

**UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO
Jamnikarjeva 101
1000 Ljubljana**

Ocena sprejemljivosti potencialno škodljivih vplivov pri sproščanju Bt koruze v okolje

Avtorja študije:

dr. Ludvik ROZMAN, Stanislav GOMBOC

Ostali sodelujoči: dr. Lea Milevoj, dr. Franci Celar, Nevenka Valič

Ljubljana, 18. januar 2002

Ocena sprejemljivosti potencialno škodljivih vplivov pri sproščanju Bt koruze v okolje

Izvleček

Na osnovi literature in rezultatov lastnih raziskav smo izdelali študijo ter podali oceno tveganja in oceno potencialno škodljivih vplivov na okolje v primeru namernega sproščanja Bt koruze v okolje. Bt koruza vsebuje modificiran gen iz naravne talne bakterije *Bacillus thuringiensis* Berliner in je sposobna sama sintetizirati proteine, ki so toksični za koruzno veščo (*Ostrinia nubilalis* Hübner). Navedene so identifikacijske metode za odkrivanje gensko spremenjenih rastlin (GSR) v okolju ter ocene škodljivih vplivov za slovenske rastne razmere in ocena smotrnosti uvedbe Bt koruze v Slovenijo. Bt koruza je zanesljivo sredstvo za zaščito koruze pred koruzno veščo. Različni izvori Bt gena učinkujejo različno. Učinek Bt gena izvora 176 po cvetenju pojema, zato ne učinkuje na drugo generacijo koruzne vešče, medtem ko izvora Bt 11 in MON 810 učinkujeta skozi vso rastno sezono. Poleganje in lom stebela sta manjša pri Bt koruzi kot pri ne-Bt koruzi. Pridelek Bt hibridov koruze je večji samo pri močnejšem napadu koruzne vešče, zaradi manjšega loma stebela, ne pa zaradi boljšega pridelka Bt koruze. Tako kot insekticidi tudi vsi Bt hibridi niso učinkoviti proti vsem škodljivcem. Zaradi dražjega semena Bt koruze se ekonomsko splača pridelovanje Bt koruze samo ob večjem napadu koruzne vešče (v ZDA najmanj 1 ličinka/rastlino). Med škodljivimi vplivi je možno delovanje Bt toksina tudi na neciljne organizme. Ugotovljeno je, da Bt toksin lahko povzroča smrtnost metulja monarha (*Danaus plexippus* L.) in navadne tenčičarice (*Crysoperla carnea* Stephens), če so hranjeni s pelodom Bt koruze. Možen je pojav odpornosti koruzne vešče na Bt toksin. Uvajanje Bt koruze v Slovenijo bi bila z ekonomskega vidika upravičena edino v Vipavski dolini, kjer koruzna vešča razvije 2 generaciji na leto. Ker pa so na tem območju površine s koruzo zelo majhne je ekonomika uvajanja vprašljiva. Ob uvajanju Bt koruze v Slovenijo obstaja precejšnja verjetnost skrižanja Bt koruze z domačimi populacijami trdink, ki jih kmetovalci sejejo za lastno rabo in ljudsko prehrano. Zaradi razdrobljenosti slovenskih njiv je to za naše razmere še največje tveganje, saj bi izgubili domače sorte in bi se zmanjšala genska raznolikost slovenske koruze. Ker je sproščanje GSR v okolje lahko ireverzibilen proces, je remediacijo težko oz. nemogoče izvesti. O perzistentnosti toksičnega Bt peloda v zemlji ali v vodnih sistemih podatkov v literaturi nismo zasledili.

The assessment of potential hazards due to release of Bt maize to the environment

Abstract

The presentation deals with the problems associated with the identification of genetically modified organisms (GMO) and the potential hazards due to the deliberate release of Bt maize genotypes to the Slovenian environment. The use of the Bt gene is considered to be a reliable way to protect maize against the European Corn Borer (ECB) (*Ostrinia nubilalis* Hübner). Bt maize fields are in this way protected without insecticides. In the literature it is possible to find a lot of studies associated with the potential negative effects and hazards due to the release and spread of Bt maize genotypes in the environment. The Bt maize contains a modified gene from the soil born bacteria *Bacillus thuringiensis* Berliner, which is responsible for the synthesis of the protein compounds, toxic to the ECB. Different Bt events may have different effects throughout the vegetation period. The effect of the Bt event 176 diminishes after the pollination and therefore does not affect the second generation of the pest while the Bt11 appears to be effective throughout the vegetation period (of maize). The stalk lodging of the Bt maize is usually much lower when compared with their non-Bt analogues. In the case of strong attack of the ECB the yields of Bt hybrids are generally higher (due to higher stalk lodging of non-Bt analogues). However, similarly to insecticides, all Bt events do not express equal effectiveness. The economic gain of using Bt maize can be positive only when the ECB attack is sufficiently strong. The Bt toxin can also affect non-intended organisms such as the monarch butterfly (*Danaus plexippus* L.) and lacewing (*Crysoperla carnea* Stephens). Another serious problem, especially in the future, will probably be the resistance of ECB populations to Bt toxins due to natural selection. To slow down the evolution of the resistance against to Bt toxins American farmers have to plant non-Bt hybrids (at least 20%) along with Bt maize. In Slovenia, the use of Bt maize hybrids is disputable. On the base of own investigation, it could be profitable only in Vipava Valley (in the Adriatic Region), however, the agricultural land there is very limited and is used for more profitable crops such as vegetables, ornamentals, some species of fruit trees and grapevines. The introduction of Bt materials to Slovenia may cause a significant genetic erosion. Bt genotypes will probably easily intercross with the existing local populations which may completely disappear. The Slovenian agricultural land is crumbled, the plots are generally small and belong to different owners. Because of this the chances of 'escape' of Bt genes are very high. Local populations are very important for the Slovenian farmers because they are well adapted to the existing pedoclimatic conditions, and are in many cases sown for human food. The release of GMO (such as Bt maize) is an irreversible process. Now, it is still hard to predict the damage, however, if we are not careful, it may be very difficult or even impossible to correct the mistakes caused by GMO. In the literature, it is not possible to find any systematic studies about the persistence of the toxicity of the Bt pollen in the soil or in aquatic systems after being washed away by rain.

KAZALO

1	UVOD.....	1
1.1	GENSKO SPREMENJENE RASTLINE IN BT KORUZA	1
1.2	PRIPOROČILA OB PRIPRAVI OCENE TVEGANJA PRI SPROŠČANJU GSO	3
2	METODE DELA.....	5
3	REZULTATI ŠTUDIJE.....	6
3.1	DEJSTVA O BT KORUZI.....	6
3.1.1	<i>Negativne lastnosti Bt koruze.....</i>	7
3.1.1.1	<i>Možnost razvoja rezistence pri koruzni vešči na Bt toksin</i>	9
3.1.1.2	<i>Posledice hranjenja živali s tujo DNA</i>	10
3.1.2	<i>Pozitivne lastnosti Bt koruze</i>	11
3.1.3	<i>Ekonomika pridelave Bt koruze</i>	12
3.1.4	<i>Vpliv Bt koruze na talni ekosistem.....</i>	13
3.1.5	<i>Problem tujeprašnosti</i>	14
3.1.6	<i>Vpliv GSR na populacijske spremembe ciljnih in neciljnih populacij.....</i>	17
3.2	SMOTRNOST UVEDBE BT KORUZE ZA PRIDELAVO V SLOVENIJI.....	18
3.2.1	<i>Pridelava koruze v Sloveniji.....</i>	18
3.2.2	<i>Značilnosti koruzne vešče v Sloveniji</i>	19
3.2.3	<i>Ekonomski parametri smotrnosti pridelave Bt koruze v Sloveniji</i>	27
3.2.4	<i>Ugotavljanje škodljivih vplivov ob sproščanju Bt koruze v Sloveniji in dejstva, na katera moramo biti še posebno pozorni</i>	29
3.3	MOŽNOSTI REMEDIACIJE PROSTORA, V KATEREM JE PRIŠLO DO NEGATIVNIH UČINKOV GSO33	
3.4	IDENTIFIKACIJSKE METODE ODKRIVANJA GSR IN BT KORUZE V OKOLJU.....	34
3.4.1	<i>Imunološki testi.....</i>	34
3.4.2	<i>Testi na osnovi DNA:</i>	35
3.4.3	<i>Institucije v Sloveniji, ki se usposablajo za opravljanje testov na GSR.....</i>	36
4	SKLEPI.....	37
5	VIRI.....	38

1 UVOD

Študija je izdelana na osnovi razpisa Ciljnega raziskovalnega programa, ki ga je razpisalo Ministrstvo za okolje in prostor in Ministrstvo za šolstvo, znanost in šport. Temelji na osnovi zbranih argumentov iz znanstvenih objav, mednarodnih predpisov na področju gensko spremenjenih organizmov (GSO) in na rezultatih lastnih raziskav, v katerih smo proučevali značilnosti koruzne vešče v Sloveniji. Njen namen je argumentiran in strnjen pregled doslej znanih argumentov za in proti uvedbi Bt koruze za pridelavo v Sloveniji. V posameznih poglavjih so pojasnjene karakteristike gensko spremenjenih rastlin (GSR) na splošno, podrobno pa na primeru Bt koruze. V poročilu je predstavljena tudi smotrnost pridelave Bt koruze v Sloveniji glede na značilnosti koruzne vešče v slovenskih razmerah.

1.1 Gensko spremenjene rastline in Bt koruza

Rastline spremenjene z genskim inženiringom ali gensko spremenjene rastline (GSR) imajo v svojo dedno zasnovo vključeno tujo gensko sekvenco. Ta je pridobljena iz drugega organizma, narejena sintetično ali je kombinacija obojega. Ta sekvenca je namenjena točno določenemu cilju, ki ga z običajnimi žlahtniteljskimi postopki ni bilo mogoče doseči oz. vsaj ne v doglednem času. Največ GSR ima vključene gene za odpornost na totalne herbicide in na škodljive organizme.

Cilj vseh izboljšav je bil višji in kakovostnejši pridelek in s tem boljši zaslužek. Kmetijski pridelovalci in proizvajalci semena GSR so si od GSR obetali večji dobiček, saj so nove tehnologije ponujale rešitev vrste težav, ki prej niso bile enostavno rešljive.

Bt koruza vsebuje modificiran gen iz talne bakterije *Bacillus thuringiensis* Berliner. Omenjena bakterija je naravna bakterija, prisotna v zemlji. Različni sevi te bakterije so sposobni proizvajati Cry (kristal) proteine, ali pa vsebujejo snovi, ki so selektivno učinkovite proti različnim žuželkam. Raziskovalci so izolirali gen, ki proizvaja proteine, ga modificirali in vstavili v koruso, tako so dobili Bt koruso. Bt gen omogoča rastlini sintezo proteina, ki je toksičen za večino gosenic pri metuljih. Bt toksin deluje na steno prebavnega trakta, kjer povzroči razpad črevesnih sten in povzroči smrt gosenic koruzne vešče in drugih ličink metuljev, ki se s tako koruso hranijo. Ličinke koruzne vešče navadno poginejo v 48 urah po zaužitju Bt koruze.

Pri Bt koruzi poznamo več različnih genov z Bt toksinom, ki je vključen v genom koruze. Ti različni geni imajo tudi različne učinke v delovanju na škodljivce, ki se na koruzi hranijo. Glavni proizvajalci teh genov in semenske Bt koruze so Novartis Seeds, Monsanto, AgrEvo, Mycogen in Pioneer. Ker imajo različni geni različno učinkovitost in s temi povezane posledice, jih je potrebno obravnavati ločeno. Ti geni so del celotnega genoma koruze, kjer je njihova ekspresija pri istih genih spet različna, zato imajo tudi različni hibridi z istimi geni povsem drugačne lastnosti. Te je prav tako potrebno obravnavati ločeno. Na ta način je že pri izdelavi pisne ocene potrebno definirati, kateri geni in hibridi bi na območju Slovenije potencialno prišli v poštev in potem za te izdelati vse potrebne ocene.

Prvi hibridi transgene koruze so prišli na trg v ZDA in Kanadi leta 1996. Takratna Ciba Geigy je po pridobitvi dovoljenja od Agencije za varovanje okolja v ZDA in Kanadi ponudila pridelovalcem koruze 8 hibridov, Mycogen pa en hibrid. Kasneje se je na trg vključil še Monsanto, ki danes združuje že več bivših semenarskih podjetij, med katerimi je prej bil tudi

Pioneer. Zaradi lažje pravne zaščite ima to seme novo blagovno znamko (kot je npr. Maximizer) in je zaradi boljše prepoznavnosti obarvano modro. Podobno je zaščiten tudi Mycogen-ov hibrid z imenom NatureGard.

Preglednica 1: Bt hibridi, ki so imeli registracijo v ZDA v letu 1999 (povzeto po referatu dr. Richard Edwards, Adana 1999, neobjavljeno)

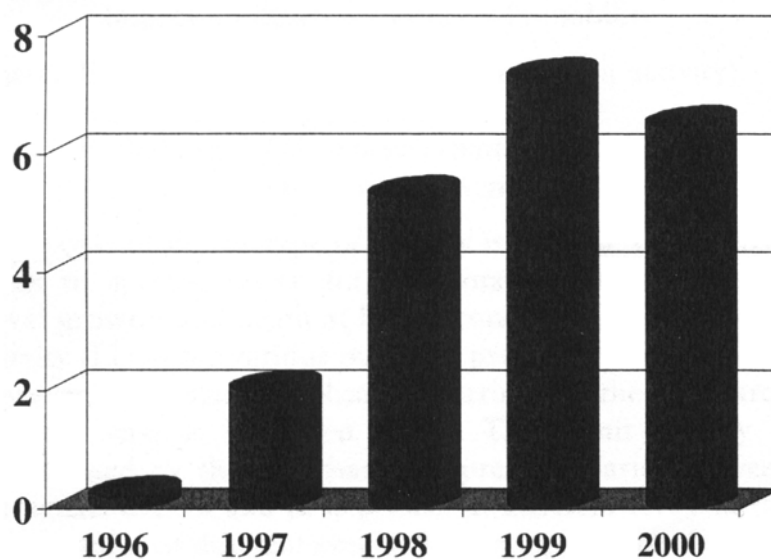
Izvor Bt	Hibrid	Leto registrac.	Potek roka	Toksin	Koruza	Firma
176	KnockOut [®]	avg. 95/mar. 98	apr. 01	Cry1Ab	nav. koruza	Novartis Seeds
176	NatureGard [®] NGBt1	avg. 95	apr. 01	Cry1Ab	nav. koruza	Mycogen
Bt11	YieldGard [®]	okt. 96	apr. 01	Cry1Ab	nav. koruza	Novartis Seeds
Bt11	Attribute [®]	mar. 98	apr. 01	Cry1Ab	sladka kor.	Novartis Seeds
Mon810	YieldGard [®]	dec. 96	apr. 01	Cry1Ab	nav. koruza	Monsanto
DBT-418	Bt-Xtra [®]	mar. 97	apr. 01	Cry1Ac	nav. koruza	DeKalb (Monsanto)
CBH-351	StarLink [®]	maj 98	maj 00	Cry9C	nav. koruza	AgrEvo/PGS

Pridelava Bt koruze v nekaterih državah ZDA že presega 50 % celotne pridelave koruze in njen delež že od komercialne uvedbe l. 1996 v ZDA narašča. Ker so ZDA in druge države Ameriške celine velike izvoznice koruznega zrnja po vsem svetu obstaja velika verjetnost, da zrnje in proizvodi Bt koruze prihajajo tudi k nam. Žal do točnih podatkov od kje in kakšne količine koruznega zrnja se v Slovenijo uvozijo nismo uspeli priti. Na podlagi podatkov fitosanitarnega nadzora nad uvozom pa vemo, da največ koruze uvozimo iz držav jugovzhodne Evrope.

Uvajanje transgenih rastlin v široko kmetijsko pridelavo ima lahko mnoge predvidljive in nepredvidljive posledice za obstoječe ekosisteme. Tega se zavedajo tako semenarske hiše kot za kmetijstvo zadolžene vladne in nevladne organizacije. Zato so projekti, ki ocenjujejo vpliv pridelovanja transgenih rastlin na okolje, sestavni del introdukcije transgenih kmetijskih rastlin. Do sedaj ni poročil o morebitnih negativnih posledicah na okolje, je pa tudi res, da so te rastline v naravnem okolju še zelo kratek čas (5 let) in da se je njihova pridelava zelo hitro razmahnila. V ZDA, Argentini in Braziliji je bil leta 2001 delež Bt koruze, v območjih, kjer koruzna večča presega ekonomski prag, višji od 50 % vse zasejane koruze (XXI IWGO simpozij, Padova, 2001). Ekonomski prag škode koruzna večča v ZDA presega na 10-12 mio hektarjih od vseh 32 mio hektarjev, ki so zasejani s koruzo. Od teh 10-12 mio ha, ki so potencialno ogroženi zaradi visokega napada koruzne večče je bilo z Bt koruzo zasejanih okrog 7 mio ha (McLaren, 2001). Glede na celotno površino koruze v ZDA znaša delež Bt koruze 20-25 %, višji pa je delež GS koruze odporne na herbicide.

Kot zanimivost naj še navedemo, da je bila koruzna večča iz Evrope prinesena v ZDA okrog l. 1915 (Lauer s sod., 1999) in je sedaj prevladujoč škodljivec koruze v severni Ameriki. V ZDA znaša škoda, ki jo povzroči koruzna večča 1 milijardo USD letno (Rice in Pilcher, 1998), ali po drugih virih pa celo 1-2 milijardi USD letno (Hyde s sod., 1999).

Površina v milijonih ha



Graf 1: Površine zasejane z Bt koruzo v ZDA po letih (vir: McLaren, 2001).

Če gledamo koristni vidik transgenih rastlin, to je večji pridelek zaradi zmanjšanja ekonomske škode in zmanjšanje porabe fitofarmaceutskih sredstev, ker takih rastlin ni potrebno škropiti, je tudi ta delež, poleg zaslužkov semenarskih podjetij, očiten. Da je ta pogoj izpolnjen pa mora biti ekonomski prag škodljivcev dovolj visok, da se pridelava tovrstne koruze splača. Stroški same pridelave so namreč za 20 % višji, kot pri običajnih hibridih (referat dr. Richard Edwards, Adana 1999, neobjavljeno). Prvi vzrok za to je že precej dražje seme v primerjavi z običajnimi hibridi. V optimalnih razmerah ti hibridi dajo nekoliko manjši pridelek v primerjavi z njihovimi izogenimi hibridi, nekoliko dražje pa je tudi sušenje zrnja, ki se pri transgenih hibridih počasneje suši. Eden bistvenih dejavnikov za zmanjšanje prodajne cene transgenih hibridov so težave pri prodaji zrnja, saj ga je na evropskem trgu in tudi sicer, če je deklarirano kot transgeno, težje prodati.

Kljub temu, da v večini držav članic EU velja moratorij na poskuse s transgenimi rastlinami na prostem, pa te v nekaterih že komercialno pridelujejo. Tako je bilo v Španiji v letu 2001 z Bt koruzo zasejanih že 22.000 ha površin (XXI IWGO simpozij, Padova, 2001). Veliko površin je v letu 2001 zasejanih tudi v Romuniji, kjer pridelujejo transgeno koruzo odporno na koruzno večšo in na glifosat. Podatka o natančnem obsegu teh površin zaenkrat še ni. Na Madžarskem tudi že tečejo uradni poljski poskusi s transgeno koruzo, za uvrstitev na uradno sortno listo. Ker iz teh držav uvažamo tudi zrnje koruze, obstaja velika verjetnost, da bomo to koruzo tudi konzumirali, ne da bi bili o tem obveščeni. Raziskave z Bt koruzo so imeli na prostem že tudi v Italiji in na Hrvaškem, vendar so jih kasneje zaradi protestov javnosti prepovedali.

1.2 Priporočila ob pripravi ocene tveganja pri sproščanju GSO

Po zakonodaji EU temelji priprava kompleksne ocene tveganja namernega sproščanja GSO v okolje predvsem na načelu preventivnosti. To načelo povzema tudi predlog našega zakona o GSO. Osnovni namen tega načela je varovanje zdravja človeka in ohranitev naravnega okolja. Glede na direktivo EU je potrebno upoštevati etične človeške norme ter zagotoviti obveščenost

javnosti. V naravi načeloma prihaja do prostega pretoka genov med različnimi populacijami, ki ga je praktično nemogoče preprečiti.

Zato je v skladu z EU direktivo potrebno upoštevati naslednja načela:

- ◆ Ločeno je potrebno obravnavati vsak posamični primer in temu prilagoditi postopke pri ocenjevanju potencialnega tveganja pri namernem sproščanju GSO v okolje.
- ◆ Ocena tveganja mora biti izdelana zmeraj pred nameranim sproščanjem GSO v okolje.
- ◆ Upoštevati je potrebno potencialne kumulativne učinke skupaj z interakcijo z drugimi GSO v okolju.
- ◆ Potrebno je zasnovati enotno metodologijo za pripravo vseh ocen tveganja na osnovi neodvisnih znanstvenih dognanj.
- ◆ Namerno sproščanje GSO v okolje je v večini primerov potrebno v fazi raziskav oz. je nujna faza pri razvoju GSO.
- ◆ Sproščanje GSO v okolje mora biti postopno. Če se pri tem naknadno ugotovijo škodljivi vplivi na okolje je sproščanje potrebno ustaviti.

Priprava kompleksne ocene tveganja mora upoštevati več osnovnih načel in sestoji iz več stopenj:

1. Identifikacija lastnosti, ki bi lahko povzročile škodljive učinke, tudi če je možnost, da do tega pride zelo mala.
2. Vrednotenje potencialnih posledic vsakega škodljivega vpliva, če se ta pojavi.
3. Vrednotenje verjetnosti pojava vsakega identificiranega potencialno škodljivega vpliva.
4. Ocena tveganja za vsako identificirano značilnost GSO za potencialno škodljive vplive na širše okolje.
5. Vključitev strategije kako najbolje ravnati v primeru pojava škodljivih posledic.
6. Ovrednotenje celotnega tveganja sproščanja GSO, z upoštevanjem predlagane strategije.

Priprava ocene tveganja se sestoji iz zbiranja informacij pridobljenih iz znanstvenih objav in sprotne identifikacije možnih negativnih učinkov pri lastnih raziskavah in v primeru omejenega sproščanja GSO v okolje. Pri ocenjevanju tveganja je potrebno identificirati potencialno nevarnost škodljivega vpliva ter verjetnost pojava škodljivega vpliva, ki ga je potrebno zmanjšati na minimum.

Končno vprašanje pri ocenjevanju tveganja mora vsebovati naslednje:

- ali je potencialno tveganje sproščanja GSO v okolje sprejemljivo v primerjavi z relativno koristnostjo takih organizmov,
- ali razpolagamo z ustreznimi razpoložljivimi mehanizmi za zadostno oz. ustrezno zagotovitev varnosti.

V naravi stalno prihaja do medsebojne izmenjave genov med populacijami, znotraj vrste ali celo med vrstami. V primeru GSO to lahko pripelje do genetske kontaminacije ekonomsko pomembnih rastlin, kar lahko vodi do izgube avtohtonih in drugih lokalno pomembnih sort ali vrst rastlin. Ta verjetnost je tem večja čim bolj so si avtohtone rastline v sorodstvu z gojenimi. Z rekombinacijo genov lahko dobimo organizme s povsem novimi lastnostmi, ki jih sicer v naravi ne srečamo. Pred nameranim sproščanjem GSO v okolje je potrebno upoštevati tudi tovrstno tveganje, čeprav je še tako majhno, vendar pa lahko vodi do zelo dolgotrajnih posledic. V študijah je zato dobro zajeti tudi vse morebitne kombinacije preskoka genov na avtohtone populacije organizmov.

2 METODE DELA

Projekt je analitične narave, opravljen kot študija na osnovi predpisanih virov (predpisov s tega področja), dodatnih literaturnih virov znanstvenih in strokovnih objav, rezultatov lastnih raziskav, ki se nanašajo na obravnavano tematiko, neobjavljenih rezultatov dosedanjih študij, ki smo jih pridobili na podlagi korespondence s kolegi iz tujine in na podlagi podatkov s kongresov in simpozijev na omenjeno tematiko.

Predpisani viri s strani financerja študije so bili naslednji:

- ◆ Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council on the Deliberate Release into the Environment of Genetically Modified Organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC, L106/1,
- ◆ Voluntary Code of Conduct for the Release of Organisms in Environment, July 1991, UNIDO,
- ◆ Manual for Assessing Ecological and Human Health Effects of Genetically Engineered Organisms, Part I and Part II, The Edmonds Institute, Washington, 1998,
- ◆ Enabling the Safe Use of Biotechnology, John J. Doyle, Gabrielle J. Persley, ESD, The World Bank, Washington, 1996.

Za študijo smo pridobili tudi veliko število znanstvenih objav na temo Bt koruze in v manjši meri drugih GSR iz različnih znanstvenih revij, ki objavljajo recenzirane članke. Ker je bilo znanstvenih objav na tem področju zelo veliko, smo strokovne objave upoštevali le v primeru, če so bile podkrepjene z dokazanimi dejstvi in na to temo ni obstajalo strokovnih objav. Pridobili smo tudi dostope do informacijskih sistemov, ki imajo omejen dostop do informacij v zvezi z GSR. V tem primeru smo uporabljali informacijski sistem Monsanto, ki vsebuje izvlečke in cele članke objavljene v strokovni in znanstveni literaturi na temo GSR in informacijski sistem Central Science Laboratory v Yourku (GB), kjer skrbijo za ves nadzor nad poskusi z GSR.

Ker smo dolgo časa raziskovali biologijo in ekologijo koruzne večče v naših razmerah, smo imeli na voljo zelo točne podatke o razširjenosti in značilnostih koruzne večče v naših razmerah. Ti so nam prišli zelo prav v primeru argumentiranja smotrnosti uvedbe Bt koruze v našo pridelavo.

Kontaktirali smo tudi veliko kolegov, ki se v tujini ukvarjajo z raziskavami na GSR in od njih pridobili veliko še neobjavljenih podatkov in najnovejše podatke o obnašanju Bt koruze v okolju. Te podatke smo prav tako uporabili v študiji.

V prejšnjem letu smo se udeležili tudi dveh mednarodnih kongresov, kjer so raziskovalci predstavili rezultate zadnjih raziskav na tem področju. Obravnavani so bili učinki na ciljne in neciljne organizme v posevkih GSR. Te študije so prav tako prispevale veliko dragocenih podatkov.

Vse tako zbrane podatke smo obravnavali v enotnem konceptu po poglavjih kakor si sledijo. Navedbe v tekstu so vse navedene z viri iz katerih so povzete, tako da je mogoče preveriti vse trditve iz originalnih virov.

3 REZULTATI ŠTUDIJE

3.1 Dejstva o Bt koruzi

Ob pregledu literature smo ugotovili, da je neodvisnih raziskav, na temo pozitivnih in negativnih učinkov Bt koruze na ciljne in neciljne organizme še zmeraj malo. Po drugi strani pa so ti rezultati zaupne narave in za laično javnost niso dosegljivi. Primer slednjega je intranet Monsanto, kamor je do informacij mogoče priti samo na posebno zahtevo in po dodelitvi osebnega identifikatorja. Vzrokov za majhno število neodvisnih raziskav je precej. Eden glavnih je velik pritisk kapitala semenarskih podjetij za čimprejšnjo prodajo novega semena, v razvoj katerega so vložili zelo velike vsote. Zelo pomembno je biti tudi prvi na trgu. Poleg tega multinacionalke prispevajo večino raziskovalnih sredstev za znanstveno delo laboratorijev z ZDA in Veliki Britaniji. Velik je tudi pritisk pridelovalcev, ki želijo s takimi rastlinami rešiti težave v pridelavi. Odpadejo škropljenja, poveča se pridelek, glede na običajne izogene kultivarje, če je pritisk škodljivcev visok. Šele potem pridejo na vrsto dejavniki, ki so pomembni za varstvo potrošnikov in varovanje okolja. Stroški tovrstnih in tako kompleksnih raziskav so zelo visoki in jih sama podjetja ne zmorejo financirati, država pa pokrivanje tovrstnih stroškov ne zanima, čeprav njihovi organi odobrijo pridelavo GSR. Prav zaradi tega je s strani tveganja še zmeraj precej odprtih vprašanj, ki se zaradi zgoraj navedenih vzrokov pogosto potisnejo v ozadje. Zato je na tem področju še vedno potrebna kar precejšnja previdnost.

Kar se tiče vloge proteina, vključenega v genom koruze, ta niti ni toliko vprašljiv, kot je vprašljivo delovanje le-tega v naravnem kompleksu. Iz literature je že dobrih trideset let znano, da je koruzno vešče mogoče zatirati s pomočjo insekticidnega delovanja beljakovin, ki jih tvori v organizmu bakterija *Bacillus thuringiensis ssp. kurstaki*, ki deluje samo na prebavni trakt reda Lepidoptera. To pomeni, da toksično deluje na larvalne stadije vseh metuljev. Ravno v tem pa je prvi problem sproščanja Bt hibridov v širši naravni prostor.

Pripravki, ki so izdelani na osnovi omenjene bakterije, so se uporabljali na relativno majhnih površinah, kot so vrtnarije, sadjarstvo, druga intenzivna proizvodnja. S tem je bilo delovanje teh pripravkov omejeno tako v prostoru, kot po času uporabe. Pri transgeni koruzi je tvorba proteina v rastlini aktivirana vso rastno dobo in se ob cvetenju s cvetnim prahom lahko z vetrom prenaša tudi na parcele, ki so v bližini teh polj. Ker je ta pelod toksičen tudi za vse ostale metulje, lahko toksično deluje tudi na zavarovane in ogrožene vrste metuljev.

Zaradi hitre širitve Bt koruze v pridelavo, obstaja velika verjetnost nastanka rezistence koruzne vešče na Bt gen. Pri nekaterih vrstah metuljev je bila tovrstna rezistenca že opažena. V ZDA imajo zato že izdelano varovalno strategijo, ki upošteva gibanje populacije koruzne vešče, njene preference in načrtno izmenjevanje njiv s transgenimi in navadnimi hibridi koruze. Računalniška simulacija je pokazala, da tak pristop lahko odloži nastanek rezistence in zmanjša škodo na poljih z navadnimi hibridi koruze. Možnost za nastanek rezistence je mogoče zmanjšati tudi s kombinacijo dveh ali več virov odpornosti z različnim načinom delovanja, kar pa je z vidika semenarskih hiš spet dodaten strošek. Poleg tovrstnih problemov, so nejasnosti še glede možnosti preskoka genov na druge rastlinske vrste, zmanjšanja ekološke raznolikosti, genske erozije in rušenja naravnega ravnotežja.

3.1.1 Negativne lastnosti Bt koruze

Head s sod. (2001) je proučeval vsebnost proteina Cry1Ab v gosenicah treh koruznih škodljivcev in sicer koruzne vešče (*Ostrinia nubilalis* Hübner), zahodne plodovrtke (*Helicoverpa zea* Boddie) in ipsilon sovke (*Agrotis ipsilon* Hufnagel), po hranjenju z Bt koruzo. Po 24-urnem hranjenju s koruzo, ki je vsebovala 20 in 100 ppm proteina Cry1Ab je bil nivo Cry1Ab v ličinkah koruzne vešče okrog 57- oz. 142-krat nižji, kot nivo proteina v hrani, v ličinkah zahodne plodovrtke 20- oz. 34-krat in v ličinkah ipsilon sovke 10-14-krat nižji. (Vsebnost Cry1Ab proteina so ugotavljali pri liofiliziranih gosenicah). Koncentracija v koruzni listni uši (*Rhopalosiphum maidis* Fitch) pa je bila izpod meje določljivosti z ELISA testom. Verjeten vzrok tako nizke vsebnosti Cry1Ab proteina je kratkotrajno hranjenje z Bt koruzo, česar pa avtorji ne navajajo.

Medtem, ko je Hilbeck s sod. (1998) ugotovil signifikantno večjo smrtnost (57 % smrtnost) ličink navadne tenčičarice (*Crysopepla carnea* Stephens) pri hranjenju s 100 ppm Cry1Ab, kot pri hranjenju brez Cry1Ab (30 % smrtnost) ter kasneje še (Hilbeck s sod., 1999) na koruzno veščo in sovko vrste *Spodoptera littoralis* (Boisduval), ki je pri hranjenju z različno koncentracijo 25-200 ppm Cry1Ab ugotovil 46-78 % smrtnost. Head s sod. (2001) sicer komentira visoko smrtnost pri Hilbeck-u s sod. (1998, 1999) kot posledico visokih koncentracij, vendar moramo vedeti, da je bilo hranjenje oz. izpostavljanje ličink Cry1Ab proteinu bistveno krajše, kot če bi te konzumirale Bt koruzo v naravi, kjer preživijo celoten larvalni stadij. V tem primeru bi koncentracija bila še večja.

Med škodljive vplive namernega sproščanja Bt koruze spada tudi delovanje Bt toksina na neciljne organizme. Med drugim povzroča smrtnost metulja monarha (*Danusa plexippus* L.) (Losey s sod., 1999), katerega glavni gostitelj je navadna svilnica (*Asclepias syriaca* L.), ki raste ob cestah, železnici, jarkih, ob robovih njiv s koruzo, sojo in drugimi poljščinami. Losey s sod. (1999) je ugotovil, da so ličinke monarha po 48-urnem hranjenju z listi svilnice, poprašenimi s pelodom Bt koruze, imele znatno večjo smrtnost (44 %) kot z listi svilnice kontaminirane s pelodom ne-Bt koruze ali z listi brez peloda (0 %). Pri ličinkah hranjenih z listi, ki so jih potresli s pelodom Bt-koruze so ugotovili tudi manjšo ješčnost in počasnejšo rast. Ugotovitve Losey-a s sod. (1999) so bile predmet več razprav in polemik (Shelton in Roush, 1999; Pimentel in Pimentel, 2000; Pimentel in Raven, 2000; McLaren, 2001), čeprav sta ugotovitve Losey-a s podobnimi rezultati potrdila tudi Jese in Obrycki (2000). Po 48-urnem hranjenju ličink monarha z rastlinami navadne svilnice, ki je bila potresena s pelodom Bt-koruze, je bila smrtnost 20 %, na rastlinah brez peloda 3 % in na rastlinah s pelodom ne-Bt koruze 0 %. Največja smrtnost je bila na rastlinah, ki so bile oddaljene 3 m ali manj od polja z Bt-koruzo. Avtorja smatrata, da so rezultati smrtnosti podcenjeni, saj so bile ličinke izpostavljene pelodu Bt-koruze samo 48 ur, medtem, ko bi bile v času cvetenja koruze, ko poteka razvoj ličink, izpostavljene še dlje. V tem primeru bi prihajalo še do dodatnih kumulativnih učinkov. Medtem, ko Wraigt s sod. (2000) ni ugotovil škodljivega vpliva peloda Bt koruze na lastovičarja vrste (*Papilio polyxenes*), hranjenega na pastinaku (*Pastinaca sativa*) kot gostiteljski rastlini. McLaren (2001) navaja, da so drugi raziskovalci (Sears s sod., 2000) prišli do naslednjih zaključkov. Če so gosenice monarha hranili z listi, na katerih je bilo 541 pelodnih zrn/cm², Bt hibrida Bt-176, je bila smrtnost teh visoka. Če pa so gosenice hranili z listi navadne svilnice, na katerih je bilo le 133 pelodnih zrn/cm², to ni imelo nobenega učinka na smrtnost gosenic. Pri Bt hibridu MON-810 in Bt-11 niso opazili nobenega vpliva na smrtnost gosenic celo pri gostoti do 600 pelodnih zrn/cm².

Kljub tovrstnim navedbam pa je bistvenega pomena čas izpostavljenosti gosenic Bt pelodu. Kdaj so gosenice izpostavljene temu pelodu in v kakšni meri, pa je prav tako odvisno od več dejavnikov. Najpomembnejši je gotovo čas cvetenja koruze. Če se gosenice hranijo na poljih ali v bližini teh v času cvetenja Bt koruze so izpostavljene večjemu tveganju kot če razvojni cikel zaključijo prej. Pomembna je tudi oddaljenost gostiteljskih rastlin od njiv z Bt koruzo. Ker je pelod koruze velik in težak, ga glavnina ostane na polju ali v bližini tega. V oddaljenosti več kot 10 m od Bt koruze je gostota peloda v času cvetenja že pod mejo smrtnosti za gosenice. Tudi način prehranjevanja gosenic ima velik vpliv na izpostavljenost Bt pelodu. Gosenice, ki se hranijo v samem tkivu rastlin, pod listi ali v tleh, temu pelodu takorekoč niso izpostavljene. Tudi vreme ima močan vpliv na količino peloda na rastlinah. Veter ga lahko zanaša z njiv, dež in vlaga preprečujeta njegovo širjenje in ga še spirata z rastlin ipd.

Neprestano izpostavljanje določenemu toksinu lahko povzroči odpornost tudi na druge toksine, kot je to dokazal Gould s sod. (1992, 1995) – cit. po Snow in Moran Palma (1997). Gosenice sovke vrste *Heliothis virescens*, ki so bile dalj časa izpostavljene Cry1A(c) toksinu, so po 20. generacijah postale odporne ne samo na ta toksin, ampak tudi na druge toksine.

Negativne lastnosti Bt koruze lahko opredelimo z naslednjimi postavkami (povzeto po Edwards R. pers. comm. in Rice in Pilcher (1998)):

1. **Potrebo po uporabi Bt koruze je nemogoče vnaprej predvideti.** Bt koruzo sejemo spomladi, ko še ne vemo, kakšen bo napad koruzne vešče v sezoni. To pomeni, da se za setev odločamo na podlagi predvidevanj napada.
2. **Povrnitev ekonomske investicije ni vedno garantirana.** Ekonomsko se setev Bt koruze splača samo ob močnem napadu koruzne vešče, tako da Bt hibridi dajo večji pridelek od njihovih izogenih ne-Bt hibridov. Bt hibridi morajo dati večji pridelek, ker je investicija v nakup semena in v dodatne manipulativne stroške večja od ne-Bt hibridov.
3. **Pridelki Bt koruze niso vedno večji od pridelka najboljših ne-Bt hibridov,** še posebno, če je napad koruzne vešče nizek. V območjih, kjer koruzna vešča razvije samo eno generacijo v sezoni, Bt koruza po pridelku navadno ni konkurenčna ne-Bt hibridom.
4. **Spremenljiv pridelek.** Pridelek je funkcija mnogih genov in okoljskih dejavnikov. Vnos Bt gena v koruzo hibrid lahko izboljša, toda ni nujno, da poveča tudi pridelek. Bt koruza nudi zavarovanje pridelka pred škodljivci, ne povečanje pridelka.
5. **Omejen trg.** Javna sprejemljivost Bt koruze je odvisna od več dejavnikov, med katerimi so tudi sociološki in politični. Nekatero države in potrošniki zavračajo uporabo GSR, tako da je njihove pridelke težko prodati in jim zaradi tega cena še dodatno pade.
6. **Možen je hiter pojav odpornih populacij koruzne vešče,** ker je rezistenca pri koruzi vezana na en sam gen.
7. **Posledice tveganja za naravo so še zmeraj nepredvidljive.** Bt koruza je v pridelavi šele 5 let. Še zmeraj ni povsem jasen prenos genov na druge rastline. Pelod, ki ga raznaša veter prav tako vsebuje visoko koncentracijo Bt toksina.
8. **Bt toksin lahko prizadene tudi koristne žuželke in druge neciljne organizme.**
9. **Spremenljivo varstvo pred drugimi škodljivci iz skupine Lepidoptera** kot sta npr. zahodna plodovrtka in ipsilon sovka.
10. **Vsi Bt hibridi niso enako odporni na koruzno veščo,** ker vsebujejo različne-Bt toksine, poleg tega pa so isti različno izraženi. Njihova ekspresija je povezana tudi s tem, v katerem delu kromosoma so vključeni.

11. **Potrebnih je več podatkov o Bt hibridih.** Javnost je največkrat zasipana s propagandnim gradivom, ki ga objavljajo semenarska podjetja, v katerih gensko spremenjene rastline samo hvalijo, neodvisnih in nepristranskih informacij pa je še zmeraj zelo malo.
12. **Bt koroza je samo eno sredstvo za varstvo koroze pred koruzno veščo.** Varstvenih ukrepov, tudi samih agrotehničnih je veliko in že ti zagotavljajo zadovoljivo raven varovanja koroze pred koruzno veščo, če ima ta samo eno generacijo.

3.1.1.1 Možnost razvoja rezistence pri koruzni vešči na Bt toksin

Zaradi opozarjanja entomologov o morebitnem pojavu odpornih populacij koruzne vešče, ki se lahko pojavi ob večletni in stalni setvi Bt koroze so v ZDA uvedli trakasto setev, v izmenjavi Bt z ne-Bt koroza. Tako se v ne-Bt koruzi ohranijo občutljive rase koruzne vešče, ki se kasneje pariyo z rezistentnimi. Tako vzdržujemo populacijo, ki v kratkem času ne doseže popolne rezistence na Bt gen, saj vsebuje še velik delež občutljivih osebkov. Na tak način se da vzdrževati relativno visoko frekvenco Bt-občutljivih genov v populaciji koruzne vešče (Hyde s sod., 2001). Na možnost razvoja odpornih populacij koruzne vešče na Bt koroza opozarjata tudi Lauer in Wedberg (1999), predvsem zato, ker je koroza prevladujoč gostitelj koruzne vešče in ker lahko ta v nekaterih območjih razvije več kot eno generacijo na leto.

Tako Oddelek za kmetijstvo severno-centralnega raziskovalnega komiteja v ZDA (US Dept. of Agriculture's North Central Regional Research Committee NC-205) priporoča vsaj 25-30 % ne-Bt koroze ob posevkih z Bt koroza, če posevki niso tretirani z insekticidi oz. 40 % če so ti tretirani. Ti tako imenovani zaščitni posevki (»refuge«) za koruzno veščo morajo biti znotraj meje 800 m od posevkov Bt koroze. Ker taka setev še dodatno poveča stroške pridelave koroze se ekonomisti v ZDA in Kanadi v zadnjem času ukvarjajo tudi z zniževanjem tovrstnih stroškov. Pri tako velikih kmetijskih obratih kot so v Severni Ameriki lahko en USD na ha pomeni kar velik delež pri dobičku ali izgubi. Hyde s sod. (2001) je s poskusi z različnimi načini zaščitne setve vmesnih pasov (z navadnimi in U-bloki okrog njive) ugotovil, da so stroški setve zaščitnih pasov najmanjši, če je njihov delež 20 % napram vsemu posevku. To pa je glede na priporočila omenjenega komiteja minimalna vrednost, saj povečuje tveganje za hitrejši razvoj odpornosti.

Problem nastopanja in pravočasnega odkrivanja odpornosti pri žuželkah je proučeval tudi Venette s sod. (2000). Ugotovil je, da je fenotipsko frekvenco odpornosti v populaciji mogoče oceniti z ugotavljanjem gostote žuželk v posevku z Bt koroza napram gostoti žuželk v posevku z ne-Bt koroza. Dobro oceno stanja odpornosti pred selekcijo daje spremljanje odpornosti tik pred in takoj po sproščanju Bt koroze v okolje, medtem ko je za ugotavljanje spremembe odpornosti potrebno nadaljnje spremljanje.

Za ugotavljanje sprememb odpornosti avtorji priporočajo dva pristopa:

1. z diskriminantno analizo (»discriminant-dose assay«) (Roush, Miller, 1986; Siegfried, 1986; Siegfried s sod., 1995; Sims s sod., 1996 - cit. po Venette s sod., 2000).
2. ugotavljanje odpornosti žuželk pri F2 generaciji (Andow, Alstad, 1998, 1999; Andow s sod., 2000 - cit. po Venette s sod., 2000).

Prva analiza sicer nudi potrebne osnovne podatke za občutljivost škodljivcev na Bt gen, se pa smatra za premalo občutljivo za zgodnje odkrivanje sprememb nivoja odpornosti v poljskih populacijah (Roush, Miller, 1986, cit. po Venette s sod., 2000). Če je rezistentnost pogojena z

recesivnim alelom, je frekvenca odpornih osebkov enaka kvadratu frekvenca alelov, to pomeni, da je pri redki frekvenci rezistentnih alelov, npr. ena odporna na 1000 oz. 10^{-3} , potrebno več kot 1000.000 ličink, da se najde ena odporna. V praksi pa so ocene osnovane v glavnem na vzorcu 100-300 nabranih ličink. Zato je ta analiza bolj primerna za ugotavljanje odpornosti, ki je pogojena z dominantnim alelom (Rousch, Miller, 1986 - cit. po Venette s sod., 2000).

Drugi pristop temelji na ugotavljanju odpornih ličink F2 generacije. Metodo so razvili Andow in Alstad (1998, 1999) ter Andow s sod. (2000) - cit. po Venette s sod. (2000). Metoda vključuje vzorčenje na polju prosto parjenih samic. Potomstvo je vzgojeno kot izolirana ene samice in je v nadaljnjih poskusih tudi tako obravnavano. Potomstvo izosamice parimo v sorodstvu in F2 generacijo izpostavimo različnim dozam Bt toksina za identificiranje odpornih osebkov. Ta metoda je zelo učinkovita, če je rezistentnost pogojena z recesivnim alelom.

Za ugotavljanje sprememb v frekvenci odpornosti na polju, je potrebno poleg posevkov z Bt koruzo, postaviti kontrolne parcele z ne-Bt koruzo, na katerih je mogoče ugotavljati frekvenco odpornosti v ciljni populaciji škodljivcev. Zaradi večje dovzetnosti koruzne vešče na sladko koruzo, se priporoča primerjanje gostote ličink v posevkih sladke Bt koruze z gostoto ličink v bližnjih posevkih sladke ne-Bt koruze. Ker so v večgeneracijskih populacijah koruzne vešče (nanaša se na eno sezono), običajno druge generacije mnogo večje kot prve, v poskusih uporabljamo kasnejšo setev sladke koruze. S tem dosežemo večji začetni napad, navadno druge generacije koruzne vešče. Tako obstaja večja verjetnost za odkritje morebitnega odpornega osebkov znotraj dovolj velike populacije vseh osebkov. Vedeti pa moramo, da gre v tem primeru za populacijske spremembe, ki jih lahko zanesljivo ugotovimo samo z metodami kvantitativne genetike in za to potrebujemo zelo veliko število osebkov oz. veliko populacijo škodljivca. Podrobnejšo metodiko poljskega ugotavljanja odpornosti je opisal Venette s sod. (2000).

Huang s sod. (1999) je ugotavljal dedovanje odpornosti ličink koruzne vešče na Bt toksin. Uporabili so odpornega in občutljivega starša koruzne vešče, jih medsebojno parili, ter za analizo uporabili obe recipročni F1 generaciji (R x S in S x R), F2 generacijo ter povratne križance F1 generacije z občutljivim roditeljem. V nasprotju z veljavnim mnenjem, da je odpornost koruzne vešče na Bt toksin recesivna, so Huang in sod. (1999) ugotovili, da se odpornost omenjenega škodljivca deduje kot nepopolno parcialno dominantno. Zato avtorji opozarjajo, da strategija visokih doz in zaščitnih pasov (»high-dose/refuge strategy«) ne more biti tako učinkovita, kot domnevajo zagovorniki take strategije.

3.1.1.2 Posledice hranjenja živali s tujo DNA

Schubbert s sod. (1994) je po krmljenju miši s tujo DNA ugotovil prehodno navzočnost tuje DNA v iztrebkih in krvnem obtoku miši in da obstoja stalni pretok tujega genskega materiala v prebavnem traktu, katerega del pride tudi v cirkulacijo. Za zagotovitev verodostojnosti podatkov so za ugotavljanje navzočnosti tuje DNA poleg PCR uporabili še »Southern blot« in »Dot blot« hibridizacijo. Kasneje (Schubbert s sod., 1998) so s poskusi krmljenja brejih miši s tujo DNA ugotovili, da lahko tuja DNA poleg črevesno-prebavne bariere prestopi tudi placentarno in doseže jedro celice zarodka ali mladiče miši, katerih matere so bile med brejostjo krmljene s testno DNA. S PCR metodo in FISH (fluorescentno in situ hibridizacijo) so ugotovili prisotnost testne DNA v celicah zarodka in v novorojenih mladičih. Nekaj od te DNA je bilo vezano s kromosomi in je verjetno vključena v gostiteljsko DNA.

Aulrich s sod. (2001) je s krmljenjem Bt koruze perutnini, prašičem in prežvekovalcem preučeval presnovne procese DNA. V limfocitih krvi pri kravah je ugotovil kratke fragmente

DNA (manj kot 200 bp) iz rastlinskih kloroplastov. V drugih organih pri kravah (mišice, jetra, vranica, ledvice) rastlinske DNA niso našli, razen v nekaj nejasnih signalih v mleku. Fragmentov Bt-genov niso našli v nobenem vzorcu organov pri kravah. Rastlinsko DNA so pa v enakih organih našli pri perutnini, vendar transgene DNA v njih niso dokazali.

3.1.2 Pozitivne lastnosti Bt koruze

Barry s sod. (2000) je na več lokacijah, z več poskusi, ugotavljal napad koruzne vešče na Bt in ne-Bt hibridih in hkrati ocenjeval pridelek. Samo v dveh primerih je bil pridelek pri Bt hibridih signifikantno boljši od genetsko enakih ne-Bt hibridov. Vzrok za višji pridelek pa tudi v tem primeru najbrž ni bil v njihovem večjem genetskem potencialu za pridelek, ampak verjetno (tako Barry s sod., 2000) pri večjem lomu stebela (10-15 %) pri ne-Bt hibridih. Pri Bt hibridih so bili rovi, ki so jih izdolble gosenice koruzne vešče signifikantno krajši. Vzrok tega je pogin gosenic pri daljšem hranjenju z Bt koruso.

Uporaba insekticidov proti koruzni vešči lahko zmanjša poškodbe napada koruzne vešče le za 50-70 % pri prvi generaciji (Sayers s sod., 1994) in za 75 % pri drugi generaciji (Gray in Steffey, 1996 - cit. po Graeber s sod., 1999), če so ti ukrepi izvedeni pravočasno. Problem pri zaščiti koruznih rastlin je višina rastlin, saj z navadno škropilno opremo korusa ne moremo škropiti. V ZDA in Kanadi za te namene koruso škropijo tudi z letali ali uporabljajo za to posebej prirejeno opremo, kar dodatno podraži pridelavo. Žlahtnjenje na odpornost pa je dolgotrajno, ker je odpornost poligena. Zato so Bt hibridi v tem primeru ena od rešitev kako posevek varovati v vsej rastni dobi, ne glede na vremenske razmere in čas pojavljanja koruzne vešče.

Graeber s sod. (1999) je potrdil rezultate Barry-a s sod. (2000). Prav tako je dokazal, da imajo Bt hibridi krajše rove v stebelu kot izogeni ne-Bt hibridi. Pridelek je bil v pogojih naravne okužbe enak. Statistično značilno boljši (a le za 6,6 %) je bil pri Bt hibridih v razmerah umetne okužbe s koruzno veščo, kjer je bil napad nadpovprečno visok, ki ga navadno v naravi ni. Pri okužbi z drugo generacijo koruzne vešče pride do zgodnejšega staranja rastlin, hitrejšega sušenja rastlin po zrelosti, čeprav dejansko male izgube pridelka pokažejo, da pospešeno staranje verjetno nima tako močnega vpliva na pridelek (Graeber s sod., 1999).

Kot navajata Rice in Pilcher (1998) Bt hibridi ne povečujejo pridelka, ampak samo zmanjšujejo škodo, ki nastane zaradi napada koruzne vešče. Škoda je toliko večja, če imamo populacijo koruzne vešče, ki razvije več generacij. V tem primeru je lahko pridelek Bt hibridov zmeraj večji od njihovih izogenih standardov. Ker so rovi v steblih Bt hibridov krajši in jih je manj, so manjše tudi okužbe trohnočnih gliv v steblih. Taka stebela zato ne trohniijo in ne polegajo, zato je tudi strojno spravilo Bt korusa v teh primerih lažje in imamo manj izpada.

Pozitivne strani pridelave Bt korusa, ki jih navaja literatura so (povzeto po Edwards R. pers. comm. in Rice in Pilcher (1998)):

1. **Bt korusa je proti koruzni vešči zavarovana vso rastno sezono.**
2. **Zagotavlja kakovostni pridelek brez polomljenih rastlin.**
3. **Zmanjša se uporaba insekticidov, ker korusa proti koruzni vešči ni več potrebno škropiti.** S tem se poveča zdravstveno varstvo kmetov, zmanjšana je verjetnost napačne rabe insekticidov ali prenos insekticidov na neciljne organizme. Ta navedba velja le za kraje, kjer so koruso pred napadom koruzne vešče varovali z insekticidi. V Sloveniji korusa proti koruzni vešči ne škropimo, ker to ni potrebno, druga stvar pa so velike omejitve pri izvedbi

tovrstnih ukrepov. Tako za naše razmere ta navedba ne velja. Po drugi strani pa je uporaba insekticidov proti talnim škodljivcem še zmeraj potrebna, saj Bt toksin na njih ne učinkuje. Delež teh insekticidov pa znaša 90 % celotne uporabe insekticidov pri pridelavi koruze, zato je koruzna vešča relativno nepomemben škodljivec napram koruznemu hrošču in drugim talnim škodljivcem (Schwartz in Klassen, 1981; Pimentel in Raven, 1999 - cit. po Pimentel in Pimentel, 2000)

4. **Zmanjšajo se stroški varstvenih ukrepov pred škodljivci**, ker je cena insekticidov višja od razlik v nabavni vrednosti semena.
5. **Stranski učinki rabe insekticidov v tem primeru odpadejo.**
6. **Zaščita posevka pred koruzno veščo je trajna**, kar je pri insekticidih težko izvedljivo, pri Bt koruzi pa je zaščita aktivna v vsej rastni dobi.
7. **Ugoden učinek na koristne organizme.** Uporaba insekticidov ne zagotavlja dovolj velike selektivnosti. V laboratorijskih poskusih Bt koruza ni pokazala negativnih učinkov na tri predatorje koruzne vešče.
8. **Zatiranje koruzne vešče je obsežno in učinkovito.** Če uspešno zatremo že potomstvo prve generacije, je pritisk druge dosti manjši. Ker je Bt koruza v ZDA zasejana na velikih površinah, se s tem v vsem tem območju pritisk koruzne vešče precej zmanjša.
9. **Zmanjšajo se stroški kontrolnih pregledov napada koruzne vešče v posevku.**
10. **Bt gen učinkuje tudi proti drugim škodljivcem iz reda Lepidoptera**, ki so v toplih pridelovalnih območjih zelo pomembni škodljivci koruze.
11. **Zmanjša se delež samosevnihi rastlin v naslednjem letu**, zaradi manjšega loma in poleganja. S tem na njivi ostane manj storžev polegih rastlin. To je še posebno pomembno pri semenskih posevkih koruze.
12. **Zmanjša se pojav boleznih storža in trohnenja stebela**, ker je manj poškodb, ki omogočajo vdor patogenov. Glive, ki povzročajo boleznih storža (fuzarioze) izločajo tudi toksine, ki so zelo toksični za toplokrvne organizme.
13. **Manjše je število polegih rastlin in s tem izgub pridelka.** To olajšuje tudi strojno spravilo pridelka.

3.1.3 Ekonomika pridelave Bt koruze

Za proizvodnjo prvega transgenega kultivarja, primerne za komercialno rabo je bilo predhodno opravljenega zelo veliko raziskovalnega dela. Preden so prišli do prvega uspešnega hibrida, so razvili in testirali 40 različnih genov odpornosti na škodljivce, ki so jih transformirali v poljščine (Bohorova in sod., 1999). Tovrstne raziskave so zahtevale visoke finančne vložke, ki so si jih lahko privoščile le največje multinacionalke.

Hyde in sod. (1999) ugotavljajo, da ocenjevanje ekonomske upravičenosti uporabe Bt koruze ni enostaven proces in je odvisen od kombinacije več dejavnikov, ki vključujejo potencialni pridelek koruze, ceno Bt koruze, stroške in učinkovitost tretiranja ne-Bt koruze z insekticidi. Za pridelek so pomembni datum setve ter intenzivnost in čas pojava koruzne vešče. Tipična raven napada v ZDA je manj kot ena ličinka koruzne vešče na rastlino. Če se pojavijo več kot tri ličinke na rastlino, govorijo o letu močnega napada. Ekonomska raven napada koruzne vešče se v Indiani, v ZDA pojavi enkrat na štiri leta.

Lauer in Wedberg (1999) ugotavljata, da so stroški za seme Bt koruze enaki stroškom uporabe insekticidov. Dokler bodo ne-Bt hibridi po pridelku enaki ali boljši od Bt hibridov, se njihova pridelava na površinah, kjer je raven napada koruzne vešče majhna ne bo izplačala.

V poskusih so ugotovili, da je bil pridelek Bt hibridov za 0,75 t/ha višji od njihovih genetsko enakih ne-Bt hibridov samo ob visokem napadu koruzne vešče, do katerega pa ne pride vsako leto. Toda tudi v tem primeru pridelek ni bil nujno višji od najrodnejših ne-Bt hibridov, ki tolerirajo napad koruzne vešče. Rice in Pilcher (1998) navajata, da se pridelava Bt hibridov ekonomsko splača samo, če se pri predvidenem pridelku 9,375 t/ha na vsaki rastlini pojavi vsaj ena gosenica koruzne vešče.

Archer s sod. (2001) je s primerjavo napada različnih škodljivcev (sovke *Diatracea grandiosella* (Dyar), koruzne vešče in zahodne plodovrtke) ugotavljal razlike v poškodbah in učinkovitost zaščite na različnih Bt hibridih. Ugotovil je, da Bt hibridi niso zanesljivo učinkoviti proti gosenicam zahodne plodovrtke, zato ne moremo posploševati trditve, da je Bt korusa odporna proti najpomembnejšim škodljivcem koruze iz skupine Lepidoptera. Proti tem je v primerih močnega pojava prav tako nujno kemično varstvo.

Poleg tega vsi Bt hibridi ne zagotavljajo uničenja druge generacije koruzne vešče, kar pomeni, da pride do poškodb stebela v isti sezoni in da je potencial škodljivca v naslednjem letu spet visok. Zaradi tega Onstand in Gould (1998) – cit. po Archer s sod. (2001) smatrata, da je pri takih hibridih še večja verjetnost za razvoj odpornosti škodljivcev, kot pri hibridih, ki obdržijo zadostno koncentracijo Bt toksina skozi vso rastno dobo. Tudi Archer s sod. (2001) je dokazal, da so nekateri Bt hibridi, ki vsebujejo izvor za odpornost 176, imeli več poškodb na stebelu in večje število preživetih ličink druge generacije vrste *Diatracea grandiosella* in koruzne vešče kot ne-Bt hibridi. Zato je vprašljivo, če so taki hibridi priporočljivi za setev, glede na to da povečujejo potencial odpornosti koruzne vešče na transgeno koruzo. Bt hibridi z izvorom odpornosti 176 so na splošno bolj dovzetni za napad koruzne vešče kot Bt hibridi z izvorom odpornosti Bt11. Ti so v nekaterih primerih, še posebej pri drugi generaciji, lahko bolj občutljivi na napad kot ne-Bt hibridi, ker delovanje endotoksina v primeru izvora 176 po cvetenju pojema.

Wilcke s sod. (2000) je ugotovil, da se Bt korusa z visoko vsebnostjo olja počasneje suši kot njeni izogeni ne-Bt hibridi, kar povečuje stroške sušenja Bt-koruze. Sušenje pa je eden od večjih stroškov v pridelavi koruze.

3.1.4 Vpliv Bt koruze na talni ekosistem

Bakterija *Bacillus thuringiensis* Berliner je talna bakterija, ki je navzoča v večini tal. Ta je vključena v naravne presnovne procese in jo ob odmrtnosti presnovijo druge bakterije. Pri Bt korusi so presnovni procesi odmrle mase še premalo proučeni. Pojavlja se vprašanje učinka Bt koruze na talni ekosistem, predvsem zaradi večletne setve Bt koruze na istih površinah in zaradi ozkega kolobarja, ker obstoja potencialna možnost dolgotrajnega kumulativnega kopičenja Bt toksina v tleh.

Graham in Istock (1978), Lee in Stotzky (1990) – cit. po Nielsen s sod. (1997) poročajo, da je od znanih načinov prenosa gena v bakterijo naravna transformacija (sprejem DNA fragmentov iz okolja - tal) najbolj verjeten posreden prenos DNA fragmentov iz rastline. Za to pa so potrebni

specifični proteini na celični membrani in energija. Tega so sposobne samo kompetentne bakterije. To je bilo ugotovljeno pri več kot 40 bakterijskih vrstah in je dedna lastnost, vendar zahteva gensko ekspresijo za normalen razvoj v bakteriji (Loren in Wackernagel 1994 – cit. po Nielsen 1997).

Kot poročajo Gallori s sod. (1994), Ogram s sod. (1994) – cit. po Nielsen s sod. (1997) ter Stotzky (2000) lahko mineralni delci stabilizirajo prosto DNA. Sproščena DNA iz odmrlih rastlin lahko prispeva k prehodnemu rezervoarju (fondu) genetskih informacij, ki bodo na razpolago mikrobiološki populaciji v tleh, oziroma tudi drugim organizmom, ki bodo sposobni vezati DNA in jo inkorporirati v svoj organizem. Vendar pa še ni nobenega eksperimentalnega dokaza, ki bi pokazal horizontalni prenos genov iz GS rastlin v naravne talne bakterije (Nielsen s sod., 1997). DNA, ki je sproščena v tla in vodo z degradacijo organizmov, je lahko v primeru delne vezanosti zaščitena proti mikrobiološki razgradnji, kar potrjuje prejšnjo razlago, da lahko tla nudijo genski rezervoar izven organizma (Romanovski s sod., 1991, Stotzky s sod., 1991 – cit. po Hoffmann s sod., 1994). V svojih poskusih Hoffmann s sod. (1994) ni mogel z gotovostjo ugotoviti, če je mogoč transfer genov iz rastlin v *Aspergillus niger* v tleh. To pomeni, da je še zmeraj nejasno, kaj bi se zgodilo v primeru tovrstnega prenosa na bakterije.

Nielsen s sod. (1997) navaja za ocenjevanje prenosa rastlinske DNA v talne bakterije tri možne načine:

1. Dolgoročni retrospektivni pristop s primerjavo sekvenc določenih bakterijskih in rastlinskih genov (Smith s sod., 1992).
2. Kratkoročni retrospektivni pristop osnovan na začetnem fenotipskem odkrivanju domnevnih transformantov iz naravnega okolja, na podlagi odkrivanja zakritih selektivnih markerskih genov GSR (Becker s sod., 1994, Smalla s sod., 1994).
3. Eksperimentalni pristop v optimiziranih laboratorijskih pogojih s prenosom genov v gojene talne bakterije.

Razgradnja Bt koruze in nekatere možne posledice v tleh je proučeval tudi Stotzky (2000). Bt toksin je bil v zemlji navzoč še 180 dni po žetvi Bt koruze, verjetno zaradi vezanosti na površine mineralnih delcev v tleh. S poskusi na več različnih lokacijah je ugotovil, da Bt hibridi razpadejo počasneje kot genetsko enaki ne-Bt hibridi. Z dodatkom čistega Cry1Ab proteina v biomaso Bt in ne-Bt koruze niso mogli dokazati razlik v hitrosti razgradnje. Eden od možnih vzrokov za slabšo biodegradacijo bi lahko bila vsebnost lignina, ki je bila v Bt hibridih značilno višja (33-97 %) kot v genetsko enakih ne-Bt hibridih. Značilne razlike v vsebnosti lignina so bile tudi med različnimi Bt hibridi, kar Stotzky (2000) pojasnjuje s pleiotrofnim učinkom Cry1Ab gena v genomu koruze. Sproščen Cry1Ab protein v tleh ni imel nobenega učinka na število gojenih bakterij in gliv, na protozoe, nematode in deževnike. Ugotovili so tudi, da rastline (ne-Bt koruza, korenje, radič, repa), ki so rasle na površini, kjer je bila prej Bt koruza, niso sprejemale proteina Cry1Ab iz tal.

3.1.5 Problem tujeprašnosti

Eden glavnih problemov pri namernem sproščanju GSR v okolje je možnost križanja z drugimi posevki ne-GSR iste vrste ali sorodnih vrst v primerih generativnega razmnoževanja. Zato je pred sproščanjem v okolje potrebno ugotoviti varno razdaljo, pri kateri bo tovrstno križanje mogoče preprečiti. Način oz. obseg raztrosa cvetnega prahu posameznih rastlinskih vrst je težko definirati, ker je za tako spremljanje potrebna velika količina rastlin oz. velika populacija, ki

služi za izvor cvetnega prahu. Potrebno je namreč slediti tudi posamezne primerke pelodnih zrn, ki se pojavljajo na daljših razdaljah. Dejansko to pomeni, da v naravi ob fertilnem pelodu lahko zmeraj pride do prenosa genov na neciljne rastline, četudi je razdalja med donorjem in akceptorjem velika, saj žuželke in veter pelod lahko prenesejo na velike razdalje. Do tovrstnih primerov je že prišlo v ZDA in Kanadi pri GS oljni ogrščici in avtohtoni divjerastoči koruzi. S prenosom genov GSR na samonikle rastline so se pojavile mnoge težave. Eden teh je odpornost divjerastočih plevelov, ki so postali odporni na totalne herbicide. Teh v posevkih GS rastlin odpornih na glifosat z glifosatom ni več mogoče zatirati, zato je potrebno vložiti veliko napora v iskanje novih herbicidov, ki bodo proti takim plevelom učinkovali.

Wright (1931) - cit. po Lavigne s sod. (1996) navaja, da je za spremembo genetske strukture populacije potrebna zelo mala količina migranta (tujega peloda) v vsaki generaciji. Kar pomeni, da že eno pelodno zrno, ki uspešno oplodi akceptorja lahko dolgoročno vpliva na spremembo genetske zasnove celotne populacije. Očiščenje tega gena iz populacije pa je dolgotrajen in velikokrat neuspešen proces, še posebno, ker v naravi ne moremo nadzorovati križanja. Zato je vnos novih genov v naravno okolje, če njihovega delovanja v naravnih ekosistemi še ne poznamo, lahko precej tvegano početje, še toliko bolj, če ima ta lastnost velik selekcijski pritisk.

Za ugotavljanje širjenja in prenosa cvetnega prahu obstaja več označevalnih metod, ki jih navaja Lavigne s sod. (1996). Te metode so mikrooznačevanje (*ang. microtags*), označevanje z radioaktivnimi izotopi, ugotavljanje barvnega polimorfizma zrn, prenos peloda glede na dolžino leta opravevalcev, označevanje peloda z genetskimi markerji in analiza očetovstva.

Lavigne s sod. (1996) je z računalniško simulacijo ugotavljal prenos cvetnega prahu pri GS oljni ogrščici in ugotovil, da je raztros peloda odvisen od velikega števila ekoloških dejavnikov, kot je oblika in velikost izvorne parcele, gostota rastlin, sposobnost opravevalca, smer in jakost vetra, velikosti in mase pelodnih zrn ipd.

Tveganje je povezano tudi z načinom oplodnje. Tveganje je manjše pri samoprašnicah (pšenica), ki lahko oplodijo same sebe, tujeprašnice pa za uspešno oploditev potrebujejo pelod druge donorske rastline. S tem je tveganje vnosa tujih genov v novo gensko zasnovo toliko večje. Tujeprašnice pa so koruza, rž, oljna ogrščica in ogrščica.

Koruza je izrazita tujeprašnica, ki se s pomočjo vetra lahko oprahuje na večje razdalje. Kot navaja Garcia s sod. (1998) je Doble (1990) dokazal, da se lahko v naravi pojavi določen obojestranski genski pretok med koruzo in teosinto (*Zea mexicana* Schrad.). Garcia s sod. (1998) je v poskusih s koruzo z belim in rumenim zrnjem ugotovil, da je na večjih površinah, kjer je večja količina cvetnega prahu, varnostna razdalja 185 m premajhna, če hočejo preprečiti kontaminacijo opravevanja z GS koruzo. Pri pridelovanju semena ni nevarnosti kontaminacije, če se GSR uporablja kot materina komponenta, ker je pri tem zaradi križanja že tako potrebno odstraniti metlice (izvor cvetnega prahu) pred prašenjem. Nasploh v proizvodnji koruze lahko kontaminacijo preprečimo bodisi s trganjem metlic (nerealno, če so površine velike, negativno učinkuje na delež oplodnje), večjo prostorsko izolacijo, z uničenjem spolno kompatibilnih divjih rastlin, s sinhronizacijo cvetenja ali z zamikom setve, s katero uravnavamo časovno izolacijo cvetenja.

Zelo strogi predpisi so glede tega v Mehiki (Garcia s sod., 1998), kjer je gencenter oz. izvor današnje koruze. Tam ima koruza veliko divjih sorodnikov, med njimi je tudi teosinta (*Zea mexicana* Schrad.), iz katere najverjetneje izhaja današnja koruza (Mangelsdorf, 1986 – cit. po Garcia s sod., 1998). Hkrati je tam še veliko domačih neselekcioniranih populacij oz. zvrsti koruze.

Tudi v Sloveniji še obstaja precej domačih slovenskih populacij koruze, predvsem v manj razvitih in težje dostopnih območjih, ki jih kmetje še sejejo, v glavnem za domačo krmo in prehrano (Rozman 1997, 1998). Z vnosom Bt koruze v Slovenijo bi se v kratkem času lahko dogodilo podobno, kot se je v začetku 50-ih let s prihodom prvih ameriških hibridov koruze, tipa zobank v Slovenijo. Zaradi medsebojnega križanja je prišlo do izpodrivanja domačih kakovostnih trdink.

Treu in Emberlin (2000) na podlagi pregleda obširne literature v zvezi z raztrosom peloda ugotavljata, da je prišlo do 0,2 % oplodnje s koruzo oddaljeno celo 800 m, ki jih je s poskusi dokazal Salmov (1940). Ena metlica koruze, ki običajno cveti 5-8 dni, vsebuje 14-50 milijonov pelodnih zrn. Tako, da je v času cvetenja v zraku mnogo cvetnega prahu. Kot primer pri razdalji 500 m je bila 0,5 % koncentracija cvetnega prahu izvirne koruze, torej 125.000 pelodnih zrn proizvedeno od ene rastline (Emberlin s sod., 1999 – cit. po Treu in Emberlin, 2000). Salmov (1940) ni ugotavljal deleža cvetnega prahu v zraku, ampak dejanski delež tuje oplodnje, kar moramo ločiti od opraitve. Čeprav se pri pridelovanju semena predlaga 250 m (Pursegllove, 1972 – cit. po Treu in Emberlin, 2000) ali 180 m (Levin in Kerster, 1974 – cit. po Treu in Emberlin, 2000) ta izolacija še zdaleč ni zadostna v primeru GS koruze (Treu in Emberlin, 2000). V Sloveniji je pri semenski pridelavi koruze z zakonom predpisana oddaljenost od drugih posevkov koruze in sicer najmanj 200 m, kar bo potrebno upoštevati oz. ponovno proučiti ob eventualnem vnosu Bt-koruze v Slovenijo.

Pri prenosu cvetnega prahu je potrebno upoštevati še geografske in vremenske razmere, kot so odprte površine, močni vetrovi, ki lahko povečajo oplodnjo na večje razdalje. Upoštevati je potrebno tudi čas fertlnosti peloda. Ta je navadno sposoben oplodnje le nekaj ur, njegova sposobnost oplodnje pa s časom zelo hitro upada. To po drugi strani pomeni, da čim dlje pelod migrira tem manj je fertilen. To se posredno nanaša tudi na konkurenčnost peloda. Najbolj fertilni je sveži pelod, tisti, ki ga veter zanese od drugod pa manj, zaradi časa, ki je pretekel od njegove dozoritve. Vendar je čas sposobnosti oplodnje cvetnega prahu pri koruzi najmanj 24 ur. V tem času pa lahko pelod migrira kar na velike razdalje, še posebno če so pri tem navzoči posredni prenašalci, kot so žuželke in druge živali.

Pelod koruze je eden večjih v rastlinskem svetu, velik 100 μm in zato relativno težak. To pomeni, da ga velika večina ostane na površini, kjer je nastal, le 10 % se ga zaradi vetra in drugih dejavnikov zanese iz površine. Vendar tudi v tem primeru ostane glavnina peloda v območju 3-10 m od polja (McLaren, 2001). Problematičen je torej tisti del pelodnih zrn, ki so zanesena na večje razdalje. Kljub majhnemu številu teh pa lahko pride do nenamernega križanja z ne-Bt koruzo.

Kot dokaz nenamernega križanja v naravi, je primer med transgeno oljno ogrščico (*Brassica napus* $2n=38$) in njenim divjim sorodnikom, samoraslo repico (*Brassica campestris* $2n=20$), kar je v svojih poljskih poskusih dokazal tudi Mikkelsen s sod. (1996). Ta je v spontanem križanju med omenjenima vrstama in s povratnim križanjem z *Brassica campestris* dobil transgene rastline *B. campestris* z $2n=20$ kromosomov, odporne na herbicid. Avtorji opozarjajo, da pojav fertlnih transgenih rastlin že po prvem povratnem križanju, kaže na možno hitro širjenje genov iz oljne ogrščice na divje sorodnike, kar je potrebno upoštevati pri prenosu novih lastnosti v oljno ogrščico.

Možnost prenosa gena s pomočjo cvetnega prahu je večkrat podcenjena, ker je nizka frekvenca introduciranih genov na daljše razdalje težko določljiva (Lavigne s sod., 1998), toda zelo

pomembna predvsem za manjše populacije, ker lahko že nizka frekvenca genov vpliva na spremembo genetske strukture populacije.

3.1.6 Vpliv GSR na populacijske spremembe ciljnih in neciljnih populacij

V populacijah se ravnotežje v frekvenci genov in genotipov ohranja samo v primeru, če v populaciji vlada princip popolnoma naključne oplodnje in če imajo vsi genotipi enako fertilnost, vitalnost in sposobnost preživetja (Borojević, 1990). Do sprememb v frekvenci genov in genotipov v populaciji v naravi prihaja zaradi migracij, mutacij, selekcije in slučajnega križanja. Čim večji je selekcijski pritisk, oziroma čim večji učinek na populacijo ima tuj gen in čim manjša je populacija, tem hitreje pride do spremembe v frekvenci genov in s tem same populacije. Pretok genov lahko nastane tudi zaradi gibanja gamet, osebkov ali skupine osebkov iz enega prostora v drugega. Pretok genov v populaciji pa je težko merljiv, ker ni odvisen le od količine pretoka gena, ampak tudi od uspešnosti križanja oz. oplodnje.

Običajno imajo GSR vnesen gen s točno določeno lastnostjo. Zato lahko namerno sproščanje GSR v okolje močno vpliva na spremembe in velikost sprememb znotraj populacij ciljnih in neciljnih organizmov, ko pride do namernega sproščanja. Za ugotavljanje genetskih sprememb v populaciji pa je potrebno veliko število osebkov oz. velike populacije in se za ta namen uporabljajo metode populacijske in kvantitativne genetike (Mather in Jinks, 1977), ki niso poceni in enostavne za razumevanje.

Do populacijskih sprememb lahko prihaja tako pri rastlinah kot pri živalih, ki prihajajo v stik z GSR. Da do tega ne prihaja je eden najprimernejših ukrepov ustrezna izolacija, ki pa je včasih praktično zelo težko izvedljiva, še posebno če prihaja do pretoka genov s pomočjo vektorjev.

Do sprememb v populacijah lahko v primeru sproščanja GSR v okolje prihaja:

- zaradi pretoka novo vnesenega gena med različnimi populacijami,
- zaradi izgube ali uničenja določene populacije oz. vrste, če je učinek GSR prevelik oz. dolgotrajen,
- zaradi prevladanja populacij neciljnih organizmov, ki so odporni na GSR,
- zaradi možnosti izginotja koristnih predatorjev, kar je posledica pomanjkanja ciljnih škodljivcev, ki so predatorjem hrana.

Gen z enakim selekcijskim pritiskom ima v mali populaciji veliko večji učinek kot v veliki populaciji, zato so genetske evolucije in njim sorodni procesi v mali populaciji veliko drastičnejši in hitrejši, ker prihaja do kopičenja enakih genov.

Če dominantna lastnost vrši velik selekcijski pritisk in se iz gojene vrste rastline prenese v samonikle populacije rastlin, lahko to pomeni popoln propad primarnega genskega fonda. Tuji geni se lahko iz gojene vrste prenesejo na samonikle sorodnike, ki s tem pridobijo lastnosti GSR in tako postanejo nadležni pleveli, ki jih je zaradi na novo pridobljene lastnosti težko izkoreniniti. Te divje populacije tudi mnogo težje nadzorujemo, ker zaradi svoje naravne konkurenčnosti dosti lažje kljubujejo neugodnim rastnim razmeram, v primerjavi s katerimi gojena rastlina ni konkurenčna (Garcia s sod., 1998). V dokaz, da v naravi prihaja do naravnega križanja med gojenimi rastlinami in njihovimi divjimi sorodniki, navajata nekatere primere tudi Snow in Morán-Palma (1997).

Visoka smrtnost ciljnih populacij škodljivcev tudi zmanjša tekmovalnost z naravno odpornimi vrstami škodljivcev, kar lahko povzroči velike gradacije drugih, ki imajo v tem primeru nezaseden prostor, ki ga lahko zavzamejo. S tem lahko pride do prerazmnožitve škodljivcev, ki so bili prvotno obravnavani kot marginalni ali pa je bil njihov pomen zanemarljiv.

3.2 Smotrnost uvedbe Bt koruze za pridelavo v Sloveniji

3.2.1 Pridelava koruze v Sloveniji

V Sloveniji pridelujemo korožo na 74.860 ha, od tega 48.009 ha koruze za zrnje in 26.851 ha silažne koruze, kar skupaj predstavlja 44 % vseh njivskih površin (Statistični letopis, 2001; <http://www.sigov.si/zrs/let01/kazalo01.htm>). Tako je koroža po površini, ki jo zavzema, pri nas najpomembnejša poljščina.

Če pogledamo podatke o pridelavi koruze za leto 2000 po regijah, ki jih lahko dobimo na spletnih straneh SURS, ugotovimo, da ti obstajajo le za družinske kmetije, brez kmetijskih podjetij, zato so številke nekoliko manjše, kot sumarne zgoraj. Vendar na kmetijska podjetja odpade le 20.583 ha od 171.000 ha obdelovalnih površin, kar je le 12 %, zato celotno gledano lahko operiramo tudi brez teh.

Preglednica 2: Popis kmetijstva 2000, raba kmetijskih zemljišč v uporabi družinskih kmetij po regijah (Statistični urad Republike Slovenije: <http://bsp.surs.gov.si/D2300.dws/allgem.html>)

Republika/regija/	Njive in vrtovi skupaj	Silažna koroža	Koroža za zrnje	Koroža skupaj
SLOVENIJA	151848,1	24899,66	42495,24	67394,90
GORENJSKA	6146,19	2421,04	141,79	2562,83
GORIŠKA	3156,98	351,74	885,36	1237,10
JUGOVZHODNA SLOVENIJA	15210,24	2537,31	3468,08	6005,39
KOROŠKA	3034,40	1254,24	251,60	1505,84
NOTRANJSKO-KRAŠKA	1870,87	96,70	77,72	174,42
OBALNO-KRAŠKA	2254,47	23,06	162,46	185,52
OSREDNJESLOVENSKA	15078,52	4422,24	1988,44	6410,68
PODRAVSKA	34911,71	4836,56	14423,56	19260,12
POMURSKA	43539,18	3268,58	12871,22	16139,80
SAVINJSKA	16262,03	4795,80	3980,68	8776,48
SPODNJEPOSAVSKA	9937,02	817,69	4182,79	5000,48
ZASAVSKA	446,49	74,70	61,54	136,24

Iz podatkov iz preglednice 2 je razvidno, da največ koruze pridelujemo v Pomurski in Podravski regiji, kar skupaj znese 53 % vseh površin pod korožo v Sloveniji. Najmanj površin pod korožo je v Zasavski, Notranjsko-Kraški in Obalno kraški regiji.

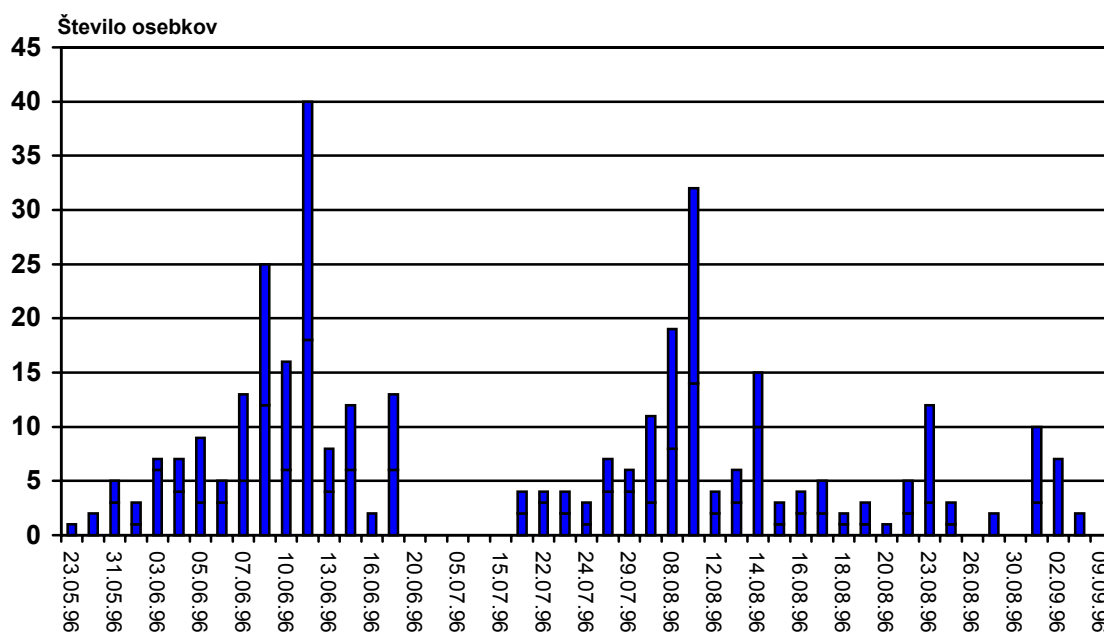
Korožo v naših razmerah sejemo v času od konca aprila do začetka maja, pospravljamo pa jo od septembra do novembra. Vzroki za tako heterogene razmere so klimatski pogoji, ki se po

območjih precej razlikujejo. To vpliva tudi na izbor zrelostnih razredov hibridov pri nas, ki se od območja do območja precej razlikujejo in so v območju od zrelostnega razreda FAO 100 do FAO 700. Višji zrelostni razredi so pri nas v pridelavi le na Primorskem, drugje pa ne dozoriyo. Večina zasejane koruze pa pripada zrelostnim razredom od FAO 100 do FAO 400. Zrelostni razred je tudi eden od dejavnikov, ki vpliva na nastalo škodo pri napadu koruzne vešče.

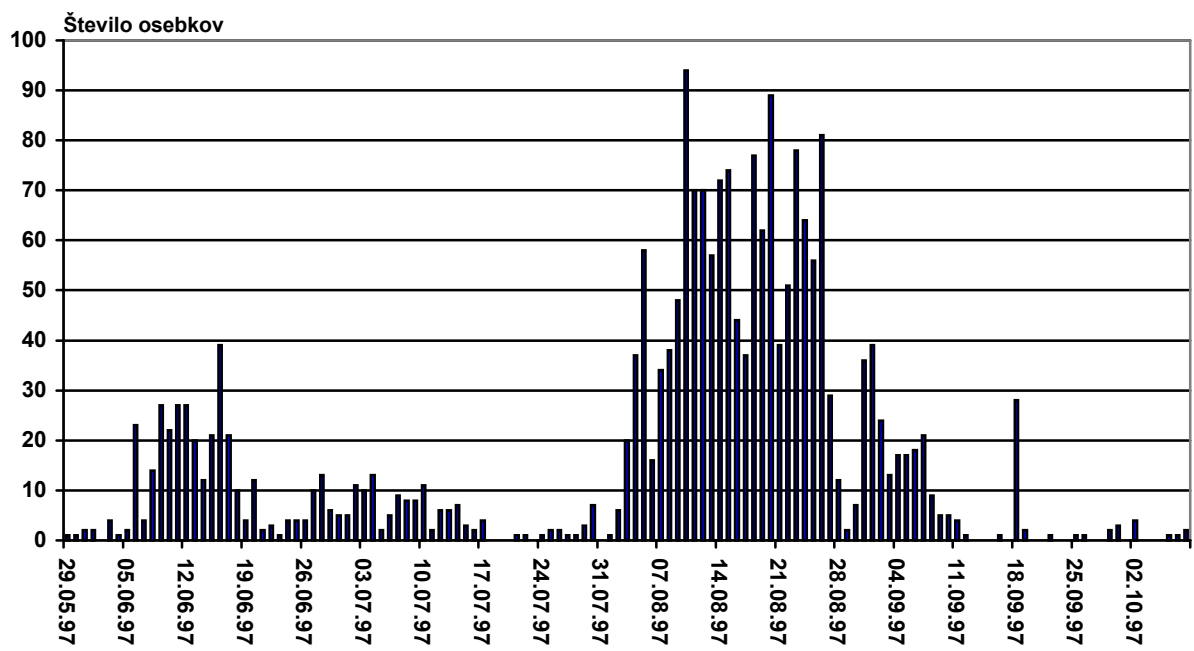
3.2.2 Značilnosti koruzne vešče v Sloveniji

Koruzna vešča je v Sloveniji najpomembnejši škodljivec koruze. Razširjena je v vsej državi do nadmorske višine 1200 m. Zaradi klimatske heterogenosti Slovenije, smo v preteklosti na različnih območjih beležili različno intenzivnost napada koruzne vešče. V preteklem obdobju je koruzno veščo v Sloveniji raziskovalo kar nekaj raziskovalcev. Vse raziskave so bile v glavnem omejene na območja, v katerih so ti službovali. Tako je Vrabl (1983, 1986, 1992) za območje SV Slovenije ugotovil eno generacijo koruzne vešče, Milevoj (1991) je za Ljubljansko območje ugotovila eno generacijo, raziskovalci v Žalcu (Matjaž, 1989; Kač, 1983, 1985) pa dve generaciji koruzne vešče. Od leta 1994 smo na Inštitutu za fitomedicino na Biotehniški fakulteti začeli z obsežnimi raziskavami koruzne vešče na več območjih Slovenije. Del teh rezultatov je bil že objavljen (Gomboc s sod., 1999, Gomboc, Milevoj, 1999), del pa še ne, saj so nekatere raziskave še v teku. Odkrili smo precejšnje razlike v razvojnem ciklusu koruzne vešče glede na klimatsko območje in velike razlike v nastali škodi, tako med območji kot med hibridi.

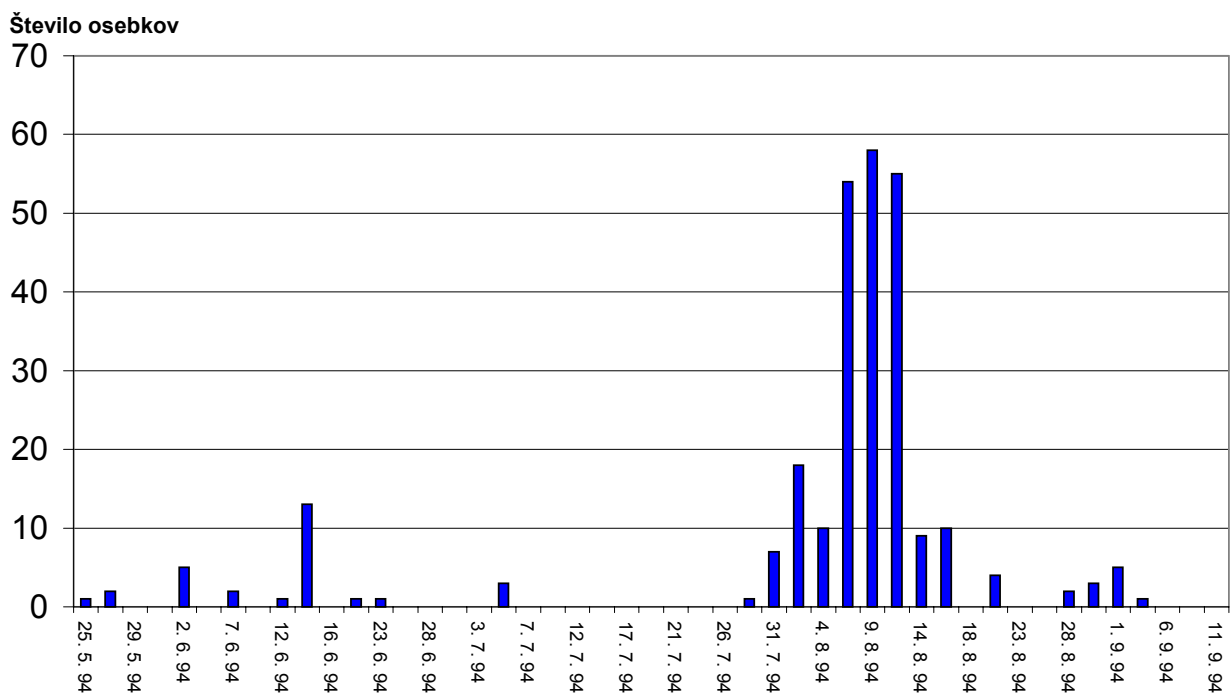
Razvojni ciklus koruzne vešče v naših razmerah se začne z izletavanjem metuljev nekje ob koncu maja, v večjem delu Slovenije. Izletavanje in dinamiko letanja metuljev v sezoni prikazujejo grafi 2-6. Dva tedna za tem začnejo samice z odlaganjem jajčec, ki jih odlagajo na vrhnje koruzne liste. Kоруza je v tem času visoka do 60 cm. Gosenice se izležejo iz jajčec po enem do dveh tednih in najprej objedajo povhrnjico na mlajših koruznih listih, zatem pa že vrtajo skozi njih. O škodi v tem času še ne moremo govoriti, saj na pridelek še ne vpliva. Razvoj gosjenice traja 1-2 meseca, kar je odvisno od temperatur, vlage in števila generacij, ki jih koruzna vešča v naših razmerah razvije.



Graf 2: Ulov metuljev koruzne vešče na svetlobno past v Biljah v l. 1996.



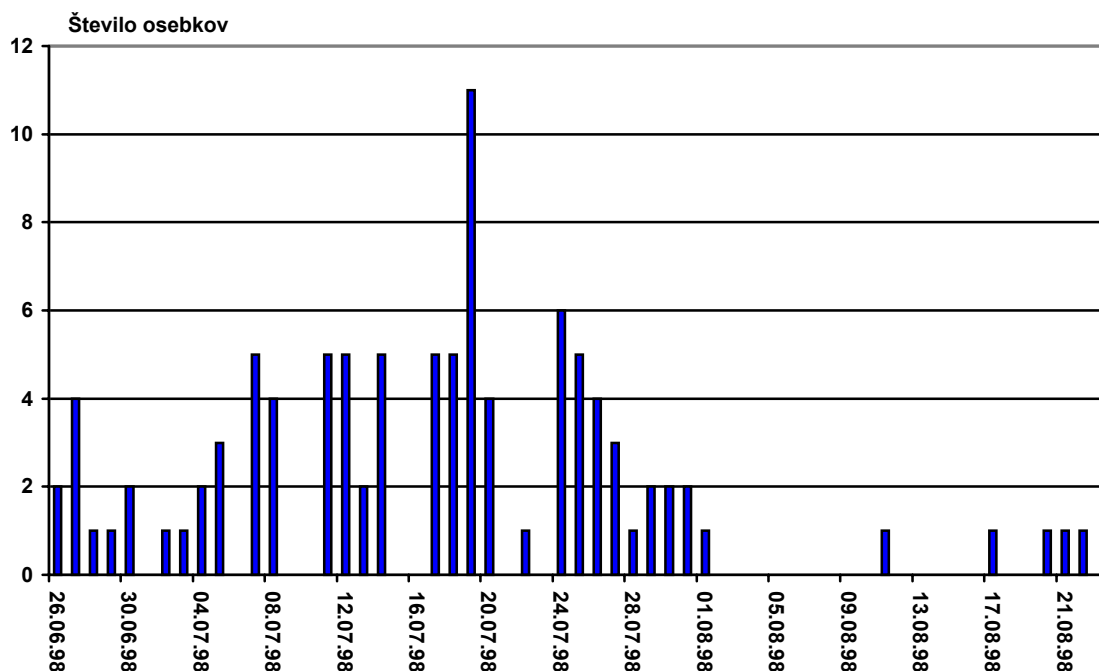
Graf 3: Ulov metuljev koruzne vešče na svetlobno past v Biljah v l. 1997.



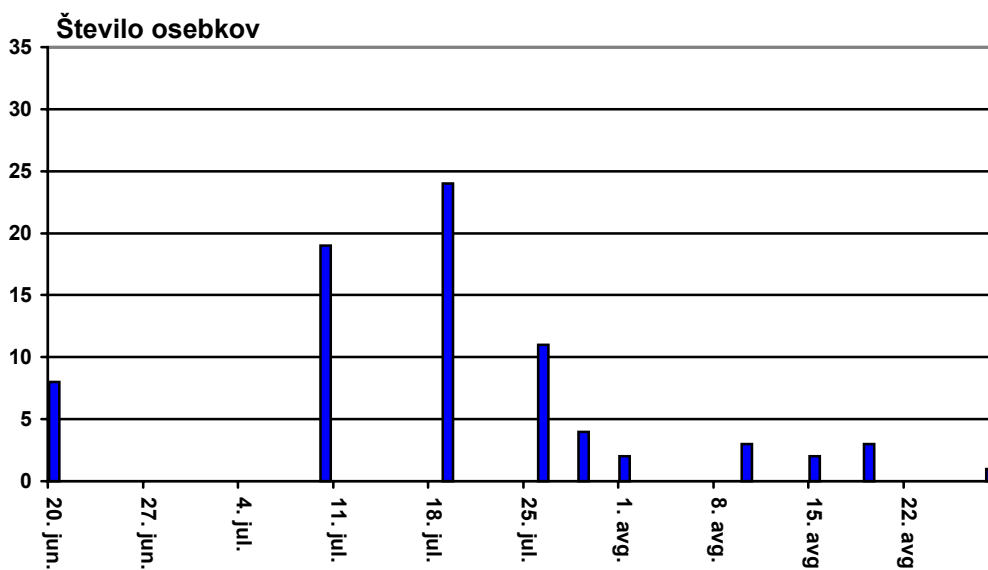
Graf 4: Ulov metuljev koruzne vešče na svetlobno past v Kostanjevici na Krki v l. 1994.

Z rednim monitoringom leta koruzne vešče smo za Bilje in Kostanjevico na Krki ugotovili, da ima koruzna vešča v teh območjih dve generaciji na leto (grafi 2, 3, 4). Prva generacija v Vipavski dolini se pojavi konec maja in ima maksimum v prvi polovici junija, druga se pojavi konec julija, z maksimumom v začetku avgusta. Let druge generacije se lahko še zavleče v del jeseni, do oktobra. Enako bionomijo ima koruzna vešča tudi v Kostanjevici na Krki, le da je tu populacija po številu primerkov precej šibkejša kot v Biljah. Iz primerjave grafov 2 in 3 je razvidno, da dinamika iz leta v leto precej niha in je odvisna od ekoloških razmer v posamezni sezoni. Bistvenega pomena pri tem je temperatura, količina padavin in relativna vlaga v času od

odlaganja jajčec do izleganja metuljev. Kot vidimo je bila druga generacija v l. 1997 precej številčnejša kot v predhodnem letu, prav zaradi ustrežnejših vremenskih razmer ob razvoju. To se je odrazilo tudi na gospodarski škodi na koruzi, ki smo jo vrednotili v jesenskem času. Še večji je bil razkorak v l. 1998, ko smo ob maksimalnem naletu druge generacije koruzne vešče, v eni noči ujeli tudi čez 400 osebkov koruzne vešče. Ob jesenskem štetju napada koruzne vešče na koruznih steblih pa nismo našli rastline, ki ne bi bila napadena. Redke so bile tudi koruzne rastline s samo eno izvrtino na steblo, kar pomeni da je bil napad v tem letu zelo močan, rastline pa zelo prizadete.



Graf 5: Ulov metuljev koruzne vešče na svetlobno past v Radljah ob Dravi v l. 1998.



Graf 6: Ulov metuljev koruzne vešče na svetlobno past v Dobrovniku, v obdobju 1998-2001.

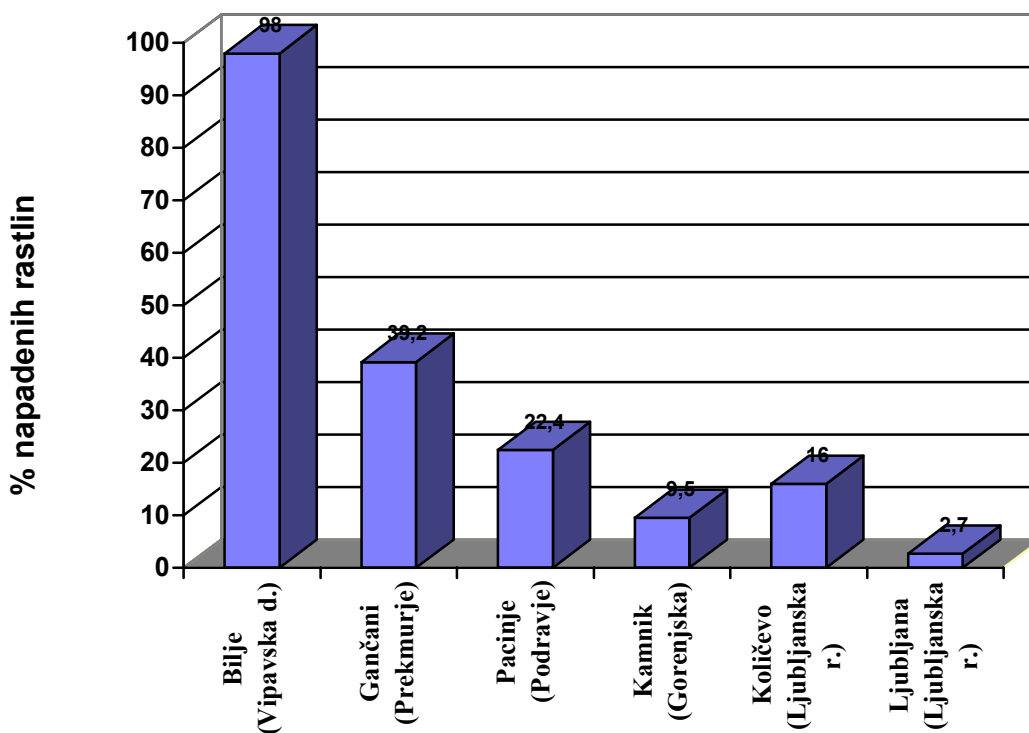
V drugih območjih Slovenije, kjer smo prav tako spremljali bionomijo koruzne vešče, smo ugotovili le eno generacijo koruzne vešče na leto. Eno generacijo smo ugotovili v Radljah ob Dravi (graf 5), v Prekmurju (graf 6) in na Ljubljanskem Barju. S spremljanjem razvojnih stadijev, napada in s spremljanjem naleta na feromonske vabe smo eno generacijo potrdili še za Kamnik, Pacinje pri Ptujju in za Žalec. V grafih 5-6 je opaziti precejšnje razlike v pojavu prvih metuljev, glede na lokacijo. V Radljah se prvi metulji pojavijo šele proti koncu junija, na Ljubljanskem Barju nekoliko prej, v Prekmurju pa že ob koncu maja. To je odvisno od klimatskih razmer, v katerih so se te populacije ustalile in od vremenskih razmer v posameznem letu.

Tudi dinamika leta metuljev te edine generacije je precej razvlečena skozi daljše časovno obdobje. To je prav tako povezano s klimo posameznega območja. Tako se let metuljev po datumu najprej konča v Radljah, sledi Ljubljansko Barje in nato Prekmurje. Pri tem niso upoštevani le v grafih prikazani podatki, temveč vsi podatki vsebovani v naši podatkovni bazi. Iz podatkov lahko povzamemo, da je obdobje leta metuljev najdaljše v območju, ki ima najdaljše toplo obdobje in nasprotno.



Slika 1: Število generacij koruzne vešče na proučevanih lokacijah.

Iz slike 1 je razvidno, da se bionomija koruzne vešče po območjih precej razlikuje. Če pogledamo napad in strukturo napada koruzne vešče na teh lokacijah (grafí 7-9), vidimo, da se ta prav tako močno razlikuje.



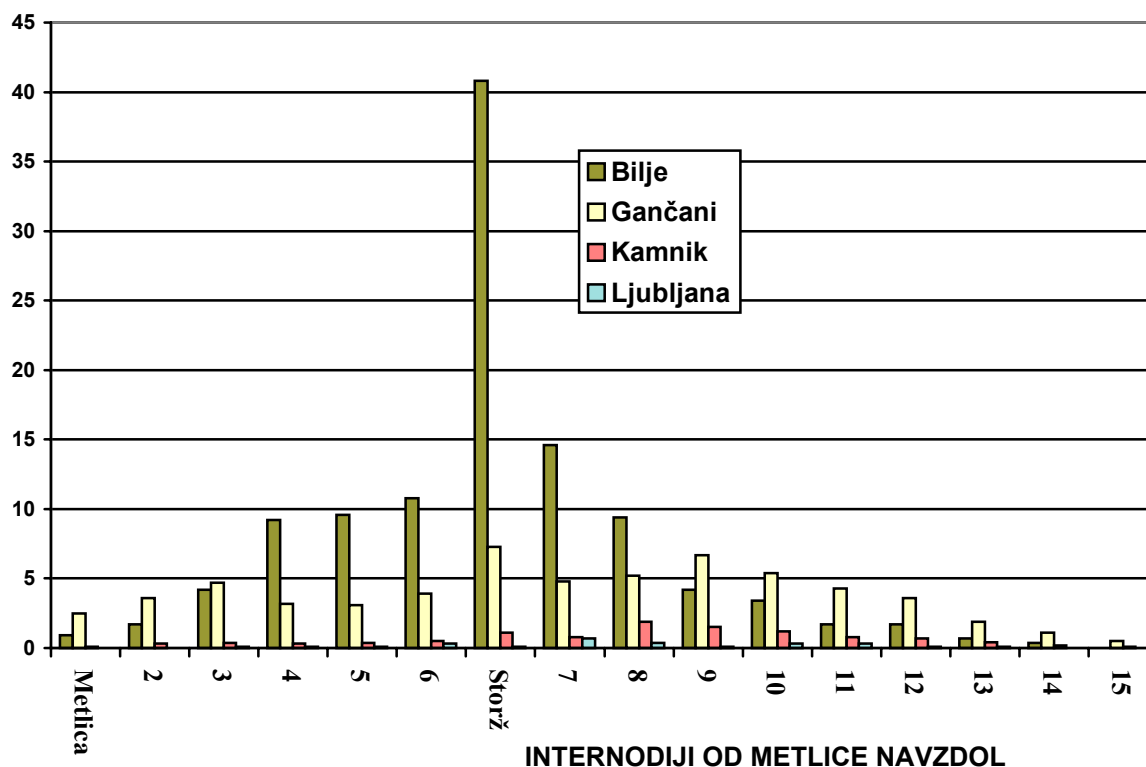
Graf 7: Štiriletno povprečje napada koruzne vešče na koruzi po lokacijah, ob jesenskem vrednotenju napada (1994-1997).

Iz grafa 7 so razvidne zelo očitne razlike glede deleža napadenih rastlin med posameznimi regijami. Zelo očitno prednjači Vipavska dolina (Bilje), kjer se napad vsako leto giblje med 95-100 % napadenih rastlin. Vzrok tega je bionomija koruzne vešče, ki ima v tem območju dve generaciji. Tako praktično ne najdemo rastline, ki ne bi bila napadena. Zaradi tako močnega napada prihaja tudi do zelo velike gospodarske škode na pridelku. Škoda se v tem primeru odraža na dva načina. Prvi je dejansko zmanjšanje pridelka zaradi zmanjšane proizvodne sposobnosti rastlin, drugi pa tiči v načinu spravila rastlin, ker pri strojnem spravilu polomljenih rastlin ni mogoče pobrati, zato tudi ta pridelek pustimo na njivi. Z ekonomskega vidika bi se zato edino v tem območju in morda še v Primorju in Krški kotlini, kjer razvije koruzna vešča dve generaciji, splačalo pridelovati Bt koruzo. Povsod drugod pa bi ekonomika tovrstne pridelave bila na meji rentabilnosti oz. bi pridelava le te bila primerjalno dražja od običajnih hibridov. Ker so površine koruze v Vipavski dolini, Primorju in Krški kotlini glede na celotno Slovenijo relativno majhne, je ekonomika poskusnega uvajanja in oskrbe tržišča z Bt-koruzo vprašljiva. Stroški vseh postopkov do pridobitve dovoljenj za potrditev sorte bi bili višji kot znaša vrednost letnega pridelka v tem območju.

V ostalih območjih delež napadenih rastlin ni tako visok, da bi presegel prag sprejemljive škode, njegova razporeditev po stebli pa je prav tako drugačna. Glavnina napada v Vipavski dolini je v območju storža in na storževem vretenu, kar zelo negativno vpliva na višino pridelka, saj prepreči pretok asimilatov v storž. Poleg tega je število gosenic na eno steblo na Primorskem 6 krat višje kot drugod v Sloveniji. K temu bistveno prispeva pojav močne druge generacije koruzne vešče. Prva v tem območju niti nima večjega vpliva na poškodbe rastlin, saj gosenice te generacije le redko vrtajo v steblo in se zabubijo v zalistjih rastlin, ob listni nožnici. Prva generacija se največkrat hrani na listih, v glavni listni žili in s pelodom, ki se nabere v listnih nožnicah. Šele druga generacija vrta v steblo in ostale dele rastline, kjer je največ proteinske hrane, to pa je okolica storža in sam storž. Ker je glavni pridelek koruze zrnje, je škoda zaradi

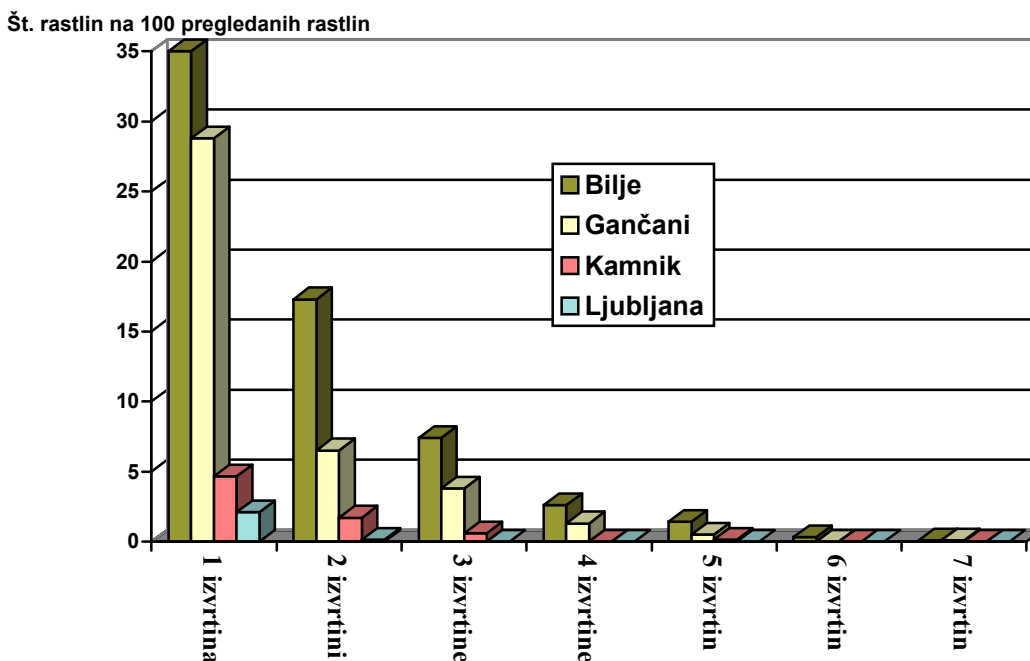
poškodb na storžu velika in lahko znaša od 10-60 % pridelka, odvisno od zrelostnega razreda hibrida. V tem primeru so občutljivejši ranjši hibridi.

Drugod po Sloveniji je napad po stebelu enakomerneje razporejen. Tudi tukaj je glavnina napada locirana v sredini rastline, kjer je steblo najdlje v vegetativni fazi. V teh območjih se jeseni večina gosenic preseli v internodije v spodnjem delu rastline, kjer prezimijo.



Graf 8: Razporeditev napada koruzne vešče v jesenskem času po stebelu in po lokacijah, preračunano na 100 pregledanih rastlin v letu 1996 (n= 5640 rastlin)

Tudi delež rastlin s posameznim številom izvrtin po regijah se razlikuje. Delež rastlin z več kot eno izvrtino v stebelu je daleč največji na Primorskem, sledi vzhodna Slovenija, daleč za temi je Gorenjska in Ljubljanska regija. Število izvrtin v stebelu je z vidika posredne škode zelo pomembno, saj je skorajda vsaka izvrtina okužena s trohobnimi glivami iz rodu *Fusarium* sp., ki povzročajo trohnenje in s tem poganje stebela. To pomeni, da je na lokacijah, kjer je napad večji, večje tudi poganje rastlin.



Graf 9: Delež rastlin s posameznim številom izvrtin v stebelu, po lokacijah, preračunano na 100 pregledanih rastlin, jeseni l. 1996.

3.2.3 Ekonomski parametri smotrnosti pridelave Bt koroze v Sloveniji

Kar se tiče Slovenije, je setev transgene koroze v naših razmerah že sama po sebi vprašljiva, saj je v večini regij s standardnimi hibridi mogoče doseči celo višje pridelke kot z rezistentnimi. Če primerjamo ekonomsko upravičenost setve Bt hibridov z ugotovitvami v ZDA, ugotovimo, da nivo praga ekonomske škode presega samo Vipavska dolina - pomeni več kot eno gosenco na rastlino. V tem območju pa je zasejane le okrog 1250 ha koroze. Če bi Bt hibride v tem območju pridelovali na 70 % površin, 30 % pa odpade na varovalne pasove bi to pomenilo 875 ha Bt koroze. Če vzamemo tržno vrednost tega pridelka po eni od trenutnih tržnih cen (36 SIT/ kg) in povprečnem pridelku 9 t/ha, pridemo do skupne vrednosti pridelka, ki znaša 283,500.000 SIT. Od tega deleža lahko za strošek semena Bt koroze računamo 15 %, kar zneso 42,525.000 SIT. Če gledamo realno, bi vrednost prodanega semena Bt koroze ob uvajanju bila dosti manjša. To pa je tako malo, da se semenarskim hišam vsa registracijska procedura, vsaj kratkoročno, ne bi izplačala. Tudi profit države iz naslova davka in registracijskih postopkov sort, bi v primerjavi z možnimi negativnimi vplivi na okolje, bil tako zanemarljiv, da se to tveganje nikakor ne bi izplačalo.



Slika 2: Pregled območij, kjer bi bila pridelava Bt koruze z vidika pridelovalca ekonomsko rentabilna - na podlagi doslej znanih argumentov.

V ostalih območjih so za zmanjšanje škode zaradi napada koruzne vešče dovolj agrotehnični ukrepi. S temi je mogoče zmanjšati že začetni napad koruzne vešče ali omiliti posledice napada, če do tega pride. Ti ukrepi sicer zahtevajo nekaj dodatnega znanja in poznavanje bionomije koruzne vešče, vendar so za večino naše države dovolj učinkoviti.

Ti ukrepi pa so:

- **Pravočasno in dovolj globoko zaoravanje koruznice in debelostebelnih plevelov**, ki so gostitelji koruzne vešče. Ker gosenice koruzne vešče prezimijo v ostankih koruznice in plevelov na površini tal, moramo te zaorati, preden iz teh ostankov izletijo metulji, to pa je do začetka maja. Še pred kratkim je bil v veljavi odlok, ki je ta rok predpisoval na konec aprila. S stališča boljšega uspeha tega ukrepa je podoravanje veliko primernejše že v jesenskem času, saj gosenice v podoranih steblih preko zime okužijo glive in bakterije, ki prizadenejo veliko večino gosenic. Če podoravamo spomladi je tovrstni uspeh precej zmanjšan. Podoravanje ne velja le za cela koruzna stebela, ampak tudi za vse koruzne ostanke na njivi. Tudi štrclji so lahko vir potencialnega napada, saj gosenice največkrat prezimujejo v najnižjih delih stebela.
- **Pravilen kolobar**. V kolobarju se čimbolj izogibajmo monokulturi koruze ali setvi koruze in prosa v sosledju. Praznih njiv ne smemo puščati zapleveljenih, ker so te lahko vir napada v naslednjem letu.
- **Pravilna izbira hibridov koruze**. Znano je, da so eni hibridi tolerantnejši na napad koruzne vešče kot drugi. Če so nam na razpolago ti podatki, se zmeraj odločamo za tolerantnejše.
- **Izbira poznih hibridov za posamezno območje**. Če sejemo hibride, ki pozno zorijo, lahko s tem v precejšnji meri omilimo škodo kljub velikemu napadu koruzne vešče. Ti hibridi imajo dolgo vegetacijsko obdobje in so dolgo časa v vegetativni fazi z zelenim stebлом, ki je fiziološko aktivno vse do jeseni. Zaradi mehkega stebela, je napad enakomerno razporejen po vsej rastlini in ni osredotočen le na storž, s čimer omilimo škodo na storžu. Ker je steblo fiziološko aktivno, je odpornejše na trohnozne glive, zato ne pretrohni tako hitro in ne poleže. Poleg tega imajo ti hibridi debelejša stebela, zato imajo izvrtine gosenic manjši učinek na poleganje kot pri tankem stebelu.
- **Setev koruze v večjih kompleksih**. Napad je zmeraj največji na robovih parcel, zato čimbolj povečamo površino, tembolj zmanjšamo napad v notranjosti posevka.
- **Izogibanje setvi koruze v bližini ruderalnih površin**, kjer ima koruzna vešča veliko samoniklih gostiteljskih rastlin. Te površine pomenijo precejšnje tveganje za večji napad koruzne vešče. To so odvodni melioracijski kanali, opuščene zapleveljene njive, gozdni rob ipd.

3.2.4 Ugotavljanje škodljivih vplivov ob sproščanju Bt koruze v Sloveniji in dejstva, na katera moramo biti še posebno pozorni

Škodljive vplive ob namernem sproščanju Bt koruze v slovenske rastne razmere bomo dejansko lahko ugotavljali šele v poljskih poskusih in v primeru, če bo do namernega sproščanja res prišlo. Dokler v Sloveniji Bt koruze ne bomo gojili, je za naše razmere ugotavljanje nemogoče. Že sedaj pa lahko na podlagi izkušenj po svetu in zbranih literaturnih virov, opozorimo na nekatere specifične posebnosti Slovenije, ki bi utegnile imeti nekatere bolj ali manj škodljive posledice v Sloveniji.

Dejstvo, da Bt toksin lahko negativno deluje na nekatere neciljne in koristne žuželke v naravi, pomeni določeno ogroženost avtohtone favne. Zato je za slovenske razmere pred nameravano introdukcijo Bt koruze potrebno proučiti:

- Na katere neciljne žuželke v slovenski favni lahko Bt toksin učinkuje toksično in kakšen je tovrstni vpliv na širši ekosistem. To pomeni, ali ima vpliv na čebele, ki v času cvetenja

nabirajo pelod tudi na koruzi ter kakšen vpliv ima na ostale škodljive organizme koruze, kot so patogeni, ogorčice ipd.

- Kakšen je lahko učinek na potencial predatorjev koruzne vešče in drugih koristnih organizmov v posevku koruze. Med te spadajo najezdniki – parazitoidi, predatorji in patogeni škodljivcev koruze. Ob zmanjšanju njihove razpoložljive hrane bi se zmanjšala tudi njihova populacija.
- Favno žuželk, ki živijo in se hranijo blizu posevkov koruze v času njenega cvetenja. Glede na to, da je koruza vetrocvetka in da je koncentracija Bt toksina največja prav v pelodu, je pomembno, kako daleč ta pelod migrira in katere organizme lahko v tem primeru prizadene. Tukaj so tudi bolj ogrožena območja z več in močnejšim vetrom v času cvetenja. Ta pelod lahko negativno vplivno vpliva na žuželke, še posebno metulje, ki se hranijo na rastlinah kontaminiranih s cvetnim prahom Bt koruze.

Ker je sladka koruza dovzetnejša za napad koruzne vešče, je maksimalni potencialni napad mogoče ugotovljati s setvijo te koruze. S tem bi lahko v naprej za posamezno območje ugotovili maksimalni potencial napada koruzne vešče in glede na to opredelili smotrnost uvajanja Bt hibridov v naš prostor. Seveda bi poskuse morali zasnovati v kontroli s standardnimi hibridi za posamezno območje in ob različnih terminih setve sladke koruze, ker se napad lahko različno odrazi glede na fenofazo koruze in bionomijo koruzne vešče v območju. V dosedanjih raziskavah smo dokazali, da se binomija koruzne vešče med območji precej razlikuje, zaradi česar prihaja tudi do razlik v intenzivnosti napada koruzne vešče. Na podlagi tovrstnih podatkov bi lahko izdelali tudi hipotetični ekonomski izračun smotrnosti uvedbe BT hibridov ob maksimalnem napadu koruzne vešče.

Drug večji problem v Sloveniji je velika razdrobljenost obdelovalnih zemljišč, kjer je povprečna velikost obdelovalne parcele okrog 0,25 ha, velikost kmetije pa obsega v povprečju okrog 2,7 ha obdelovalnih površin. V ZDA je povprečna kmetija velika med 1500 do 400 ha in ugotavljajo, da vsako dodatno delo, kot je npr. setev zaščitnih posevkov, občutno poveča stroške že tako dražjega semena Bt koruze. Tam v tem primeru že samo en USD na ha pomeni 1500 do 400 USD dodatnih stroškov, kar lahko bistveno vpliva na ekonomiko pridelave Bt koruze. V primeru naše razdrobljenosti je že velik problem izvedbe setve zaščitnih pasov, ki jih priporočajo sejati v razmerju 25-40 % ne-Bt koruze. Na tako ozkih površinah in ob uporabi štirivrstne sejavnice bi bila zamuda zaradi dodatnega praznjenja sejavnice in ločene setve precejšnja. Takorekoč zelo težko izvedljivo pa bi bilo ločeno strojno spravilo takega posevka, če bi imeli le eno ali dve vrsti ne-Bt koruze po celi dolžini parcele. Pri nas bi bili stroški za tako setev in spravilo nesorazmerno večji kot v ZDA. Seveda to za kmetijo z 2 ha zemljišč morda ne bi bil tako velik strošek, če pa pogledamo celo Slovenijo, bi ti dodatni stroški kar precej podražili pridelavo koruze za zrnje.

Drugi vidik, ki lahko sledi iz razdrobljenosti naših parcel, je medsebojna izolacija takih posevkov. Ker so si vse njive blizu skupaj, obstaja nevarnost, da bi zaradi setve Bt koruze brez zaščitnih posevkov bil pojav koruzne vešče na sosednjih oz. bližnjih njivah toliko večji, kar bi pridelovalce ne-Bt koruze postavilo v podrejen položaj. Znano je namreč, da samice koruzne vešče lahko izberejo hibrid do katerega imajo večjo preferenco in tam raje odlagajo jajčeca. To smo prav tako potrdili v dosedanjih poskusih.

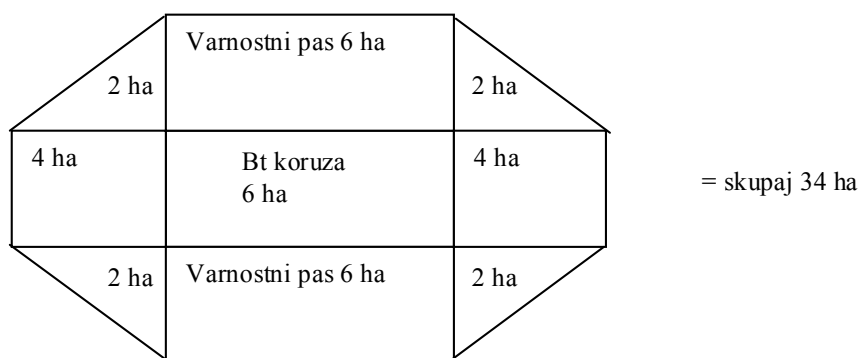
V Sloveniji kmetje še tudi pridelujejo domače populacije trdink, ki jih poleg za krmljenje živini uporabljajo za lastno prehrano. Tudi v teh primerih bi morali poskrbeti za varovanje tovrstnih območij pred nezaželenim vnosom tujih genov, ki bi spremenile izvirne lastnosti teh populacij

in bi okrnile demografske in etnografske posebnosti naše krajine. Čeprav je Salmov (1940) dokazal, da je možna oplodnja koruze z drugim posevkom koruze oddaljenim celo 800 m, nekateri avtorji opozarjajo, da varne razdalje v naravi praktično ni, saj so možni še drugi prenosi cvetnega prahu, kot je veter, divjad, ptiči, žuželke in človek. Glede na to, da imamo v Sloveniji zelo majhne in razdrobljene parcele ter glede na potrebno priporočljivo izolacijo (preprečitve tuje oplodnje), bi v primeru setve Bt hibridov to s praktičnega vidika le težko izvedli. V tem primeru bi en kmet, ki bi zasejal njivo z Bt hibridom ostalim kmetom onemogočil setev ne-Bt koruze.

Če vzamemo primer njive dolžine 300 m in širine 200 m, ki zavzema površino 6 ha, je potrebna minimalna izolacija, ki zavzema površino 34 ha (Preglednica 3). Če hočemo zagotoviti minimalno oplodnjo koruze s tujim pelodom, to je 800 m izolacije (Salmov je pri tem ugotovil 0,2 % tuje oplodnje), nam ta površina predstavlja 234 ha, kjer ne smemo sejati koruze. Koruza pa je v Sloveniji najpomembnejša poljščina, zato bi to praktično nemogoče izvedli, saj koruzo več ali manj seje vsak kmet.

Preglednica 3: Pregled velikosti površine, ki mora biti prosta koruze ob zahtevani različni velikosti izolacije.

Dimenzije njive	Površina njive	Potrebna izolacija	Minimalna površina možnega obsega oplodnje
200 x 300 m	6 ha	200 m	34 ha
200 x 300 m	6 ha	800 m	234 ha
400 x 20 m	0,8 ha	200 m	25,6 ha
400 x 20 m	0,8 ha	800 m	222 ha



Slika 3: Primer načina izračuna potrebne površine, ki jo zahteva izolacija za preprečitev medsebojne oplodnje. V tem primeru je izhodišče njiva z Bt koruzo velikosti 200 x 300 m.

Na sliki je prikazana idealna oblika in površina parcele za slovenske razmere, v praksi pa je stanje povsem drugačno. V Prekmurju imamo opravka s parcelami, ki so dolge med 300-500 m

in široke le 10-20 m. Torej lahko že na videz majhna površina Bt koruze (0,8 ha) zavzame varno površino (v primeru 800 m izolacije) 222 ha.

Ena od možnih rešitev je setev čiste Bt koruze v izbranih območjih ali setev hibridnega semena, ki ga vsako leto zamenjamo. To pa je že tako pretežna praksa. Rešitve so možne tudi v lokalni izolaciji Bt koruze znotraj naravnih barier, kot jih predstavljajo strnjeni gozdovi in makrorelief, vendar tudi v tem primeru pridemo do mnogih omejitev v velikosti površin. Za sproščanje Bt koruze je zato primerno najti primerne površine v soglasju z vsemi pridelovalci na tistem območju. To pomeni, da bi v tem primeru vso koruzo zasejano v območju tretirali kot kontaminirano Bt koruzo, saj ne bi mogli preprečiti medsebojne oplodnje. Eden takih možnih izoliranih območij bi potencialno lahko bila Vipavska dolina, kjer je napad koruzne večče visok in kjer so bariere, ki preprečujejo širjenje peloda v druga območja. To pa so visoke kraške planote in vetrovi, ki v glavnem pihajo proti jugu. Vendar pa bi tudi tukaj pred introdukcijo morali upoštevati tudi vsa ostala načela možnega tveganja.

Poseben problem je tudi pridelava semenske koruze in vzdrževanje nekontaminiranega semenskega materiala. Po sedANJI veljavni zakonodaji je zahtevana izolacija od drugih posevkov koruze 200 m. V primeru sproščanja Bt koruze v našo pridelavo bi bilo to v tem primeru občutno premalo, zaradi vseh prej naštetih vzrokov. Četudi bi prišlo le do najmanjšega deleža tuje oplodnje z Bt koruzo, bi s setvijo F1 generacije tega semena dobili pridelek merkantilnega zrnja kontaminiranega v veliko večjem deležu kot v izvornem semenu, zaradi rekombinacije genov pri oplodnji (načela populacijske genetike). Ta delež je možno ugotoviti le s poljskimi poskusi in laboratorijskimi preiskavami posameznih zrn F1 generacije, kar bi bilo zelo drago.

V primeru nenamernega križanja prihaja tudi do vprašanja načela kršenja licenčnih pravic lastnika sorte. Na tem področju pa imajo multinacionalke zelo agresiven nastop. Predpisi jim omogočajo, da lahko od vsakega pridelovalca koruze, ki mu dokažejo primesi njihove licenčne sorte (vsebnost Bt gena), ki jo imajo zaščiteno z zakonom o registraciji sort, zahtevajo licenčnino in jo lahko v vsakem primeru tudi iztožijo. Moralna načela, kdo je dejansko kriv, da so se njihovi hibridi nenamerno križali z ne-Bt koruzo tukaj povsem odpovedo. Dejansko bi morale multinacionalke same zagotoviti varnost, da do medsebojnega križanja ne bi moglo priti. Po dosedanjih predpisih pa jim je v interesu, da se to dogaja, saj lahko na ta način dobro zaslužijo z izterjavo licenčnin in monopolom nad pridelavo hrane, kjer lahko povsem prevzamejo nadzor. Tudi na tem področju bi naši predpisi morali predvidevati sankcije za proizvajalce semena GSR, pri katerih bi prihajalo do medsebojne oplodnje z običajnimi sortami in vrstami rastlin, ki so že dolgo časa v pridelavi. Agresivnost multinacionalk je sedaj povsem v nasprotju z načeli svobodnega odločanja potrošnika o svoji prehrani, če želi ali ne želi uživati hrano iz GSR. Te izbire namreč ne bo več, če pride do nenadzorovanega križanja GSR z ne GSR.

Večletna zaporedna setev Bt koruze lahko privede do kopičenja Bt gena v tleh, bodisi zaradi samih rastlin ki so podorane, bodisi zaradi raztrosa cvetnega prahu na tla. Čeprav negativni učinki na talni ekosistem v dosedanjih študijah še niso potrjeni, moramo biti vseeno previdni, saj znanstveniki opozarjajo, da sproščena DNA iz odmrlih rastlin lahko prispeva k prehodnemu rezervoarju genski informacij, ki bodo na razpolago mikrobiološki populaciji v tleh. Je pa ugotovljeno, da je bil Bt toksin v zemlji prisoten še 180 dni po žetvi Bt koruze. Bt koruza ima tudi veliko večjo vsebnost lignina ter v tleh tudi precej počasneje razpada kot ne-Bt koruza.

3.3 Možnosti remediacije prostora, v katerem je prišlo do negativnih učinkov GSO

Več avtorjev, med njimi tudi Dale s sod. (1993) opozarja, da je sprostitvev GSR v okolje ireverzibilen proces, ki ga zaradi prostega pretoka genov v naravi ni mogoče zaustaviti. V prejšnjih poglavjih smo že nakazali probleme, do katerih lahko pride ob sproščanju Bt korus v slovenski prostor. Delno bi negativne učinke sproščanja lahko omilili z zadostno varnostno razdaljo, kar pa je glede na specifičnost njivskih površin v Sloveniji težko izvedljivo. Ker so pri nas tudi ekološke kmetije, ki še sejejo svoje domače sorte korus in za nadaljnjo setev uporabljajo lastno seme, obstaja nevarnost da te izgubijo svoje avtohtone sorte zaradi preskoka Bt gena v njihov semenski material. Korusa je namreč izrazita tujeprašnica. V takem primeru povratnega procesa oziroma vzpostavljanja prvotnega stanja ni, ker vsa semenska korusa vsebuje primesi modificiranega gena. Na dolgi rok seme skladiščijo le genske banke, ostali pridelovalci pa vsako leto seme odbirajo iz predhodnega posevka. Zaradi tega prvotnega stanja ni mogoče restavrirati.

Da bi prišlo do križanja Bt korus z njenimi divjimi sorodniki pri nas, kot je teosinta, je praktično nemogoče, ker pri nas ne uspevajo in jih tudi ne gojimo. Ravno zaradi možnosti takega križanja veljajo v Mehiki zelo strogi predpisi glede uvedbe Bt korus v Mehiko (Garcia s sod., 1998). Za možnost preskoka genov na korusi sorodne vrste rastlin, kot je npr. divji sirek ali proso v svetu še ni dokazov, deloma mogoče tudi zato, ker se Bt korusa prideluje šele razmeroma kratek čas.

Če pride do negativnih učinkov GSR v naravnem okolju, je stanje potrebno čimprej sanirati. Seveda je najprej potrebno uničiti vse dele GSR, ki se v prostoru nahajajo, tako gojenih kot samoniklih. Glede načina uničenja samih GSR v okolju prihaja do razhajanj, kako ta ukrep čimbolj natančno opraviti, da ne pustimo ostankov v okolju. Vsekakor je to nujno izvesti takoj, čim ugotovimo negativne učinke, katerih posledice so lahko dolgotrajne. V tem primeru rastline zberemo in sežgemo, če je to nujno, sicer pa jih podorjemo ali zakopljemo, pri čemer moramo paziti, da ne pride do naknadnega vznika teh rastlin. Ukrep, ki je prav tako možen je uničenje rastlin s totalnimi herbicidi, v kolikor so te še v zgodnjih razvojnih stadiji. Vendar moramo biti pozorni, ker so nekatere GSR odporne tudi na totalne herbicide. Kljub popolnemu uničenju GSR, kot je sežig, na polju še vedno ostanejo podzemni deli rastlin, kot so korenine in delci, ki so v času vegetacije z rastlin odpadli. Ni pa še jasno, kako odstraniti kemične substance, ki so vezane na talni kompleks.

Da bi preprečili morebiten preskok genov, je v območju, kjer remediacijo izvajamo, potrebno prepovedati setev njim sorodnih rastlin, če pa so te že posejane, pa skupaj z GSR uničimo tudi te. Seveda je to odvisno od vsakega posamičnega primera.

Težje in veliko dražje je v prvotno stanje mogoče vzpostaviti v ekosistemu, če v njem pride do porušnja naravnega ravnotežja. Če bi zaradi negativnih učinkov prišlo do izumrtja določenih vrst v območju pridelave GSR, bi bila nujna njihova umetna reintrodukcija (Snow in Morán-Palma, 1997), če je ta sploh mogoča. Še dosti težje pa je harmonizirati odnose znotraj kompleksnega ekosistema v primeru njihovega porušnja.

Pri remediaciji je zato glavni problem pravočasen umik GSR iz okolja, če je to sploh izvedljivo, kajti ko so posledice opazne, je v večini primerov že prepozno in je nastala škoda tako obsežna, da prvotnega stanja ni več mogoče vzpostaviti. V primeru introdukcije GSR v okolje bi zato

prijavitelj GSR sort moral predvideti ukrepe remediacije v primeru negativnih vplivov na okolje in kriti stroške vzpostavitve prvotnega stanja.

3.4 Identifikacijske metode odkrivanja GSR in Bt koruze v okolju

Evropske regulative (EU Directive 58/97, 1139/98, 49/2000, 50/2000) predpisujejo označevanje živil, ki vsebujejo sestavine gensko spremenjenih organizmov, če vsebujejo več kot 1 % primesi GSR. To pomeni, da morajo biti živila testirana na prisotnost GSR, da zagotovimo veljavnim predpisom. Če ni mogoče zagotoviti testiranja vseh živil, ki lahko izvirajo iz GSR, mora biti testiranje vsaj naključno.

Identifikacija navzočnosti GSO v vzorcih je mogoča na dveh principih: z iskanjem identičnega vzorca vnešene DNA v genetsko spremenjeno rastlino (testi na osnovi DNA) ali na osnovi proteinov, ki so produkt sinteze introducirane DNA (imunološki testi) (Jakše in Javornik, 2002).

Za določanje DNA v vzorcih so največ v uporabi PCR metode (metode polimerazne verižne reakcije), ki so tudi najbolj zanesljive. S PCR tehniko je mogoče v nekaj urah namnožiti na milijarde kopij enostavne DNA molekule. Po namnoževanju sledi odkrivanje specifičnih sekvenc in določanje deleža DNA v vzorcu. Ta metoda je znana po svoji občutljivosti in odkrije GSO na zelo nizkem nivoju, tudi pri 0,05 %, kar pomeni, da ugotovi prisotnost transgene DNA tudi če je samo 5 GS zrn na 10.000 ne-GS zrn (Villar, 2001).

3.4.1 Imunološki testi

So hitri testi, ki služijo za hitro določanje specifičnih proteinov v rastlini, uporabni so predvsem za določanje tujega proteina v surovih vzorcih.

Uporabljata se predvsem dve metodi (Villar, 2001):

- s pomočjo testnih indikatorskih lističev (lateral flow test strip metod) in
- ELISA test na mikrotiterskih ploščah.

S pomočjo testnih indikatorskih lističev lahko odkrijemo specifične proteine kot Cry1Ab, Cry9C, PAT v koruzi in EPSPS protein v soji. Ti testi so relativno hitri in poceni, nudijo pa samo kvalitativne rezultate z uporabo protiteles na kontrolnih lističih. Ta test uporablja zvezni inšpekcijski servis za žita (FGIS – Federal Grain Inspection Service) kot uradno merilo pod nadzorom US Grain Standards Act (USGSA). FGIS navaja, da je s to metodo možno ugotoviti prisotnost proteina Cry9C celo do 0,125 % (Villar, 2001).

ELISA test na mikrotiterskih ploščah omogoča kvalitativne in delno kvantitativne rezultate z uporabo protiteles v mikrotiterskih ploščah ter encimatskih in barvnih reagentov za detekcijo. S to metodo lahko določimo, poleg prej omenjenih, še Cry1Ac protein.

Laboratorijsko opremo kot tudi protitelesa ter certificiran referenčni material za že znane GSO oz. nove proteine je možno dobiti pri več podjetjih, med njimi navajamo tudi: Envirologix, <http://www.envirologix.com>, Strategic Diagnostic, <http://www.sdix.com> in <http://www.sigma-aldrich.com>.

ELISA test so med drugim uporabljali tudi Head in sod. (2001) za ugotavljanje nivoja proteina Cry1Ab v 4 vrstah fitofagnih škodljivcev po hranjenju z Bt koruzo, ki je vsebovala ta protein, Wraight s sod. (2000) ter Jesse in Obrycki (2000) za ugotavljanje nivoja proteina Cry1Ab v cvetnem prahu koruze.

3.4.2 Testi na osnovi DNA:

Metode določanja transgenih rastlin in njihovega deleža v vzorcih na osnovi DNA temeljijo na molekularnih tehnikah. Postopek pri teh je sledeč:

- ◆ Izolacija DNA iz vzorca.
- ◆ Namnoževanje DNA s (Taq) polimerazo.
- ◆ Potrditev izolacije DNA s kvalitativnim PCR, pri katerem ugotavljamo samo navzočnost GS-DNA v vzorcu.
- ◆ Kvantitativni PCR, pri katerem ugotavljamo tudi količino GS-DNA.

Te metode se vedno bolj izpolnjujejo, zato so razvili t.i. kvantitativne tekmovalne oz. kompetitivne PCR metode ter PCR v realnem času (real time PCR). Zraven teh se za identifikacijo segmentov transgene DNA v vzorcu in njihove količine lahko uporabljajo še različne metode na osnovi hibridizacije. Te so »Southern blot« hibridizacija, »Dot blot« hibridizacija, »FISH« (fluorescentna in situ hibridizacija).

Jankiewicz s sod. (1999) je v mešanicah z različnimi koncentracijami GS in ne-GS soje ter koruze skušali ugotoviti mejo določljivosti, pri kateri je še možno s kvantitativno tekmovalno PCR metodo zanesljivo ugotoviti količino GS DNA v vzorcu. Tako pri soji kot pri koruzi je uspel ugotoviti prisotnost transgene DNA vzorcih pri 0,1 %, kar je precej pod mejo, ki je z evropsko zakonodajo o označevanju GSO ali proizvodov s sestavinami GSO dovoljena do največ 1 %, zato jo sprejemajo za dovolj natančno.

Vollenhofer s sod. (1999) je za ugotavljanje prisotnosti Bt proteina v koruzi poleg PCR metod uporabljal še Southern blot hibridizacijo. Tudi njim je uspelo dokazati zelo nizko koncentracijo Bt proteina v koruzi in sicer pri 0,01 % vsebnosti. Visoko občutljivost metod so ugotovili tudi pri zelo nizkem številu kopij.

Eden od 8 inštitutov v Evropi, Institute for Reference Materials and Measurements v Geel-u, v Belgiji, ki so člani Skupnega raziskovalnega centra evropske komisije (EC's Joint Research Centre – EC's JRC) je prvi razvil referenčni material za odkrivanje GSO (Anon, 1999). Certificiran referenčni material za sojo in koruzo je bil proizveden v sodelovanju z Institute for Health and Consumer Protection v Ispri, v Italiji in podjetjem Fluka Chemie AG, v Švici. EC's JRC nadaljuje z nudenjem referenčnega materiala novih GSO, ki se pojavljajo na trgu, prav tako pa razvija in izpopolnjuje primerne analitične metode za ugotavljanje prisotnosti GSO.

Problemi določitve GSO se pojavijo pri končnih izdelkih, še posebno, če so ti toplotno obdelani, kar povzroči denaturacijo DNA, ali če ti vsebujejo le določene izvlečke iz zrnja GSR. V tem primeru obstaja možnost, da določimo proteine, ki so kopija GS-DNA, vendar v veliko primerih živil tudi tovrstni testi odpovejo in je poreklo živil tako rekoč nemogoče dokazati.

3.4.3 Institucije v Sloveniji, ki se usposablajo za opravljanje testov na GSR

Rutinski testi na GSR v hrani se v Sloveniji še ne izvajajo. Prvi so pri nas začeli z uvajanjem analitskih testov na GSR na Nacionalnem inštitutu za biologijo (NIB) in na Agronomskem oddelku Biotehniške fakultete. Sedaj se na tem področju usposablja še Kmetijski inštitut Slovenije. Drugi laboratoriji po našem vedenju trenutno še niso usposobljeni za opravljanje tovrstnih analiz, tako na področju znanja, opreme in standardov. Stanja na veterinarskem področju, v zvezi s testiranjem živinske krme na GSR, ne poznamo.

Od naštetih laboratorijev so delež transgene DNA v vzorcu sposobni določiti samo na NIB in še to le pri nekaj sortah transgenih rastlin, saj je analitika na tem področju precej zapletena. Za rutinsko določanje transgene DNA v živilih pa bo potrebno doreči še precej stvari. Ena glavnih je plačevanje tovrstnih analiz, ki niso poceni.

4 Sklepi

S pomočjo GS – Bt koruze je mogoče rešiti kar nekaj težav v zvezi v zaščito koruze pred napadom koruzne vešče, vendar je smotrnost uvedbe Bt koruze v naše okolje vprašljiva že z samega ekonomskega vidika. Ekonomski prag napada je presežen edino v Vipavski dolini in po naši oceni - glede na klimatske značilnosti, še v Primorju. Površine pod koruzo v teh območjih pa so glede na ostalo Slovenijo takorekoč zanemarljive.

Prav tako je še veliko pomislekov glede smotrnosti sproščanja Bt koruze v okolje v literaturnih navedbah, zaradi negativnih učinkov na neciljne organizme. Neciljna selekcija lahko privede do problemov, ki so večji kot pred vnosom GSR. Izguba učinkovitosti Bt toksina je eden od najpomembnejših ekoloških tveganj povezanih z Bt koruzo.

Zelo dobri rezultati v laboratorijskih testih še ne zagotavljajo uspeha v naravnem okolju ali širši pridelavi. Tako ne vemo, kakšen vpliv lahko ima Bt gen na čebele, ki v času cvetenja na koruzi nabirajo pelod. Ne vemo, v kolikšnem času in na kakšen način lahko pride do razvoja rezistence pri koruzni vešči. Ne poznamo možnih vplivov na našo avtohtono floro in favno. Zaskrbljujoče so ugotovitve negativnih učinkov Bt toksina na neciljne organizme. Nenazadnje pa sama pridelava GSR v Sloveniji ne more biti dovolj za njihovo introdukcijo, ker bo proizvode iz njih moral tudi nekdo porabiti. Odpor proti uporabi GSR v naši prehrani je zaenkrat prevelik, da bi tovrstne rastline bilo smiselno uvajati tudi v našo pridelavo, saj bi si s tem nakopali veliko nepredvidenih jeznih potrošnikov.

Vsekakor je pred uvajanjem kakršnihkoli GSR v naše okolje potrebna priprava ocene tveganja za posamezni organizem, ki bi ga želeli vnesti v naše okolje. Za izdelavo tovrstne ocene pa ne morejo biti dovolj le literaturne navedbe, ker so si te v mnogih primerih nasprotujoče si, kot se je pokazalo pri primeru Bt koruze, ampak je potrebno opraviti tudi lastne raziskave. Vsekakor bo ob nepremišljeni odobritvi vnosa GSR v naše okolje določeno odgovornost imela tudi uprava, ki bo za to področje pristojna.

Pred vnosom bi vsekakor morali opraviti naslednje raziskave:

- osnovni laboratorijski testi na različne učinke,
- majhni poljski poskusi ali poskusi v nadzorovanih razmerah,
- računalniška simulacija možnih negativnih učinkov,
- večji poljski poskusi z natančno analizo vseh vplivov.

Šele po opravljenih tovrstnih poskusih in pozitivni oceni tveganja za okolje bi lahko odobrili sproščanje GSR v komercialno uporabo.

5 VIRI

- Anon., (1999): The role of the EC's Joint Research Centre in the detection of GM foods.- European-Food-&-Drink-Review., Winter, 65-67.
- Anon., (2001): Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council on the Deliberate Release into the Environment of Genetically Modified Organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC, L106/1.
- Anon., (1991): Voluntary Code of Conduct for the Release of Organisms in Environment, July 1991, UNIDO,
- Archer, T.L., Patrick, C., Schuster, G., Cronholm, G., Bynum, Jr.E.D., Morrison, W.P. (2001): Ear and shank damage by corn borers and corn earworms to four events of *Bacillus thuriangiensis* transgenic maize.- Crop Protection, 20, 139-144.
- Archer, T.L., Schuster, G., Patrick, C., Cronholm, G., Bynum, Jr.E.D., Morrison, W.P. (2000): Whorl and stalk damage by European and Southwestern corn borers to four events of *Bacillus thuriangiensis* transgenic maize.- Crop Protection, 19, 181-190.
- Bača, F. (1995): Dinamika leta leptira kukuruznog plamenca (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) i stanje napada u Zemun polju 1989-1994. godine.- Biljni lekar, 23, 4, 388-391.
- Barry, B.D., Darrah, L.L., Huckla, D.L., Antonio, A.Q., Smith, G.S., O'-Day, M.H. (2000): Performance of transgenic corn hybrids in Missouri for insect control and yield. Journal of Economic Entomology.- 93, 3, 993-999.
- Bohorova, N., Zhang, W., Julstrum, P., McLean, S., Luna, B., Brito, R.M., Diaz, L., Ramos, M.E., Estanol, P., Pacheo, M., Salgado, M., Hoisington, D. (1999): Production of transgenic tropical maize with cryIAb and cryIAc genes via microprojectile bombardment of immature embryos.- TAG, 99, 437-444.
- Borojević, K. (1991): Geni i populacija.- 2. izd., Forum, Novi Sad, 545 s.
- Dale, P.J., Irwin, J.A., Scheffler, J.A. (1993): The Experimental and Commercial Release of Transgenic Crop Plants.- Plant Breeding, 111, 1-22.
- Doyle, J.J., Persley, G.J. (1996): Enabling the Safe Use of Biotechnology, ESD, The World Bank, Washington.
- Edwards, R. (1999): Referat na XXth Int. Working Group on *Ostrinia nubilalis* and other Maize Pests. Adana, Turkey.
- Garcia, M.C., Figueroa, M.J., Gomez, R.L., Townsend, R., Schoper, J. (1998): Pollen control during transgenic hybrid maize development in Mexico.- Crop Sci., 38, 1597-1602.
- Gomboc, S., Carlevaris, B., Vrhovnik, D., Milevoj, L., Celar, F. (1999): Bionomija koruzne večče (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) v Sloveniji.- Zbornik predavanj in referatov 4. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, v Portorožu od 3. do 4. marca 1999, 459-467.
- Gomboc, S., Milevoj, L. (1999): Bionomy and Strains of European Corn Borer (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) in Slovenia.- IWGO Newsletter 19, 2, 14-15.
- Graeber, J.V., Nafziger, E.D., Mies, D.W. (1999): Evaluation of transgenic, Bt-containing corn hybrids.- Journal of Production Agriculture. 12, 4, 659-663.
- Hamill, J.D., Rousley, S. (1991): The use of the polymerase chain reaction in plant transformation studies.- Plant Cell Reports, 10, 221-224.
- Hartzler, G.H., Buhler, D.D. (2000): Occurrence of common milkweed (*Asclepias syriaca*) in cropland and adjacent areas.- Crop Protection, 19, 363-366.
- Head, G., Brown, C.R., Groth, M.E., Duan, J.J. (2001): Cry1Ab protein levels in phytophagous insects feeding on transgenic corn: implications for secondary exposure risk assessment.- Entomologia Experimentalis et Applicata, 99: 1, 37-45.

- Hellmich, R.L., Higgins, L.S., Witkowski, J.F., Campbell, J.E., Lewis, L.C. (1999): Oviposition by European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) in response to various transgenic corn events.- *Journal of Economic Entomology*, 92: 5, 1014-1020.
- Hilbeck, A., Moar, W.J., Pusztai-Carey, M., Filippini, A., Bigler, F. (1998): Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae).- *Environmental Entomology* 27: 1255-1263.
- Hilbeck, A., Moar, W.J., Pusztai-Carey, M., Filippini, A., Bigler, F. (1999): Prey-mediated effects of Cry1Ab toxin and protoxin and Cry2A protoxin to the predator *Chrysoperla carnea*.- *Entomologia Experim. et Applicata* 91: 305-316.
- 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.
- Huang, F., Buschman, L.L., Higgins, R.A., McGaughey, W.H. (1999): Inheritance of Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin (Dipel ES) in the European Corn Borer.- *Science*, 284, 965-967.
- Hyde, J., Martin, M.A., Preckel, P.V., Dobbins, C.L., Edwards, C.R. (2001): An economic analysis of non-Bt corn refuges.- *Crop Protection*, 20: 2, 167-171.
- Jankiewicz, A., Broll, H., Zagon, J. (1999): The official method for the detection of genetically modified soybeans (German Food Act LMBG 35): a semi-quantitative study of sensitivity limits with glyphosate-tolerant soybeans (Roundup Ready) and insect-resistant Bt maize (Maximizer).- *European Food Research and Technology*, 209, 2, 77-82.
- Jesse, L.C.H., Obrycki, J.J. (2000): Field deposition of Bt transgenic corn pollen: lethal effects on the monarch butterfly.- *Oecologia*, 125, 2, 241-248.
- Kač, M. (1983): Kakšna je koruzna vešča in kako živi.- *Hmeljar*, 10, priloga 31-32.
- Kač, M. (1985): Proseni vešča v hmeljiščih v letu 1984.- *Hmeljar* 10, priloga 24-25.
- Lakše, J., Javornik, B. (2002): Detekcija gensko spremenjenih organizmov v hrani in krmi.- *Sodob. kmetijstvo*, 35, 1, 19-23.
- Lauer, J., Wedberg, J. (1999): Grain yield of initial Bt corn hybrid introductions to farmers in the northern Corn Belt.- *Journal of Production Agriculture*, 12, 3, 373-376.
- Lavigne, C., Godelle, B., Rebonud, X., Gouyon, P.H. (1996): A method to determine the mean pollen dispersal of individual plants growing within a large pollen source.- *TAG*, 93, 1319-1326.
- Lavigne, C., Klein, E.K., Vallée, P., Pierre, J., Godelle, B., Renard, M. (1998): A pollen-dispersal experiment with transgenic oilseed rape. Estimation of the average pollen dispersal of an individual plant within a field.- *TAG*, 96, 886-896.
- Lee, C.M., Lee, Y.J., Lee, M.H., Nam, G.H., Cho, T.J., Hahn, T.R., Cho, M.J., Sohn, U. (1998): Large-scale analysis of expressed genes from the leaf of oilseed rape (*Brassica napus* L.).- *Plant Cell Reports*, 17, 930-936.
- Losey, J.E., Raynor, L.S., Carter, M.E. (1999): Transgenic pollen harms monarch larvae.- *Nature*, 399, 214.
- Manual for Assessing Ecological and Human Health Effects of Genetically Engineered Organisms, Part I and Part II, The Edmonds Institute, Washington, 1998, beb@igc.apc.org.
- Mather, K., Jinks, J.L. (1977): *Biometrical Genetics*.- Chapman and Hall Ltd., London, 382 s.
- Matjaž, K. (1989): Koruzna (proseni) vešča (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) kot škodljivka hmelja in njeno zatiranje.- *Diplomska naloga*, BF, Oddelek za agronomijo, Ljubljana, 50 s.
- McLaren, J.S. (2001): Butterflies and Biotech: a cautionary Principle.- *Pesticide Outlook*, 12, 4, 136-140.
- Mikkelsen, T.R., Andersen, B., Joergensen, R.B. (1996): The risk of crop transgene spread.- *Nature*, 380, March 7.
- Milevoj, L.: Koruzna (proseni) vešča.- v knjigi: Tajnšek, T. s sodelavci (1991): *Koruza*.- ČZP Kmečki glas, Ljubljana, 156-160.
- Moser, M.A., Kniel, B., Schmitz-Winnenthal, J., Hupfer, C., Engel, K.H. (1999): Einfluss verfahrenstechnischer Parameter auf den analytischen Nachweis gentechnisch veränderter Zutaten in Backwaren. *Getreide Mehl und Brot*, 53, (6), 334-341.

- 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.- TAG, 95, 815-821.
- Pimentel, D., Pimentel, M., Guerinot, M.L. (2000): To improve nutrition for the world's population.- Science Washington, 288, 5473, 1966-1967.
- Pimentel, D.S., Raven, P.H. (2000): Bt corn pollen impacts on nontarget Lepidoptera: assessment of effects in nature.- Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 97, 15, 8198-8199.
- Rice, M.E., Pilcher, C.D. (1998): Potential benefits and limitations of transgenic Bt corn for management of the European corn borer (Lepidoptera: Crambidae).- American Entomologist, 44, 2, 75-78.
- Rozman, L. (1997): Pomen koruze v razvoju človeštva.- Sodob. kmetijstvo, 30, 4, 155-158.
- Rozman, L. (1998): Genska banka koruze.- Sodob. kmetijstvo, 31, 2, 71-73.
- Sayers, A.C., Johnson, R.H., Arndt, D.J., Bergman, M.K. (1994): Development of economic injury levels for European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) on corn grown for seed.- J. Econ. Entomol, 87, 2, 458-464.
- Schubbert, R., Hohlweg, U., Renz, D., Doerfler, W. (1998): On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus.- Mol. Gen. Genet., 259, (6), 569-576.
- Schubbert, R., Lettman, C., Doerfler, W. (1994): Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice.- Mol. Gen. Genet. 242, 495-504.
- Scriber, J.M. (2001): *Bt* or non *Bt*: Is that the question? - <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.241503398>.
- Shelton, A.M., Roush, R.T. (1999): False reports and the ears of men.- Nature Biotechnology, 17, 9, 832.
- Snow, A., Morán Palma, P. (1997): Commercialization of Transgenic Plants: Potential Ecological Risks.- BioScience, 47, 2, 86-96.
- Stotzky, G. (2000): Toxins of *Bacillus thuringiensis* in Transgenic Organisms: Persistence and Ecological Effects.- <http://es.epa.gov/ncer/progress/grants/97/envbio/stotzky00.html>.
- Treu, R., Emberlin, J. (2000): Pollen dispersal in the crops Maize (*Zea mays*), Oil seed rape (*Brassica napus ssp. oleifera*), Potatoes (*Solanum tuberosum*), Sugar beet (*Beta vulgaris ssp. vulgaris*) and Wheat (*Triticum aestivum*).- A report for the Soil Association from the National Pollen Research Unit, Univ. College, Worcester, WR2 6AJ, <http://soilassociation.org>.
- Venette, R.C., Hutchison, W.D., Andow, D.A. (2000): An in-field screen for early detection and monitoring of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* in transgenic crops.- Journal of Economic Entomology, 93, 4, 1055-1064.
- Vilar, J.L. (2001): GMO contamination around the world.- Friends of the Earth Intern., Amsterdam, Netherlands.
- Vollenhofer, S., Burg, K., Schmidt, J., Kroath, H. (1999): Detection of genetically modified organisms in food.- Deutsche Lebensmittel Rundschau, 95, (7), 275-278.
- Vrabl, S. (1986): Posebna entomologija, škodljivci poljščin.- BF, VTOZD za agronomijo, Ljubljana, 145 s.
- Vrabl, S. (1992): Škodljivci poljščin.- ČZP Kmečki glas, Ljubljana, 143 p.
- Vrabl, S., Matis, G., Beber, K. (1983): Prispevek k poznavanju koruzne večje v severovzhodni Sloveniji.- Hmeljar, 10, priloga 32-34.
- Wilcke, W.F., Ileleji, K.E., Morey, R.V. (2000): Storability of high-oil and Bt corn varieties.- ASAE Annual International Meeting, Milwaukee, Wisconsin, USA, 9.-12.July 2000, 1-13., ASAE Paper No. 006037.
- Wraight, C.L., Zangerl, A.R., Carroll, M.J., Berenbaum, M.R. (2000): Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions.- Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 97, 14, 7700-7703.