

Transgenní řepka olejka (*Brassica napus* L.) – její monitoring, molekulární detekce a vliv agrotechniky na eliminaci výdrolu

Genové inženýrství umožňuje vnesení hospodářsky významných znaků do zájmových plodin způsobem, který nelze realizovat běžným křížením. Geneticky modifikované organismy (GMO) jsou produktem transformace, neboli zavádění cizorodých genů do cílového organismu. První geneticky modifikovaná (GM) plodina byla uvolněna pro trh v r. 1994 – jednalo se o rajče s prodlouženou životaschopností nazvané FlavrSavr. Další, k herbicidům tolerantní a ke škůdcům rezistentní GM plodiny, hlavně sója, kukuřice, bavlník a řepka se na trhu objevily v roce 1996.

Jednou z mnoha oblastí zájmu je tvorba herbicid tolerantních odrůd, do jejichž genomu je vpraven gen, jehož produkt – enzym, určitý herbicid metabolizuje nebo je schopen ho tolerovat. V současné době existuje řada herbicid tolerantních vyšších rostlin, do kterých byl vnesen gen z bakterií nebo jiných tolerantních rostlin. Jedním z příkladů je vnesení genu pro enzym fostinotricin-acetyl transferázu (*PAT*), který zamezuje účinku herbicidu glufosinát. Tento herbicid je součástí přípravku Liberty nebo Basta.

Pro uvolnění GM odrůd do prostředí a do oběhu platí přísné regulace z důvodu negativního vnímání odolnosti hospodářsky významných druhů rostlin k herbicidům (zejména evropskou veřejností) a jejich širokou aplikací v zemědělství. Výzkum a používání GMO jsou u nás legislativně velmi dobře ošetřeny.

Před uvolněním GMO do prostředí a do oběhu se zvažují možné interakce s ekosystémy a zdravím člověka. Pozorování nepřímých účinků může být časově opožděno. Významná je potenciální možnost hybridizace s planými příbuznými druhy, která provází produkci a šlechtění kulturních rostlin. Také je potřeba zvažovat rozdílné regionální podmínky.

Řepka olejka je jednou z hlavních plodin, které byly geneticky upraveny a její transgenní odrůdy byly v některých zemích uvolněny pro komerční využití. Je čtvrtou nejpěstovanější transgenní plodinou na světě (cca 19% plochy). Jako invazivní druh, často pěstovaný ve velkých měřících, vytváří velké množství pylu a semen. V ornici může přetrvávat po mnoho let a za určitých podmínek se může šířit do okolních ekosystémů. Cílem četných studií je proto identifikovat možná rizika a definovat základní pravidla pro bezpečné pěstování. Je také nutné, aby interpretace výstupů takových studií odrážely místní specifické geografické a biologické podmínky, lokální agrotechnické postupy i požadavky představitelů daného regionu. Tyto studie pak mohou sloužit jako základ pro definování pravidel koexistence.

Monitoring ploch

V rámci projektu Ministerstva životního prostředí byl prováděn monitoring ploch v roce 2005 na lokalitách v ČR, kde probíhaly do r. 2001 registrační a předregistrační zkoušky geneticky modifikované řepky olejky. Namátkově bylo monitorováno 6 lokalit (z toho dvě opakovaně) v rozdílných výrobních podmínkách Čech a Moravy. Jednalo se o řepku olejku ozimou, hybridní, s tolerancí k herbicidu fostinotricinu (glufosinátu amonnému), s geny pro samčí sterilitu a obnovení plodnosti – insert MS8RF3 a s genem pro samčí sterilitu – insert MS8.

Byl monitorován výskyt rostlin GM řepky olejky vzešlých z výdrolu z předchozích let a současně byl zjišťován výskyt transgenů u řepce blízce příbuzných plevelných druhů čeledi *Brassicaceae*.

Nutnost monitoringu daných lokalit vyplynula z potencionálního předpokladu možnosti hybridizace řepky (*Brassica napus* L. var. *napus*) i s blízce příbuznými plevelnými druhy (*Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L.). Pro monitoring byly experimentálně záměrně vybrány ještě některé další příbuzné druhy – (*Arabidopsis thaliana*, *Barbarea vulgaris*, *Thlaspi arvense*, *Capsella bursa-pastoris*). Monitoring byl prováděn nejen na lokalitě samotné, ale i v jejím bezprostředním okolí (do 50 m od okraje pozemku pěstované GM řepky).

Metodika stanovení transgenů

Výchozím materiálem pro izolaci DNA byly semenáčky/mladé listy řepky a příbuzných druhů nalezených na pozemku a v jeho bezprostřední blízkosti (≤ 50 m).

Pro potřeby PCR reakce byla nejprve extrahována DNA z listů dle CTAB metody podle Williamse a kol. (1992). Protokol PCR byl dle potřeb optimalizován, byl použit přesný teplotní režim, délka jednotlivých kroků a přesné množství a koncentrace potřebných chemikálií.

Pro detekci transgenů *bar* (*PAT*) byly použity primery BarHyg1 (5'-CGG TCT GCA TCG TCA AC-3'), HygPat4 (5'-ACC CAG GTC ATG CCA GTT CC-3'). Amplifikovaný fragment genu *bar* měl velikost 428 bp.

Současně s amplifikací (namnožením) transgenů *bar* byla amplifikována také interní kontrola pro potvrzení, že v dané reakční směsi PCR reakce proběhla.

Fragment genu měl velikost 212 bp. V případě, že v příslušném elektroforegramu daný fragment vnitřní kontroly chyběl, byla PCR reakce provedena znovu, či byla ze zásobní tkáně provedena nová izolace DNA. PCR produkty byly elektroforeticky separovány v 1,5% agarózovém gelu v TBE pufru při napětí 80 V po dobu cca 2 hod.

PCR analýzy byly zajištěny na pracovišti Biotechnologického centra JU v Českých Budějovicích.

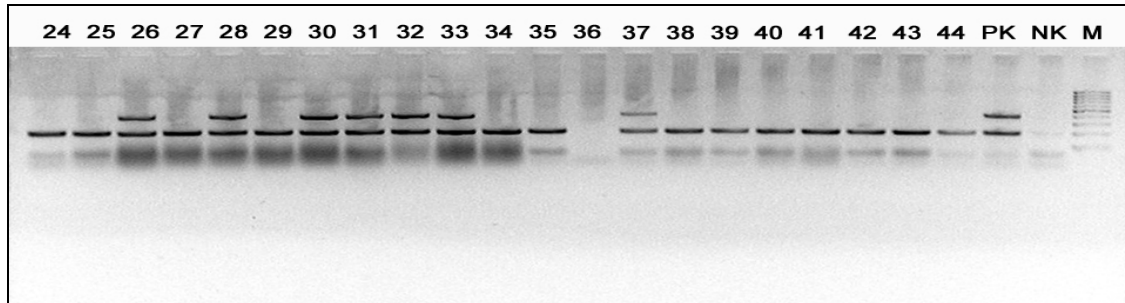
Obr. 1 Příklad detekce transgenu *bar* v řepce

Vzorky: */V/pořadové číslo/A 99/00

PK – pozitivní kontrola

NK – negativní kontrola

M - 100 bp ladder (velikostní standard)



Spodní fragment o velikosti 212 bp odpovídá genu UDP-glucose: sinapát glukosyltransferáze, který se vyskytuje u brukvovitých rostlin. Pomáhá určit, zda PCR reakce proběhla správně. U vzorků, kde nebyl přítomen (*/V/36/A 99/00), byla analýza zopakována. Horní fragment o velikosti 428 bp odpovídá transgenu *bar*, jehož přítomnost indikuje pozitivní vzorky.

Výsledky

Z výsledků PCR analýz vyplývá, že pozitivní rostliny řepky olejky nesoucí sledovaný transgen *bar* byly nalezeny na 3 lokalitách. Z celkového počtu 221 rostlin řepky olejky neslo transgen 58 rostlin, což odpovídá 26,2 % . Tento výsledek koresponduje s výsledkem monitoringu z r. 2004 (Bříza et al.), kdy z celkového počtu 281 testovaných řepok, byl transgen detekován u 74 rostlin, což znamená, že 27% rostlin řepok neslo transgen *bar*. Lze tedy konstatovat, že perzistence semen transgenních řepok v půdní zásobě trvá již čtyři roky (u některých lokalit 5 let) po skončení pokusů s GM řepkou.

Tab. 1. Počty rostlin s transgenem *bar* z celkového počtu rostlin odebraných na jednotlivých lokalitách dle jednotlivých rostlinných druhů

Lokalita	Datum odběru 2005	Rostl. druh	Počet rostlin celkem	Počet rostlin Bar +	Počet rostlin Bar -
1	25.5.	řepka olejka	3	1	2
		hořčice rolní	14	0	14
2	27.5.	huseníček rolní	1	0	1
		kokoška pastuší tobolka	7	0	7
		barborka obecná	11	0	11
3	27.5.	řepka olejka	70	28	42
		penízek rolní	4	0	4
		hořčice rolní	3	0	3
3*	7.6.	hořčice rolní	3	0	3
4	27.5.	řepka oleka	15	4	11
		hořčice rolní	2	0	2
		penízek rolní	11	0	11
4*	7.6.	řepka olejka	85	25	60
5	20.5.	řepka olejka	48	0	48
6	3.6.	-	0	0	0

Pozn: * - znamená 2. odběr (po 14 dnech)

Tab.2. Výskyt transgenu *bar* z celkového počtu rostlin konkrétních rostlinných druhů

Rostlinný druh	Celkem odebráno	Celkem GMO rostlin	% výskyt transgenu <i>bar</i>
řepka olejka (<i>Brassica napus</i> L.)	221	58	26,2
hořčice rolní (<i>Sinapis arvensis</i> L.)	22	0	0
penízek rolní (<i>Thlaspi arvense</i> L.)	15	0	0
kokoška pastuší tobolka (<i>Capsella bursa-pastoris</i> L.)	7	0	0
barborka obecná (<i>Barbarea vulgaris</i> R.Br.)	11	0	0
huseníček rolní (<i>Arabidopsis thaliana</i> L.)	1	0	0

Závěrem

Rostliny řepky olejky (*Brassica napus var. napus*) se vyskytovaly jen na těch lokalitách, kde nebyla provedena aplikace příslušným postemergentním herbicidem. Tyto rostliny pocházely z půdní zásoby nebo z výdrolu. Ojedinele se vyskytovaly také rostliny řepky na okrajích monitorovaných lokalit (meze, polní cesty) cca do vzdálenosti 50 m od sledovaného pozemku. Plané příbuzné druhy se vyskytovaly jak na lokalitách samotných, tak v jejich bezprostředním okolí (do 50 m) v různé četnosti v závislosti na konkrétní lokalitě a agrotechnice.

Na základě získaných výsledků z molekulárních analýz omezených souborů planých příbuzných druhů s řepkou olejkou (hořčice rolní, peníze rolní, kokoška pastušá, barborka obecná, huseníček rolní) rostoucích přímo na lokalitách nebo v jejich těsné blízkosti, nebyly nalezeny žádné rostliny nesoucí sledovaný transgen. Lze tedy konstatovat, že na základě získaných výsledků nedošlo k cizosprášení GM řepky olejky s těmito planými druhy z čeledi *Brassicaceae*. V naší studii, prováděné na omezeném počtu vzorků, tedy nebyl potvrzen přenos genu *bar* do planých příbuzných druhů. K hybridizaci planých druhů s řepkou olejkou může přímo v porostu docházet jen minimálně, hlavně z důvodu překrývání dob kvetení řepky a jí příbuzných druhů.

Např. KUČERA (2005) uvádí, že nezaznamenal výskyt spontánních hybridů řepky s planými plevelnými druhy, které by mohly umožnit vyhodnocení horizontálního přenosu genů. Avšak skutečnost, že nebyly zaznamenány případy hybridů, nelze chápat jako absolutní potvrzení nemožnosti horizontálního přenosu genů z *B. napus* do příbuzných planých druhů.

Námi zjištěné výsledky dokazují, že na pokusných lokalitách mohou být ještě po 5 letech od ukončení pokusů přítomny rostliny GM řepky pocházející z výdrolu semen po sklizni. Vhodnými agrotechnickými opatřeními lze však tento výskyt regulovat tak, aby se nejen snížila rizika cizosprášení konvenční produkce řepky, ale zároveň aby se minimalizoval možný přenos transgenů do příbuzných druhů rostlin. Ve shodě se zahraničními studiemi nebyla oproti běžné řepce prokázána zvýšená schopnost GM řepky přežít (jak rostlin, tak semen) či konkurovat jiným rostlinným druhům. Potvrdilo se, že užitím vhodné agrotechniky lze, z hlediska rizik přenosu genů a koexistence různých způsobů zemědělské výroby, již v prvních letech účinně snížit množství rostlin řepky z výdrolu na bezpečnou úroveň. Ponechání semen po sklizni na povrchu půdy a oddálení dalších agrotechnických zásahů (podmítka, ošetření herbicidy) je jedním z nejúčinnějších kroků, vedoucích ke snížení počtu rostlin z výdrolu. Také pěstování kompetitivních či úzkořádkových plodin (např. pícniny, obiloviny) v následujících letech, napomáhá k dalšímu snižování výskytu řepky.

Závěrem lze říci, že vhodně zvolenými agrotechnickými postupy (osevní postup, zpracování půdy, chemická ochrana proti plevelům) lze nežádoucí výskyt rostlin vzešlých především z výdrolu geneticky modifikované řepky olejky v maximální míře eliminovat. Potvrdilo se, že cílená, precizní agrotechnika je schopna postupně v průběhu let snížit nežádoucí výskyt semen z výdrolu v půdní zásobě na minimum.

Použitá literatura je k dispozici u autorů.

Výsledky prezentované v příspěvku vznikly za finanční podpory Ministerstva životního prostředí.

Autoři a kontaktní adresy:

Ing. Petra Hájková, Ing. Jan Hrubý, CSc., Výzkumný ústav pícninářský, spol. s r.o., Zahradní 1, Troubsko, 664 41
e-mail: hajkova@vupt.cz, hruby@vupt.cz

Doc. Ing. Vladislav Čurn PhD., Ing. Jana Žaludová, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Biotechnologické centrum, Studentská 13, 370 05
e-mail: curn@zf.jcu.cz

Autoři obrázků: Obr. 1 – Žaludová J.