronit estävät kyseisten geenien ilmentymisen alkeistumallisissa soluissa. Siirtyneellä geenillä pitäisi lisäksi olla valintaetua lisääviä ominaisuuksia, jotta sen omaavien bakteerien osuus populaatiossa lisääntyisi. Toisaalta esim. sienet ovat aitotumallisia kuten GM-kasvitkin, joten niissä geenin ilmentyminen siirtymisen jälkeen voi olla todennäköisempää kuin bakteereissa. Useiden tutkijoiden mukaan siirtogeenisen vapaan DNA:n osuus verrattuna totaaliseen vapaan DNA:n määrään luonnossa on niin pieni, että sen vaikutukset ovat jokseenkin merkityksettömiä. On kuitenkin mahdollista, että tulevaisuudessa kasvien geeniteknisessä muuntamisessa käytetään muutettuja tai kokonaan uudenlaisia geenejä, tai geenejä, jotka ovat peräisin täysin toisenlaisista ekosysteemeistä kuin se ekosysteemi, jossa muunnettua kasvia kasvatetaan. Tällöin uuden geenin aiheuttamalla ominaisuudella saattaa ilmetä arvaamattomia ympäristövaikutuksia. Horisontaalisen geenien siirtymisen tutkimiseen voidaan käyttää kokeellisia laboratoriomenetelmiä tai fylogeniomenetelmää, joka sopii historiallisten HGT-tapahtumien yleisyyden kartoittamiseen.

3. Vaikutukset muihin kuin kohdeorganismeihin

Siirretyillä torjuntaominaisuuksilla voi olla vaikutuksia myös muihin kuin kohde-eliöihin (nontarget effects), eli sellaisiin viljelykasvin ohessa eläviin eliöihin, jotka eivät aiheuta merkittäviä tuhoja viljelyksellä (esim. saalistajat, loiset, pölyttäjät tai maaperän mikrobit). Vaikutukset voivat olla suoria, esim. tiettyä hyönteistä vastaan tarkoitettu Bt-toksiini voi vaikuttaa muihin kuin kohde-eläimiin toksisesti tai vaikutus voi kohdistua maaperän mikroorganismeihin. Vaikutukset voivat olla myös välillisiä, esim. herbisidikestävän GM-kasvin viljelyn yhteydessä muuttuneet herbisidikäsitteilyt voivat vaikuttaa koko ekosysteemiin. Tietoa vaikutuksista maaperän eliöihin saadaan mikrobien määrän, aktiivisuuden ja yhdyskuntarakenteen tutkimuksilla. Vaikutuksista eläimiin saadaan tietoa esim. syöttökokeilla ja ns. mesokosmosjärjestelyillä, joissa on mukana useampia eliöitä.

4. Ennustamattomat vaikutukset

GM-kasvia viljeltäessä voi ilmetä odottamattomia vaikutuksia. Odottamattomat vaikutukset tulevat todennäköisimmin ilmi seurantatutkimuksissa ja pitkän ajan kuluessa. Ennalta arvaamattomia vaikutuksia voi syntyä esim. siirtogeenien pleiotrooppisista ominaisuuksista (eli siirtogeeni vaikuttaakin muihinkin kuin haluttuun ominaisuuteen). Lisäksi siirtogeenit voivat sijoittua genomissa satunnaisesti estäen siten jonkin tärkeän geenin toiminnan. Vaihtoehtoisesti siirtogeenit voivat asettua jonkin erittäin aktiivisen säätelyalueen viereen ja ilmentyä aiottua enemmän. Ennakoimattomat vaikutukset ovat luultavasti sellaisia, että ne ilmenevät muiden tutkimusten yhteydessä tai esim. seurannan aikana.

GM-kasveilla voi olla erilainen vaste erilaisissa ympäristöissä, esim. erilaisista stressitekijöistä riippuen. Vaikka tiettyä GM-kasvia olisikin tutkittu jossain tietyssä ympäristössä, ei ole varmaa, että tulokset päisivät muualla, esim. muissa maissa viljeltäessä. Erityisesti pitkäaikaisten tai viipeellä ilmenevien ympäristövaikutusten selvittämiseen tarvitaan laajoja, pitkäaikaisia ja tapauskohtaisia tutkimuksia.

GM-kasvien viljelyn haitallisia ympäristövaikutuksia voidaan ennakoida ja mahdollisesti vähentää seurannan ja riskien hallinnan avulla. Seuranta on sellaisten ympäristövaikutusten tarkastelua, jotka on tunnistettu GMO:ien riskinarvioinnissa tai tuntemattomien vaikutusten seuraamista. Vaikka seuranta on luultavasti kallista, aikaa vievää ja menetit vielä suurelta osin

määrittelemättä, se voi kuitenkin olla ainoa keino saada tietoa esim. riskinarvioinnissa esitetyistä ympäristövaikutuksista, sekä tunnistamattomista ja ennustamattomista vaikutuksista. Riskien hallinnan tarkoituksena on minimoida haittavaikutusten todennäköisyys. Esimerkiksi GM-kasvin viljely alueella, josta lähisukuiset lajit puuttuvat, ehkäisee tehokkaasti siirtogeenien leviämisen ympäristöön introgression kautta.

Lähteet

- Aaziz, R. & Tepfer, M. 1999. Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants. *J. Gen. Vir.* 80: 1339-1346.
- Adams, W. T., Griffin, A. R. & Moran, G. F. 1992. Using paternity analysis to measure effective pollen dispersal in plant populations. *Am. Nat.* 139: 762-780.
- Aerts, R., de Caluwe, H. & Beltman, B. 2003. Plant community mediated vs. nutritional controls on litter decomposition rates in grasslands. *Ecology* 84: 3198-3208.
- Aga, E., Bryngelsson, T., Bekele, E. & Salomon, B. 2003. Genetic diversity of forest arabica coffee (*Coffea arabica* L.) in Ethiopia as revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Hereditas* 138:36-46.
- Agarwal, A. R., Gahlot, A., Verma, R. & Rao, P. B. 2002. Effect of weed extracts on seedling growth of some varieties of wheat. *J. Environ. Biol.* 23:19-23.
- Ahrenholtz, I., Harms, K., de Vries, J. & Wackernagel, W. 2000. Increased killing of *Bacillus subtilis* on the hair roots of transgenic T4 lysozyme-producing potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1862-1865.
- Aikio, S., Ranta, E., Kaitala, V. & Lundberg, P. 2002. Seed bank in annuals: competition between banker and non-banker morphs. *J. Theor. Biol.* 217: 341-349.
- Akimoto, M., Shimamoto, Y. & Morishima, H. 1999. The extinction of genetic resources of Asian wild rice, *Oryza rufipogon* Griff.: a case study in Thailand. *Genet. Resource Crop Evol.* 46: 419-425.
- Alla, S., Cherqui, A., Kaiser, L., Azzouz, H., Sangwan-Norreel, P. S. & Giordanengo, P. 2003. Effects of potato plants expressing the *nptII-gus* fusion marker genes on reproduction, longevity, and host-finding of the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 106: 95-102.
- Aliotta, G., Cafiero, G., Fiorentino, A. & Strumia, S. 1993. Inhibition of radish germination and root growth by coumarin and phenylpropanoids. *J. Chem. Ecol.* 19: 175-183.
- Al Mazayad, P.R & Ammann, K. 1999. Biogeographical assay and natural gene flow. In: K. Amman, Y. Jacot, V. Simonsen & G. Kjellsson (toim.): *Methods for Risk Assessment of Transgenic Plants III: Ecological risks and prospects of transgenic plants.* Birkhäuser Verlag/Switzerland 95-98 s.
- Altschul, S. F., Madden T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J. Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Andersen, M. C. 1993. Diaspore morphology and seed dispersal in several wind-dispersed *Asteraceae*. *Am. J. Bot.* 80: 487-492.
- Argyès, A. Z. & Schmitt, J. 1991. Microgeographic genetic structure of morphological and life history traits in a natural population of *Impatiens capensis*. *Evolution* 45: 178-189.
- Arias, D. M. & Rieseberg, L. H. 1994. Gene flow between cultivated and wild sunflowers. *Theor. Appl. Genet.* 89: 655-660.
- Arnaud, J. F., Viard, F., Delescluse, M. & Cuguen, J. 2003. Evidence for gene flow via seed dispersal from crop to wild relatives in *Beta vulgaris* (Chenopodiaceae): consequences for the release of genetically modified crop species with weedy lineages. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270: 1565-1571.
- Arnold, A. J. 1994. Insect suction sampling without nets, bags or filters. *Crop Protection* 13: 73-76.
- Arriola, P. E. & Ellstrand, N. C. 1996. Crop-to-weed gene flow in the genus *Sorghum* (Poaceae): spontaneous interspecific hybridization between johnsongrass, *Sorghum halepense*, and crop sorghum, *S. bicolor*. *Am. J. Bot.* 83: 1153-1160.
- Ashouri A., Overney S., Michaud D., Cloutier C., 1998 Fitness and feeding are affected in the two-spotted stinkbug *Perillus bioculatus*, by the cysteine proteinase inhibitor, oryzacystatin I. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 38: 74-83
- Asmussen, C. B. 1993. Pollination biology of the sea pea, *Lathyrus japonicus*: Floral characters and activity and flight patterns of bumblebees. *Flora* 188: 227-237.
- Auld, B. A. & Coote, B. A. 1990. Invade: Towards the simulation of plant spread. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 30: 121-128.

- Awasthi, A. K., Nagaraja, G., Naik, G., Kanginakudru, S., Thangavelu, K. & Nagaraju, J. 2004. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. *BMC Genetics* 5: 1-9.
- Bagley, M. J., Medrano, J. F. & Gall, G. A. E. 1997. Polymorphic molecular markers from anonymous nuclear DNA for genetic analysis of populations. *Mol. Ecol.* 6: 309-320.
- Bais, H. P., Vepachedu, R., Gilroy, S., Callaway, R. M. & Vivanco, J. M. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science* 301: 1377.
- Baker, R. J. 1988. Analysis of genotype-environmental interactions in crops. *Ici. Atlas Sci. Anim. Plant Sci.* 1: 1-4.
- Baker, M. E. 1998. Evolution of mammalian 11 beta- and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases- type 2 and retinol dehydrogenases from ancestors in *Caenorhabditis elegans* and evidence for horizontal transfer of a eukaryote dehydrogenase to *E. coli*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 66: 355-363.
- Baldo, A. M. & McClure, M. A. 1999. Evolutionary History of the dUTPase Enzyme: Horizontal Exchange between Viral Pathogens and Their Hosts, *J. Virol.* 73: 7710-7721.
- Baldwin, I. T. 2003. Finally, proof of weapons of mass destruction. *Science* 203: 42.
- Ballegaard, T. K. & Warncke, E. 1985. Observations on autotoxic effects on seed germination and seedling growth in *Cirsium palustre* from a spring area in Jutland, Denmark. *Holarct. Ecol.* 8: 63-65.
- Banaszak, J. 1980. Studies on methods of censusing the numbers of bees (Hymenoptera, Apoidea). *Polish Ecol. Stud.* 6: 355-366.
- Bandelt, H., Forster, P. & Rohl, A. 1999. Median joining networks for inferring intraspecific relationships. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-48.
- Banilas, G., Minas, J., Gregoriou, C., Demoliou, C., Kourti, A. & Hatzopoulos, P. 2003. Genetic diversity among accessions of an ancient olive variety of Cyprus. *Genome* 46: 370-376.
- Bartsch, D. & Ellstrand, N. C. 1999. Genetic evidence for the origin of Californian wild beets (genus *Beta*). *Theor. Appl. Genet.* 99: 1120 – 1130.
- Bartsch, D., Lehnen, M., Clegg, J., Pohl-Orf, M., Schuphan, I. & Ellstrand, C. 1999. Impact of gene flow from cultivated beet on genetic diversity of wild sea beet populations. *Mol. Ecol.* 8: 1733-1741.
- Baskin, J. M. & Baskin, C. C. 1986. Temperature requirements for after-ripening in seeds of nine winter annuals. *Weed Res.* 26: 375-380.
- Baskin, J. M. & Baskin, C. C. 1990a. The role of light and alternating temperatures on germination of *Polygonum aviculare* seeds exhumed on various dates. *Weed Res.* 30: 397-402.
- Baskin, J. M. & Baskin, C. C. 1990b. Seed germination ecology of poison hemlock (*Conium maculatum*). *Can. J. Bot.* 68: 2018-2024.
- Batschelet, E. 1981. *Circular Statistics in Biology*. Academic Press, New York. 371 p.
- Bauer, S., Berger, U., Hildenbrandt, H. & Grimm, V. 2002. Cyclic dynamics in simulated plant populations. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 269: 2443-2450.
- Baulcombe, D.C., English, J.J., Mueller, E. & Davenport, G. 1996. Gene silencing and virus resistance in transgenic plants. *Teoksessa: Mechanisms and applications of gene silencing*. D. Grierson, G. W. Lycett, and G. A. Tucker, (toim.). Nottingham: Nottingham University Press, s. 127-138.
- Belsky, A. J. 1992. Effects of grazing, competition, disturbance and fire on species composition and diversity in grassland communities. *J. Veg. Sci.* 3: 187-200.
- Benoit, D. L., Kenkel, N. C. & Cavers, P. B. 1989. Factors influencing the precision of soil seed bank estimates. *Can. J. Bot.* 67: 2833-2840.
- Bergelson, J. 1994. Changes in fecundity do not predict invasiveness: a model study of transgenic plants. *Ecology*: 249-252.
- Bergelson, J., Purrington, C. B., Palm, C. J. & Lopez-Gutierrez, J. C. 1996. Costs of resistance: a test using transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 263:1659-1663.
- Bergelson, J., Purrington, C. B. & Wichmann, G. 1998. Promiscuity in transgenic plants. *Nature* 395: 25.
- Berghthorsson, U., Adams, K. L., Thomason, B. & Palmer, J. D. 2003. Widespread horizontal transfer of mitochondrial genes in flowering plants. *Nature* 424: 197-201.

- Beringer, J. E. 2003. Horizontal gene flow. In: Amman, K., Jacot, Y. & Braun, R. Methods for risk assessment of transgenic plants IV. Biodiversity and biotechnology. 2003 Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland. 1-177 s.
- Bertin, C., Paul, R. N., Duke, S. O. & Weston, L. A. 2003. Laboratory assessment of the allelopathic effects of fine leaf fescues. *J. Chem. Ecol.* 29:1919-1937.
- Bertolla, F. & Simonet, P. 1999. Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms. *Res. Microbiol.* 150: 375-384.
- Best, L. S. & Bierzychudek, P. 1982. Pollinator foraging on foxglove (*Digitalis purpurea* L): A test of a new model. *Evolution* 36: 70-79.
- Bevan, M. W., Flavell, R. B. & Chilton, M. D. 1983. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304: 184-187.
- Bigwood, D. W. & Inouye, D. W. 1988. Spatial pattern analysis of seed banks: an improved method and optimized sampling. *Ecology* 69: 497-507.
- Björklöf, K., Suoniemi, A., Haahtela, K. & Romantschuck, M. 1995. High frequency of conjugation versus plasmid segregation of RP1 in epiphytic *Pseudomonas syringae* populations. *Microbiology* 141: 2719-2727.
- Blum, U., Gerig, T. M., Worsham, A. D., Holappa, L. D. & King, L. D. 1992. Allelopathic activity in wheat-conventional and wheat-no-till soils – development of soil extract bioassays. *J. Chem. Ecol.* 18: 2191-2221.
- Bouchard, E., Cloutier, C. & Michaud, D. 2003a. Oryzacystatin I expressed in transgenic potato induces digestive compensation in an insect natural predator via its herbivorous prey feeding on the plant. *Mol. Ecol.* 12: 2439-2446.
- Bouchard, E., Michaud, D. & Cloutier, C. 2003b. Molecular interactions between an insect predator and its herbivore prey on transgenic potato expressing a cysteine protease inhibitor from rice. *Mol. Ecol.* 12: 2429-2437.
- Boudry, P., Mörchen, M., Saumitou-Laprade, P., Vernet, P. & Van Dijk, H. 1993. The origin and evolution of weed beets: consequences for the breeding and release of herbicide-resistant transgenic sugar beets. *Theor. Appl. Genet.* 87: 471-478.
- Boury, S., Lutz, I., Gavalda, M. C., Guidet, F. & Schlessler, A. 1992. Genetic fingerprinting in cauliflower by the RAPD method and determination of the level of inbreeding in a set of F1 hybrid seeds. *Agronomie* 12: 669-681.
- Brandt, P. 2003. Overview of the current status of genetically modified plants in Europe as compared to the USA. *J. Plant Physiol.* 160: 735-742.
- Bremer, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics* 10: 295-304.
- Brennan, A. C., Harris, S. A. & Hiscock, S. J. 2003. Population genetics of sporophytic self-incompatibility in *Senecio squalidus* L. (Asteraceae) II: a spatial autocorrelation approach to determining mating behaviour in the presence of low S allele diversity. *Heredity* 91: 502-509.
- Brewster, J. L. & Sutherland, R. A. 1993. The rapid determination in controlled environments of parameters for predicting seedling growth rates in natural conditions. *Ann. Appl. Biol.* 122: 123-133.
- Briske, D. D. & Butler, J. L. 1989. Density-dependent regulation of ramet populations within the bunchgrass (*Schizachyrium scoparium*): interclonal versus intraclonal interference. *J. Ecol.* 77: 963-974.
- Brodsgaard, H. F., Brodsgaard, C. J., Hansen, H. & Lovei, G. L. 2003. Environmental risk assessment of transgene products using honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *Apidologie* 34: 139-145.
- Brooks, D. R., Bohan, D. A., Champion, G. T., Haughton, A. J., Hawes, C., Heard, M. S., Clark, S. J., Dewar, A. M., Firbank, L. G., Perry, J. N., Rothery, P., Scott, R. J., Woiwod, I. P., Birchall, C., Skellern, M. P., Walker, J. H., Baker, P., Bell, D., Browne, E. L., Dewar, A. J. G., Fairfax, C. M., Garner, B. H., Haylock, L. A., Horne, S. L., Hulmes, S. E., Mason, N. S., Norton, L. R., Nuttall, P., Randle, Z., Rossall, M. J., Sands, R. J. N., Singer, E. J. & Walker, M. J. 2003. Invertebrate responses to the management of genetically modified herbicide-tolerant and conventional spring crops. I. Soil-surface-active invertebrates. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 358: 1847-1862.
- Brown, V. K. & Gange, A. C. 1989. Differential effects of above- and below- ground insect herbivory during early plant succession. *Oikos* 54: 67-76.

- Brown, A. H. D., Clegg, M. T., Kahler, A. L. & Weir, B. S. 1990. Plant population genetics, breeding, and genetic resources. Sinauer Associates, Sunderland. 449 s.
- Broyles, S. B. 2002. Hybrid bridges to gene flow: a case study in milkweeds (*Asclepias*). *Evolution* 56: 1943-1953.
- Bruinsma, M., Kowalchuk, G. A., van Veen, J. A. 2003. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. *Biology and Fertility of Soils* 37: 329-337.
- Buades, C. & A. Moya. 1996. Phylogenetic analysis of the isopenicillin-N-synthetase horizontal gene transfer. *J. Mol. Evol.* 42: 537-542.
- Bucchini, L. & Goldman, L. R. 2002. Starlink corn: a risk analysis. *Environ. Health Perspect.* 110: 5-13.
- Buhariwalla, H. & Mithen, R. 1995. Cloning of a Brassica repetitive DNA element from resting spores of *Plasmidiophora brassicae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 47: 95-101.
- Bults, G., Horwitz, B. A., Malkin, S. & Cahen, D. 1982. Photoacoustic measurements of photosynthetic activities in whole leaves. *Photochemistry and gas exchange. Biochim. Biophys. Acta* 679: 452-465.
- Burdon, J. J., Marshall, D. R. & Brown, H. D. 1983. Demographic and genetic changes in populations of *Echium plantagineum*. *J. Ecol.* 71: 667-679.
- Burdon, J. J. & Thrall, P.H. 2003. The fitness costs to plants of resistance to pathogens. *Genome Biol.* 4: 227.
- Cabello, M. & Arambarri, A. 2002. Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* forests in the eastern Buenos Aires province (Argentina). *Microbiol. Res.* 157: 115-125.
- Cain, M. L., Pacala, S. W. & Silander, J. A. 1991. Stochastic simulation of clonal growth in the tall goldenrod (*Solidago altissima*). *Oecologia* 88: 477-485.
- Callaghan, T. V., Svensson, B. M., Bowman, H., Lindley, D. K. & Carlsson, B. Å. 1990. Models of plant growth based on population dynamics and architecture. *Oikos* 57: 257-269.
- Campbell, D. R., Waser, N. M. and Pederson, G. T. 2002. Predicting patterns of mating and potential hybridization from pollinator behavior. *Am. Naturalist* 159: 438-450.
- Cannas, S. A., Marco, D. E. & Paez, S. A. 2003. Modelling biological invasions: species traits, species interactions, and habitat heterogeneity. *Math. Biosci.* 183: 93-110.
- Caprio, M. A. & Suckling, D. M. 2000. Simulating the impact of cross resistance between Bt toxins in transformed clover and apples in New Zealand. *J. Econ. Entomol.* 93:173-179.
- Carney, S. E., Cruzan, M. B. & Arnold, M. L. 1994. Reproductive interactions between hybridizing irises: Analyses of pollen-tube growth and fertilization success. *Am. J. Bot.* 81: 1169-1175.
- Carré, S., Badenhauer, I., Taséi, J. N., le Guen, J. & Mesquida, J. 1994. Pollen deposition by *Bombus terrestris* L., between male-fertile and male-sterile plants in *Vicia faba* L. *Apidologie* 25: 338-349.
- Caruso, C. M. 1999. Pollination of *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae): effects of intra- vs. interspecific competition. *Am. J. Bot.* 86: 663.
- Champion, G. T., May, M. J., Bennett, S., Brooks, D. R., Clark, S. J., Daniels, R. E., Firbank, L. G., Houghton, A. J., Hawes, C., Heard, M. S., Perry, J. N., Randle, Z., Rossall, M. J., Rothery, P., Skellern, M. P., Scott, R. J., Squire, G. R. & Thomas, M. P. 2003. Crop management and agronomic context of the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 358: 1801-1818.
- Chen, X. & Li, B. L. 2003. Effect of global climate change and human disturbances on tree diversity of the forest regenerating from clear-cuts of mixed broadleaved Korean pine forest in Northeast China. *Chemosphere* 51: 215-226.
- Cherqui, A., Alla, S., Saguez, J., Doury, G., Sangwan-Norreel, B. S., Giordanengo, P. 2003. Probiotic effects of beta-glucuronidase on the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Aphididae). *J. Insect Physiol.* 49: 1199-1209.
- Chèvre, A. M., Eber, F., Darmency, H., Fleury, A., Pickault, H., Letanneur, J. C. & Renard, M. 2000. Assessment of interspecific hybridization between transgenic oilseed rape and wild radish under normal agronomic conditions. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1233-1239.
- Chilcutt, C. F. & Tabashnick, B. E. 2004. Contamination of refuges by *Bacillus thuringiensis* toxin genes from transgenic maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 20: 7526-7529.

- Choe, H. S., Chu, C., Koch, G., Gorham, J. & Mooney, H. A. 1988. Seed weight and seed resources in relation to plant growth rate. *Oecologia* 76: 158-159.
- Collins, S. L. & Good, R. E. 1987. The seedling regeneration niche: habitat structure of tree seedlings in an oak-pine forest. *Oikos* 48: 89-98.
- Conner, A. J., Glare, T. R. & Nap, J. P. 2003. The release of genetically modified crops into the environment. Part II. Overview of ecological risk assessment. *Plant J.* 33: 19-46.
- Cowgill, S. E., Bardgett, R. D., Kiezebrink, D. T. & Atkinson, H. J. 2002. The effect of transgenic nematode resistance on non-target organisms in the potato rhizosphere. *J. Appl. Ecol.* 39: 915-923.
- Cowgill, S. E. & Atkinson, H. J. 2003. A sequential approach to risk assessment of transgenic plants expressing protease inhibitors: effects on nontarget herbivorous insects. *Transgenic Res.* 12: 439-449.
- Cowgill, S. E., Danks, C. & Atkinson, H. J. 2004. Multitrophic interactions involving genetically modified potatoes, nontarget aphids, natural enemies and hyperparasitoides. *Mol. Ecol.* 13: 639-647.
- Cox, G. W. 1987. Nearest-neighbour relationships of overlapping circles and the dispersion pattern of desert shrubs. *J. Ecol.* 75: 193-199.
- Crawley, M. J., Hails, R. S., Rees, M., Kohn, D. & Buxton, J. 1993. Ecology of transgenic oilseed rape in natural habitats. *Nature* 363: 620-623.
- Crawley, M.J., Brown, S.L., Hails, R.S., Kohn,D.D. & Rees, M. 2001. Transgenic crops in natural habitats. *Nature* 409, 682-683.
- Crecchio, C. & Stotzky, G. 2001. Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound on complexes of montmorillonite-humic acids- α 1 hydroxypolymers. *Soil Biol. Biochem.* 33: 573 - 581.
- Cruzan, M. B. 1990. Variation in pollen size, fertilization ability, and postfertilization siring ability in *Erythronium grandiflorum*. *Evolution* 44: 843-856.
- Dafni, A. 1992. Pollination ecology. A practical approach. IRL Press at Oxford University Press, Oxford. 250 s.
- Dale, E. C. & Ow, D. W. 1991. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10558-10562.
- Dale, P. J. 1994. The impact of hybrids between genetically modified crop plants and their related species: general considerations. *Mol. Ecol.* 3: 31-36.
- Dale, P. J., Clarke, B., Fontes, E. M. 2002. Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nature Biotech.* 20: 843.
- Dalrymple, R. L. & Rogers, J. L. 1983. Allelopathic effects of western ragweed on seed germination and seedling growth of selected plants. *J. Chem. Ecol.* 9: 1073-1078.
- Damgaard, C. & Løkke, H. 2001. A critique of the "concept of familiarity" as used in ecological risk assessments of genetically modified plants. *BioSafety J.* 6. Online Journal - URL: <http://www.bioline.org.br/by>.
- Damgaard, C. 2004. Dynamics in a discrete two-species competition model: coexistence and over-compensation. *J. Theor. Biol.* 227: 197-203.
- Daniell, H. 2002. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nature Biotech.* 20: 581-586.
- Darmency, H., Lefol, E. & Fleury, A. 1998. Spontaneous hybridizations between oilseed rapes and wild radish. *Mol. Ecol.* 7: 1467-1473.
- de Kathen, A. 1996. The impact of transgenic crop releases on biodiversity in developing countries. *Biotechnol. Dev. Monit.* 28: 10-14.
- de Kroon, H., Plaisier, A. & van Groenendael, J. 1987. Density dependent simulation of the population dynamics of a perennial grassland species, *Hypochoeris radicata*. *Oikos* 50: 3-12.
- Demaneche, S., Bertolla, F., Buret, F., Nalin, R., Sailland, A., Auriol, P., Vogel, T. M. & Simonet, P. 2001. Laboratory-scale evidence for lightning-mediated gene transfer in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3440-3444.
- de Marchis, F., Bellucci, M. & Arcioni, S. 2003. Measuring gene flow from two birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) field trials using transgenes as tracer markers. *Mol. Ecol.* 12: 1681-1685.
- DeRisi, J., Penland, L., Brown, P. O., Bittner, M. L., Meltzer, P. S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y. A. & Trent, J. M. 1996. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genet.* 14: 457-460.

- Dessaint, F., Chadoeuf, R. & Barralis, G. 1991. Spatial pattern analysis of weed seeds in the cultivated seed bank. *J. Appl. Ecol.* 28: 721-730.
- De Turck, S., Giordanengo, P., Cherqui, A., Ducrocq-Assaf, C. & Sangwan-Norreel, B. S. 2002. Transgenic potato plants expressing the *nptII-gus* marker genes affect survival and development of the Colorado potato beetle. *Plant Sci.* 162: 373-380.
- Devey, M. E., Groom, K. A., Nolan, M. F., Bell, J. C., Dudzinski, M. J., Old, K. M., Matheson, A. C. & Moran, G. F. 2004. Detection and verification of quantitative trait loci for resistance to *Dothistroma* needle blight in *Pinus radiata*. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1056-1063.
- de Vries, J. & Wackernagel, W. 1998. Detection of *nptII* (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. *Mol. Gen. Genet.* 257: 606-613.
- de Vries, J., Meier, P. & Wackernagel, W. 2001. The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp. by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 195: 211-215.
- de Vries, J., Heine, M., Harms, K. & Wackernagel, W. 2003. Spread of recombinant DNA by roots and pollen of transgenic potato plants, identified by highly specific biomonitoring using natural transformation of an *Acinetobacter* sp. *Appl. Env. Microbiol.* 69: 4455-4462.
- D'Halluin, K. D., Block, M., Denecke, J., Janssens, J., Leemans, J., Reynaerts, A. & Botterman, J. 1992. The *bar* gene as a selectable and screenable marker in plant engineering. *Methods Enz.* 216: 415-426.
- Dogan, E. B., Berry, R. E., Reed, G. & Rossignol, P. A. 1996. Biological parameters of convergent lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) feeding on aphids (Homoptera: Aphidae) on transgenic potato. *J. Econ. Entomol.* 89: 1105-1108.
- Donegan, K. K., Palm, C. J., Fieland, V. J., Porteous, L. A., Ganio, L. M., Schaller, D. L., Bucao, L. Q. & Seidler, R. J. 1995. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. *Appl. Soil Ecol.* 2:111-124.
- Donegan, K.K. & Seidler, R. J. 1999. Effects of transgenic plants on soil and plant microorganisms. *Recent Res. Devel. Microbiol.* 3: 415-424.
- Dorken, M. E. & Barrett, S. C. 2003. Life-history differentiation and the maintenance of monoecy and dioecy in *Sagittaria latifolia* (Alismataceae). *Evolution* 57: 1973-1988.
- Doust, L. L. & Doust, J. L. 1987. Leaf demography and clonal growth in female and male *Rumex acetosella*. *Ecology* 68: 2056-2058.
- Down, R. E., Ford, L., Woodhouse, S. D., Davison, G. M., Majerus, M. E., Gatehouse, J. A. & Gatehouse, A. M. 2003. Tritrophic interactions between transgenic potato expressing snowdrop lectin (GNA), an aphid pest (peach-potato aphid; *Myzus persicae* (Sulz.) and a beneficial predator (2-spot ladybird; *Adalia bipunctata* L.). *Transgenic Res.* 12: 229-241.
- Doyle, J. J. & Gaut, B. S. 2000. Evolution of genes and taxa: a primer. *Plant Mol. Biol.* 42: 1-23.
- Dröge, M., Püchler, A. & Selbitschka, W. 1998. Horizontal gene transfer as a biosafety issue: A natural phenomenon of public concern. *J. Biotech.* 64: 75-90.
- Duan, J. J., Head, G., McKee, M. J., Nickson, T. E., Martin, J. W. & Sayegh, F. S. 2002. Evaluation of dietary effects of transgenic corn pollen expressing Cry3Bb1 protein on a non-target ladybird beetle, *Coleomegilla maculata*. *Entom. Exp. Appl.* 104: 271-280.
- Duan, J. J., Head, G., Jensen, A. & Reed, G. 2004. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* potato and conventional insecticides for Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) management on the abundance of ground-dwelling arthropods in Oregon potato ecosystems. *Environ. Entomol.* 33: 275-281.
- Duggan, PS, Chambers PA, Heritage J, Michael Forbes J. 2003. Fate of genetically modified maize DNA in the oral cavity and rumen of sheep. *Br. J. Nutr.* 89: 159-166.
- Dunfield, K. E. & Germida, J. J. 2001. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38: 1-9.
- Dunfield, K. E. & Germida, J. J. 2003. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7310-7318.

- Dutton, A., Klein, H., Romeis, J. & Bigler, F. 2002. Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. *Ecol. Entomol.* 27: 441-447.
- Dutton, A., Klein, H., Romeis, J. & Bigler, F. 2003a. Prey-mediated effects of *Bacillus thuringiensis* spray on the predator *Chrysoperla carnea* in maize. *Biological Control* 26: 209-216.
- Dutton, A., Romeis, J. & Bigler, F. 2003b. Assessing the risks of insect resistant transgenic plants on entomophagous arthropods: Bt-maize expressing Cry1Ab as a case study. *Biocontrol* 48: 611-636.
- Dyer, R. J., Westfall, R. D., Sork, V. L. & Smouse, P. E. 2004. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape V: a stepwise approach for extracting factors contributing to pollen structure. *Heredity* 92: 204-211.
- Eber, F., Lettanneur, J. C. & Chevre, A. M. 1997. Chromosome number of oilseed rape (*Brassica napus* L.) – wild radish (*Raphanus raphanistrum*) spontaneous hybrids and of their progeny estimated by flow cytometry. *Cruciferae Newsletter* 19: 17-18.
- Ebinuma, H., Sugita, K., Matsunaga, E. & Yamakado, M. 1997. Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 2117-2121.
- Eckert, C. G. & Barrett, S. C. H. 1994. Inbreeding depression in partially self-fertilizing *Decodon verticillatus* (Lythraceae): Population genetic and experimental analyses. *Evolution* 48: 952-964.
- Eckhart, V. M. 1992. The genetics of gender and the effects of gender on floral characters in gynodioecious *Phacelia linearis* (Hydrophyllaceae). *Am. J. Bot.* 79: 792-800.
- Ekelund, F., Ronn, R. & Griffiths, B. S. 2001. Quantitative estimation of flagellate community structure and diversity in soil samples. *Protist* 152: 301-314.
- Ellstrand, N. C. & Marshall, D. L. 1985. Interpopulational gene flow by pollen in wild radish, *Raphanus sativus*. *Am. Naturalist* 126: 606-616.
- Ellstrand, N. C., Whitkus, R. & Rieseberg, L. H. 1996. Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 5090-5093.
- Ellstrand N. C., Prentice, H. C. & Hancock, J. F. 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Ann. Rev. Ecol. System.* 30: 539-563.
- Ellstrand, N. C. & Schierenbeck, K. A. 2000. Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7043-7050.
- Ellstrand, N. C. 2001. When transgenes wander, should we worry? *Plant Physiol.* 125: 1543-1545.
- Ellstrand, N. C. 2003a. Current knowledge of gene flow in plants: implications for transgene flow. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 358: 1163-1170.
- Ellstrand, N. C. 2003b. Going to "great lengths" to prevent the escape of genes that produce specialty chemicals. *Plant Physiol.* 132: 1770-1774.
- England, L. S., Trevors, J. T. & Holmes, S. B. 2001. Extraction and detection of baculoviral DNA from lake water, detritus and forest litter. *J. Appl. Microbiol.* 90: 630-636.
- Ennos, R. A. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* 72: 250-259.
- Epperson, B. K. & Allard, R. W. 1989. Spatial autocorrelation analysis of the distribution of genotypes within populations of lodgepole pine. *Genetics* 121: 369-377.
- Eriksson, O. 1987. Regulation of seed-set and gender variation in the hermaphroditic plant *Potentilla anserina*. *Oikos* 49: 165-171.
- Excoffier, L., Smouse, P. E. & Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Fairley, D. & Batchelder, G. L. 1986. A study of oak-pollen production and phenology in Northern California: Prediction of annual variation in pollen counts based on geographic and meteorologic factors. *J. Allerg. Clin. Immunol.* 78: 300-307.
- Farris, J. S., Albert, V. A., Källersjö, M., Lipscomb, D. & Kluge, A. G. 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* 12:99-124
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits in phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

- Felsenstein, J. 1990. PHYLIP Manual. University Herbarium, University of California, Berkeley, California.
- Fenster, C. B. 1991. Gene flow in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). I. Gene dispersal. *Evolution* 45: 398-409.
- Ferré, J. & Van Rie, J. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 501-533.
- Filion, M., St-Arnaud, M. & Jabaji-Hare, S. H. 2003. Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR. *J. Microbiol. Meth.* 53: 67-76.
- Finlay, R. D. & Read, D. J. 1986. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. I. Translocation of ¹⁴C-labelled carbon between plants interconnected by a common mycelium. *New Phytologist* 103: 143-156.
- Fischbach, R. J., Zimmer, I., Steinbrecher, R., Pfichner, A. & Schnitzler, J. P. 2000. Monoterpene synthase activities in leaves of *Picea abies* (L.) Karst. and *Quercus ilex* L. *Phytochemistry* 54: 257-265.
- Fernandez-Quintanilla, C., Navarrete, L., Andujar, J. L. G., Fernandez, A. & Sanchez, M. J. 1986. Seedling recruitment and age-specific survivorship and reproduction in populations of *Avena sterilis* L. ssp. *ludoviciana* (Durieu) Nyman. *J. Appl. Ecol.* 23: 945-955.
- Fladung, M., Nowitzki, O., Ziegenhagen, B. & Kumar, S. 2003. Vegetative and generative dispersal capacity of field released transgenic aspen trees. *Trees – Structure and Function* 17: 412-416.
- Fowler, N. L. 1988. What is a safe site?: neighbour, litter, germination date and patch effects. *Ecology* 69: 947-961.
- Fraleigh, R. T., Rogers, S. G., Horch, R. B., Sanders, P. R., Fklick, 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. & Woo, S. C. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 870: 4803-4807.
- Franklin, J., Michaelson, J. & Strahler, A. H. 1985. Spatial analysis of density dependent pattern in coniferous forest stands. *Vegetatio* 64: 29-36.
- Froud-Williams, R. J. & Chancellor, R. J. 1986. Dormancy and seed germination of *Bromus catharticus* and *Bromus commutatus*. *Seed Sci. Technol.* 14: 439-450.
- Furner, I.J., Huffman, G.A., Amasino, R.M., Farfinkel, D.J., Gordon, M.P., & Nester, E.W. 1986. An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana*. *Nature* 319: 422-427.
- Galen, C. & Plowright, R. C. 1985. Contrasting movement patterns of nectar-collecting and pollen-collecting bumble bees (*Bombus terricola*) on fireweed (*Chamaenerion angustifolium*) inflorescens. *Ecol. Entomol.* 10: 9-17.
- Gange, A. C., Brown, V. K., Evans, I. M. & Storr, A. L. 1989. Variation in the impact of insect herbivory on *Trifolium pratense* through early plant succession. *J. Ecol.* 77: 537-551.
- Garcia-Vallve, S., Guzman, E., Montero, M. A. & Romeu, A. HGT-DB: a database of putative horizontally transferred genes in prokaryotic complete genomes. *Nucleic Acids Res.* 31: 187-189.
- Gatehouse, A. M. R., Ferry, N. & Raemaekers, M. J. R. 2002. The case of the monarch butterfly: a verdict is returned. *Trends Genet.* 18: 249-251.
- Gaugitsh, H. & Tørgensen, H. 1995. Streamlining regulations, keeping high safety standards: revised criteria for the assessment of releases of genetically modified organisms (GMOs) into the environment. *Ambio* 24: 47-50.
- Gaugitsch, H. 2002. Experience with environmental issues in GM crop production and the likely future scenarios. *Toxicol. Lett.* 127: 351-357.
- Gebhard, F. & Smalla, K. 1999. Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiology Ecology* 28: 261-272.
- Gerber, S., Mariette, S., Streiff, R., Bodénès, C. & Kremer, A. 2000. Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Mol. Ecol.* 9: 1037-1048.
- Ginsberg, H. S. 1983. Foraging ecology of bees in an old field. *Ecology* 64: 165-175.
- Giovannetti, M. 2003. The ecological risks of transgenic plants. *Riv. Biol.* 96 :207-23.

- Glandorf, D.C.M., Bakker, P.A.H.M. & Van Loon, L.C. 1997. Influence of the production of antibacterial and antifungal proteins by transgenic plants on the saprophytic soil microflora. *Acta Bot. Neerl.* 46: 85-104.
- Gliddon, C. 1994. The impact of hybrids between genetically modified crop plants and their related species: biological models and theoretical perspectives. *Mol. Ecol.* 3: 41-44.
- GM-Science Review 2003. An open review of the science relevant to GM crops and food based on interests and concerns of the public. Saatavilla verkkosivustolla: <http://www.gmsciencedebate.org.uk/report/pdf/gmsci-report1-full.pdf>.
- GM Science Review 2004. An open review of the science relevant to GM crops and food based on interests and concerns of the public. Saatavilla verkkosivustolla: <http://www.gmsciencedebate.org.uk/>.
- Godwin, I. D., Aitken, E. A. & Smith, L. W. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18:1524-1528.
- Goldberg, D. E. & Barton, A. M. 1992. Patterns and consequences of interspecific competition in natural communities: A review of field experiments with plants. *Am. Natural.* 139: 771-801.
- Goloboff, P. A. 1993. Estimating character weights during tree search. *Cladistics* 9: 83-91.
- Goloboff, P.A. 1999. Analyzing large data sets in reasonable times: solutions for composite optima. *Cladistics* 15: 415-428.
- Gonzalez-Martinez, S. C., Gerber, S., Cervera, M. T., Martinez-Zapater, J. M., Gil, L. & Alia, R. 2002. Seed gene flow and fine-scale structure in a Mediterranean pine (*Pinus pinaster* Ait.) using nuclear microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 104: 1290-1297.
- Goubara, M. & Takasaki, T. Pollination effects of the sweat bee *Lasioglossum villosulum trichopse* (Hymenoptera : Halictidae) on genic male-sterile lettuce. *Appl. Entom. Zool.* 39: 163-169.
- Govindaraju, D. R. 1988. Relationship between dispersal ability and levels of gene flow in plants. *Oikos* 52: 31-35.
- Goy, P. A. & Duesing, J. H. 1996. Assessing the environmental impact of gene transfer to wild relatives. *Bio/Technology* 14: 39-40.
- Granström, A. & Vries, C. 1985. Depletion of variable seeds of *Betula pubescens* and *Betula verrucosa* onto some north Swedish forest soils. *Can. J. For. Res.* 15: 1176-1180.
- Granström, A. 1987. Seed viability of fourteen species during five years of storage in a forest soil. *J. Ecol.* 75: 321-331.
- Greene, D. F. & Johnson, E. A. 1989. A model of wind dispersal of winged or plumed seeds. *Ecology* 70: 339-347.
- Gressel, J. 1999. Tandem constructs for mitigating risks of weediness from transgenic crops. *Trends Biotechnol.* 17: 361-366.
- Griffiths, B. S., Geoghehan, I. E. & Robertson, W. M. 2000. Testing genetically engineered potato, producing the lectins GNA and Con A, on nontarget soil organisms and processes. *J. Appl. Ecol.* 37: 159-170.
- Grime, J. P., Mason, G., Curtis, A. V., Rodman, J., Band, S. R., Mowforth, M. A. G., Neal, A. M. & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. *J. Ecol.* 69: 1017-1059.
- Grime, J. P., Hodgson, J. G. & Hunt, R. 1988. *Comparative plant ecology*. Hyman, London. 742 s.
- Groose, R. W. & Bingham, E. T. 1991. Gametophytic heterosis for in vitro pollen traits in alfalfa. *Crop Sci.* 31: 1510-1513.
- Groot, A. T. & Dicke, M. 2002. Insect-resistant transgenic plants in a multi-trophic context. *Plant J.* 31: 387-406.
- Gross, K. L. 1984. Effects of seed size and growth form on seedling establishment of six monocarpic perennial plants. *J. Ecol.* 72: 369-387.
- Grotkopp, E., Rejmanek, M. & Rost, T. L. 2002. Toward a causal explanation of plant invasiveness: Seedling growth and life-history strategies of 29 pine (*Pinus*) species. *Am. Natural.* 159: 396-419.
- Guitián, J., Guitián, P. & Sanches, J. M. 1993. Reproductive biology of two *Prunus* species (Rosaceae) in the Northwest Iberian peninsula. *Plant Syst. Evol.* 185: 153-165.
- Gustine, D. L. & Sanderson, M.A. 2001. Quantifying spatial and temporal genotypic changes in white clover populations by RAPD technology. *Crop Sci.* 41: 143-148.

- Gustine, D. L., Voigt, P. W., Brummer, E. C. & Papadopoulos, Y. A. 2002. Genetic variation of RAPD markers for North American white clover collections and cultivars. *Crop Sci.* 42: 343-347.
- Gyamfi, S., Pfeifer, U., Stierschneider, M. & Sessitsch, A. 2002. Effects of transgenic glufosinate-tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 41: 181-190.
- Hails, R. S. 2000. Genetically modified plants – the debate continues. *Trends Ecol. Evol.* 15: 14-18.
- Hamill, D. N. & Wright, S. J. 1986. Testing the dispersion of juveniles relative to adults: a new analytic method. *Ecology* 67: 952-957.
- Hamrick, J. L., Linhart, Y. B. & Mitton, J. B. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 10: 173-200.
- Hanley, M. E. 2004. Seedling herbivory and the influence of plant species richness in seedling neighbourhoods. *Plant Ecol.* 170: 35-41
- Hansen, P. E. 1989. Leslie matrix models. *Math. Popul. Stud.* 2: 37-67.
- Hansen, L. B., Siegismund, H. R., Jorgensen, R. B. 2001. Introgression between oilseed rape (*Brassica napus* L.) and its weedy relative *B. rapa* L. in a natural population. *Gen. Res. Crop Evol.* 48: 621-627.
- Hansen, L. B., Siegismund, H. R. & Jorgensen, R. B. 2003. Progressive introgression between *Brassica napus* (oilseed rape) and *B. rapa*. *Heredity* 91: 276-283.
- Hardy, O. J. & Vekemans, X. 2002. SPAGeDi: versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol. Ecol. Notes* 2: 618-620.
- Harlan, J. R. 1992. *Crops and man*. Madison, WI: American Society of Agronomy. 295 p.
- Hartgernik, A. P. & Bazzaz, F. A. 1984. Seedling-scale environmental heterogeneity influences individual fitness and population structure. *Ecology* 65: 198-206.
- Hartl, D.L. & Clark, A.G. 1997. *Principles of population genetics*. 3rd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. 542 s.
- Hartnett, D. C. & Bazzaz, F. A. 1985. The regulation of leaf, ramet and genet densities in experimental populations of the rhizomatous perennial *Solidago canadensis*. *J. Ecol.* 73: 429-433.
- Hartnett, D. C. 1990. Size-dependent allocation to sexual and vegetative reproduction in four clonal composites. *Oecologia* 84: 254-259.
- Haughton, A. J., Bell, J. R., Boatman, N. D. & Wilcox, A. 2001. The effect of the herbicide glyphosate on non-target spiders. II. Indirect effects on *Lepthyphantes tenuis* in field margins. *Pest Management Sci.* 57: 1037-1042.
- Haughton, A. J., Champion, G. T., Hawes, C., Heard, M. S., Brooks, D. R., Bohan, D. A., Clark, S. J., Dewar, A. M., Firbank, L. G., Osborne, J. L., Perry, J. N., Rothery, P., Roy, D. B., Scott, R. J., Woiwod, I. P., Birchall, C., Skellern, M. P., Walker, J. H., Baker, P., Browne, E. L., Dewar, A. J. G., Garner, B. H., Haylock, L. A., Horne, S. L., Mason, N. S., Sands, R. J. N. & Walker, M. J. 2003. Invertebrate responses to the management of genetically modified herbicide-tolerant and conventional spring crops. II. Within-field epigeal and aerial arthropods. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 358: 1863-1877.
- Hauser, T. P. & Loeschcke, V. 1995. Inbreeding depression in *Lychnis flos-cuculi* (Caryophyllaceae): Effects of different levels of inbreeding. *J. Evol. Biol.* 8: 589-600.
- Hauser, T. P., Shaw, R. G. & Østergård, H.. 1998. Fitness of F1 hybrids between weedy *Brassica rapa* and oilseed rape (*B. napus*). *Heredity* 81: 429-435.
- Hawes, C., Haughton, A. J., Osborne, J. L., Roy, D. B., Clark, S. J., Perry, J. N., Rothery, P., Bohan, D. A., Brooks, D. R., Champion, G. T., Dewar, A. M., Heard, M. S., Woiwod, I. P., Daniels, R. E., Young, M. W., Parish, A. M., Scott, R. J., Firbank, L. G. & Squire, G. R. 2003. Responses of plants and invertebrate trophic groups to contrasting herbicide regimens in the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 358: 1899-1913.
- Hay, I., Morency, M-J. & Séguin, A. 2002 Assessing the persistence of DNA in decomposing leaves of genetically modified poplar leaves. *Can. J. For. Res.* 32: 977-982.
- Haygood, R., Ives, A. R., Andow, D. A. 2003. Consequences of recurrent gene flow from crops to wild relatives. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270: 1879-1886.

- Hazebroek, J. P. & Metzger, J. D. 1990a. Environmental control of seed germination in *Thlaspi arvense* (Cruciferae). *Am. J. Bot.* 77: 945-953.
- Heard, M. S., Hawes, C., Champion, G. T., Clark, S. J., Firbank, L. G., Haughton, A. J., Parish, A. M., Perry, J. N., Rothery, P., Scott, R. J., Skellern, M. P., Squire, G. R. & Hill, M. O. 2003a. Weeds in fields with contrasting conventional and genetically modified herbicide-tolerant crops. I. Effects on abundance and diversity. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 358: 1819-1832.
- Heard, M. S., Hawes, C., Champion, G. T., Clark, S. J., Firbank, L. G., Haughton, A. J., Parish, A. M., Perry, J. N., Rothery, P., Roy, D. B., Scott, R. J., Skellern, M. P., Squire, G. R. & Hill, M. O. 2003b. Weeds in fields with contrasting conventional and genetically modified herbicide-tolerant crops. II. Effects on individual species. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 358: 1833-1846.
- Hellmich, R. L., Siegrid, B. D., Sears, M. K., Stanley-Horn, D. E., Daniels, M. J., Mattila, H. R., Spencer, T., Bidne, K. G. & Lewis, L. C. 2001. Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*-purified proteins and pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11925-11930.
- Hendrix, S. D. & Trapp, E. J. 1992. Population demography of *Pastinaca sativa* (Apiaceae): Effects of seed mass on emergence, survival and recruitment. *Am. J. Bot.* 79: 365-375.
- Henkel J. 1995. Genetic engineering: fast forwarding to future foods. *FDA Consumer* 4: 6-11.
- Hennig W. 1966. *Phylogenetic Systematics*. Univ. Illinois Press, Urbana.
- Herrera, C. M. 1991. Dissecting factors responsible for individual variation in plant fecundity. *Ecology* 72: 1436-1448.
- Heuer, H. & Smalla, K. 1999. Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme producing variants. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 357-371.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. & Wellington, E. M. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3233-3241.
- Heuer, H., Kroppenstedt, R. M., Lottmann, J., Berg, G. & Smalla, K. 2002. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1325-1335.
- Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J.D., Higgins, D.G., & Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Hilbeck, A., Moar, W. J., Pusztai-Carey, M., Filippini, A. & Bigler, F. 1998a. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ. Entomol.* 27: 1255-1263.
- Hilbeck, A., Baumgartner, M., Fried, M. P. & Bigler, F. 1998b. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environ. Entomol.* 27: 480-487.
- Hilbeck, A., Meier, M., & Raps, A. (2000). Review on non-target organisms and Bt-plants, Ecostrat GmbH, Ecological Technology Assessment Consulting. Report to Greenpeace International, Amsterdam.
- Hirst, R. A., Pywell, R. F., Marrs, R. H. & Putwain, P. D. 2003. The resistance of a chalk grassland to disturbance. *J. Appl. Ecol.* 40: 368-379.
- Hjelmroos, M. 1991. Evidence of long-distance transport of *Betula* pollen. *Grana* 30: 215-228.
- Hoffman, T., Golz, C. & Schieder, O. 1994. Foreign DNA sequences are received by a wild-type strain of *Aspergillus niger* after co-culture with transgenic higher plants. *Curr. Genet.* 27: 70-76.
- Hongo, A. 1989. Survival and growth of seedlings of *Rumex obtusifolius* L. and *Rumex crispus* L. in newly sown grassland. *Weed Res.* 29: 7-12.
- Hood, E. E. 2003. Selecting the fruits of your labors. *Trends Plant Sci.* 8: 357-358.
- Huang, J., Pray, C. & Rozelle, S. 2002. Enhancing the crops to feed the poor. *Nature* 418: 678-684.
- Huang, Q., Beharav, A., Li, Y., Kirzhner, V. & Nevo, E. 2002. Mosaic microecological differential stress causes adaptive microsatellite divergence in wild barley, *Hordeum spontaneum*, at Neve Yaar, Israel. *Genome* 45:1216-1229.
- Huelsensbeck, J. P. & Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.

- Häikiö, E. & Kangasjärvi, J. 1999. Biotekniikan riskit. Siirtogeenisten kasvien ympäristövaikutukset Suomessa. Suomen Ympäristö 185: 1-119.
- Ingham, D. J., Beer, S., Money, S. & Hansen, G. 2001. Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *Biotechniques* 31: 132-140.
- Inouye, D. W. 1978. Resource partitioning in bumblebees: Experimental studies of foraging behavior. *Ecology* 59: 672-678.
- Isobe, S., Klimenko, I., Ivashuta, S., Gau, M. & Kozlov, N. N. 2003. First RFLP linkage map of red clover (*Trifolium pratense* L.) based on cDNA probes and its transferability to other red clover germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 108: 105-112.
- Ivandic, V., Hackett, C. A., Zhang, Z. J., Staub, J. E., Nevo, E., Thomas, W. T. & Forster, B. P. 2000. Phenotypic responses of wild barley to experimentally imposed water stress. *J. Exp. Bot.* 51: 2021-2029.
- Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D. & Kilian, A. 2001. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Res.* 29: e25.
- Jacquemyn, H., Honnay, O., Galbusera, P. & Roldan-Ruiz, I. 2004. Genetic structure of the forest herb *Primula elatior* in a changing landscape. *Mol. Ecol.* 13: 211-219.
- Jain, S. M. 1993. Recent advances in plant genetic engineering. *Curr. Sci.* 64: 715-724.
- James, C. 1999. Global review of commercialised transgenic crops: 1999. ISAAA Briefs, 12. Ithaca, NY: International service for the acquisition of agri-biotech applications. 8 p.
- James, C. M., Barrett, J. A., Russell, S. J. & Gibby, M. 2001. A rapid PCR based method to establish the potential for paternal inheritance of chloroplasts in *Pelargonium*. *Plant Mol. Biol. Reporter* 19: 163-167.
- Jank, B., Haymerle, H. & Dolbhoff-Dier, O. 1997. Zurich hazard analysis in biotechnology. *Nature Biotech.* 14: 894-896.
- Jansen, M. A. K., Shaaltiel, Y., Kazzes, D., Canaani, O., Malkin, S. & Gressel, J. 1989. Increased tolerance to photoinhibitory light in paraquat-resistant *Conyza bonariensis* measured by photoacoustic spectroscopy and ¹⁴CO₂-fixation. *Plant Physiol.* 91: 1174-1178.
- Jasinski, J. R., Eisley, J. B., Young, C. E., Kovach, J. & Willson, H. 2003. Select nontarget arthropod abundance in transgenic and nontransgenic field crops in Ohio. *Environ. Entom.* 32: 407-403.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. & Thein, S. L. 1985. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.
- Jensen, T. S. & Nielsen, O. F. 1986. Rodents as seed dispersal in a heath – oak wood succession. *Oecologia* 70: 214-221.
- Jeon, J. S., Lee, S., Jung, K. H., Jun, S. H., Jeong, D. H., Lee, J., Kim, C., Jang, S., Yang, K., Nam, J., An, K., Han, M. J., Sung, R. J., Choi, H. S., Yu, J. H., Choi, J. H., Cho, S. Y., Cha, S. S., Kim, S. I. & An, G. 2000. T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant J.* 22: 561-570.
- Joersbo, M., Donaldson, I., Kreiberg, J., Peterson, S. G., Brunstedt, J. & Okkels, F. T. 1998. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol. Breeding* 4: 111-117
- Johnson, E. L., Saunders, J. A., Mischke, S., Helling, C. S. & Emche, S. D. 2003. Identification of *Erythroxylum* taxa by AFLP DNA analysis. *Phytochemistry* 64: 187-197.
- Joly, P. 2000. Biological invasions - State of the art and perspectives. *Revue d'Ecologie – la Terre et la Vie* 7 (supplement): 21-35.
- Jong, T. J., Waser, N. M., Price, M. V. & Ring, R. M. 1992. Plant size, geitonogamy and seed set in *Ipomopsis aggregata*. *Oecologia* 89: 310-315.
- Jonsson, O., Rosquist, G. & Widén, B. 1991. Operation of dichogamy and herkogamy in five taxa of *Pulsatilla*. *Holarc. Ekol.* 14: 260-271.
- Jones, K. N. & Reithel, J. S. 2001. Pollinator-mediated selection on a flower color polymorphism in experimental populations of *Antirrhinum* (Scrophulariaceae). *Am. J. Bot.* 88: 447-454.
- Jukes, T. H. & Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. Teoksessa: Munro, H.N. (toim.), *Mammalian Protein Metabolism*, s. 21-32. Academic Press, New York.
- Jørgensen, R. B. & Andersen, B. 1994. Spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy *B. campestris* (Brassicaceae): a risk of growing genetically modified oilseed rape. *Am. J. Bot.* 81: 1620-1626.
- Kaldorf, M., Fladung, M., Muhs, H. J. & Buscot, F. 2002. Mycorrhizal colonization of transgenic aspen in a field trial. *Planta* 214:653-660.

- Kaplinsky N, Braun D, Lisch D, Hay A, Hake S, Freeling M. 2002. Biodiversity (Communications arising): maize transgene results in Mexico are artefacts. *Nature* 416: 541-543.
- Kareiva, P, Morris, W. & Jacobi, C. M. 1994: Studying and managing the risk of cross-fertilization between transgenic crops and wild relatives. *Mol. Ecol.* 3: 15-21.
- Kareiva, P, Parker, I. M. & Pascual, M. 1996. Can we use experiments and models in predicting the invasiveness of genetically engineered organisms. *Ecology* 77: 1670-1675.
- Karl, S. A. & Avise, J. C. 1993. PCR-based assays of Mendelian polymorphisms from anonymous single-copy nuclear-DNA -techniques and applications for population-genetics. *Mol. Biol. Evol.* 10: 342-361.
- Karol, K. G., McCourt, R. M., Cimino, M. T. & Delwiche, C. F. 2001. The closest living relatives of land plants. *Science* 294: 2351-2353.
- Katz, L. A. 1996. Transkingdom transfer of the phosphoglucose isomerase gene. *J. Mol. Evol.* 43: 453-459.
- Ke, D., Boissinot, M., Huletsky, A., Picard, F, Frenette, J., Ouellette, M., Roy, P & Bergeron, MG. 2000. Evidence for horizontal gene transfer in evolution of elongation factor Tu in enterococci. *J. Bacteriol.* 182: 6913-6920.
- Keane, R. M., Crawley, M. J. 2002. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends Ecol. Evol.* 17: 164-170.
- Keeler, K. H., Turner, C. E. & Bolick, M. R. 1996. Movement of crop transgenes into wild plants. Teoksessa: S. O. Duke, (toim.). *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects*. Boca Raton, FL: CRC Lewis. s. 303-330.
- Kemppinen, A., Pitkääjärvi, J. & Ruohonen-Lehto, M. 2003. Geenitekniikalla muunnettujen organismien ympäristövaikutusten seuranta. *Suomen Ympäristö* 621: 1-52.
- Kellogg, E. A. 1987. Apomixis in the *Poa secunda* complex. *Am. J. Bot.* 74: 1431-1437.
- Kercher, S.M. & Zedler, J. B. 2004. Multiple disturbances accelerate invasion of reed canary grass (*Phalaris arundinacea* L.) in a mesocosm study. *Oecologia* 138: 455-464.
- Khan, M. L. & Tripathi, R. S. 1989. Survival and growth of transplanted nursery seedlings of three subtropical trees at burnt and unburnt sites in dense and sparse forest stands. *Trop. Ecol.* 30: 23-30.
- Khattak, S., Darai, G., Sule, S. & Rosen-Wolff, A. 2002. Characterization of expression of Puumala virus nucleocapsid protein in transgenic plants. *Intervirology* 45: 334-339.
- Kivilaan, A. & Bandurski, R. S. 1981. The one hundred-year period for Dr. Beal's seed viability experiment. *Am. J. Bot.* 68: 1290-1292.
- Kjær, C., Damgaard, K., Kjellsson, G., Strandberg, B. & Strandberg, M. 1999. Ecological risk assessment of genetically modified higher plants (GMHP). Identification of data needs. NERI Technical Report 303, 34 p.
- Kjellsson, G. 1991. Seed fate in an ant-dispersed sedge, *Carex pilulifera* L.: recruitment and seedling survival in test of models for spatial dispersion. *Oecologia* 88: 435-443.
- Kjellsson, G. 1992. Seed banks in Danish deciduous forests: species composition, seed influx and distribution pattern in soil. *Ecography* 15: 86-100.
- Kjellsson, G. & Simonsen, V. (toim.). 1994. Methods for risk assessment of transgenic plants. I. Competition, establishment and ecosystem effects. Birkhäuser Verlag, Basel. 1-214 s.
- Kjellsson, G., Simonsen, V. & Amman, K. (toim.). 1997. Methods for risk assessment of transgenic plants. II. Pollination, gene-transfer and population impacts. Birkhäuser Verlag, Basel. 1-308 s.
- Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R. & Sanford, J. C. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70-73.
- Kleiner, K. W., Ellis, D. D., McCown, B. H. & Raffa, K. F. 2003. Leaf ontogeny influences leaf phenolics and the efficacy of genetically expressed *Bacillus thuringiensis* cry1A(a) d-endotoxin in hybrid poplar against gypsy moth. *J. Chem. Ecol.* 29: 2585-2602.
- Klemow, K. M. & Raynal, D. J. 1985. Demography of two facultative biennial plant species in an unproductive habitat. *J. Ecol.* 73: 147-167.
- Klinger, T. & Ellstrand, N.C. 1994. Engineered genes in wild populations: fitness of weed-crop hybrids of *Raphanus sativus*. *Ecol. Appl.* 4: 117-120

- Klinkhamer, P. G. L., de Jong, T. J. & Linnebank, L. A. Small-scale spatial patterns determine ecological relationships: an experimental example using nectar production rates. *Ecol. Letters* 4: 559-567.
- Kohn, J. R. & Kasper, B. B. 1992. Pollen-mediated gene flow in *Cucurbita foetidissima* (Cucurbitaceae). *Am. J. Bot.* 79: 57-62.
- Koivisto, R., Törmäkangas, K. & Kauppinen, V. 2001. Hazard identification and risk assessment procedure for genetically modified plants in the field – GMHAZID. *Env. Sci. Poll. Res.* 8: 1-7.
- Kowalchuk, G. A., Bruinsma, M. & van Veen, J. A. 2003. Assessing responses of soil micro-organisms to GM plants. *Trends Ecol. Evol.* 18: 403-410.
- Koziel, M. G., Beland, G. L., Bowman, C., Carozzi, N. B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M. R., Merlin, E., Rgodes, R., Warren, G. W., Wright, S. V. & Evola, S. V. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology* 11: 194-200.
- Krannitz, P. G. & Carey, C. K. 1988. Among-site differences in seedling size, growth, and survivorship in *Solidago flexicaulis*. *Can. J. Bot.* 66: 1632-1638.
- Kresovich, S., Williams, J. K. G., McFerson, J. R., Routman, E. J. & Schaal, B. A. 1992. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. *Theor. Appl. Genet.* 85: 190-196.
- Kurland, C. G., Canback, B. & Berg, O. G. 2003. Horizontal gene transfer: A critical view. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 9658-9662.
- Kuvshinov, V., Koivu, K., Kanerva, A. & Pehu, E. 2001. Molecular control of transgene escape from genetically modified plants. *Plant Sci.* 160: 517-522.
- Kyozuka, J., Fujimoto, H., Izava, T. & Shimamoto, K. 1991. Anaerobic induction and tissue-specific expression of maize *Adh1* promoter in transgenic rice plants and their progeny. *Mol. Gen. Genet.* 228: 40-48.
- Kwiatkowska, A. J. & Symonides, E. 1986. Spatial distribution of species diversity indices and their correlation with plot size. *Vegetatio* 68: 99-102.
- Kwok, P. Y. & Chen, X. 2003. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr. Issues Mol. Biol.* 5: 43-60.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lamb, E. M., Davis, D. W. & Andow, D. A. 1994. Mid-parent heterosis and combining ability of European corn borer resistance in maize. *Euphytica* 72: 65-72.
- Lander, E. S. & Botstein, D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
- Lander, E. S. & Schork, N. J. 1994. Genetic dissection of complex traits. *Science* 265: 2037-2049.
- Landry, B. S., Kesseli, R. V., Farrara, B. & Michelmore, R. V. 1987. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Genetics* 116: 331-337.
- Landry, B. S., Hubert, N., Etoh, T. & Lincoln, S. T. 1991. A genetic map for *Brassica napus* based on restriction fragment length polymorphisms detected with expressed DNA sequences. *Genome* 34: 543-552.
- Lavigne, C., Klein, E. K. & Couvet, D. 2002. Using seed purity data to estimate an average pollen mediated gene flow from crops to wild relatives. *Theor. Appl. Genet.* 104: 139-145.
- Lecardonnel, A., Prévost, G., Beaujean, A., Sangwan, R. S. & Sangwan-Norreel, B. S. 1999. Genetic transformation of potato with *nptII-gus* marker genes enhances foliage consumption by Colorado potato beetle larvae. *Mol. Breeding* 5: 441-451.
- Lee, J. M., Nahm, S. H., Kim, Y. M. & Kim, B. D. 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theor. Appl. Genet.* 108: 619-627.
- Legere, A. & Deschenes, J. M. 1989. Effects of time of emergence, population density and interspecific competition on hemp-nettle (*Galeopsis tetrahit*) seed production. *Can. J. Plant Sci.* 69: 185-194.

- Lemmetyinen, J, Elo, A. & Sopanen, T. 1995. Kukkimattomien koivujen kehittäminen kukintospesifisten geenien avulla. Teoksessa: Oksa, E. (toim.): Metsäntutkimus uusissa puissa: monistusta ja molekyyliä. Metsäntutkimuslaitoksen tiedonantoja 574. Metsäntutkimuslaitos, Punkaharjun tutkimusasema, s. 93-152.
- Lewis, P. O. 1998. Maximum likelihood as an alternative to parsimony for inferring phylogeny using nucleotide sequence data. Teoksessa: Soltis, D. E., Soltis, P. S. & Doyle, J. J. (toim.), Molecular Systematics of Plants II: DNA sequencing. Kluwer Academic Publishers, Boston, s.132-163.
- Lewis, M. A. 2000. Spread rate for a nonlinear stochastic invasion. *J. Math. Biol.* 41: 430-454.
- Lewontin, R. C., Hubby, J. L. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 595-609.
- Li, Z. A. & Hao, S. 1992. Chromosome engineering of wheat in China. *Critical Rev. Plant Sci.* 10: 471-485.
- Lian, C., Miwa, M., Hogetsu, T. 2001. Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. *Heredity* 87: 88-98.
- Lilley, A. K., Fry, J. C., Day, M. J. & Bailey, M. J. 1994. In situ transfer of an exogenously isolated plasmid between *Pseudomonas* spp. in sugar beet rhizosphere. *Microbiology* 140: 27-33.
- Linder, C. R. & Schmitt, J. 1994. Assessing the risks of transgene escape through time and crop-wild hybrid persistence. *Mol. Ecol.* 3: 23-30.
- Linder, C. R., Taha, I., Seiler, G. J., Snow, A. A. & Rieseberg, L. H. 1998. Long-term introgression of crop genes into wild sunflower populations. *Theor. Appl. Genet.* 96: 339-347.
- Litt, M. & Luty, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44: 397-401.
- Liu, Z. & Furnier, G.R. 1993. Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theor. Appl. Genet.* 87: 97-105.
- Locatelli, G., Urso, V. & Malnati, M. 2000. Quantitative analysis of GMO food contaminations using real time PCR. *Ital. J. Biochem.* 49:61-63.
- Loos, C., Seppelt, R., Meier-Bethke, S., Schiemann, J. & Richter, O. 2003. Spatially explicit modelling of transgenic maize pollen dispersal and cross-pollination. *J. Theor. Biol.* 225: 241-255.
- Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* 58: 563-602.
- Losey, J. E., Rayor, M. E. & Carter, M. E. 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* 399: 214.
- Lottmann, J., Heuer, H., Smalla, K., & Berg, G. 1999. Influence of transgenic T4-lysozyme-producing plants on beneficial plant-associated bacteria. *FEMS Microb. Ecol.* 29: 365-377.
- Lottmann J. & Berg G. 2001. Phenotypic and genotypic characterization of antagonistic bacteria associated with roots of transgenic and non-transgenic potato plants. *Microbiol Res.* 156: 75-82.
- Loveless, M. D. & Hamrick, J. L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 65-95.
- Luff, M. L. 1996. Use of carabids as environmental indicators in grasslands and cereals. *Ann. Zool. Fennici* 33: 185-195.
- Lukow, T., Dunfield, P. F. & Liesack, W. 2000. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *Microbiol. Ecol.* 32: 241-24.
- Luna, M., Badiana, M., Felici, M., Artemi, F. & Sermanni, G. G. 1985. Selective enzyme inactivation under water stress in maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 25: 153-156.
- Luna, S., Figueroa, J., Baltazar, B., Gomez, R., Townsend, R. & Schoper, J. B. 2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. *Crop Sci.* 41: 1551-1557.

- Lundgren, J. G. & Wiedenmann, R. N. 2002. Coleopteran-specific Cry3Bb toxin from transgenic corn pollen does not affect the fitness of a nontarget species, *Coleomegilla maculata* DeGeer (Coleoptera : Coccinellidae). *Environ. Entomol.* 31: 1213-1218.
- Majumder, N. D., Ram, T. & Sharma, A. C. 1997. Cytological and morphological variation in hybrid swarms and introgressed population of interspecific hybrids (*Oryza rufipogon* Griff. –*Oryza sativa* L.) and its impact on evolution of intermediate types. *Euphytica* 94: 295-302.
- Malkamäki, U. 1997. Tekijät, jotka vaikuttavat geenifrekvenssien muuttumiseen populaatioissa. Raportti. Suomen ympäristökeskus, kemikaaliyksikkö. 12s.
- Malone, L. & Pham-Delègue, M. 2001. Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie* 32: 87–304.
- Marchelli, P. & Gallo, L. A. 2001. Genetic diversity and differentiation in a southern beech subjected to introgressive hybridization. *Heredity* 87: 284-293.
- Marshall, D. L. & Ellstrand, N. C. 1988. Effective mate choice in wild radish: Evidence for selective seed abortion and its mechanism. *Amer. Naturalist* 131: 739-756.
- Martienssen, R. & Springer, P. 1998. Enhancer and gene trap transposon mutagenesis in *Arabidopsis*. Teoksessa: G. Coupland (toim.). Insertional mutagenesis: a practical approach. Oxford University Press. <http://genetraps.cshl.org/traps.html>.
- Martinez-Ghersa, M. A., Worster, C. A. & Radosevich, S. R. 2003. Concerns a weed scientist might have about herbicide-tolerant crops: A revisitation. *Weed Technol.* 17: 202-210.
- Marvier, M. 2002. Improving risk assessment for nontarget safety of transgenic crops. *Ecol. Applic.* 12: 1119-1124.
- Mason, G., Provero, P., Vaira, A. M. & Accotto, G. P. 2002. Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. *BMC Biotechnol.* 24; 2: 20.
- Matlack, G. R. 1987. Diaspore size, shape and fall behavior in wind-dispersed plant species. *Am. J. Bot.* 74: 1150-1160.
- Matzke, M. A., Aufsatz, W., Kanno, T., Mette, M. F., & Matzke, A. J. 2002. Homology-dependent gene silencing and host defense in plants. *Adv. in Genet.* 46: 235-275.
- Mayo, G. M. & Langridge, P. 2003. Modes of reproduction in Australian populations of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort) revealed by DNA fingerprinting and cytological methods. *Genome* 46: 573-579.
- Mazer, S. J. 1987. Maternal investment and male reproductive success in angiosperms: parent-offspring conflict or sexual selection? *Biol. J. Linn. Soc.* 30: 115-133.
- Mazer, S. J. & Schick, C. T. 1991. Constancy of population parameters for life history and floral traits in *Raphanus sativus* L. I. Norms of reaction and the nature of genotype by environmental interactions. *Heredity* 67: 143-156.
- McCanny, S. J. & Cavers, P. B. 1989. Parental effects of spatial patterns of plants: a contingency table approach. *Ecology* 70: 368-378.
- McCarthy, B. C. & Quinn, J. A. 1990. Reproductive ecology of *Carya* (Juglandaceae): Phenology, pollination, and breeding system of two sympatric tree species. *Am. J. Bot.* 77: 261-273.
- McCauley, D. E., Smith, R. A., Lisenby, J. D. & Hsieh, C. 2003. The hierarchical spatial distribution of chloroplast DNA polymorphism across the introduced range of *Silene vulgaris*. *Mol. Ecol.* 12: 3227-3235.
- McEvoy, P. B. & Cox, C. S. 1987. Wind dispersal distances in dimorphic achenes of ragwort, *Senecio jacobaea*. *Ecology* 68: 2006-2015.
- McGrath, J. M. & Quiros, C. F. 1992. Genetic diversity at isozyme and RFLP loci in *Brassica campestris* as related to crop type and geographical origin. *Theor. Appl. Genet.* 83: 783-790.
- McKersie, B. D., Chen, Y., de Beus, M., Bowley, S. R., Bowler, C., Inze, D., D'Halluin, K. & Botterman, J. 1993. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 103: 1155-1163.
- McKone, M. J., Ostertag, R., Rauscher, J. T., Heiser, D. A. & Russell, F. L. 1995. An exception to Darwin's syndrome: Floral position, protogyny, and insect visitation in *Besseyia bullii* (Scrophulariaceae). *Oecologia* 101: 68-74.
- McMaugh, S. J. & Lyon, B. R. 2003. Real-time quantitative RT-PCR assay of gene expression in plant roots during fungal pathogenesis. *Biotechniques* 34: 982-986

- Meagher, T. R., Belanger, F. C. & Day, P. R. 2003. Using empirical data to model transgene dispersal. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 358: 1157-1162.
- Meier, M.S. & Hilbeck, A. 2001. Influence of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on prey preference of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Basic Appl. Ecol.* 2: 35-44.
- Meyer, P. 1995. Gene silencing in higher plants and related phenomena in other eukaryotes. Springer-Verlag, New York. 232 pp.
- Michalakis, Y. & Excoffier, L. 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*. 142: 1061-1064.
- Miksic, J. R. 1992. Validation procedures that test for matrix effects. *Liquid Gas Chromatography* 10: 316-320.
- Miller, T. E. & Weiner, J. 1989. Local density variation may mimic effects of asymmetric competition on plant size variability. *Ecology* 70: 1188-1191.
- Milne, R. I. & Abbott, R. J. 2004. Geographic origin and taxonomic status of the invasive privet, *Ligustrum robustum* (Oleaceae), in the Mascarene Islands, determined by chloroplast DNA and RAPDs. *Heredity*. 92: 78-87.
- Mitchell, C. E., Power, A. G. 2003. Release of invasive plants from fungal and viral pathogens. *Nature* 421: 625-627.
- Moire, L, Rezzonico, E. & Poirier, Y. 2003. Synthesis of novel biomaterials in plants. *J. Plant Physiol.* 160: 831-839.
- Morse, D. H & Schmitt, J. 1991. Maternal and paternal effects on follicle production in the milkweed *Asclepias syriaca* (Asclepiadaceae). *Am. J. Bot.* 78: 1304-1309.
- Motavalli, P. P., Kremer, R. J., Fang, M. & Means, N. E. 2004. Impact of genetically modified crops and their management on soil microbially mediated plant nutrient transformations. *J. Environ. Quality* 33: 816-824.
- Moyes, C. L., Lilley, J. M., Casais, C. A., Cole, S. G., Haeger, P. D. & Dale, P. J. 2002. Barriers to gene flow from oilseed rape (*Brassica napus*) into populations of *Sinapis arvensis*. *Mol. Ecol.* 11: 103-112.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273.
- Nakamura, R. R. & Stanton, M. L. 1987. Cryptic seed abortion and the estimation of ovule fertilization. *Can. J. Bot.* 65: 2463-2465.
- Narvel, J. M., Walker, D. R., Rector, B. G., All, J. N., Parrott, W. A. & Boerma, H. R. 2001. A retrospective DNA marker assessment of the development of insect resistant soybean. *Crop Sci.* 41: 1931-1939.
- Nason, J. D. & J. L. Hamrick. 1997. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: Two case studies of neotropical canopy trees. *J. Heredity* 88: 264-276.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70: 3321-3323.
- Nevo, E., Beiles, A., Kaplan, D., Golenberg, E. M., Olsvig-Whittaker, L. & Naveh, Z. 1986. Natural selection of allozyme polymorphisms: a microsite test revealing ecological genetic differentiation in wild barley. *Evolution* 40: 13-20.
- Nevo, E. & Beiles, A. 1989. Genetic diversity of wild emmer wheat in Israel and Turkey. *Theor. Appl. Genet.* 77: 421-455.
- Nickel, S. E., Simmons, S. R., Scheaffer, C. C. & Radosevich, S. R. 1990. Addition series approach to assessing competition in a small grain alfalfa companion crop community. *Crop. Sci.* 3: 1139-1141.
- Nielsen, K. M., Gebhard, F., Smalla, K., Bones, A. M. & van Elsas J. D. 1997. Evaluation of possible horizontal gene transfer from transgenic plants to the soil bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* BD413. *Theor. Appl. Genet.* 95: 815-821.
- Nielsen, K. M., Bones, A. M., Smalla, K. & van Elsas, J. D. 1998. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria – rare event. *FEMS Microbiol. Res.* 22: 79-103.
- Nielsen, K. M., van Elsas, J. D. & Smalla, K. 2000. Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 (pFG*nptII*) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1237-1242.

- Nielsen, R. & Signorovitch, J. 2003. Correcting for ascertainment biases when analyzing SNP data: applications to the estimation of linkage disequilibrium. *Theor. Popul. Biol.* 63: 245-255.
- Nimura, M., Kato, J., Mii, M. & Morioka, K. 2003. Unilateral compatibility and genotypic difference in crossability in interspecific hybridization between *Dianthus caryophyllus* L. and *Dianthus japonicus* Thunb. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1164-1170.
- Nixon, K.C. 1999. The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* 15: 407-414.
- Nwakanma, D. C., Pillay, M., Okoli, B. E. & Tenkouano, A. 2003. PCR-RFLP of the ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS) provides markers for the A and B genomes in *Musa* L.: *Theor. Appl. Genet.* 108:154-9.
- Obrycki, J. J., Losey, J. E., Taylor, O. R. & Hansen, L.C. 2001. Transgenic insecticidal corn: Beyond insecticidal toxicity to ecological complexity. *BioScience* 51: 353-361.
- Oddou-Muratorio, S., Houot, M. L., Demesure-Musch, B. & Austerlitz, F. 2003. Pollen flow in the wildservice tree, *Sorbus torminalis* (L.) Crantz. I. Evaluating the paternity analysis procedure in continuous populations. *Mol. Ecol.* 12: 3427-2439.
- Olczak, T., Rurek, M., Janska, H., Augustyniak, H. & Sawicka-Sienkiewicz, E. J. 2001. Screening of cytoplasmic DNA diversity between and within *Lupinus mutabilis* Sweet and *Lupinus albus* sensu lato by restriction fragment length polymorphism (RFLP). *J. Appl. Genet.* 42: 127-137.
- Olesen, J. M. & Warncke, E. 1989. Flowering and seasonal changes in flower sex ratio and frequency of flower visitors in a population of *Saxifraga hirculus*. *Holarctic Ecol.* 12: 21-30.
- Orr, D. B. & Landis, D. A. 1997. Oviposition of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and impact of natural enemy populations in transgenic versus isogenic corn. *J. Econ. Entomol.* 90: 905-909.
- Osman, M. A., Raju, P. S. & Peacock, J. M. 1991. The effect of soil temperature, moisture and nitrogen on *Striga asiatica* (L.) Kuntze seed germination, viability and emergence on sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) roots under field conditions. *Plant Soil* 131: 265-273.
- Ottaviano, E. & Mulcacy, D. L. 1989. Genetics of angiosperm pollen. *Adv. Genet.* 26: 1-64.
- Ouborg, N. J., van Treuren, R. & van Damme, J. M. M. 1991. The significance of genetic erosion in the process of extinction. II. Morphological variation and fitness components in populations of varying size of *Salvia pratensis* L. and *Scabiosa columbaria* L. *Oecologia* 86: 359-367.
- Owens, J. N., Colangeli, A. M. & Morris, S. J. 1990. The effect of self-pollination, cross-pollination and no pollination on ovule, embryo, seed, and cone development in Western red cedar (*Thuja plicata*). *Can. J. Forest Res.* 20: 66-75.
- Page, G. F., George, V., Go, R. C., Page, P. Z. & Allison, D. B. 2003 "Are we there yet?": Deciding when one has demonstrated specific genetic causation in complex diseases and quantitative traits. *Am. J. Hum. Gen.* 73: 711-719.
- Paget, E. & Simonet, P. 1994. On the track of natural transformation in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 15: 109-118.
- Palmer, J. D., Adams, K. L., Cho, Y. ym. 2000. Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: mobile genes and introns and highly variable mutation rates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6960-6966.
- Parker, M. A. 1988. Disequilibrium between disease-resistance variants and allozyme loci in an annual legume. *Evolution* 42: 239-247.
- Pasonen, H-L., Pulkkinen, P. & Käpylä, M. 2001. Do pollen donors with fastest-growing pollen tubes sire the best offspring in an anemophilous tree, *Betula pendula* (Betulaceae)? *Am. J. Bot.* 88: 854-860.
- Pasonen, H-L., Pulkkinen, P. & Kärkkäinen, K. 2002. Genotype-environment interactions in pollen competitive ability in an anemophilous tree, *Betula pendula* Roth. *Theor. Appl. Genet.* 105: 465-473.
- Pasonen, H-L, Seppänen, S. K., Degefu, Y., Rytönen, A., von Weissenberg, K. & Pappinen, A. 2004. Field performance of chitinase transgenic silver birch (*Betula pendula* Roth.): Resistance to fungal diseases. *Theor. Appl. Genet.* Painossa.

- Pattison, R. R., Golstein, G. & Ares, A. 1998. Growth, biomass allocation and photosynthesis of invasive and native Hawaiian rainforest species. *Oecologia* 117: 449-459.
- Peakall, R., Smouse, P. E. & Huff, D. R. 1995. Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloe dactyloides*. *Mol. Ecol.* 4: 135-147.
- Peakall, R., Gilmore, S., Keys, W., Morgante, M. & Rafalski, A. 1998. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol. Biol. Evol.* 15: 1275-1287.
- Peart, M. H. 1984. The effects of morphology, orientation and position of grass diaspores on seedling survival. *J. Ecol.* 72: 437-453.
- Perl, A., Perl-Treves, R., Galili, S., Shalgi, E., Malkin, S. & Galun, E. 1993. Enhanced oxidative-stress defence in transgenic potato expressing tomato Cu,Zn superoxide dismutases. *Theor. Appl. Genet.* 85: 568-576.
- Perry, J. N., Rothery, P. Clark, S. J., Heard, M. S. & Hawes, C. 2003. Design, analysis and statistical power of the farm-scale evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *J. Appl. Ecol.* 40: 17-31.
- Pessel, F. D., Leconte, J., Emeriau, V., Krouti, M., Messean, A. & Goyon, P. H. 2001. Persistence of oilseed rape (*Brassica napus* L.) outside cultivated fields. *Theor. Appl. Genet.* 102: 841-846.
- Pettersson, M. W. 1992. Advantages of being a specialist female in the gynodioecious *Silene vulgaris* S. L. (Caryophyllaceae). *Am. J. Bot.* 79: 1389-1395.
- Philipp, M., Svart Madsen, H. E. & Sigismund, H. R. 1992. Gene flow and population structure in *Armeria maritima*. *Heredity* 69: 32-42.
- Pilate, G., Guiney, E., Holt, K., Petit-Conil, M., Lapierre, C., Leple, J. C., Pollet, B., Mila, I., Webster, E. A., Marstorp, H. G., Hopkins, D. W., Jouanin, L., Boerjan, W., Schuch, W., Cornu, D. & Halpin, C. 2003. Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nature Biotech.* 20: 607-612.
- Pilcher, D. C., Rice, M. E., Obrycki, J. J. & Lewis, L. C. 1997. Field and laboratory evaluations of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn on secondary lepidopteran pests (Lepidoptera: Noctuidae). *Plant Resistance* 90: 669-678.
- Pilon-Smits, E. & Pilon, M. 2002. Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Critical Rev. Plant Sci.* 21: 439-456.
- Pitkääjärvi, J. 1997. Geenitekniikalla muunnettujen mikro-organismien ympäristövaikutukset. Suomen ympäristö 98. Helsinki.
- Pohl-Orf, M., Brand, U., Schupan, I. & Bartsch, D. 1999. Monitoring the environmental impact of transgenic sugar beet *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris altissima* Döll – are we able to ask the right questions? Teoksessa: Amman, K., Jackot, Y., Simonsen, V. & Kjellsson, G. (toim.). Methods for risk assessment of transgenic plants. III. Ecological risks and prospects of transgenic plants, where we go from here? A dialogue between biotech industry and science. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland. 1-260 s.
- Pollard, E. & Yates, T. J. 1993. Monitoring butterflies for ecology and conservation. London: Chapman & Hall.
- Ponsard, S., Gutierrez, A. P. & N. J. Mills. 2002. Effect of Bt-toxin (Cry1Ac) in transgenic cotton on the adult longevity of four heteropteran predators. *Environ. Entomol.* 31: 1197-1205.
- Poulet, P., Cahen, D. & Malkin, S. 1983. Photoacoustic detection of photosynthetic oxygen evolution from leaves. Quantitative analysis by phase and amplitude measurements. *Biochim. Biophys. Acta* 724: 433-466.
- Pratley, J., Unwin, N., Stanton, R., Baines, P., Broster, J., Cullis, K., Schafer, B., Joseph, B. & Krueger, R. 1999. Resistance to glyphosate in *Lolium rigidum*. 1. Bioevaluation. *Weed Sci.* 47: 405-411.
- Preston, R. E. 1991. The interfloral phenology of *Streptanthus tortuosus* (Brassicaceae). *Am. J. Bot.* 78: 1044-1053.
- Primack, R. B. & Levy, C. K. 1988. A method to label seeds and seedlings using gamma-emitting radionuclides. *Ecology* 69: 796-800.
- Puchta, H. 2003. Towards the ideal GMP: Homologous recombination and marker gene excision. *J. Plant Physiol.* 160: 743-754.

- Puterka, G. J., Bocchetti, C., Dang, P., Bell, R. L. & Scorza, R. 2002. Pear transformed with a lytic peptide gene for disease control affects nontarget organism, pear psylla (Homoptera : Psyllidae). *J. Econ. Entomol.* 95: 797-802.
- Pyke, D. A. & Thompson, J. N. 1986. Statistical analysis of survival and removal rate experiments. *Ecology* 67: 240-245.
- Quist, D. & Chapela, I. H. 2001. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature* 414: 541-543.
- Rahman, M. H. & Rajora, O. P. 2002. Microsatellite DNA fingerprinting, differentiation, and genetic relationships of clones, cultivars, and varieties of six poplar species from three sections of the genus *Populus*. *Genome* 45: 1083-1094
- Rampton, H. H. & Ching, T. M. 1970. Persistence of crop seeds in soil. *Agron. J.* 62: 272-277.
- Rannala, B. & Yang, Z. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *J. Mol. Evol.* 43: 304-311.
- Rannala, B. & Mountain, J. L. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 9197-9201.
- Raps A., Kehr J., Gugerli P., Moar W.J., Bigler F. & Hilbeck A., 2001. Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and the non target herbivore *Rhopalosiphum padi* (Homoptera : Aphididae) for the presence of Cry1Ab. *Mol. Ecol.* 10: 525-533.
- Raybould, A. F. & Clarke, R. T. 1999b. Defining and measuring gene flow. Teoksessa: Lutman, P. J. W. (toim.): Gene flow and agriculture: Relevance to transgenic crops. British Crop Protection Council for CPS Symposium Proceeding Monograph No. 72BCBC, Farnham, UK, s. 41-88.
- Raybould, A. F. & Moyes C. L. 2001. The ecological genetics of aliphatic glucosinolates. *Heredity* 87: 383-391.
- Rejmánek, M. & Richardson, D. M. 1996. What attributes make some plant species more invasive? *Ecology* 77: 1655-1661.
- Rice, K. J. 1985. Responses of *Erodium* to varying microsites: the role of germination cueing. *Ecology* 66: 1651-1657.
- Riches, C. R. & Valverde, B. E. 2002. Agricultural and biological diversity in Latin America: implications for development, testing, and commercialization of herbicide-resistant crops. *Weed Technol.* 16: 200-214.
- Riddick, E. W. & Barbosa, P. 2000. Cry3A-intoxicated *Leptinotarsa decemlineata* (Say) are palatable prey for *Lebia grandis*. Hentz. *J. Entomol. Sci.* 35: 342-346.
- Rieger, M. A., Lamond, M., Preston, C., Powles, S.- B. & Roush, R. T. 2002. Pollen-mediated movement of herbicide resistance between commercial canola fields. *Science* 296: 2386-2388.
- Ritala, A., Nuutila, A. M., Aikasalo, R., Kauppinen, V. & Tammisola, J. 2002. Measuring gene flow in the cultivation of transgenic barley. *Crop Sci.* 42: 278-285.
- Robert, T., Lespinasse, R., Pernès, J. & Sarr, A. 1991. Gametophytic competition as influencing gene flow between wild and cultivated forms of pearl millet (*Pennisetum typhoides*). *Genome* 34: 195-200.
- Roberts, H. A. & Neilson, J. E. 1980. Seed survival and periodicity of seedling emergence in some species of *Atriplex*, *Chenopodium*, *Polygonum* and *Rumex*. *Ann. Appl. Biol.* 94: 111-120.
- Roberts, H. A. 1981. Seed banks in soil. Teoksessa: Coaker, T. H. (toim.): Advances in applied biology VI. Academic press, London. 1-55 s.
- Roberts, H. A. Boddrell, J. E. 1985a. Seed survival and seasonal pattern of seedling emergence in some *Leguminosae*. *Ann. Appl. Biol.* 106: 125-132.
- Roberts, H. A. 1986. Seed persistence in soil and seasonal emergence in plant species from different habitats. *J. Appl. Ecol.* 23: 639-656.
- Robertson, A. W., Diaz, A. & McNair, M. R. 1994. The quantitative genetics of floral characters in *Mimulus guttatus*. *Heredity* 72: 300-311.
- Rogers, H. J. & Parkes, H. C. 1995. Transgenic plants and the environment. *J. Exp. Bot.* 46: 467-488.
- Romeis, J., Battini, M. & Bigler, F. 2003. Transgenic wheat with enhanced fungal resistance causes no effects on *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae). *Pedobiologia* 47: 141-147.

- Romeis, J., Dutton, A. & Bigler, F. 2004. *Bacillus thuringiensis* toxin (Cry1Ab) has no direct effect on larvae of the green lacewing *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). *J. Insect Physiol.* 50: 175-183.
- Rouget, M. & Richardson, D. M. 2003. Inferring process from pattern in plant invasions: a semimechanistic model incorporating propagule pressure and environmental factors. *Am. Natural.* 162: 713-724.
- Rousset, F. & Raymond, M. 1995. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* 140: 1413-1419.
- Routley, M. B., Mavraganis, K. & Eckert, C. G. 1999. Effect of population size on the mating system in a self-compatible, autogamous plant, *Aquilegia canadensis* (Ranunculaceae). *Heredity* 82: 518-528.
- Rowe, D. E. 1989. Competition thinning of alfalfa planted at three densities. *Crop Sci.* 29: 1357-1361.
- Roy, B. A. 1995. The breeding systems of six species of *Arabidopsis* (Brassicaceae). *Am. J. Bot.* 82: 869-877.
- Royo, J., Gimez, E. & Hueros, G. 2000. CMP-KDO synthetase: a plant gene borrowed from gram-negative eubacteria. *Trends Genet.* 16: 432 - 433.
- Roy, D. B., Bohan, D. A., Haughton, A. J., Hill, M. O., Osborne, J. L., Clark, S. J., Perry, J. N., Rothery, P., Scott, R. J., Brooks, D. R., Champion, G. T., Hawes, C., Heard, M. S. & Firbank, L. G. 2003. Invertebrates and vegetation of field margins adjacent to crops subject to contrasting herbicide regimens in the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 358: 1879-1898.
- Sage, T. L. & Webster, B. D. 1990. Seed abortion in *Phaseolus vulgaris* L. *Bot. Gaz.* 151: 167-175.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. L. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Savolainen, O., Kärkkäinen, K., Harju, A., Nikkanen, T. & Rusanen, M. 1993. Fertility variation in *Pinus sylvestris*: A test of sexual allocation theory. *Am. J. Bot.* 80: 1016-1020.
- Savova, D., Rufener Al Mazyad, P. & Felber, F. 1996. Cytogeography of *Medicago falcata* L. and *M. sativa* L. in Switzerland. *Bot. Helv.* 106: 197-207.
- Saxena, D., Flores, S. & Stotzky, G. 1999. Transgenic plants: insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature* 402: 480.
- Saxena, D. & Stotzky, G. 2000. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33: 35-39.
- Saxena, D. & Stotzky, G. 2001. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria and fungi in soil. *Soil Biol. Biochem.* 33: 1225-1230.
- Saxena, D., Flores, S. & Stotzky, G. 2002. Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. *Soil Biol. Biochem.* 34: 133-137.
- Sharma, H. C., Sharma, K. K. & Crouch, J. H. 2004. Genetic transformation of crops for insect resistance: Potential and limitations. *Critical Rev. Plant Sci.* 23: 47-72.
- Scheffler, J. A., Parkinson, R. & Dale, P. J. 1993. Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). *Transgenic Res.* 2: 353-364.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. & Brown, P. O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.
- Schmid, B. & Harper, J. L. 1985. Clonal growth in grassland perennials. I. Density and pattern-dependent competition between plants with different growth forms. *J. Ecol.* 73: 793-808.
- Schmid, B. & Bazzaz, F. A. 1990. Plasticity in plant size and architecture in rhizome derived *Solidago* and *Aster*. *Ecology* 71: 523-535.
- Schmid, B. & Dolt, C. 1994. Effects of maternal and paternal environment and genotype on offspring phenotype in *Solidago altissima* L. *Evolution* 48: 1525-1549.
- Schonswetter, P., Paun, O., Tribsch, A. & Niklfeld, H. 2003. Out of the Alps: colonization of Northern Europe by East Alpine populations of the glacier buttercup *Ranunculus glacialis* L. (Ranunculaceae). *Mol. Ecol.* 12: 3373-3381.

- Schou, O. & Philipp, M. 1984. An unusual heteromorphic incompatibility system. 3. On the genetic control of distyly and self-incompatibility in *Anchusa officinalis* L. (Boraginaceae). *New Phytol.* 89: 693-703.
- Schribailo, R. W. & Barrett, S. C. H. 1994. Effects of prior self-pollination on outcrossed seed set in tristylous *Pontederia sagittata* (Pontederiaceae). *Sex. Plant Reprod.* 7: 273-281.
- Schuler, T. H., Poppy, G. M., Kerry, B. R. & Denholm, I. 1999. Potential side effects of insect-resistant transgenic plants on arthropod natural enemies. *Trends. Biotech.* 17: 210-216.
- Schuler, T. H., Denholm, I., Jouanin, L., Clark, S. J., Clark, A. J. & Poppy, G. M. 2001. Population-scale laboratory studies of the effect of transgenic plants on nontarget insects. *Mol. Ecol.* 10: 1845-1853.
- Seavey, S. R. & Carter, S. K. 1994. Self-sterility in *Epilobium obcordatum* (Onagraceae). *Am. J. Bot.* 81: 331-338.
- Seidler, R. J. & Levin, M. 1994. Potential ecological and nontarget effects of transgenic plant gene products on agriculture, silviculture, and natural ecosystems: general introduction. *Mol. Ecol.* 3: 1-3.
- Seppänen, S. K., Syrjälä, L., von Weissenberg, K., Teeri, T. H., Pajanen, L. & Pappinen, A. 2004. Antifungal activity of stilbenes in in vitro bioassays and in transgenic *Populus* expressing a gene encoding pinosylvin synthase. *Plant Cell Rep.* 22: 584-593.
- Shaw, C. H., Leemans, J., Shaw, C. H., van Montagu, M. & Schell, J. 1983. A general method for the transfer of cloned genes to plant cells. *Gene* 23: 315-330.
- Sheldon, J. C. 1974. The behaviour of seeds in soil. III. The influence of seed morphology and behaviour of seedlings on the establishment of plants from surface-lying seeds. *J. Ecol.* 62: 47-62.
- Siciliano, S. D. & Germida, J. J. 1999. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Exel and *B. rapa* cv. Parkland. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 263-272.
- Siciliano, S. D., Germida, J. J., Banks, K. & Greer, C. W. 2003. Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 483-489.
- Sime, K. R., Baldwin, I. T. 2003. Opportunistic out-crossing in *Nicotiana attenuata* (Solanaceae), a predominantly self-fertilizing native tobacco. *BMC Ecol.* 3: 6.
- Simonet, P. 2000. Evaluation des potentialités de transfert de l'ADN des plantes transgéniques vers les bactéries du sol. *OCL* 7 : 320-323.
- Sinclair, D. F. 1985. On tests of spatial randomness using mean nearest neighbour distance. *Ecology* 66: 1084-1085.
- Snaydon, R. W. & Satorre, E. H. 1989. Bivariate diagrams for plant competition data: modifications and interpretation. *J. Appl. Ecol.* 26: 1043-1057.
- Snaydon, R. W. 1991. Replacement or additive designs for competition studies. *J. Appl. Ecol.* 28: 930-946.
- Snow, A. A., Moran-Palma, P., Rieseberg, L. H., Wszelaki, A. & Seiler, G. J. 1998. Fecundity, phenology, and seed dormancy of F1 wild-crop hybrids in sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Am. J. Bot.* 85: 794-801.
- Snow, A.A., Andersen, B. & Bagger Jørgensen, R. 1999. Costs of transgenic herbicide resistance introgressed from *Brassica napus* into weedy *B. napus*. *Mol. Ecol.* 8: 605-615.
- Snow, A. A., Uthus, K. L. & Culley, T. M. 2001. Fitness of hybrids between weedy and cultivated radish: implications for weed evolution. *Ecol. Appl.* 11: 934-943.
- Snow, A. A., Pilson, D., Rieseberg, L. H., Paulsen, M. J., Pleskac, N., Reagon, M. R., Wolf, D. E. & Selbo, S. M. 2003. A Bt transgene reduces herbivory and enhances fecundity in wild sunflowers. *Ecol. Appl.* 13: 279-286.
- Soboleva, T. K., Shorten, P. R., Pleasants, A. B. & Rae, A. L. 2003. Qualitative theory of the spread of a new gene into a resident population. *Ecol. Modell.* 163: 33-44.
- Soltis, D. E. & Soltis, P. S. (toim.) 1990. *Isozymes in Plant Biology*. Dioscorioides Press, Portland, Oregon. 268 s.
- Soltis, D. E. & Soltis, P. S. 1993. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Rev. Plant Sci.* 12: 243-273.
- Spence, J. R. & Niemelä, J. K. 1994. Sampling carabid assemblages with pitfall traps: the madness and the method. *Can. Entomol.* 126: 881-894.

- Squire, G. R., Crawford, J. W., Ramsay, G., Thompson, C. & Brown, J. 1999. Gene flow at the landscape level. Teoksessa: P. J. W. Lutman, (toim.). Gene flow and Agriculture: Relevance for transgenic crops. Farnham, U. K.: British Crop Protection Council. s. 57-72.
- Squire, G. R., Brooks, D. R., Bohan, D. A., Champion, G. T., Daniels, R. E., Haughton, A. J., Hawes, C., Heard, M. S., Hill, M. O., May, M. J., Osborne, J. L., Perry, J. N., Roy, D. B., Woiwod, I. P. & Firbank, L. G. 2003. On the rationale and interpretation of the Farm Scale Evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 358: 1779-1799.
- St. Amand, P. C., Skinner, D. Z. & Peadar, R.N. 2000. Risk of alfalfa transgene dissemination and scale-dependent effects. *Theor. Appl. Genet.* 101: 107-114.
- Stanley-Horn, D. E., Dively, G. P., Hellmich, R. L., Mattila, H. R., Sears, M. K., Rose, R., Jesse, L. C. H., Losey, J. E., Obrycki, J. J. & Lewis, L. 2001. Assessing the impact of Cry1Ab-expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11931-11936.
- Stanton, M. L. 1985. Seed size and emergence time within a stand of wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.): the establishment of a fitness hierarchy. *Oecologia* 67: 524-531.
- Steffey, K. L., Venditti, M., Barrido, B. R. & Felsot, A. S. 2004. Effect of *Bacillus thuringiensis* corn on natural enemies of the European corn borer. *Agricultural Biotechnology: Challenges and Prospects. ACS Symposium Series* 866: 139-150.
- Stratton, D. A. 1995. Spatial scale of variation in fitness of *Erigeron annuus*. *Am. Naturalist* 146: 608-624.
- Su, J., Shen, Q., Ho, T. H. D. & Wu, R. 1998. Dehydration stress-regulated transgenic expression in stably transformed rice plants. *Plant Physiol.* 117: 913-922.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods) Version 4 (Sinauer, Sunderland, Massachusetts, 1998).
- Tabaschnik, B. E., Carriere, Y., Dennehy, T. J., Morin, S., Sisterson, M. S., Roush, R. T., Shelton, A. M. & Zhao, J. Z. 2003a. Insect resistance to transgenic Bt crops: Lessons from the laboratory and field. *J. Econ. Entomol.* 96: 1031-1038.
- Tabashnik, B. E., Dennehy, T. J., Carriere, Y., Liu, Y. B., Meyer, S. K., Patin, A., Sims, M. & Ellers-Kirk, C. 2003b. Resistance management: Slowing pest adaptation to transgenic crops. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science* 53: 51-56. Suppl. 1.
- Tanksley, S. D., Ganai, M. W., Prince, J. P., de Vicente, M. C., Bonierbale, M. W., Broun, P., Fulton, T. M., Giovannoni, J. J., Grandillo, S., Martin, G. B., Messeguer, R., Miller, J. C., Paterson, A. H., Pineda, O., Riider, M. S., Wing, R. A., Wu, W. & Young, N. D. 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-1160.
- Tanksley, S. D. 1993. Mapping polygenes. *Ann. Rev. Genet.* 27: 205-233.
- Tanksley, S. D., & Orton, T. J. (toim.). 1993. Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Elsevier, New York, s. 1-33.
- Tapp, H. & Stotzky, G. 1998. Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. *Soil Biol. Biochem.* 30: 471-476.
- Taylor, J. P. 1982. Carbon dioxide treatment as an effective aid to the production of selfed seeds in kale and brussel sprouts. *Euphytica* 31: 957-964.
- Templeton, A. R., Routman, E. & Phillips, C. A. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140: 767-782.
- Templeton, A. R. 1998. Nested clade analysis of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol. Ecol.* 7: 381-397.
- Tepfer, M. 2002. Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 467-491.
- Tepfer, D., Garcia-Gonzales, R., Mansouri, H., Seruga, M., Message, B., Leach, F. & Perica, M.C. 2003. Homology-dependent DNA transfer from plants to a soil bacterium under laboratory conditions: implications in evolution and horizontal gene transfer. *Transgenic Res.* 12: 425-437.
- Tero, N., Aspi, J., Siikamäki, P., Jäkäläniemi, A. & Tuomi, J. 2003. Genetic structure and gene flow in a metapopulation of an endangered plant species, *Silene tatarica*. *Mol. Ecol.* 12: 2073-85.

- Tesfaye, M., Dufault, N. S., Dornbusch, M. R., Allan, D. L., Vance, C. P. & Samac, D. A. 2003. Influence of enhanced malate dehydrogenase expression by alfalfa on diversity of rhizobacteria and soil nutrient availability. *Soil Biol. Biochem.* 35: 1103-1113.
- Thompson, K. & Grime, J. P. 1979. Seasonal variation in the seed banks of herbaceous species in ten contrasting habitats. *J. Ecol.* 67: 893-921.
- Thompson, K., Band, S. R. & Hodgson, J. G. 1993. Seed size and shape predict persistence in soil. *Funct. Ecol.* 7: 236-241.
- Thompson, C. J., Thompson, B. J. P., Ades, P. K., Cousens, R., Garnier-Gere, P., Landman, K., Newbiggin, E. & Burgman, M. A. 2003. Model-based analysis of the likelihood of gene introgression from genetically modified crops into wild relatives. *Ecol. Modell.* 162: 199-209.
- Tiedje, J. M., Colwell, R. K., Grossman, Y. L., Hodson, R. E., Lenski, R. E., Mack, R. N. & Regal, P. J. 1989. The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology* 70: 298-315.
- Timmons, A. M., Charters, Y. M., Crawford, J. W., Burn, D., Scott, S. E., Dubbels, S. J., Wilson, N. J., Robertson, A., O'Brien, E. T., Squire, G. R. & Wilkinson, M. J. 1996. Risks from transgenic crops. *Nature* 380: 48.
- Timonen, S., Finlay, R. D., Söderström, B. & Raudaskoski, M. 1993. Identification of cytoskeletal proteins in pine ectomycorrhizas. *New Phytologist* 124: 83-92.
- Tomimatsu, H., Hoya, A., Takahashi, H. & Ohara, M. 2003. Genetic diversity and multilocus genetic structure in the relictual endemic herb *Japonolirion osense* (Petrosaviaceae). *J. Plant Res.* 117: 13-18.
- Toole, E. H. & Brown, E. 1946. Final results of the Duvel buried seed experiment. *J. Agric. Res.* 72: 201-210.
- Troxler, J., Azelvandire, P., Zala, M., Defago, G. & Haas, D. 1997. Conjugative transfer of chromosomal genes between fluorescent pseudomonas in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 213-219.
- Tsarouhas, V., Gullberg, U. & Lagercrantz, U. 2003. Mapping of quantitative trait loci controlling timing of bud flush in *Salix*. *Hereditas* 138: 172-178.
- Turnbull, L. A., Rees, M. and Crawley, M. J. 1999. Seed mass and the competition/colonisation trade off: a sowing experiment. *J. Ecol.* 87: 899-912.
- Tyson, G. W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., Solovyev, V. V., Rubin, E. M., Rokhsar, D. S. & Banfield, J. F. 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature AOP*, published online 1 February 2004; doi:10.1038/nature02340.
- Urwin, P.E., Troth, K., Zubko, E.I. & Atkinson, H.J. 2001. Effective transgenic resistance to *Globodera pallida* in potato field trials. *Mol. Breeding* 8: 95-101.
- Vaeck, M., Reyenaerts, A., Höfte, H., Jansens, S., De Beuckeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Van Montagu, M. & Leemans, J. 1987. Transgenic plant protected from insect attack. *Nature*: 328: 33-37.
- van Aarssen, R., Soetaert, P., Stam, M., Dockx, J., Gossele, V., Seurinck, J., Reynaerts, A. & Cornelissen, M. 1995. CryIA(b) transcript formation in tobacco is inefficient. *Plant Mol. Biol.* 28: 513-524.
- Van Cutsem, P., du Jardin, P., Boutte, C., Beauwens, T., Jacqmin, S. & Vekemans, X. 2003. Distinction between cultivated and wild chicory gene pools using AFLP markers. *Theor. Appl. Gen.* 107: 713-718.
- Van Elsas, J. D., Nikkel, M. & van Overbeek, L. S. 1989. Detection of plasmid RP4 transfer in soil and rhizosphere, and the occurrence of homology to RP4 in soil bacteria. *Curr. Microbiol.* 19: 375-381.
- Van Gaal, T. M., Galatowitsch, S. M. & Strefeler, M. S. 1998. Ecological consequences of hybridization between a wild species (*Echinacea purpurea*) and related cultivar (*E. purpurea* "White Swan"). *Sci. Hort.* 76: 73-88.
- VanGessel, M. J. 2001. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. *Weed Sci.* 49: 703-705.
- van Tiendren, P. H. 1992. Variation in a population of *Plantago lanceolata* along a topographical gradient. *Oikos* 64: 560-572.
- Van Tuyl, J. M., van Diën, M. P., van Creijl, M. G. M., van Kleinwee, T. C. M., Franken, J. & Bino, R. J. 1991. Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. *Plant Sci.* 74: 115-126.

- Vekemans, X. & Hardy, O. J. 2004. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Mol. Ecol.* 13: 921-935.
- Veltman, C. J., Nee, S. & Crawley, M. J. 1996. Correlates of introduction success in exotic New Zealand birds. *Am. Natural.* 147: 542-557.
- Vierheilig, H., Alt, M., Lange, J., Gut-Rella, M., Wiemken, A. & Boller, T. 1995. Colonization of transgenic tobacco constitutively expressing pathogenesis-related proteins by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3031-3034.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., & Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Walden, R. & Schell, J. 1990. Techniques in plant molecular biology - progress and problems. *Eur. J. Biochem.* 192: 563-576.
- Walker, N. F., Hulme, P. E. & Hoelzel, A. R. 2003. Population genetics of an invasive species, *Heracleum mantegazzianum*: implications for the role of life history, demographics and independent introductions. *Mol. Ecol.* 12: 1747-1756.
- Warwick, S. I. 1990. Allozyme and life history variation in five northwardly colonizing North American weedy species. *Plant Syst. Evol.* 169: 41-54.
- Warwick, S. I., Black, L. D. & Aguinalalde, I. 1992. Molecular systematics of *Brassica* and allied genera (Subtribe *Brassicinae*, *Brassicaceae*) – chloroplast DNA variation in the genus *Diplotaxis*. *Theor. Appl. Genet.* 83: 839-850.
- Warwick, S. I., Simard, M. J., Legere, A., Beckie, H. J., Braun, L., Zhu, B., Mason, P., Seguin-Swartz, G. & Stewart, C. N. Jr. 2003. Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives: *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Willd.) O.E. Schulz. *Theor. Appl. Genet.* 107: 528-539.
- Warzescha, H. & Mason, H. 2003. Benefits and risks of antibody and vaccine production in transgenic plants. *J. Plant Physiol.* 160: 755-764.
- Waser, N. M. 1982. A comparison of distances flown by different visitors to flowers of the same species. *Oecologia* 55: 251-257.
- Weir, B. S. 1990. Genetic data analysis. Sinauer, Associates, Sunderland. 377 s.
- Weiss, J., Nerd, A. & Mizrahi, Y. 1994. Flowering behaviour and pollination requirements in climbing cacti with fruit crop potential. *HortScience* 29: 1487-1492.
- Weller, J. I., Soller, M. & Brody, T. 1988. Linkage analysis of quantitative traits in an interspecific cross of tomato (*Lycopersicon esculentum* X *Lycopersicon pimpinellifolium*) by means of genetic markers. *Genetics* 118: 329-339.
- Wendel, J. F. & Percy, R. G. 1990. Allozyme diversity and introgression in the Galapagos Islands endemic *Gossypium darwinii* and its relationship to continental *G. barbadense*. *Biochem. Syst. Ecol.* 18: 517-528.
- Werner, P. A. 1975. A seed trap for determining patterns of seed deposition in terrestrial plants. *Can. J. Bot.* 53: 810-813.
- Westcott, B. 1986. Some methods of analysing genotype-environment interaction. *Heredity* 56: 243-253.
- Westerbergh, A. & Doebley, J. 2002. Morphological traits defining species differences in wild relatives of maize are controlled by multiple quantitative trait loci. *Evol. Int. J. Org. Evolution* 56: 273-283.
- Wheeler, W. C. 1996. Optimization Alignment: the end of multiple sequence alignment in phylogenetics? *Cladistics* 12: 1-9.
- Wheeler, W. C. 1999. Fixed Character States and the Optimization of Molecular Sequence Data. *Cladistics* 15: 379-385.
- Wheeler, W. C., D. S. Gladstein, and Jan De Laet. 1996-2003. POY. Version 3.0. ftp.amnh.org/pub/molecular/poy (current version 3.0.11).
- Whitton, J., Wolf, D. E., Arias, D. M., Snow, A. A. & Rieseberg, L. H. 1997. The persistence of cultivar alleles in wild populations of sunflowers five generations after hybridization. *Theor. Appl. Gen.* 95: 33-40.
- Widmer, F., Seidler R. J. & Watrud L. S., 1996: Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms. *Mol. Ecol.* 5: 603-613.
- Wilcox, M. D. 1983. Inbreeding depression and genetic variances estimated from self- and cross-pollinated families of *Pinus radiata*. *Silvae Genet.* 32: 89-96.

- Wilkinson, M. J., Davenport, I. J. & Charters, Y. M., Jones, A. E., Allainguillaume, J., Butler, H. T., Mason, D. C. & Raybould, A. F. 2000. A direct regional scale estimate of transgene movement from genetically modified oilseed rape to its wild progenitors. *Mol. Ecol.* 9: 983-991.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Williams, J. H., Friedman, W. E. & Arnold, M. L. 1999. Developmental selection within the angiosperm style: Using gamete DNA to visualize interspecific pollen competition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9201-9206.
- Willson, M. F. 1994. Sexual selection in plants: Perspective and overview. *Am. Natural.* 144: 13-39.
- Wilson, S. D. & Tilman, D. 1991. Components of plant competition along an experimental gradient of nitrogen availability. *Ecology* 72: 1050-1065.
- Wilson, G. A. & Rannala, B. 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163: 1177-1191.
- Winn, A. A. 1985. Effects of seed size and microsite on seedling emergence of *Prunella vulgaris* in four habitats. *J. Ecol.* 73: 831-840.
- Wisniewski, J-P, Frangne, N., Massonneau, A. & Dumas, C. 2002. Between myth and reality: genetically modified maize, an example of a sizeable scientific controversy. *Biochimie* 84: 1095-1103.
- Whitton, J., Wolf, D. E., Arias, D. M., Snow, A. A. & Rieseberg, L. H. 1997. The persistence of cultivar alleles in wild populations of sunflowers five generations after hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 95 : 33-40.
- Wolf, D. E., Takebayashi, N. & Rieseberg, L. H. 2001. Predicting the risk of extinction through hybridization. *Conservation Biol.* 15: 1039-1053.
- Wolfe, K. H., Li, W. H. & Sharp, P. M. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 9054-9058.
- Wolfe, A. D., Estes, J. R. & Chissoe III, W. F. 1991. Tracking pollen flow of *Solanum rostratum* (Solanaceae) using backscatter scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. *Am. J. Bot.* 78: 1503-1507.
- Wolfe, L. M. 1993. Inbreeding depression in *Hydrophyllum appendiculatum*: Role of maternal effects, crowding, and parental mating history. *Evolution* 47: 374-386.
- Wolfe, L. M. 2002. Why alien invaders succeed: support for the escape-from-enemy hypothesis. *Am. Natural.* 160: 705-711.
- Wolfenbarger, L. L., & Phifer, P. R. 2000. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. *Science* 290: 2088-2093.
- Wraight, C. L., Zangerl, A. R., Carroll, M. J. & Berenbaum, M. R. 2000. Absence of toxicity of Bt pollen to black swallowtails under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7700-7703.
- Zhang, D. X. & Hewitt, G. M. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol. Ecol.* 12: 563-584.
- Zhang, J. & Maun, M. A. 1990. Effects of sand burial on seed germination, seedling emergence, survival and growth of *Agropyron psammophilum*. *Can. J. Bot.* 68: 304-310.
- Zhao, S. & Bruce, W. B. 2003. Expression profiling using cDNA microarrays. *Methods Mol. Biol.* 236: 365-380.
- Zwahlen, C., Hilbeck, A., Howald, R. & Nentwig, W. 2003. Effects of transgenic Bt corn litter on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Mol. Ecol.* 12: 1077-1086.
- Åkerman, S., Tammissola, J., Lapinjoki, S. P., Söderlund, H., Kauppinen, V., Viherä-Aarnio, A., Regina, M. & Hagqvist, R. 1995. RAPD markers in parentage confirmation of a valuable breeding progeny of European white birch. *Can. J. For. Res.* 25: 1070-1076.
- Åkerman, S., Tammissola, J., Regina, M., Kauppinen, V. & Lapinjoki, S. 1996. Segregation of AFLP markers in *Betula pendula* (Roth). *Forest Genetics* 3: 117-124.

Liite I. Valikoituja menetelmiä

Valikoituja menetelmiä

Molekyyli menetelmät ovat käyttökelpoisia työkaluja tutkittaessa muuntogeenisten kasvien ympäristövaikutuksia, mm. risteytymismahdollisuutta, introgressiota ja horisontaalista geenin siirtymistä. Geneettiset markerit eivät ole välttämättä informatiivisia sellaisenaan, mutta erilaisiin analyysimenetelmiin yhdistettynä niiden avulla voidaan selvittää esim. vanhemmuutta, sukulaisuussuhteita, geenivirtaa ja populaatiodynamiikkaa sekä tunnistaa ja erottaa toisistaan tutkittavia yksilöitä.

Kasvien kromosomilukua tai kromosomaalisia **poikkeavuuksia** voidaan tutkia **kromosomilaskennan** (ks. Li & Hao 1992; Soltis & Soltis 1993) tai virtausyotometrian (ks. Eber ym. 1997; Wilkinson ym. 2000) avulla. Menetelmiä voidaan käyttää esim. hybridisaatiotutkimuksissa tutkittaessa eri kromosomiluvun omaavien kasvien jälkeläisiä.

Morfologisia markkereita ovat esim. kukkien/siementen väri tai muoto (ks. Hamrick ym. 1979; Wilcox 1983; Landry ym. 1987; Baker 1988; Schmid & Bazzaz 1990; Argyes & Schmitt 1991; Philipp 1992; Isobe ym. 2003). Morfologisten markkereiden käytön etuna on se, että kalliita laboratoriotutkimuksia ei tarvita siinä määrin kuin proteiini- tai DNA-markkereita käytettäessä, sillä morfologiset ominaisuudet voi havaita silmämääräisesti. Morfologisten markkereiden käytön haittapuolena on, ettei aina ole helppoa päätellä, johtuuko havaittu vaihtelu kasvin perimästä (jolloin se voi olla yhden tai useamman geenin ohjaama; ks. esim. Westerbergh & Doebley 2002) vai ympäristökijöistä.

Proteiinit

Entsyymimarkerit ovat yleisesti käytettyjä mm. geenivirran tutkimisessa ja geneettisen diversiteetin arvioinnissa hyvän vaihtelevuutensa ja menetelmien suhteellisen helppouden takia. Proteiinimarkkereita valitessa päädytään yleensä nimenomaan entsyymeihin, koska niiden oletetaan olevan valinnan suhteen neutraaleja (Parker 1988; Kemppinen ym. 2003). Lisäksi elektroforeettisilla menetelmillä havaittavien entsyymien oletetaan olevan kodominanteja, eli niiden avulla voidaan erottaa homo- ja heterotsygootit toisistaan. Proteiinimarkerit ovat suhteellisen helppokäyttöisiä, mutta niiden käytön ongelmana on rajallinen vaihtelu (polymorfismi).

Entsyymiaktiivisuus

Entsyymiaktiivisuuksia määritetään joko tietyssä kasvuvaiheessa tai tietyssä osassa kasvia. Entsyymiaktiivisuutta voidaan myös mitata erilaisissa ympäristöpaineissa (enzyme assay; ks. Luna ym. 1985; McKersie ym. 1993; Fischbach ym. 2000).

Immunologinen vaste

Immunologista vastetta voidaan tutkia **ELISA**-menetelmää käyttämällä. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) on antigeeni-vasta-ainereaktioihin perustuva määritysmenetelmä, jota on käytetty esim. Bt-toksiinien pitoisuuden mittaamiseen kasveista ja selkärangattomista (ks. esim. Dutton ym. 2002) tutkittaessa toksiinien vaikutuksia muihin kuin kohdeorganismeihin. ELISA-menetelmä on herkkä, mutta sen heikkoutena on, että eri eristysmenetelmät voivat synnyttää analyysiä häiritseviä tuotteita (ks. Miksic 1992).

Proteiinimarkkerit

Allotsyymit ovat eri alleelien koodaamia entsyymejä, jotka erotellaan toisistaan elektroforeettisesti kokonsa ja sähkövarauksessa perusteella. Niistä saatua tietoa voidaan käyttää esim. populaatioiden geneettisen diversiteetin arviointiin (Wendel & Percy 1990; Bartsch ym. 1999; Tomimatsu ym. 2003). Allotsyymien käytön rajoitteena on niiden rajallinen polymorfia. Lisäksi lokukset saattavat liittyä kelpoisuusominaisuuksiin, joten ne eivät välttämättä ole neutraaleja markkereita. **Isoentsyymit** ovat entsyymejä, joilla on sama katalyyttinen vaikutus, mutta eri sähkövaraus (Lewontin & Hubby 1966). Isoentsyymejä on käytetty erilaisiin analyysimenetelmiin yhdistettynä (ks. edellä) mm. populaatiodynamiikan (Burdon ym. 1983; Govindaraju 1988; Adams ym. 1992), ekosysteemivaikutusten (Nevo ym. 1986), invaasion (Warwick 1990) ja geneettisen diversiteetin (Marchelli & Gallo 2001) tutkimiseen. Isotsyymimenetelmä paljastaa vain osan geneettisestä vaihtelusta, sillä vain noin yksi kolmasosa aminohapposubstituutioista vaikuttaa proteiinin sähkövaraukseen (Kjellsson & Simonsen 1994).

DNA

DNA-menetelmiä käyttämällä päästään käsiksi informaatioon, johon ympäristötekijät eivät vaikuta siinä määrin kuin esim. morfologisiin ominaisuuksiin. Esimerkiksi geenivirtaa tutkittaessa voidaan käyttää joko pelkästään tuman markkereita tai niiden lisäksi paternaalisesti (paljassiemenisten kloroplastit) ja/tai maternaalisesti (koppisiemenisten kloroplastit, yleisesti mitokondriot) periytyviä markkereita. Viimeksi mainitussa tapauksessa kyetään arvioimaan siementen välityksellä tapahtuneen geenivirran määrä suhteessa siitepölyvälitteisen geenivirran määrään (Kemppinen ym. 2003). Kasvien kolmesta genomista (tuma, kloroplasti ja mitokondrio) mitokondrion DNA on joitakin poikkeuksia lukuunottamatta kaikkein konservoitunein (ks. Palmer ym. 2000), kun taas eläimillä kyseinen DNA on erittäin nopeasti muuttuvaa (Wolfe ym. 1987). Tästä syystä tuman ja kloroplastin DNA on kasvien populaatiotutkimuksissa mitokondrion DNA:ta käyttökelpoisempaa. Seuraavista menetelmistä esimerkiksi sekvensointia, mikro- ja minisatelliitteja, sekä RFLP-menetelmää käytettäessä on tutkittavien geenialueiden nukleotidien emäsjärjestys tunnettava jo etukäteen. Tämä johtuu siitä, että niiden monistamiseen on suunniteltava sopivat alukkeet (noin 20 emäsparin pituiset oligonukleotidisekvenssit), joiden avulla templaatti-DNA:sta saadaan monistettua juuri haluttu alue. Tietoja eri eliöiden DNA- ja proteiinisekvensseistä löytyy geenipankeista (ks. esim. <http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html> tai <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR-menetelmässä (ks. Mullis ym. 1986) tutkittavan organismin tietty geenialue monistetaan eristetystä DNA-näytteestä (tai suoraan tutkittavasta solukosta) geenispesifejä tai satunnaisia alukkeita käyttämällä. Kyseistä menetelmää voidaan käyttää GM-kasvien yhteydessä geenivirran tutkimisessa siinä tapauksessa, että siirtogeneeni on liitetty (paternaalisesti periytyvän) kloroplastin genomiin. Esim. James ym. (2001) kehittivät pelargonian siitepölystä suoran PCR-menetelmän, jonka avulla voidaan tutkia kloroplastien paternaalista periytymistä. Ritala ym. (2002) puolestaan tutkivat geenivirtaa *nptII*-muunnetusta ohrasta koirassteriileihin muuntamattomiin kasveihin 225 m² ja 2000 m² kokoisilta aloilta. *NptII*:n siirtymistä arvioitiin PCR-analyysin avulla 1-100 m:n päästä kerätyistä vastaanottajakasveista.

Sekvensointi

Sekvensointi (ks. Sanger ym. 1976) tehdään nukleotidisekvenssin emäsjärjestyksen määrittämiseksi esim. PCR-tuotteista. PCR-monistamisen jälkeen valmis tuote puhdistetaan ja sekvensoidaan. Valmiit sekvenssit tarkastetaan ja käsitellään jollakin monista sekvenssiohjelmista (ks. esim. <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>), minkä jälkeen ne tarvittaessa analysoidaan jäljempänä mainittuja menetelmiä käyttäen. DNA-sekvenssit sisältävät yleensä vähän vaihtelua (etenkin populaatioiden sisällä), mutta ovat satunnaisia fragmentteja (esim. RAPD) luotettavampia käyttää varsinkin eliöiden fylogeniaa tutkittaessa (ks. edellä). Sekvensoinnin avulla voidaan tutkia **geenien rakennetta, jäljittää (siirto)geenejä** tai niiden osia tai tutkia eliöiden **sukulaisuussuhteita**. Konservoituneita geenialueita fylogeneettisessa analyysissä käyttämällä voidaan selvittää tutkittavien eliöiden polveutumista esim. heimotasolla; vaihtelevammat alueet (esim. intronit) taas käyvät suku- tai joskus populaatiotasonkin tutkimuksiin. Sekvensoinnista on tullut nopeaa, helppoa ja suhteellisen halpaa menetelmien kehittymisen myötä. Sekä DNA:n eristykseen, monistamiseen, puhdistamiseen että sekvensoimiseen on saatavilla helppokäyttöisiä kittejä.

Real-time PCR

Real-time PCR -menetelmän (RT-PCR) avulla voidaan mitata DNA:n (tai RNA:n) määrä tutkittavasta näytteestä DNA:n monistamisen yhteydessä. RT-PCR-järjestelmä perustuu fluoresoivan merkkiaineen (reportterin) käyttöön. Fluoresoivan signaalin voimakkuus näytteessä lisääntyy suoraan verrannollisesti siinä olevan PCR-tuotteen (eli DNA- tai RNA-molekyylien) määrään. Näytteessä alunperin olleen templaatti-DNA:n määrä saadaan selville, kun kustakin PCR-syklistä mitataan fluoresoivan emission määrä. Esim. Ingham ym. (2001) ja Mason ym. (2002) määrittivät menetelmän avulla siirtogeenien lukumääriä tutkittavista GM-kasveista. Menetelmää on myös käytetty selvittäessä GM-materiaalin osuutta elintarvikenäytteistä (ks. esim. Locatelli ym. 2000). RT-PCR -menetelmän avulla on myös mahdollista tutkia kasvigeenien ilmentymistä vuorovaikutuksessa muiden organismien kanssa, esim. patogeeni-infektion aikana (McMaugh & Lyon 2003). Filion ym. (2003) tutkivat RT-PCR -menetelmän avulla sieni-DNA:n määrää maaperänäytteistä. Lähestymistapaa voidaan mahdollisesti käyttää maaperämikrobien määrän tai yhdyskuntarakenteen muutosten selvittämiseen tutkittaessa GM-kasvien (tai niistä johtuvien viljelymenetelmien muutosten) muihin kuin kohdeorganismeihin kohdistuvia vaikutuksia.

In situ -hybridisaatiomenetelmä

In situ -hybridisaatiomenetelmän avulla voidaan kromosomista, solusta tai solukosta paikallistaa tietty DNA- tai RNA-jakso leimatun koettimen avulla. Menetelmä perustuu koettimen liittymiseen kohde-DNA:han tai RNA:han ja näin syntyvän nukleinihappohybridin havainnoimiseen. Leimoina voidaan käyttää radioaktiivisia aineita tai esim. biotiinia.

DNA-sirumenetelmä

DNA-sirumenetelmällä (DNA microarray) mitataan kuinka monta mikrosirulle kiinnitettyä DNA-koetinta vastaavaa geeniä tutkittavasta näytteestä löytyy. DNA-siru on lasi- tai piilevy, jonka pinnalle on syntetisoitu tai sidottu DNA-molekyyliä (geenien osia), joihin hybridisoidaan tutkittavan näytteen RNA:sta valmistettua fluoresoivalla aineella leimattua vastin-DNA:ta (ks. Schena ym. 1995; DeRisi ym. 1996; Zhao & Bruce 2003). Hybridisoinnin jälkeen siru luetaan laserin avulla, minkä jälkeen mikrosirudata on sähköisessä muodossa. Saatu informaatio käsitellään valtavan määränsä vuoksi erilaisilla bioinformatiikan menetelmillä. Geenisirujen

avulla voidaan tutkia samanaikaisesti kymmenien tuhansien geenien ilmentymistasot soluissa tai solukoissa. DNA-sirujen avulla voidaan myös jäljittää yksittäisiä nukleotidipolymorfismeja.

QTL (Quantitative trait loci)

Suuri osa eliöiden ominaisuuksista on kvantitatiivisia, eli niihin vaikuttaa ympäristön lisäksi määrältään ja vaikutuksiltaan tuntematon joukko geenejä (ks. esim. Westerbergh & Doebley 2002). QTL:n (ks. Tanksley 1993; Lander & Schork 1994; Page ym. 2003), eli kvantitatiivisia ominaisuuksia säätelevien lokusten kartoittamisen tavoitteena on tunnistaa kromosomialueita, joissa esiintyvä muuntelu vaikuttaa merkittävästi tutkittaviin (kvantitatiivisiin) ominaisuuksiin, sekä tunnistaa vaikutuksen taustalla olevia geenejä. QTL-kartoituksessa tutkitaan eliön koko genomi tasaisin välimatkoin sijaitsevien DNA-markkerien avulla. Markkereita käyttämällä tutkimus voidaan kohdistaa suoraan ominaisuuden perinnölliseen osaan ilman ympäristövaikutusten aiheuttamaa häiriötä. Menetelmän avulla on tutkittu esim. silmujen puhkeamisen geneettistä kontrollia pajuilla (*Salix sp.*; ks. Tsarouhas ym. 2003). Lisäksi esim. Narvel ym. (2001) selvittivät soijan (*Glycine max*) mutaation kautta syntyneen hyönteisresistenssin introgressoitumista muihin soijalajikkeisiin käyttämällä QTL- ja RFLP -menetelmiä.

Nukleotidipolymorfismit

Nukleotidipolymorfismit (SNP; single nucleotide polymorphism; ks. esim. Kwok & Chen 2003) ovat genomisen DNA:n yksittäisiä emäsparikohtia, joista esiintyy eri alleeleja joidenkin populaatioiden normaaleissa yksilöissä. SNP:itä käytetään monenlaisten populaatiogenetiikan ongelmien, kuten esim. populaatioiden sisäisen alleelien jakautumisen tarkastelussa (ks. esim. Nielsen & Signorovitch 2003), sekä tutkittaessa alleelien tasapainoa ja kytkeytymistä. Mikäli tutkittavasta organismista ei ole aiemmin tutkittu SNP-markkereita, on sellaiset kehitettävä erikseen (ks. esim. Karl & Avise 1993; Bagley ym. 1997). Zhang ja Hewitt (2003) mukaan tuman DNA:sta erityisesti intronit ovat vaihtelunsa ja alukkeiden helpon valmistuksen vuoksi genomien käyttökelpoisimpia osia, ja niiden käyttö tulee luultavasti yleistymään tulevaisuudessa entisestään.

RFLP

RFLP (restriction fragment length polymorphism) -menetelmässä eristetty kokonais-DNA (tai valmis PCR-tuote) pilkotaan valituilla restriktioentsyymeillä ja näin saadut fragmentit erotetaan toisistaan elektroforeesin avulla (ks. esim. Landry ym. 1987, 1991; McGrath & Quiros 1992; Warwick ym. 1992; Jain 1993; Olczak ym. 2001; Devey ym. 2004; Milne & Abbot 2004).

- **Southern blotting** -menetelmässä elektroforeesigeelin DNA siirretään nailon- tai nitroselluloosamembraanille, jolta halutut DNA-fragmentit voidaan jäljittää erityisiä nukleotidikoettimia käyttämällä.
- **Northern blotting** -menetelmässä DNA:n sijasta käytetään pilkkomatonta RNA:ta. Eristetyn kokonais-DNA:n tilalla voidaan käyttää myös monistettua PCR-tuotetta, joka pilkotaan restriktioentsyymien avulla. Saadut pilkkoutumistuotteet erotellaan elektroforeesissa, jonka jälkeen eri näytteistä saatuja fragmenttikuvioita voidaan verrata keskenään (ks. esim. Nwakanma ym. 2003). Nykyään RFLP-menetelmän sijasta kuitenkin suositaan mikrosatelliittimenetelmien käyttöä.
- **Western-analyysissä** jäljitetään proteiineja spesifien vasta-aineiden avulla. Menetelmän avulla on mm. jäljitetty siirtogeeniperäisiä proteiineja herbivorihyönteisistä (ks. esim. Cherqui ym. 2003).

RAPD

RAPDit (random amplified polymorphic DNA) ovat populaatiotason geneettisiä markkereita (ks. esim. Williams ym. 1990; Boury ym. 1992; Kresowitch ym. 1992; Åkerman ym. 1995; Aga ym. 2003; Milne & Abbot 2004). RAPD-menetelmässä käytetään lyhyitä nukleotidialukkeita, joiden avulla kasvin genomista monistetaan satunnaisia DNA-fragmentteja PCR-menetelmää käyttäen. Monistetut fragmentit erotellaan toisistaan elektroforeesin avulla. Elektroforeesissa syntyneitä DNA-fragmenttikuvioita voidaan käyttää yksilöiden tai populaatioiden tunnistamiseen tai vertailuun sellaisenaan, tai kutakin fragmenttia voidaan käyttää esim. fylogeneettisessä analyysissä tutkittavien eliöiden sukulaisuussuhteiden selvittämiseksi (jolloin informatiivinen ominaisuus = tutkittavassa näytteessä on/ei ole tietyn pituista fragmenttia). Lisäksi menetelmää voidaan hyödyntää populaatioiden geneettisen vaihtelun määrän selvittämiseen yhdessä erilaisten analyysimenetelmien (ks. jäljempänä) kanssa. Pohl-Orf ym. (1999) mukaan RAPD-markkerit ovat erittäin käyttökelpoisia markkereita tutkittaessa geenivirtaa viljeltyjen ja luonnonvaraisten juurikkaitten (*Beta vulgaris*) välillä. Lisäksi menetelmällä saatiin tietoa kasvien geneettisestä monimuotoisuudesta. RAPD-menetelmän käyttäminen on suhteellisen edullista, sillä syntyneitä DNA-fragmentteja ei yleensä sekvensoida, paitsi tarkistusmielessä. Menetelmän käytön haittapuoli on se, että tulos on herkkä monistusolosuhteiden muutoksille (esim. templaatti-DNA:n määrän vaihtelulle). Fylogenian tutkimisessa RAPD:ien käyttöä on kritisoitu, sillä samanpituisten monistettujen DNA-fragmenttien homologiasta ei voida olla täysin varmoja ilman niiden sekvensointia.

Gradientielektroforeesi

Gradientielektroforeesissa (ks. esim. Heuer ym. 1997; Gyamfi ym. 2002) sekvensituotteet erotellaan toisistaan joko lämpötila- (TGGE) tai denaturaatiogradientin (DGGE) avulla (ks. <http://www.ich.ucl.ac.uk/cmgs/dgge.htm>). Esim. Siciliano ym. (2003) tutkivat fytoimediaation vaikutuksia maaperän mikrobisyhdyskuntien rakenteeseen DGGE:n avulla. Bakteereja tutkittaessa maaperän totaalinen DNA eristetään ja monistetaan PCR:n avulla bakteerispesifejä alukkeita käyttämällä, minkä jälkeen saadut sekvenssituotteet erotellaan toisistaan gradientielektroforeesin avulla. Saatu fragmenttikuvio voidaan analysoida joko sellaisenaan (ks. Siciliano ym. 2003) tai eripituiset fragmentit (joista kukin vastaa omaa bakteerilajiaan) leikataan irti geelistä, monistetaan edelleen PCR:n avulla ja sekvensoidaan. Menetelmä on herkkä ja yksinkertainen, ja lisäksi gradientissa ajettavat sekvenssit voi jälkikäteen sekvensoida DNA:n emäsjärjestyksen selvittämiseksi. Gradientielektroforeesia voidaan mahdollisesti hyödyntää muitakin maaperän eliöitä, esim. sieniyhdyskuntien rakennetta tutkittaessa.

AFLP

AFLP (amplified fragment length polymorphism; ks. Vos ym. 1995) -menetelmässä genominen DNA pilkotaan restriktioentsyymeillä ja osa saaduista fragmenteista monistetaan PCR-menetelmän avulla erityisiä kolmiosisaisia alukkeita käyttämällä. Syntyneiden DNA-fragmenttien päihin liitetään ns. adapterit, joihin alukkeet voivat kiinnittyä. Valmiit DNA-fragmentit erotellaan toisistaan polyakryyliamidigeelillä ja jäljitetään radioisotooppien tai fluoresoivan leiman avulla. AFLP:t ovat usein vaihtelevia populaatiotasolla (ks. esim. Åkerman ym. 1996; Johnson ym. 2003) ja RAPD-menetelmään verrattuna tulokset ovat hyvin toistettavia. AFLP-menetelmää on käytetty mm. jääleinikin (*Ranunculus glacialis*) leviämishistoriaa selvittäessä (Schonswetter ym. 2003). Tero ym. (2003) tutkivat tataarikohokin (*Silene tatarica*) osapopulaatioiden sisäistä ja välistä geneettistä muuntelua käyttämällä AFLP-markkereita yhdessä mm. bayesilaisen analyysin kanssa (joka ryhmitti kun-

kin tutkitun osapopulaation omaksi ryhmäkseen). Lisäksi tutkimuksessa käytettiin simulaatiota (coalescent-based simulaation) ja **assignment**-testiä geenivirran ja kaukolevinnän tutkimiseen populaatioiden välillä.

Mikrosatelliitit

Mikrosatelliitit (tai SSR; simple sequence repeat) ovat yhdestä kuuteen vierekkäisen emäsparin muodostamia DNA-toistojaksoja. Mikrosatelliitit monistetaan PCR-menetelmän avulla ja PCR-tuotteet erotellaan toisistaan polyakryyliamidigeleielektroforeesin avulla, jolloin eripituiset tuotteet erottuvat yhden nukleotidin tarkkuudella. Mikrosatelliittifragmentit jäljitetään geelistä radioaktiivisen tai fluoresoivan leiman avulla. Mikrosatelliitit ovat hyviä geneettisiä markkereita muuntelevuutensa, kodominanssin (heterotsygootit ja homotsygootit voidaan erottaa toisistaan) ja mendelistisen periytymisensä takia. Niitä voidaan yleensä käyttää erojen havaitsemiseen sellaistenkin populaatioiden välillä, jotka eivät eroa toisistaan muita menetelmiä käyttämällä (Peakall ym. 1998). Mikrosatelliitteja on käytetty neutraaleina markkereina populaatiogeneettisissä tutkimuksissa selvittäessä mm. vanhemmuutta ja sukulaisuussuhteita, geenivirtaa, populaatioiden erilaistumista, leviämistä ja valinnan vaikutusta muuntelun määrään (ks. esim. Litt & Luty 1989; Gonzales-Martinez ym. 2002; Huang ym. 2002b; Lee ym. 2004; Walker ym. 2003). Lisäksi mikrosatelliitteja on käytetty markkereina mm. QTL-menetelmässä (quantitative trait loci; ks. edellä). Mikrosatelliitti-menetelmän käyttö edellyttää kuitenkin jonkin verran sekvenssien aiempaa tuntemista, sillä halutun lokuksen monistamiseen käytetään reuna-alueisiin sopivia alukkeita. Vaikka useimpia geneettisiä markkereita pidetään yleisesti valinnan suhteen neutraaleina, on Zhang ja Hewitt (2003) mukaan mikrosatelliittimenetelmällä saatuihin tuloksiin suhtauduttava jossakin määrin varauksellisesti. Tämä johtuu mm. siitä, että toistojaksojen mutaationopeus vaihtelee suuresti läheistenkin sukulaisten kesken. On siis mahdollista, että toisin kuin on aiemmin oletettu, jotkut mikrosatelliittimarkkerit eivät olekaan neutraaleja (Zhang & Hewitt 2003).

ISSR

Toisin kuin mikrosatelliittimenetelmässä, inter-simple sequence repeat (ISSR) – markkereita käytettäessä ei monistettavaa aluetta tarvitse tuntea etukäteen, sillä ISSR-alukkeet sopivat suoraan toistosekvensseihin (Godwin ym. 1997). Esim. Awasthi ym. (2004) ovat käyttäneet menetelmää geneettisen diversiteetin tutkimiseen yhdessä RAPD-markkerien kanssa.

Minisatelliitit

Minisatelliitit (VNTR; variable number of tandem repeats; ks. Jeffreys ym. 1985) ovat noin 10-100:n emäsparin mittaisia toistojaksoja, joiden määrä vaihtelee yksilöiden välillä. Minisatelliitteja monistetaan PCR-menetelmän avulla siten, että toinen tarvittavasta kahdesta alukkeesta sijaitsee itse toistojaksossa ja toinen toistojakson ulkopuolella. Valmiit PCR-fragmentit voidaan jäljittää agarosielektroforeesilla tai Southern blotting-menetelmän (ks. edellä) avulla. Minisatelliitteja voidaan käyttää mm. yksilöiden tunnistuksessa.

EST

EST (expressed sequence tags) -sekvenssit ovat lyhyitä vastin-DNA klooneja. Vastin-DNA valmistetaan entsyymaattisesti kopioimalla lähetti-RNA (mRNA) kaksijuosteiseksi DNA:ksi. Koska EST-sekvenssit ovat peräisin lähetti-RNA:sta, ne antavat kuvan geenien ilmentymisestä esim. tietyissä solukoissa tai tietyssä kehitysvaiheessa.

DNA:n sekvensoinnin avulla selvitetään yleensä yksittäisten geenien tai geenialueiden nukleotidijärjestys, kun taas muilla menetelmillä voidaan saada suhteellisen laaja otos koko genomista. RAPD- ja RLFP -markkerit ovat muuntelevampia kuin proteiinimarkkerit (ks. esim. Liu & Furnier 1993). Mikro- ja minisatelliitit ovat taas edellä mainittuja markkereita vielä muuntelevampia. Mikro- ja minisatelliittien, RAPD-, AFLP- tai RFLP-markkerien avulla voidaan tutkittavista eliöistä valmistaa **DNA-sormenjälkiä**. DNA-sormenjälkiä on käytetty sekä kasvien geneettisen muuntelun, että myös kasviryhmien sukulaisuussuhteiden selvittämiseen (ks. Rahman ym. 2002; Mayo & Langridge 2003). Sormenjälkien saamiseksi voidaan käyttää myös DarT-menetelmää (Diversity Arrays™ Technology; ks. Jaccoud ym. 2001). Menetelmän avulla voidaan valikoitujen polymorfisten markkerien läsnäolon/puuttumisen perusteella mm. tunnistaa yksilöitä, tutkia sukulaisuussuhteita ja tutkia geneettistä diversiteettiä (ks. [www-sivu http://www.cambia.org](http://www.cambia.org)).

Esimerkkejä menetelmistä, joita voidaan käyttää erilaisten molekyyliaiaineistojen analysointiin

Geneettiset markkerit sopivat sellaisenaan esim. tutkittavien yksilöiden tunnistamiseen. Useimmiten molekyyliaiaineisto on kuitenkin tulosten saamiseksi tai niiden ymmärrettävyyden parantamiseksi analysoitava yhden tai useamman menetelmän avulla. Polymorfisten geneettisten markkereiden analysointiin käyvät muun muassa seuraavanlaiset menetelmät:

Wrightin fiksaatioindeksi

Wrightin fiksaatioindeksi on tilastollinen menetelmä, josta saadaan arvo (F) havaitun ja odotetun heterotsygotian asteen perusteella (Burdon ym. 1983; Soltis & Soltis 1990). Fiksaatioindeksin arvo vaihtelee nolasta (ei erilaistumista populaation ja sen osapopulaatioiden välillä) yhteen. Arvo yksi on lähinnä teoreettinen, sillä käytännössä indeksi on pienempi, jopa erittäin erilaistuneissa populaatioissa. Wrightin fiksaatioindeksiä voidaan käyttää mendelistisesti periytyvien ja Hardy-Weinbergin tasapainossa olevien markkereiden analysointiin ja esim. sisäsiittoisuuden asteen tutkimiseen (Kjellsson & Simonsen 1994).

AMOVA

Analysis of Molecular Variance (AMOVA) -menetelmän avulla voidaan suoraan molekyyliaiaineistosta laskea populaatioiden erilaistumisaste ja testata erilaisia erilaistumishypoteeseja. Menetelmässä voidaan käyttää monenlaista molekyyliaiaineistoa, esim. DNA-sekvenssejä, RFLP- ja AFLP-markkereita. Lisäksi aineistona voidaan käyttää molekyylidataan perustuvia fylogeneettisiä puita (Excoffier ym. 1992; Michalakis & Excoffier 1996). Esim. Peakall ym. (1995) ovat käyttäneet menetelmää erään heinän (*Buchloe dactyloides*) populaatioiden RAPD-markkerien ja alotsyymidatan analysointiin ja Gustine ym. (2002) valkoapilan (*Trifolium repens*) RAPD-markkerien analysoimiseen.

F-statistiikka

Wrightin F-statistiikka on menetelmä, jonka avulla voidaan tutkia populaatioiden välisen geneettisen erilaistumisen astetta (Tanksley & Orton 1983; Govindraju 1988; Soltis & Soltis 1990). F-statistiikka on populaatioiden osapopulaatioiden keskimääräisen heterotsygotia-asteen ja populaation kaikkien vapaasti lisääntyvien yksilöiden heterotsygotia-asteen frekvenssien ero (Hartl & Clark 1997). Kjellsson ja Simonsen (1994) mukaan testin perusteella saa sitä luotettavamman arvion, mitä useampia polymorfisia markkereita on käytettävissä. Wrightin F-statistiikan avul-

la on selvitetty mm. kasvien leviämiskyvyn ja geenivirran määrän välistä korrelaatiota (Govindraju 1988). Menetelmää voidaan käyttää ainoastaan mendelistisesti periytyvien ja Hardy-Weinbergin tasapainossa olevien markkereiden analysointiin.

Tasapaino

Tutkittavien lokusten vastaavuutta Hardy-Weinberg-tasapainoon voidaan testata käyttämällä esim. Rousset ja Raymond (1995) kuvaamaa menetelmää (the score test; U-test), joka sopii erityisesti pienten näyteotosten (ja suuren alleelimäärän) testaamiseen.

Kytkeäntäanalyysi

Kytkeäntäanalyysi (linkage analysis; Landry ym. 1987; Weller ym. 1988; Lander & Botstein 1989; Weir 1990; Tanksley ym. 1992) sisältää useita menetelmiä, joiden avulla tutkittavasta organismista saadaan geneettinen kartta, eli voidaan selvittää ovatko tutkittavat lokukset kytkeytyneitä. Kytkeäntäanalyysi voidaan tehdä kerrallaan yhdestä (two-point linkage analysis) tai useammasta markkerista (ks. myös multipoint linkage analysis). Kjellsson ja Simonsen (1994) mukaan geneettiset kartat ovat tarpeellisia tutkittaessa ominaisuuksia, joilla voi olla vaikutuksia toisiin, läheisesti kytkeytyneisiin ominaisuuksiin. Kytkeytymisanalyysissä voidaan käyttää ainoastaan mendelistisesti periytyviä polymorfisia markkereita.

Diversiteetti-indeksi

Diversiteetti-indeksiä (ks. Kwiatkowska & Symonides 1986; Brown ym. 1990; Belsky 1992; Jacquemyn ym. 2004) voidaan käyttää populaatiotason tutkimuksissa (ks. esim. Nei's genetic diversity; Nei 1973; Shannon-Weaver diversity index; ks. esim. Aga ym. 2003; Simpson's index of diversity; ks. esim. Tomimatsu ym. 2003). Diversiteetti-indeksi on Kjellsson ja Simonsen (1994) mukaan helppo laskea, ja siitä näkee välittömästi, onko tutkittava populaatio geneettisesti yhtenäinen vai ei. Menetelmää on käytetty mm. lajinsisäisen geneettisen muuntelun selvittämiseen sekä geneettisen diversiteetin ja esim. kasvupaikan ominaisuuksien välisen korrelaation tutkimiseen.

Assignment-testi

Ns. assignment-testin (ks. esim. Rannala & Mountain 1997) avulla voidaan arvioida migratoituneiden eliöiden alkuperää polymorfisten markkereiden avulla. Rannala ja Mountain (1997) mukaan testin avulla voidaan määrittää migranttien esi-isät populaatioiden alleelifrekvenssien vähäistenkin erojen perusteella. Wilson ja Rannala (2003) ovat kuvanneet bayesilaisen ohjelman, jossa yksittäisten monilokuksisten genotyyppien avulla arvioidaan populaatioon hiljattain, usean sukupolven ajan tapahtunutta migraation määrää. Ohjelma arvioi jälkikäteen todennäköisyysjakaumat yksittäisten immigranttisi-isien jakautumiselle, populaation alleelifrekvensseille ja sisäsiirtoisuuskertoimille sekä myös joitakin muita parametreja. Ohjelmassa voidaan käyttää mm. allotsyymi-, mikrosatelliitti-, RFLP- ja SNP -aineistoa. Wilson ja Rannala (2003) mukaan ohjelman avulla voidaan saada erittäin tarkkoja arvioita eliöiden migraationopeudesta ja migranttien esi-isistä, mikäli tutkittava populaatio on geneettisesti riittävän vaihteleva ja mikäli tutkimukseen on sisällytetty riittävä määrä eri lokuksia.

Isyysanalyysi

Isyysalyysin (paternity analysis) avulla selvitetään esim. mistä kasvista emokasvin hedelmöittänyt siitepöly on lähtöisin (ks. esim. Kjellsson ym. 1997). Mahdollisilta siitepölyn lähteiltä tutkitaan esim. polymorfisia proteiinimarkkereita tai mikrosatelliitteja, ja niitä verrataan tutkittavista siemenistä (itäneistä taimista) saatui-

hin vastaaviin markkereihin. Isyysanalyysin avulla voidaan selvittää tarkasti populaatiossa tapahtunutta geenivirtaa (ks. esim. Lian ym. 2001; Oddou-Muratorio ym. 2003). Kjellsson ym. (1997) mukaan isyysanalyysin avulla saatava tieto ympäröivistä populaatioista pieniin populaatioihin tapahtuneesta migraatiosta (ks. Ellstrand & Marshall 1985; Kohn & Kasper 1992) on erityisen mielenkiintoinen kysymys GM-kasvien yhteydessä. Kjellsson ym. (1997) mukaan käytettyjen markkerien tulee olla kodominantteja, mutta esim. Gerber ym. (2000) mukaan myös dominanteista markkereista (AFLP) on hyötyä isyyden selvittämisessä, vaikka ne ovatkin vähemmän informatiivisia kuin mikrosatelliittidata.

Fylogenia

Fylogeniamenetelmien (ks. Hennig 1966) avulla selvitetään tutkittavien eliöiden (tai geenien) polveutumista. Perusajatuksena fylogeneettisen puun muodostamisessa on, että vertailtavilla eliöillä (tai tutkittavilla geeneillä) on ollut yhteinen kantamuoto, josta jälkeläiset ovat erkaantuneet mutaatioiden (substituutio, insertio, deleetio) seurauksena. Analyysin tuloksena saatava fylogeneettinen puu heijastaa tutkittujen eliöiden tai tutkittujen geenien välisiä sukulaisuussuhteita. Eliöiden polveutumisen tutkimisessa käytettyjen geenialueiden on oltava homologisia (eli yhteisen kantamuodon omaavia) ja ortologisia (eli lajiutumisen yhteydessä syntyneitä). Paralogiset sekvenssit ovat syntyneet geenien kopioituessa yksittäisten lajien sisällä ja niiden sisällyttäminen analyysiin voi antaa polveutumisesta harhaanjohtavan kuvan. Myös rekombinoituneet geenit, introgressio ja horisontaalinen geenin siirtyminen voivat vaikeuttaa fylogeneettisen puun tulkintaa. Toisaalta juuri fylogeneettisten menetelmien avulla voidaan tutkia näitä ilmiöitä. Geeniperheitä tutkittaessa kaikki saatavilla olevat homologiset (ortologiset ja paralogiset) geenit sisällytetään analyysiin. Näin voidaan saada tietoa esim. geenien kahdentumisista (duplikaatioista) ja horisontaalisista geenien siirtymisistä.

Fylogeniamenetelmistä voi olla hyötyä kasvien ympäristövaikutuksia tutkittaessa. Esim. Grotkopp ym. (2002) sisällyttivät mäntyjen leviämiskykyyn vaikuttavien tekijöiden tutkimukseen fylogeneettisen analyysin 29 tutkimuksessa käytetystä mäntylajista. Analyysin avulla selvitettiin, johtuivatko jotkut saaduista tuloksista läheisestä sukulaisuusasteesta vai olivatko mäntyjen leviämiskykyyn vaikuttavat tekijät fylogeneettisistä ryhmistä riippumattomia. Fylogeniamenetelmiä on käytetty myös geenivirran ja geneettisen diversiteetin tutkimisessa (ks. Bergthorsson ym. 2003; Van Cutsem ym. 2003). Esim. Bergthorsson ym. (2003) mukaan koppisiemenisten kasvien fylogeneettinen analyysi osoittaa, että horisontaalinen geenien siirtyminen kasvien mitokondrioissa on varsin yleinen tapahtuma jopa erittäin kaukaisten sukulaisten kesken.

Tutkittaville taksoneille tai geeneille etsitään yleensä ulkoryhmä, jonka avulla voidaan arvioida, ovatko aineiston sisältämät ominaisuudet apomorfisia (edistyneitä) vai plesiomorfisia (esi-isiien kaltaisia). Ulkoryhmänä käytettyjen geenien tulee kuulua esim. lähisukuisille, mutta sisäryhmään (eli tutkimuksen kohteena olevaan ryhmään) kuulumattomille eliöille. Tutkittavat sekvenssit kohdennetaan keskenään ennen analysointia siten, että emäs- tai aminohappoparit vastaavat toisiaan. Kohdennuksen voi tehdä joko manuaalisesti tai käyttämällä erilaisille algoritmeille perustuvia tietokoneohjelmia (esim. CLUSTALW, ks. Higgins ym. 1994; MALIGN, ks. Wheeler 1996). Kohdennus on tulosten luotettavuuden kannalta ratkaiseva vaihe ja saman aineiston erilaisiin kohdennuksiin perustuvat analyysit saattavat tuottaa erilaisia fylogeneettisiä puita, etenkin jos käytettävät sekvenssit ovat hyvin eri pituisia. Joissakin fylogeniaohjelmissa tämä ongelma voidaan välttää. Ns. optimisaatiokohdennuksessa (ks. Wheeler 1996) aineistoa ei tarvitse erik-

seen linjata vaan analyysi perustuu ominaisuuksien optimisaatioon (ks. Wheeler 1999). Tietokoneohjelmien käyttö on jokseenkin välttämätöntä suuria aineistoja ja eripituisia sekvenssejä käytettäessä.

Fylogeneettisten puiden laskemiseen yleisimmin käytettäviä menetelmiä

Parsimoniamenetelmän (parsimonia = säästeliäisyys) avulla pyritään löytämään lyhin mahdollinen fylogeneettinen puu, joka minimoi käytetyn aineiston selittämiseen tarvittavat evolutiiviset muutokset (tässä tapauksessa nukleotidisubstitutiot, -deleetiot ja -insertiot). Menetelmä saattaa joko tuottaa yhden, lyhyimmän (ja siten optimaalisen) puun tai useita puita, joista voidaan laskea ns. konsensuspuu. Esim. ns. "strict consensus" -puu sisältää ainoastaan sellaiset ryhmät, jotka ovat yhteisiä kaikille saaduille optimaalisimmille puille. Parsimoniaan perustuvia (tai parsimoniaohjelman sisältäviä) ohjelmia ovat mm.: Nona (Goloboff 1993), Parsimony jackknifing (Farris ym. 1996), PAUP (Swofford 1998), POY (Wheeler 1996; ohjelma Wheeler ym.1996-2003), TNT (ks. Goloboff 1999 ja Nixon 1999).

Maximum likelihood -analyysissä (ks. esim. Lewis 1998) käytetään hyväksi erilaisia etukäteen valittavia sekvenssien evoluution malleja (ks. esim. Jukes & Cantor 1969). ML-analyysissä pyritään löytämään sellainen puu ja evoluutiomalli, joka parhaiten kuvaa annettua (sekvenssi-) aineistoa. Analyysissä testataan puun kaikki mahdolliset topologiat ja valitaan niistä se, joka antaa parhaimman todennäköisyyden sille, että aineisto vastaa käytettyä puuta. Tietyn puun todennäköisyys saadaan laskemalla todennäköisyys kyseiselle puulle kaikissa sekvenssien kohdennuksen kohdissa ja kertomalla saadut todennäköisyydet keskenään. Menetelmän haittapuoli on valtavan laskennallisen tehon tarve. Analysointiin käytettävä aika on moninkertainen esim. parsimoniamenetelmiin verrattuna sekvenssien lukumäärän kasvaessa yli tietyn pisteen. ML-analyysin sisältäviä ohjelmistoja ovat mm. PAUP, POY ja Phylip (Felsenstein 1990).

Distanssimenetelmät (ks. esim. Saitou & Nei 1987) perustuvat sekvenssien välisiin etäisyyksiin eivätkä suoraan sekvenssien nukleotidien muutoksiin. Myös distanssimenetelmissä hyödynnetään sekvenssien evoluutiomalleja. Distanssimenetelmät toimivat siten, että aluksi lasketaan kaikkien tutkittavien taksonien (käytettyjen sekvenssien) väliset etäisyydet niiden samankaltaisuuden perusteella ja puu muodostetaan parittaisten etäisyyksien pohjalta. Puun muodostaminen aloitetaan yhdistämällä ensin kaksi samankaltaisinta taksonia, minkä jälkeen puuhun lisätään uusi taksoni tai ryhmä taksoneja sen mukaan, mikä niiden etäisyys on jo muodostettuun puuhun. Yksi distanssimenetelmän haittapuolista on se, että suuri osa sekvenssien sisältämästä informaatiosta menee hukkaan (koska nukleotidien sijasta siinä käytetään niiden välisiä etäisyyksiä). Lisäksi distanssimenetelmillä saadut puut voivat poiketa varsinaisilla fylogeniamenetelmillä (parsimonia, Maximum likelihood) saaduista puista. Distanssimenetelmiä voidaankin käyttää geenialueiden samankaltaisuuden asteen tarkastelussa, mutta varsinaiset fylogeneettiset menetelmät soveltuvat paremmin eliöiden polveutumisen selvittämiseen. Distanssianalyysin sisältäviä ohjelmapaketteja ovat: PAUP, Phylip. Lisäksi muutamia sekvenssien editointiohjelmat kuten esim. BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) sisältävät myös yksinkertaisen distanssiohjelman (UPGMA, ks. Saitou & Nei 1987; tätä ei tosin suositella enää käytettäväksi).

Analyysin jälkeen saadulle puulle lasketaan tukilukuja, jotka kertovat mitkä puussa esiintyvistä ryhmistä ovat vahvoja ja mitkä heikommin tuettuja. Tuen laskemiseen käytettäviä menetelmiä ovat esim. Bayesilainen menetelmä (ks. jäljempänä),

bootstrapping (Felsenstein 1985), Bremer support (decay index; Bremer 1994) ja jackknifing (Farris ym. 1996), joita löytyy ohjelmapaketeista (PAUP, Phylip, POY). Jotkut tuen laskemiseen käytettävät menetelmät (esim. Parsimony jackknifing) ovat itsenäisiä ohjelmia.

Bayesilainen menetelmä (ks. esim. Rannala & Yang 1996) on tilastollinen lähestymistapa, joka perustuu todennäköisyyteen. Bayesilaisen menetelmän fylogenia-sovellus, MrBayes-ohjelma (Huelsenbeck & Ronquist 2001), käyttää Markovin ketjujen simulointiin perustuvaa Monte Carlo (MCMC-)menetelmää arvioimaan fylogeneettisten puiden todennäköisyyksiä. Sekä bayesilainen-, että Maximum likelihood-menetelmä perustuvat todennäköisyyksiin ja sekvenssien evoluutiomalleihin, mutta bayesilainen menetelmä kuitenkin eroaa jälkimmäisestä siksi, että se perustuu havainnoinnista riippuvaisten parametrien *a posteriori* -jakautumiseen. Karol ym. (2001) mukaan bayesilaisen menetelmän etuna on sen nopeus. Lisäksi puun vahvuutta mittaavat luvut ovat paremmin verrattavissa perinteisiin tilastollisiin lukuihin kuin muista fylogeniamenetelmistä saatavat vastaavat luvut (ks. Karol ym. 2001). Ohjelma: MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist 2001).

Vaikka polymorfisten geneettisten markkereiden fylogeneettistä analyysiä on yleisesti käytetty lajinsisäisten sukulaisuussuhteiden selvittämiseen, ei fylogeneettinen puu välttämättä vastaa todellisia (verkkomaisia) lajinsisäisiä sukulaisuussuhteita. Tämä johtuu esim. rekombinaatiosta ja epätäydellisestä evoluutiolinjojen erkaantumisesta (lineage sorting). Esim. Templeton ym. (1995), Templeton (1998) ja Bandelt ym. (1999) ovat kehittäneet menetelmiä polymorfisten markkerien tehokkaampaan hyödyntämiseen lajinsisäisissä tutkimuksissa, esim. geenivirtaa ja populaatioiden leviämishistoriaa selvitettäessä.

Parsimonia- ja Maximum likelihood (ML) eroavat muista fylogeneettisistä menetelmistä, esim. distanssianalyysistä siinä, että ne perustuvat kumpikin ns. optimaalisuuskriteeriin (optimality criterion; ks. esim. Wheeler 1996). Menetelmistä ja niiden vertailusta löytyy lisää informaatiota esim. Doyle & Gaut (2000) artikkelista, jossa paneudutaan erityisesti evoluutiomallien käyttöön. Fylogeniaohjelmien kotisivuja on koottu verkkosivuilla: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>, <http://www.cladistics.org/education.html>, sekä <http://www.ucmp.berkeley.edu/subway/phylo/phylosoft.html>. Sivuilta löytyy linkkejä sekvenssien käsittely-, kohdennus- ja analyysiohjelmiin.

Liite 2. Esimerkki herbisidikestävien GM-kasvien viljelyn välillisistä ympäristövaikutuksista (FSE:t)

Britanniassa toteutettiin hiljattain laaja ympäristötutkimus herbisidikestävien GM-kasvien viljelyn välillisistä ympäristövaikutuksista (ks. Perry ym. 2003; Squire ym. 2003). Tutkimuksissa oli mukana noin 70 maatilaa/tutkittu viljelykasvilaji. Koealueet valittiin maantieteellisesti mahdollisimman laajalta alueelta siten, että kunkin kasvin koko (Britannian) viljelyalue saatiin mukaan. Mukana oli siten laaja otos erilaisista fysikaalisista ja biologisista oloista. Tutkittavia kasvilajeja olivat maissi (*Zea mays*), juurikkaat (sokeri- ja rehujuurikas; *Beta vulgaris*) sekä (kevät)öljyrapsi (*Brassica*). Tutkimuksessa käytettiin glufosinaatti-ammoniumia kestäviä GM-maissia ja -rapsia, sekä glyfosaattikestäviä GM-juurikkaita. Herbisidikestävien GM-kasvien ja perinteisten kasvien hoito eroavat toisistaan lähinnä herbisidiruiskutusten ajankohdissa ja spesifisyydessä. Herbisidikestävien GM-kasvien käyttö mahdollistaa joustavamman herbisidien käytön ajoituksen kuin muuntamattomien kasvien viljely (eli herbisidejä voidaan käyttää myös kesken kasvukauden). Glyfosaatti ja glufosinaatti-ammonium ovat laaja-alaisia herbisidejä, ja herbisidikestäviä GM-kasveja viljeltäessä niitä voidaan käyttää tavallista myöhäisempänä ajankohtana kuin tavallisilla viljelyksillä. Herbisidikestävien GM-kasvien viljelyn ja siihen liittyvän erilaisen rikkakasvikontrollon on pelätty kaventavan viljelysalojen biodiversiteettiä (mm. vähentämällä alueiden linnustoa ja muuta eläimistöä).

Koko tutkimuksen (FSE, Field Scale Evaluation) tarkoituksena oli selvittää vaikuttaako herbisidikestävien GM-kasvien viljely käsittelyineen rikkakasvien ja selkärangattomien eläinten runsauteen ja monimuotoisuuteen enemmän kuin perinteinen viljely tyypillisine käsittelyineen. Keskeinen tavoite oli testata nollahypoteesia, eli: 'herbisidikestävien GM-kasvien viljely käsittelyineen ei vaikuta viljelyalueen biodiversiteettiin perinteistä viljelyä enempää'. Herbisidikestävien GM-kasvien viljelyn mahdollisen vaikutuksen oletettiin ensisijaisesti johtuvan glyfosaatin ja glufosinaatti-ammoniumin vaikutuksesta rikkakasveihin ja vaikuttavan niillä elävien herbivorien, detrivorien, saalistajien ja parasiittien elämään välillisesti.

Koejärjestelyt suoritettiin jaetuilla pelloilla (split-field design) siten, että toisella puoliskolla kasvatettiin GM-kasvia ja toisella puoliskolla samaa perinteistä viljelykasvia. Toistoja oli 60-75 aluetta (maatilaa) tutkittua kasvilajia kohti, jotta saataisiin tilastollisesti merkittäviä tuloksia, ja jotta mukana olisi mahdollisimman monenlaisia viljely-ympäristöjä (katso lisää Perry ym. 2003; Champion ym. 2003). Kaikkien ei-kohdelajien populaatioiden/runsauden muutosten suuruutta ei voitu kokeen aikana mitata. Siksi valittiin indikaattorilajit erilaisista suurista taksonomia- ja trofiaryhmistä. Indikaattorilajien tuli olla herkkiä viljelykäytäntöjen muutoksille. Näyttekoot ja tutkittavat parametrit valittiin niin, että ne sopivat nollahypoteesin testaamiseen. Rikkakasvit arvioitiin tutkimuksessa kaikkein altteimmiksi herbisidikestävien GM-kasvien viljelyssä, samoin kuin selkärangattomat eläimet, joista osa on suoraan, osa taas välillisesti riippuvaisia rikkakasvifloorasta. Jotta mukaan saataisiin laaja otos vuodenaikaisvaihtelusta, vertailut tehtiin monena ajankohtana kolmen ensimmäisen vuoden aikana (2000-2002). Tilastollisia analyysejä käytettiin tunnistamaan vuodesta, paikasta ynnä muusta aiheutuvia eroja (Perry ym. 2003). Mittaukset ajoitettiin niin, että rikkakäsittelyn vaikutuksia voitiin seurata sekä GM- että perinteisillä viljelyaloilla. Kasvien genotyyppi-taustasta johtuvia sekundaarisia vaikutuksia seurattiin myös kasvukauden aikana. Tutkijat eivät olleet varmoja, kuinka monta rikkakasvia, hyppyhäntäistä jne. pitäisi kullakin pellolla esiintyä, mutta 50 % ero siemenpankista, rikkakasvistosta tai muusta ryhmästä mitattuna ja verrattuna aiempiin agrokemiallisista muutoksista johtuviin muutoksiin (1900-luvulla) tulkittiin suureksi eroksi (Perry ym. 2003).

Heard ym. (2003a) tutkimuksen tavoitteena oli ensisijaisesti testata, johtuvatko rikkakasvilajiston kasvukauden aikaiset muutokset siirtymisestä GM-viljelymenetelmiin; toiseksi arvioida mahdollisten muutosten laajuus ja seuraukset; ja kolmanneksi arvioida, miten muutokset ilmenivät kahden vuoden aikana GM-viljelyn aloittamisen jälkeen. Tutkimuksessa vertailtiin siemenpankkeja, siemenlaskeumaa (seed rain), kasvien kasvutiheyttä sekä biomassan suuruutta. Kasvukauden alussa rikkakasvien tiheys GM-juurikas- ja GM-rapsialoilla oli korkeampi kuin perinteisesti viljellyillä aloilla, mutta tilanne muuttui päinvastaiseksi heti GM-aloilla tehtyjen herbisidikäsitteilyjen jälkeen. Biomassa ja siemenlaskeuma olivat GM-aloilla huomattavasti pienempiä kuin perinteisillä aloilla, ja muutokset olivat näkyvissä myös siemenpankissa. Maissin kohdalla tilanne oli toisenlainen. Rikkakasvitiheys oli koko kasvukauden ajan korkeampi GM-aloilla kuin perinteisillä aloilla. Kasvukauden lopulla GM-maissialojen rikkakasvibiomassa oli jopa 82 % korkeampi kuin perinteisellä alalla ja siemenlaskeuma oli GM-alalla 87% suurempi perinteiseen alaan verrattuna. Nämä muutokset eivät kuitenkaan näkyneet siemenpankissa. Kaikkien kolmen viljelykasvin tapauksessa käsitteilyt (GM- vs. perinteinen) eivät juurikaan vaikuttaneet rikkakasvien lajirunsauteen. Keskeisimmäksi tekijäksi pitkäaikaisvaikutuksia silmälläpitäen arvioitiin siemenlaskeumaa ja sen vaikutusta siemenpankkiin. GM-rapsilla ja -juurikkaalla oli selvä vaikutus siemenpankkiin seuraavana vuonna. Lyhyellä tähtämellä runsas siemenpankki voi kompensoida uuden siemenlaskeuman vähäisyyttä. Yhden vuoden vähentynyt laskeuma taas ei yksistään aiheuta suuria muutoksia tulevaisuuden rikkakasvirunsaudessa. Toisaalta pienet muutokset voivat kumuloitua pitkän ajan kuluessa. Yhteenvetona tutkimuksessa todetaan, että herbisidikestävien GM-rapsin ja GM-juurikkaan viljely vaikuttaa voimakkaasti viljelysmaiden kasvillisuuteen verrattuna viljelyyn perinteisillä menetelmillä. Rikkakasvikontrollointi paranee, mikä johdosta siemenpankki pienenee, ja siemenpankin jo 60-luvulta alkanut pieneminen nopeutuu entisestään. Herbisidiresistentin GM-maissin viljelyllä näyttäisi olevan päinvastainen vaikutus, johtuen luultavasti siitä, että perinteisessä viljelyssä käytetään erittäin voimakkaita herbisidejä.

Heard ym. (2003b) tutkivat GM-viljelyn ja perinteisen viljelyn vaikutusta rikkakasvilajiston runsauteen, kun edellisessä tutkimuksessa oli tarkasteltu rikkakasvien biomassaa. Heard ym. (2003b) valitsivat tutkimukseensa seurattavaksi 12 Britannian yleisintä rikkakasvilajia. Kasviyksilöt laskettiin, ja niiden biomassa sekä siemenlaskeuma (seed rain) mitattiin. Lisäksi siemenpankinäytteet kerättiin ennen ja jälkeen viljelykasvin kylvön. Tiheyssuhdelukuja käytettiin itämisen, eloonjäämisen, lisääntymisen ja siemenpankin runsauden muutosten arvioimiseen. Käsitteilyt vaikuttivat merkittävästi kuuden kasvin biomassaan sokerijuurikasviljelyksillä, kahdeksaan maissiviljelyksillä ja viiteen rapsilla. Muutamaa poikkeusta lukuunottamatta kasvien itämistiheys oli korkeampi herbisidikestäville GM-kasviviljelmillä. Eloonjääminen (subsequent survival) oli merkittävästi madaltunut kahdeksalla lajilla GM-sokerijuurikasaloilla ja kuudella lajilla GM-rapsialoilla. Sokerijuurikkaalla selviytyminen huononi yhdeksällä lajilla yhdestätoista GM-aloilla, kun se taas nousi viidellä kasvilla GM-maissipellossa ja yhdellä GM-rapsipellossa. GM-kasvien viljely vaikutti rikkakasvien lisääntymisnopeuteen. Merkittäviä siemenpankimuutoksia havaittiin neljän lajin kohdalla. Monella rikkakasvilajilla GM-juurikas- ja rapsialoilla (19/24 tapauksesta) siemenpankin siementiheys oli madaltunut sadonkorjuun jälkeen GM-kasvialoilla.

Tutkijat arvelivat, että tutkimuksessa ilmenneet muutokset monen vuoden ajalta kumuloituneena voivat merkittävästi pienentää viljelysmaiden rikkakasvien populaatioita. Herbisidikestäville GM-maissiviljelyksillä tilanne voi olla päinvastainen.

Brooks ym. (2003) tutkivat herbisidikestävien GM-kasvien vaikutuksia maanpinnan tason selkärangattomien yleisyyteen ja monimuotoisuuteen. Tutkimuksessa käytettiin ansakeräysmenetelmää (katso liite 1). Kiitäjäisten (Carabidae), lyhytsiipisten (Staphylinidae), hämähäkkien (Araneae), hyppyhäntäisten (Collembola) ja kotiloiden (Gastropoda) diversiteetissä tai yleisyydessä havaittujen erojen suuruutta tutkittiin GM-kasvialoilla vs. perinteisillä aloilla. Lisäksi arvioitiin viljelysmaiden ja viljelykasvien vaihtelevien tekijöiden merkitystä. Näitä olivat mm. kasvillisuusvyöhyke, siemenpankin runsauden alkuperäinen arvio, viljelyn intensiivisyys, vuosi, välimatka viljelykseltä, biomassa ja siemenlaskeuma (seed rain). Rikkakasvien siemeniä syöviä maakiitäjäisiä (Carabidae) laskettiin vähemmän GM-juurikas ja GM-rapsialoilta kuin vastaavilta perinteisiltä viljelyaloilta. Maissin kohdalla tilanne oli päinvastainen: GM-maissialoilla oli selvästi enemmän selkärangattomia kuin perinteisillä maissialoilla. Detritusta (kuollutta kasviainesta) ravintonaan käyttäviä hyppyhäntäisiä (*Collembola*) oli merkittävästi enemmän kaikilla GM-kasvialoilla verrattuna perinteisen viljelyn aloihin. Käsittelyillä ei ollut juuri vaikutusta useimpiin generalisteihin ja laajalle liikkuviin maanpinnan saalistajiin eikä niihin lajeihin, jotka käyttävät itse viljelykasvia ravintonaan. Rikkakasvien siemeniä ravintonaan käyttävien hyönteisten määrät olivat pienempiä GM-rapsi- ja -juurikasaloilla, mutta suurempia GM-maissialalla. Se, että detritusta ravintonaan käyttävien hyppyhäntäisten määrä oli suurempi GM-aloilla, johtui luultavasti tehokkaammista herbisidikäsittelyistä aiheutuvasta runsaasta detrituksesta. Selvää selitystä saaduille tuloksille ei kuitenkaan vielä ole. Suurin osa vaikutuksista oli sellaisia, jotka eivät vaihdelleet eri vuosina, erilaisilla maantieteellisillä alueilla jne., joten tulokset voidaan käsittää sovellettaviksi koko Britannian alueelle.

Haughton ym. (2003) tutkivat maanpinnan yläpuolella eläviä ja lentäviä niveljalkaisia. Keräykseen käytettiin imumenetelmää. Herbisidikestävien GM-kasvien käsittelyllä vs. perinteisellä käsittelyllä ei ollut vaikutusta suurimpaan osaan tutkituista niveljalkaisista, mutta merkitseviä eroja löytyi kuitenkin vähintään yhden ryhmän runsauden osalta kustakin tutkitusta taksonista. Herbisidikestävien GM-juurikkaiden ja -rapsien aloilla esiintyi vähemmän perhosia kuin vastaavilla perinteisellä viljelyksillä. Myös luteiden (Heteroptera) ja mehiläisten (Apidae) määrä oli pienempi GM-juurikkaan viljelyksillä kuin perinteisellä aloilla. Hyppyhäntäisten (*Collembola*) määrä taas oli suurempi kaikilla GM-aloilla kuin perinteisillä aloilla. Nämä erot olivat spesifisiä kullekin viljelykasvityypille ja heijastivat tutkittujen niveljalkaisten fenologiaa ja ekologiaa, olivat epäsuoria ja yhteydessä rikkakasvien käsittelyyn. Taksonit, jotka olivat harvinaisempia GM-alalla kuin perinteisellä, olivat suuren liikkuvuuden omaavia ryhmiä (perhokset ja mehiläiset). GM-alalla runsaammin esiintyvät niveljalkaiset taas olivat hitaasti levittäytyviä. Tulokset ovat tekijöiden mukaan käyttökelpoisia laajan GM-viljelyn mahdollisia pitkäaikaisvaikutuksia ennakoivissa matemaattisissa malleissa. Tutkimuksessa käytetyt hyönteislajit voivat puolestaan olla käyttökelpoisia indikaattorilajeja herbisidikestävien GM-kasvien viljelykäsittelyn vaikutusten tutkimuksissa.

Roy ym. (2003) tutkivat peltojen reunoilla eläviä kasveja ja selkärangattomia. Eroja tuloksissa GM- ja perinteisen viljelyn alojen välillä oli vain vähän. Suurimmat erot löytyivät peltojen reuna-alueiden sisimmistä osista. GM-rapsi- ja GM-juurikasalojen reunoilla oli vähemmän kukkivia kasveja ja vähemmän perhosia kuin perinteisillä aloilla. GM-maissialojen reunoilla oli taas enemmän kukkivia kasveja kuin perinteisillä pelloilla, mutta perhosten määrässä ei ollut vastaavaa muutosta.

Hawes ym. (2003) tutkivat (yksittäisten taksonien sijasta) herbisidikestävien GM-kasvien käsittelyn ja perinteisen käsittelyn vaikutusta erilaisiin toiminnallisiin ryhmiin, kuten kasvinsyöjiin, pölyttäjiin, detrivoreihin, saalistajiin (pedot) ja loisiin. Luteille (Heteroptera) ja maakiitäjäisille (Carabidae) määritettiin lajitasolla kullekin oma trofiatasonsa, muiden selkärangattomien trofiatasot määritettiin lähinnä heimotason taksonista. Omnivoreja (kaikkiruokaisia) ei otettu mukaan tutkimukseen. Tutkimuksessa käytetty hyönteisten lukumäärä antaa tutkijoiden mukaan jonkinlaisen arvion viljelymenetelmien vaikutuksesta eri trofiatasoihin (vaikkakin selkärangattomien biomassan määrä olisi toiminut paremmin). Kokeen tulokset analysoitiin sekä koko kasvukauden (tai kausien) ajalta, että myös erikseen kasvukauden eri kuukausilta. Kasvinsyöjien määrä ei vaihdellut GM- ja perinteisten viljelyalojen välillä. Toisaalta GM-sokerijuurikasalalta laskettiin kesäkuussa vähemmän loisia kuin perinteiseltä sokerijuurikasalalta ja tilanne oli samanlaisen heinäkuussa GM-rapsialalla. Elokuussa GM-maissialalla oli vähemmän saalistajia kuin perinteisillä viljelyksillä. Kovarianssialyysi viittasi siihen, että viljelykasvin herbivorien tiheydellä oli merkittävä positiivinen vaikutus saalistajien runsauteen maissialoilla ja loisten runsauteen rapsialoilla. Yleinen suuntaus oli, että detrivorien määrän suhde kasvinsyöjien määrään kasvoi GM-aloilla perinteisiin aloihin verrattuna. Pölyttäjien määrä oli GM-aloilla hiukan pienempi kuin perinteisillä aloilla sokerijuurikkaan ja rapsin kohdalla, mutta maissialoilla tilanne oli päinvastainen. Nämä suuntauksukset olivat tilastollisesti merkitseviä juurikasaloilla ja rapsilla koko kasvukauden ajan ja maissilla heinäkuussa.

Tutkijoiden mukaan esitettyjen tulosten perusteella on selvää, että erot eliöiden monimuotoisuudessa ja biomassassa herbisidikestävien GM- ja perinteisten viljelyalojen välillä johtuvat rikkakasvikäsittelyistä; näitä eroja ei olisi ilmennyt, mikäli kummankaan tyyppin viljelyksillä ei olisi käytetty herbisidejä, eli GM-kasvilla itsellään oli tuskin vaikutusta havaittuihin eroihin. FSE:t ovat osoittaneet (koko Britannian alueelta kolmen vuoden ajalta), että viljelysalojen kasvinsyöjät, detrivorit ja monet niiden saalistajista ja loisista ovat herkkiä uusien rikkakasvikäsittelyjen aiheuttamille rikkakasviyhteisöjen muutoksille. Mikäli herbisidikestävät GM-viljelykasvit otettaisiin Britanniassa laajaan käyttöön, monen toiminnallisen eliöryhmän runsauksissa tapahtuisi merkittäviä muutoksia (Hawes ym. 2003). Vielä ei tiedetä kuinka pysyviä havaitut erot ovat. Esim. kasvukauden alussa GM-alojen rikkakasvitiheys oli suurempi kuin perinteisillä aloilla, mutta myöhemminä vuosina tilanne voi muuttua, sillä kasvukauden lopulla GM-alojen siemenpankki pienee. Lisätutkimuksia GM-viljelyn vaikutuksista selkärangattomiin eläimiin siis tarvitaan, esim. kuluttajaeliöiden toiminnallisen ja numeerisen vasteen arvio, toiminnallisten ryhmien (kasvinsyöjät, loiset ym.) yksityiskohtainen luokittelu ja ravintoverkon rakenteen analysointi.

Brooks ym. (2003) mukaan lisätutkimukset ovat välttämättömiä myös selvittämään GM-alojen lisääntyneen detrituksen määrän seurauksia laajemmilla viljelmillä. Esim. pitkällä tähtäimellä detrituksen määrä ei herbisidikestävien GM-kasvien viljelmillä välttämättä kasvaisi, sillä ne ylläpitäisivät pienempiä määriä siemeniä tuottavia rikkakasveja. Lajitason määrittäminen on tärkeää, sillä korkeampien taksonien käyttö analysoissa voi peittää yksittäisten lajien erot alleen.

Heard ym. (2003a) mukaan herbisidikestävät rikkakasvit tulevat todennäköisesti lisääntymään, sillä yksikään käytössä oleva herbisidi ei ole niin tehokas, etteivät kasvit pystyisi kehittämään sille vastustuskykyä. Glyfosaattikestäviä kasveja on jo raportoitu (*Lolium* ja *Eleusine* sekä *Conyza canadensis*, joka leviää nopeasti Yhdysvalloissa; VanGessel 2001). On vain ajan kysymys ennen kuin herbisidikestävät kasvit yleistyvät. Luonnon monimuotoisuus tulee todennäköisesti pienenemään, sillä kehittynyt herbisidikestävyys lisää muutamien lajien dominanssia.

Koko FSE-tutkimus kattoi suunnittelun koealojen taustatiedoista, aineiston keräämisestä ja tilastollisesta käsittelystä (Haughton ym. 2003). Monessa tapauksessa käytettiin vaihtoehtoisia menetelmiä osin päällekkäisiin tutkimuksiin, mikä mahdollisti menetelmien vertailun. Esimerkkinä tästä on mm. hyönteistutkimukset, joissa vertailtiin erilaisilla keräysmenetelmillä saatuja selkärangattomien runsauksia. Vertailu osoitti, että eri keräysmenetelmät vaikuttavat tuloksiin joidenkin taksonien/ryhmien osalta. Tämä johtunee siitä, että menetelmät mittaavat erityyppisiä runsauksia (Brooks ym. 2003).

Kuvailulehti

Julkaisija	Suomen ympäristökeskus	Julkaisu-aika Joulukuu 2004
Tekijä(t)	Katileena Lohtander-Buckbee, Kirsi Törmäkangas ja Marja Ruohonen-Lehto	
Julkaisun nimi	Menetelmien valinta muuntogeenisten kasvien ympäristövaikutusten arviointiin ja seurantaan	
Julkaisun osat/ muut saman projektin tuottamat julkaisut	Julkaisu on saatavana myös internetistä: http://www.ymparisto.fi/julkaisut	
Tiivistelmä	<p>Uudistetussa, tarkoituksellista geenitekniikalla muunnettujen organismien ympäristöön levittämistä säätelevässä EU:n direktiivissä 2001/18/EY on kirjattu ensi kertaa ympäristöriskien arvioinnin periaatteet. Vakiintuneita tutkimusmenetelmiä muuntogeenisten kasvien ympäristövaikutusten tutkimiseen ja seurantaan ei vielä ole, koska kaupallisia sovelluksia on ollut käytössä vasta kymmenisen vuotta. Tämän raportin tarkoituksena on esitellä sellaisia tutkimusmenetelmiä, joiden toivomme soveltuvan riskinarvioinnissa esiin tulleiden tietotarpeiden täyttämiseen. Raportissa käsitellään lisäksi lyhyesti muuntogeenisten kasvien viljelyyn liittyviä ympäristön kannalta edullisia vaikutuksia, muuntogeenisten kasvien riskinarviointia ja viljelyn seuranta, sekä riskien hallintamenetelmiä.</p>	
Asiasanat	geenitekniikka, muuntogeeniset eliöt, GMO, kasvit, ympäristövaikutukset, riskinarviointi, tutkimusmenetelmät	
Julkaisusarjan nimi ja numero	Suomen ympäristö 736	
Julkaisun teema	Ympäristönsuojelu	
Projektihankkeen nimi ja projektinumero		
Rahoittaja/ toimeksiantaja		
Projektiryhmään kuuluvat organisaatiot		
	ISSN 1238-7312	ISBN 952-11-1889-X
		952-11-1890-3 (PDF)
	Sivuja 130	Kieli Suomi
	Luottamuksellisuus Julkinen	Hinta 18 e
Julkaisun myynti/ jakaja	Edita Publishing Oy, PL 800, 00043 EDITA, vaihde 020 450 00 Asiakaspalvelu: puhelin 020 450 05, faksi 020 450 2380 Sähköposti: asiakaspalvelu.publishing@edita.fi , http://www.edita.fi/netmarket	
Julkaisun kustantaja	Suomen ympäristökeskus, PL 140, 00251 Helsinki	
Painopaikka ja -aika	Edita Prima Oy, Helsinki 2004	

Presentationsblad

Utgivare	Finlands miljöcentral	Datum December 2004
Författare	Katleena Lohtander-Buckbee, Kirsi Törmäkangas och Marja Ruuhonen-Lehto	
Publikationens titel	Menetelmien valinta muuntogeenisten kasvien ympäristövaikutusten arviointiin ja seurantaan (Val av metoder för bedömning och uppföljning av gentekniskt modifierade växters miljöeffekter)	
Publikationens delar/ andra publikationer inom samma projekt	Publikationen finns tillgänglig på internet: http://www.ymparisto.fi/julkaisut	
Sammandrag	I det förnyade EU-direktivet 2001/18/EG, som reglerar avsiktlig spridning av gentekniskt modifierade organismer i miljön, har principerna för bedömning av miljöriskerna för första gången angivits. Några hävdvunna metoder för att studera och följa upp miljöeffekter av gentekniskt modifierade växter (GM-växter) finns ännu inte, eftersom kommersiella tillämpningar har använts endast ett tiotal år. Avsikten med denna rapport är att presentera sådana metoder, som vi hoppas skall lämpa sig för att fylla informationsbehoven vid riskbedömningar. I rapporten behandlas dessutom kortfattat gynnsamma miljöeffekter i anslutning till odling av GM-växter, riskbedömning av GM-växter och uppföljning av deras odling samt metoder att hantera riskerna.	
Nyckelord	genteknik, genmodifierade organismer, GMO, växter, miljöeffekter, riskbedömning, forskningsmetoder	
Publikationsserie och nummer	Miljön i Finland 736	
Publikationens tema	Miljöskydd	
Projektets namn och nummer		
Finansiär/ uppdragsgivare		
Organisationer i projektgruppen		
	ISSN 1238-7312	ISBN 952-11-1889-X
		952-11-1890-3 (PDF)
	Sidantal 130	Språk Finska
	Offentlighet Offentlig	Pris 18 EUR
Beställningar/ distributör	Edita Publishing Ab, PB 800, 00043 EDITA, växel 020 450 00 Postförsäljningen: telefon 020 450 05, fax 020 450 2380 e-mail: asiakaspalvelu.publishing@edita.fi , http://www.edita.fi/netmarket	
Förläggare	Finlands miljöcentral, PB 140, 00251 Helsingfors	
Tryckeri/ tryckningsort och -år	Edita Prima Ab, Helsingfors 2004	

Documentation page

Publisher	Finnish Environment Institute	Date December 2004
Author(s)	Katileena Lohtander-Buckbee, Kirsi Törmäkangas and Marja Ruohonen-Lehto	
Title of publication	Menetelmien valinta muuntogeenisten kasvien ympäristövaikutusten arviointiin ja seurantaan (Ecological and biological research methods applicable for assessing and monitoring risks of genetically modified plants)	
Parts of publication/ other project publications	Publication is also available in the internet: http://www.ymparisto.fi/julkaisut	
Abstract	Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms has for the first time provided principles for environmental risk assessment (ERA). However, few established research methods for studying the environmental impacts of genetically modified plants (GMP's) exist due to the relative novelty of the commercial applications. The aim of this report is thus to present research methods potentially useful for obtaining information needed for comprehensive ERA. GMP's potentially favorable environmental impacts, risk assessment and monitoring, as well as risk management are also briefly discussed in the report.	
Keywords	gene technology, genetically modified organisms, GMO, plants, environmental impacts, risk assessment, research methods	
Publication series and number	The Finnish Environment 736	
Theme of publication	Environmental Protection	
Project name and number, if any		
Financier/ commissioner		
Project organization		
	ISSN 1238-7312	ISBN 952-11-1889-X
		952-11-1890-3 (PDF)
	No. of pages 130	Language Finnish
	Restrictions Public	Price 18 EUR
For sale at/ distributor	Edita Publishing Ltd., P.O.Box 800, FIN-00043 EDITA, Finland, Phone +358 20 450 00 Mail orders: Phone +358 20 450 00, Fax +358 450 2380 e-mail: asiakaspalvelu.publishing@edita.fi , Internet: http://www.edita.fi/netmarket	
Financier of publication	Finnish Environment Institute, P. O. Box 140, 00251 Helsinki, Finland	
Printing place and year	Edita Prima Ltd, Helsinki 2004	



**YMPÄRISTÖN-
SUOJELU**

Menetelmien valinta muuntogeenisten kasvien ympäristövaikutusten arviointiin ja seurantaan

Uudistetussa, tarkoituksellisista muuntogeenisten, eli geeniteknikalla muunnettujen organismien (GMO) ympäristöön levittämistä säätelevässä EU:n direktiivissä 2001/18/EY on kirjattu ensi kertaa ympäristöriskien arvioinnin periaatteet. Sekä Suomen kansallinen lainsäädäntö että EU:n lainsäädäntö edellyttävät kattavaa riskien arviointia ennen GMO:ien tarkoituksellista ympäristöön levittämistä tai suljettua käyttöä. GMO:ien ympäristöriskien arvioinnissa tarkastellaan suoria ja välillisiä ympäristövaikutuksia, jotka voivat ilmetä välittömästi tai viiveellä. Riskinarvioinnin perusteena on riskien tunnistaminen sekä riskin todennäköisyyden ja haitan suuruuden arviointi. Mikäli GM-organismien käyttäytymisestä ei ole riittävästi tietoa, tarvitaan lisää tutkimusta. Vakiintuneita tutkimusmenetelmiä muuntogeenisten kasvien ympäristövaikutusten tutkimiseen ja seurantaan ei kuitenkaan vielä ole, koska kaupallisia sovelluksia on ollut käytössä vasta kymmenen vuotta.

Riskien arvioinnin perustana on kasviin siirretty uusi ominaisuus (esim. herbisidikestävyys tai hyönteiskestävyys) ja sen toiminta uudessa ympäristössä (uudessa kasvissa). Eri GM-kasvien mahdolliset ympäristövaikutukset voivatkin olla hyvin erilaisia, koska ne riippuvat siirretystä ominaisuudesta ja käytetystä kasvista. Tästä syystä GM-kasvien ympäristövaikutusten tutkimiseen on mahdotonta tarjota valmista menetelmäpakettia. Tämän raportin tarkoituksena onkin esitellä sellaisia tutkimusmenetelmiä, joiden toivomme soveltuvan riskinarvioinnissa esiin tulleiden tietotarpeiden täyttämiseen. Raportissa käydään läpi viimeaikaisia GM-kasvien ympäristövaikutuksista tehtyjä tutkimuksia ja esitellään niissä käytettyjä menetelmiä. Raportissa tarkastellaan myös jonkin verran GM-kasveihin liittyvää kansallista ja EU:n lainsäädäntöä, sekä käsitellään lyhyesti GM-kasvien viljelyn seurantaan ja riskienhallintamenetelmiin liittyviä kysymyksiä.

Julkaisu on saatavana myös Internetissä:
<http://www.ymparisto.fi/julkaisut>

ISBN 952-11-1889-X
ISBN 952-11-1890-3 (PDF)
ISSN 1238-7312