

Latvijas Universitāte, Bioloģijas fakultāte

**Pārskats par Latvijas Republikas Zemkopības
ministrijas Lauku atbalsta dienesta zinātniskā
projekta „Ģenētiski modificēto organismu riska
faktoru un ietekmes uz vidi novērtējums” norisi
2008. gadā**

Rīga, 2008

Satura rādītājs

KOPSAVILKUMS	4
ZM LAD projekta darba grafiks un tā izpilde 2008. gadā	6
ZM LAD projekta 1. etapā 2008. gadā paveiktā darba apraksts	9
Pielikums Nr. 1. Projekta darba grupas sēdes PROTOKOLS 1	11
Pielikums Nr. 2. Projekta darba grupas sēdes PROTOKOLS 2	13
Pielikums Nr. 3. Vides riska novērtējums ĢMO līnijām	16
Kukurūza NK 603	16
Kukurūza 59122x1507xNK603	19
Kukurūza T25	24
Kartupeļi EH92-527-1	26
Pielikums Nr. 4. Krustošanās risku ar Latvijas savvaļas augiem novērtējums	29
Pielikums Nr. 5. ĢMO siltumnīcu un laboratoriju standarti – ārzemju pieredze	30
Pielikums Nr. 6. References materiāls kvantitatīvai un kvalitatīvai ĢMO uztveršanai	31
Pielikums Nr.7. Savvaļas augu bioloģiskās daudzveidības monitoringa plāns un protokols	32
Pielikums Nr. 8. Augsnes indikatormikroorganismi un to analīzes metodes	34
Pielikums Nr. 9. Pārbaudāmo līniju ietekme uz augsnes mikroorganismiem un to monitorings	38
Pielikums Nr. 10. Paraugu ievākšana augsnes mikroorganismu analīzei VPLSI	40
Pielikums Nr.11. Augsnes paraugu molekulāro analīžu rezultāti	41
Pielikums Nr.12. Augsnes mikrobioloģiskās analīzes rezultāti	50
16.06.2008. ievākto augsnes paraugu mikrobioloģiskās izpētes rezultāti	50
28.08.2008. ievākto augsnes paraugu mikrobioloģiskās izpētes rezultāti	71
2008. gada jūnijā un augustā ievākto augsnes paraugu mikrobioloģisko rādītāju salīdzinājums	92
Pielikums Nr. 13. Nezāļu daudzveidības analīze VPLSI	94
Pielikums Nr. 14. N. Rostoka atskaite par dalību konferencē „1st Global Conference on GMO Analysis”	95

Pielikums Nr.15. L. Grantiņas atskaite par dalību kongresā EUROSIL 2008	97
Pielikums Nr.16. N. Rostoka atskaite par dalību konference Plant GEM 7	100
Pielikums Nr.17. EK JRC CRL (Joint Research Center, Community Reference Laboratory) validētās ĢMO uztveršanas metodes konkrētajām līnijām	102

KOPSAVILKUMS

Pārskats par Latvijas Republikas Zemkopības ministrijas Lauku atbalsta dienesta (LR ZM LAD) zinātniskā projekta „Ģenētiski modificēto organismu riska faktoru un ietekmes uz vidi novērtējums” pirmā etapa norisi.

Saskaņā ar Eiropas Padomes direktīvu 2001/18 un Padomes Lēmumu 2002/811 par tirgū laižamo Ģenētiski Modificēto Organismu (ĢMO) ietekmes uz apkārtējo vidi monitoringu, tiek uzsvērts, ka sekmīgam ietekmes novērtējumam ir nepieciešams noteikt bāzes līniju, saskaņā ar kuru tiek salīdzināti ĢMO monitoringa rezultāti. Tāpat pastāv nepieciešamība izvērtēt kumulatīvos tirgū laižamo ĢMO efektus, kas rodas, piemēram, lauksaimniecības kultūru rotācijas rezultātā, vai audzējot dažādas ĢMO kultūras blakus esošos laukos. Latvijai ir saistošas Eiropas Savienības prasības par darbībām ar atzītiem ĢM kultūraugiem, kuru audzēšana, novākšana, uzglabāšana, sagatavošana, iepakšana un transportēšana veicama saskaņā ar LR MK Noteikumiem Nr. 30 „Par prasībām ģenētiski modificēto kultūraugu līdzāspastāvēšanas nodrošināšanai, kā arī uzraudzības un kontroles kārtību”.

Tādējādi pastāv akūta un konkrēta nepieciešamība veikt zinātniskus pētījumus, lai noteiktu bāzes līnijas saskaņā ar kurām varētu noteikt ar ĢMO līdzāspastāvēšanu saistītos riska faktorus un varbūtējo kumulatīvo ietekmi. Gan konvencionālā, gan arī bioloģiskā lauksaimniecība tiešā un netiešā veidā ietekmē apkārtējo vidi. Lai noteiktu ietekmi uz vidi, kas specifiski saistīta ar ĢMO līdzāspastāvēšanu, nepieciešams izstrādāt bāzes līnijas saskaņā ar kurām vērtēt ar ĢMO kultivēšanu saistītos iespējamus riskus.

Darbību uzsākšanai ar ĢM kultūraugiem Eiropas Savienībā ir nepieciešams izstrādāt un apstiprināt monitoringa plānu. Ar ĢM kultūraugu audzēšanu saistītie riski ir atkarīgi gan no noteiktās ĢM kultūras, gan arī no konkrētajā dalībvalstī pastāvošajiem vietējiem apstākļiem, tādiem kā flora un fauna vai lauksaimniecības prakse. Lai nodrošinātu efektīvu un drošu ĢM kultūraugu monitoringu nepieciešams izvērtēt bāzes līniju jeb vides stāvokli.

Projekta pirmajā gadā tika veikta izvēlētu ĢMO līniju dosjē analīze un salīdzinājums ar datiem par Latvijas floru. Uz doto brīdi pieejamie dati liecina, ka dosjē sniegtā informācija ir atbilstoša un, ka nepastāv Latvijas lauksaimniecības apstākļiem specifiski faktori, kas varētu izmainīt atsevišķo ĢM kultūraugu izplatīšanas vidē riskus. Tai pat laikā efektīvam monitoringa programmu

pielietojumam ir uzsākta bāzes līniju izstrāde. Publicēti dati liecina, ka viens no galvenajiem ĢMO riskiem ir saistīts ar to varbūtējo ietekmi uz augsnes mikroorganismiem. Šajā kontekstā projekta ietvaros ir uzsākta augsnes mikroorganismu daudzveidības izvērtēšana bioloģiskās un konvencionālās lauksaimniecības laukos Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūtā (skat. Pielikumus Nr. 8 – 12). Pirmā gada dati parāda atšķirības starp dažādiem izmēģinājuma laukiem un kultūrām, un arī starp dažādiem analīzes periodiem. Lai novērtētu, cik būtiskas ir novērotās atšķirības, šādi izmēģinājumi jāturpina vairāku sezonu garumā un jāpilnveido paraugu ievākšanas metodika. Kopumā projekta gaitā paredzēts iegūt unikālus datus, kuru pielietojums neaprobežosies ar ĢMO bāzes līniju izstrādi. Projekta realizācijai izveidotā darba grupa, kas ietver gan Latvijas Universitātes, gan Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūta zinātniekus veicinās bioloģijas un lauksaimniecības nozaru sadarbību un savstarpēju bagātināšanos. Doktorantūras un maģistratūras studentu piesaiste projekta darbā nodrošina gan jaunās zinātnieku paaudzes veidošanos, gan arī kompetentu jauno speciālistu sagatavošanu valsts pārvaldes un kontroles institūcijām, kuras veic ĢMO līdzāspastāvēšanas nodrošinājumu Latvijas Republikā.

ZM LAD projekta darba grafiks un tā izpilde 2008. gadā

Pielikums ar Zemkopības ministrijas
2007.gada 21.septembra rīkojumu Nr.217
apstiprinātās komisijas sēdes
2008.gada 18.marta
protokolam Nr.1

p. k.	N.	Darba uzdevums (saskaņā ar iesniegto projektu)	Plānotās aktivitātes/ darbības uzdevuma sasniegšanai (ja ilgtermiņa, tad pa gadiem)	Plānotā izpilde (gads/mēnesis)	Faktiskā izpilde (gads/mēnesis)
1.		Darba grupas izveide monitoringa un vides risku novērtējuma analīzei.	Projekta dalībnieku sanāksmes un darba uzdevumu sadale	2008. g. aprīlis – jūnijs	Izpildīts, 2008. g. jūnijs
			Monitoringa un vides risku novērtējuma metodikas apgūšana	2008. gada aprīlis – oktobris	Izpildīts, 2008. gada oktobris
2.		Vides risku novērtējuma analīze (ģenētiskās modifikācijas molekulārā izpēte, ietekmes veids, u.c.), slēdziena sagatavošana par vides risku novērtējumu ĢM kultūraugiem	kukurūzas līnijai - 59122 x 1507 x NK603	2008. gada aprīlis	Izpildīts, 2008. g. jūnijs
			kukurūzas līnijai - NK603	2008. gada maijs	Izpildīts, 2008. g. jūnijs
			kukurūzas līnijai – T 25	2008. gada jūnijs	Izpildīts, 2008. g. jūnijs
			kartupeļu līnijai - EH92-527-1	2008. gada jūlijs	Izpildīts, 2008. g. jūlijs
3.		Savvaļas augu kolekcijas izveide LU Botāniskajā dārzā, lai noteiktu potenciālos krustojanos riskus ĢM kultūraugiem, kas minēti 2.punktā.	ĢM kultūraugiem radniecīgo savvaļas augu apzināšana Latvijā	2008. gada jūlijs	Izpildīts, 2008. g. jūlijs
			ĢM kultūraugiem radniecīgo savvaļas augu kolekcijas izveide LU BD	2008. gada septembris	Izpildīts, 2008. gada septembris
			ĢM kultūraugiem radniecīgo savvaļas augu uzturēšana LU BD (ilgtermiņa)	2008. – 2011. gads	Uzsākta 2008. gada augustā
4.		ĢM kultūraugu, kas minēti 2.punktā, mainīgo rādītāju noteikšana (bāzes līnijas).	Bāzes līniju noteikšanas pieredzes apgūšana	2008. gada oktobris	Izpildīts, 2008. gada oktobris
5.		Laboratorijas telpu un eksperimentālo siltumnīcu sagatavošana ĢM kultūraugu, kas minēti 2.punktā, audzēšanai LU Bioloģijas fakultātē un Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūtā.	Iepazīšanās ar prasībām laboratorijas telpām	2008. gada augusts	Izpildīts, 2008. gada septembris
			Iepazīšanās ar prasībām siltumnīcu telpām	2008. gada augusts	Izpildīts, 2008. gada septembris
			Bioanalītisko metožu laboratorijas telpu sagatavošana darbam ar ĢMO	2008. gada septembris	Izpildīts, 2008. gada septembris

		VPLSI siltumnīcas sagatavošana darbam ar ĢMO	2008. gada oktobris	Pabeigta jumta nomaiņa, 2008. gada septembris
6.	Izmēģinājumu veikšana siltumnīcās ar ĢM kultūraugiem, kas minēti 2.punktā un to salīdzināšana ar nemodificētajiem kultūraugiem.	ĢM kukurūzu un kartupeļu sēklmateriāla iegāde	2008. gada oktobris	Iegādāts ĢM kukurūzas un kartupeļu references materiāls, 2008. g. augusts
		Siltumnīcas izmēģinājumu iekārtošana ĢM kultūraugiem (ilgtermiņa)	2009. – 2011. gads	Pabeigts siltumnīcas renovācijas 1. etaps, iegādāti materiāli augsnes sagatavošanai
7.	ĢM kultūraugu, kas minēti 2.punktā, noteikto bāzes līniju precizēšana un monitoringa programmas pielāgošana, ņemot vērā rezultātus, kas iegūti saskaņā ar 6.punktā noteiktajām darbībām.	Monitoringa programmas pielāgošana Latvijas apstākļiem	2008. gada jūlijs	Uzsākta un tiks turpināta atkarībā no 6. punktā paredzēto aktivitāšu rezultātiem
		Bāzes līniju un monitoringa veidlapu precizēšana (ilgtermiņa)	2008. – 2011. gads	Turpinās darbs pie monitoringa veidlapu precizēšanas
8.	Lauka izmēģinājumu veikšana ar salīdzināmām nemodificētām kultūrām. Izolācijas attālumu un buferjoslu noteikšana ĢM kultūraugiem, kas minēti 2.punktā.	ĢM un tiem radniecīgo kultūraugu iespējamā krustošanās riska izvērtējums	2008. gada oktobris	Izpildīts, 2008. gada oktobris
		Izolācijas attālumu un buferjoslu efektivitātes izvērtējums (ilgtermiņa)	2008. – 2011. gads	Uzsākts
9.	Siltumnīcas, lauka izmēģinājumu un to tuvākās apkārtnes apsekošana, lai novērtētu ietekmi uz nemērķa organismiem (piemēram, augiem, kukaiņiem un augsnes mikroorganismiem).	Molekulāro analīžu rezultātu analīze, lai noteiktu ĢM kultūraugiem un tiem radniecīgo augu krustošanās risku iespējamību	2008. gada septembris	Apgūta metodika molekulāro analīžu veikšanai
		Augsnes mikroorganismu bioloģiskās daudzveidības analīze izmēģinājuma laukā un siltumnīcā (ilgtermiņa)	2008. – 2011. gads	Pabeigta 1. sezonas augsnes mikroorganismu daudzveidības analīze
		Savvaļas augu bioloģiskās daudzveidības analīzes lauksaimniecības lauku tuvumā (ilgtermiņa)	2008. – 2011. gads	Sagatavota pētījumu metodika savvaļas augu bioloģiskās daudzveidības analīzei
		Bišu un citu kukaiņu pētījumi izmēģinājuma lauka tuvumā (ilgtermiņa)	2008. – 2011. gads	Atlikts uz 2009. gadu

10.	ĢM kultūraugu, kas minēti 2.punktā, nekontrolētas izplatīšanās veida (piemēram, Latvijas klimatiskie un ģeogrāfiskie apstākļi, pārziemošanas spējas u.c.) analīze.	ĢM un nemodificēto kultūraugu pārziemošanas spējas novērtējums (ilgtermiņa)	2008. – 2011. gads	Notiek sagatavošanās 2009. gada pavasarim
11.	Monitoringa rezultātu apkopojums, datu analīze, rekomendāciju izstrāde monitoringa pilnveidošanai, izolācijas attālumu un buferjoslu noteikšana ĢM kukurūzai un kartupeļiem.	Ilgtermiņa	2008. – 2011. gads	Uzsākta
12.	ĢM kultūraugu kumulatīvās ietekmes novērtēšana, atbilstoši 1. – 4. gadā iegūtajiem rezultātiem.	Ilgtermiņa	2008. – 2011. gads	Uzsākta

ZM LAD projekta 1. etapā 2008. gadā paveiktā darba apraksts

1. Izveidota projekta darba grupa, kurā piedalās zinātnieki un studenti no Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedras, LU Bioloģijas fakultātes Bioanalītisko metožu laboratorijas, Latvijas Mikroorganismu kultūru kolekcijas, Latvijas Universitātes Botāniskā dārza un Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūta. Projekta darba organizēšanai notika divas sanāksmes, viena Latvijas Universitātē, otra Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūtā (sanāksmju protokolus skatīt Pielikumos Nr. 1 un Nr. 2).
2. Apkopota vides riska novērtējuma analīze par 4 ĢMO augu šķirnēm un sagatavots slēdziens par šo šķirņu vides risku saskaņā ar apstiprināto darba grafiku (skat. Pielikumu Nr. 3).
3. Apkopota informācija par Latvijas florā sastopamajiem savvaļas augiem, kuriem varētu pastāvēt krustošanās riski ar ĢMO kartupeļiem. Uzsākts darbs pie savvaļas augu, kam pastāv krustošanās risks ar ĢM kartupeļiem, kolekcijas izveides LU Botāniskajā dārzā (skat. Pielikumu Nr. 4).
4. Apmeklējot Skotijas Lauksaimniecības augu pētniecības institūtu (2008. gada 19. – 21. jūnijs un 2. – 30. septembris), Dandija, Skotija, Lielbritānija tika iegūti materiāli par prasībām, kas izvirzāmas laboratoriju un siltumnīcu ēkām darbam ar transgēniem augiem ierobežotas izmantošanas apstākļos (skat. Pielikumu Nr. 5).
5. Piedaloties konferencē „1st Global Conference on GMO Analysis”, Komo, Itālija (2008. gada 24. – 28. jūnijs) tika iegūta informācija par iespējam iegādāties references materiālu (augu materiālu, genomisko un plazmīdu DNS) no noteiktām ĢMO līnijām. References materiāla pieejamība ir būtiska ĢMO uztveršanas metožu apguvei, kā arī references materiāls ir svarīgs kvantitatīvai ĢMO uztveršanai pārtikā, īpaši gadījumos, kad tas ietekmē pārtikas marķējumu (skat. Pielikumu Nr. 6 un Nr. 14). Par projekta līdzekļiem ir iegādāts darba uzdevumos minēto ĢMO līniju references materiāls un nepieciešamie reaģenti molekulāro analīžu veikšanai. Ir apkopota informācija par validētām ĢMO uztveršanas metodēm (Pielikums Nr. 17).
6. Pabeigts siltumnīcas renovācijas pirmais etaps Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūtā, kura laikā tika izveidots jauns polikarbonāta jumta segums un pusautomātiska ventilācijas sistēma (darbus veica SIA „Siltumnīca” Latvijas Universitātes iepirkuma LU 2008/I-114 ietvaros). Lai sagatavotu siltumnīcu ĢMO izmēģinājumu prasībām, 2009. gada II. kvartālā jāiekārto noslēgti boksi un ventilācijas sistēmas filtri, kā arī autonoma apūdeņošanas un notekūdeņu savākšanas sistēma.
7. Apkopota informācija par augsnes mikroorganismu analīzes metodēm to daudzveidības noteikšanai, kā arī metodēm rekombinantās DNS uztveršanai augsnes DNS paraugos. Apkopota informācija par pārbaudāmo līniju ietekmi uz augsnes mikroorganismiem (skat. Pielikumus Nr. 8 un Nr. 9).
8. 2008. gada jūnijā un augustā ievākti augsnes paraugi augsnes mikroorganismu bāzes līniju noteikšanai Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūtā un veiktas to

mikrobioloģiskās un molekulāri bioloģiskās analīzes (skat. Pielikumus Nr. 10 – Nr. 12). Augsnes mikroorganismu mikrobioloģiskās un molekulārbioloģiskās analīzes uzrādīja gan atšķirības starp lauksaimniecības veidiem un kultūrām (laukiem), gan arī sezonālas atšķirības, taču jāņem vērā, ka šie rezultāti iegūti tikai vienā lauka sezonā 2 mēnešu laikā. Projekta gaitā 2009. – 2011. gadā paredzēts darbu turpināt, pilnveidojot paraugu ievākšanas un analīzes metodiku.

9. Uzsākts darbs pie savvaļas augu sugu daudzveidības izvērtējuma. Izvērtēta nezāļu daudzveidība Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūtā (skat. Pielikumu Nr. 13), kā arī izstrādāta savvaļas augu uzskaites metodika (Pielikums Nr. 7). Lielāka nezāļu sugu daudzveidība tika konstatēta bioloģiskajos laukos, lai gan VPLSI izmēģinājumos herbicīdi netiek pielietoti. Šie dati jāņem vērā novērtējot ĢMO ietekmi uz nemodificētu kultūru sējumiem bioloģiskajā un konvencionālajā lauksaimniecībā. Jāizvērtē arī, kā dažādas kultūras un to audzēšanas ilgums ietekmē bioloģisko daudzveidību. Tāpat jāturpina nezāļu daudzveidības uzskaitē, lai novērtētu to daudzveidību bioloģiskajā un konvencionālajā lauksaimniecībā ilgstošākā laika periodā. Par minēto tēmu tiek izstrādāta doktora disertācija. Tāpat tika konstatēta dažu kondicionālo nezāļu (kultūraugu) klātbūtne bioloģiskajos laukos, kas raksturo dažu kultūraugu sugu pārziemošanas spējas.
10. Piedaloties kongresā EUROSOL 2008 Vīnē, Austrijā (2008. gada 24. – 30. augusts) gūtas atziņas par analīzes metodēm ĢMO ietekmes izvērtēšanai, kā arī aplūkoti augsmes mikroorganismus populācijas raksturojoši parametri, ko ĢMO ietekmē (skat. Pielikumu Nr. 15).
11. Piedaloties 7. Augu genomikas konferencē Albenā, Bulgārijā (2008. gada 24. – 27. septembris) iegūta aktuālākā informācija par bioloģiskās drošības jautājumiem attiecībā uz ĢMO, aplūkotas esošās un perspektīvās ĢMO uztveršanas metodes, ĢMO risku samazināšanas iespējas, kā arī cisģenēzes tehnoloģijas (skat. Pielikumu Nr. 16).

Kopumā projekta pirmajā etapā uzsākts intensīvs darbs pie izvirzīto un darba grafikā apstiprināto uzdevumu izpildes. Uz doto brīdi ir izpildīti visi izvirzītie uzdevumi, izņemot izvēlēto ĢMO līniju sēklmateriāla iegādi par kuru notiek pārrunas. Projekta realizācijas gaitā nav novērotas būtiskas novirzes no izpildes grafika. Lai nodrošinātu racionālu pirmajā projekta gadā ieguldīto līdzekļu atdevi, nepieciešams turpināt projekta finansējumu 2009. – 2011. gadā saskaņā ar projekta pieteikumā norādīto finansējuma plānu.

Kopā ar atskaiti iesniegti 17 pielikumi.

Projekta vadītājs: _____ /Nils Rostoks/
Rīga, 2008. gada 31. oktobrī

Pielikums Nr. 1. Projekta darba grupas sēdes PROTOKOLS 1

Priekuļi, Zinātnes iela 1
2008.gada 30.maijā, plkst. 9:00

Nr.1

Sēdē piedalās:

Projekta vadītājs, vadošais pētnieks Nils Rostoks
Vadošais pētnieks Ilze Skrabule
Vadošais pētnieks Līvija Zariņa
SIA „Siltumnīca” pārstāvis

Sēdi protokolē: vad. pētnieks Nils Rostoks

1. Par projekta Nr. L-2476-090 „Ģenētiski modificēto organismu riska faktoru un ietekmes uz vidi novērtējums” realizāciju Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūtā.

N. Rostoks informē, ka ir izveidota darba grupa projekta realizācijas nodrošināšanai. Projekta realizācijā piedalās LU Bioloģijas fakultātes zinātniskie darbinieki, LU Botāniskā dārza un Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūta darbinieki. Projektam ir piesaistīti doktorantūras studenti, kuriem tiek dota iespēja projekta ietvaros izstrādāt doktorantūras darba daļu.

2. Tikšanās ar SIA „Siltumnīca” pārstāvi un renovējamās siltumnīcas apskate.

Tikšanās gaitā tiek apsekota renovējamā siltumnīca. SIA „Siltumnīca” pārstāvis tiek informēts par renovācijas plānu, projekta mērķiem un pieejamajiem finansu līdzekļiem. Ņemot vērā iepriekšējās aplēses, tiek plānots 2008. gada laikā atjaunot siltumnīcas jumta segumu. Tiek panākta vienošanās, ka SIA „Siltumnīca” iesniegs aptuveno tāmi 2008. gada jūnija laikā.

3. Par projekta mērķiem un darba uzdevumu izpildes grafiku 2008. gadam.

N. Rostoks informē par projektā izvirzīto mērķi – novērtēt ģenētiski modificēto organismu (ĢMO) riska faktorus un potenciālo ietekmi uz apkārtējo vidi. Vides risku novērtējumu plānots veikt trim kukurūzas un vienai kartupeļu līnijai. Šīm līnijām nepieciešams sagatavot slēdzienu par vides risku novērtējumu un noteikt bāzes līnijas. LU Botāniskajā dārzā nepieciešams izveidot kartupeļiem radniecīgo savvaļas augu kolekciju. Laboratorijas telpas darbam ar augiem iekārtotas LU Bioanalītisko metožu laboratorijā, Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūtā notiks eksperimentālās siltumnīcas renovācija.

N. Rostoks uzsver, ka līdz 15.07.2008 nepieciešams iesniegt izskatīšanai starppārskatu LR Zemkopības ministrijas Jauno pārtiku nodaļā. LR ZM apstiprinātu starppārskatu līdz 1.08.2008 jāiesniedz Lauku atbalsta dienestā. Līdz 1.11.2008 LR ZM jāiesniedz gala atskaite. Apstiprinātu atskaiti kopā ar visu finansu dokumentu kopijām līdz 1.12.2008 nepieciešams iesniegt Lauku atbalsta dienestā.

4. Par plānotajām projekta aktivitātēm .

N. Rostoks informē par 2008. gada darba grafiku, kas saskaņots ar ZM Biotehnoloģijas un jaunās pārtikas nodaļu.

N. Rostoks, I. Skrabule un L. Zariņa apspriež iespējas Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūtā veikt lauka izmēģinājumus ar ģenētiski nemodificētām kultūrām. Izmēģinājumus ar ĢMO varētu veikt siltumnīcās. N. Rostoks informē, ka

iespējas iegūt ĢMO līnijas ir ierobežotas. Par ĢMO līniju iegādāšanos iespējams interesēties kompānijās, kuras šīs līnijas ir izstrādājušas, alternatīva ir interesēties laboratorijā Itālijā, kuras īpašumā ir ĢMO līnijas.

Projekta darba grupas sēde slēgta plkst. 12:00.

Projekta vadītājs

N. Rostoks

Pielikums Nr. 2. Projekta darba grupas sēdes PROTOKOLS 2

Rīgā, Kronvalda bulvārī 4
2008.gada 03.jūnijā, plkst. 9:00

Nr.2

Sēdē piedalās:

Projekta vadītājs, vadošais pētnieks Nils Rostoks
Vadošais pētnieks Vizma Nikolajeva
Asoc. prof. Voldemārs Spuņģis
Asistente Lelde Grantiņa
Asistente Lauma Strazdiņa
Asistente Anna Ramata-Stunda
Laborante Baiba Ieviņa

Sēdi protokolē: asistente A. Ramata-Stunda

1. Par projekta Nr. L-2476-090 darba grupas izveidi

N. Rostoks informē, ka ir izveidota darba grupa projekta realizācijas nodrošināšanai (skat. protokolam pievienoto sarakstu). Projekta realizācijā piedalās LU Bioloģijas fakultātes zinātniskie darbinieki, LU Botāniskā dārza un Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūta darbinieki. Projektam ir piesaistīti doktorantūras studenti, kuriem tiek dota iespēja projekta ietvaros izstrādāt doktorantūras darba daļu.

2. Par projekta mērķiem un darba uzdevumu izpildes grafiku 2008. gadam.

N. Rostoks informē par projektā izvirzīto mērķi – novērtēt ģenētiski modificēto organismu (ĢMO) riska faktoros un potenciālo ietekmi uz apkārtējo vidi. Vides risku novērtējumu plānots veikt trim kukurūzas un vienai kartupeļu līnijai. Šīm līnijām nepieciešams papildināt slēdzienu par vides risku novērtējumu un noteikt bāzes līnijas. LU Botāniskajā dārzā nepieciešams izveidot savvaļas augu kolekciju. Laboratorijas telpas darbam ar augiem iekārtotas LU Bioanalītisko metožu laboratorijā, Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūtā notiks eksperimentālās siltumnīcas renovācija.

N. Rostoks uzsver, ka līdz 15.07.2008 nepieciešams iesniegt izskatīšanai starppārskatu LR Zemkopības ministrijas Biotehnoloģijas un jaunās pārtikas nodaļā. LR ZM apstiprinātu starppārskatu līdz 1.08.2008 jāiesniedz Lauku atbalsta dienestā. Līdz 1.11.2008 LR ZM jāiesniedz gala atskaite. Apstiprinātu atskaiti kopā ar visu finanšu dokumentu kopijām līdz 1.12.2008 nepieciešams iesniegt Lauku atbalsta dienestā.

B.Ieviņa informē par slēdziena sagatavošanu – ir savākta nepieciešamā informācija par trim kukurūzas un vienu kartupeļu līniju. Informāciju nepieciešams apkopot. B.Ieviņa informē par šo līniju īpašībām.

N. Rostoks informē, ka nepieciešams sagatavot kartupeļiem radniecīgo savvaļas augu sugu sarakstu.

3. Par plānotajām projekta aktivitātēm.

N. Rostoks informē par 2008. gada darba grafiku kā tas saskaņots ar ZM Biotehnoloģijas un jaunās pārtikas nodaļu.

N. Rostoks informē, ka Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūtā ir iespējas veikt lauka izmēģinājumus ar ģenētiski nemodificētām kultūrām. Izmēģinājumus ar ĢMO varētu veikt siltumnīcās.

V. Nikolajeva un L. Grantiņa informē par iespējām projekta ietvaros analizēt augsnes mikrofloras izmaiņas. N. Rostoks informē, ka par projekta līdzekļiem iespējams iegādāties arī noteiktu daudzumu reaģentus un materiālus augsnes mikroorganismu analīzei.

L. Grantiņa izsaka priekšlikumu sadarbībai ar lauksaimniekiem projekta realizācijas ietvaros. N. Rostoks informē, ka projekta attiecināmajos izdevumos ietilpst minerālmēsli un degviela, ko varētu kompensēt VPLSI par dalību projektā.

V. Nikolajeva jautā par iespējām iegūt ĢMO līnijas eksperimentu veikšanai.

N. Rostoks informē, ka iespējas iegūt ĢMO līnijas ir ierobežotas. Par ĢMO līniju iegādāšanos iespējams interesēties kompānijās, kuras šīs līnijas ir izstrādājušas, alternatīva ir interesēties laboratorijā Itālijā, kuras īpašumā ir ĢMO līnijas.

V. Spunģim tiek jautāts par iespējām veikt entomoloģisku pētījumu. V. Spunģis precīzāk par iespējām veikt šādu pētījumu informēs vēlāk.

V. Spunģis informē par lauka izmēģinājumu, ko sadarbības partneri cita projekta ietvaros veic Vācijā.

V. Nikolajeva jautā, vai projekta ietvaros nav paredzētas publicitātes aktivitātes. N. Rostoks informē, ka pašreiz publicitātes pasākumi nav paredzēti, bet iespējams tie būs nepieciešami vēlāk projekta realizācijas gaitā.

A. Ramata-Stunda ierosina painteresēties, vai līdzīgi pētījumi tiek veikti Igaunijā un Lietuvā.

V. Spunģis jautā vai par projekta līdzekļiem iespējams uz zināmu periodu abonēt literatūras datubāzi. N. Rostoks informē, ka projekta tāmē vēl iespējams paredzēt datubāzes abonēšanai nepieciešamos izdevumus, un uzdod V. Spunģim precizēt abonēšanas izmaksas.

Projekta darba grupas sēde slēgta plkst. 10:00.

Projekta vadītājs

N.Rostoks

Protokolētājs

A.Ramata-Stunda

Projekta darba grupas sastāvs

Vārds, Uzvārds	Amats	Institūcija	Kompetence
Nils Rostoks	Vad. pētnieks	LU BF	Darba grupas vadītājs, ĢMO uztveršanas molekulārās metodes
Vizma Nikolajeva	Vad. pētnieks	LU BF	Augsnes mikroorganismu mikrobioloģiskās analīzes
Ilze Skrabule	Vad. pētnieks	VPLSI	Izmēģinājumu iekārtošana kartupeļiem
Līvija Zariņa	Vad. pētnieks	VPLSI	Izmēģinājumu iekārtošana krustziežiem
Anta Sparinska	Direktore	LU BD	ĢM kultūraugiem radniecīgo savvaļas augu identifikācija
Lelde Grantiņa	Asistente	LU BF	Augsnes mikroorganismu molekulārās analīzes
Anete Keiša	Asistente	LU BF	ĢMO ierobežota izmantošana
Dace Piliksere	Asistente	VPLSI	Nezāļu analīze bioloģiskajā un

			konvencionālajā lauksaimniecībā
Lauma Strazdiņa	Asistente	LU BD	ĢM kultūraugiem radniecīgo savvaļas augu identifikācija
Anna Ramata-Stunda	Asistente	LU BF	ĢMO literatūras analīze, projekta dokumentācijas un atskaišu sagatavošana
Baiba Ieviņa	Laborante	LU BF	EPNI vides risku novērtējumu analīze

LU BF – Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultāte

LU BD – Latvijas Universitātes Botāniskais dārzs

VPLSI – Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūts

Pielikums Nr. 3. Vides riska novērtējums ĢMO līnijām

Kukurūza NK 603

Komerčiālais nosaukums: Roundup Ready® Maize
Identifikātors: MON-00603-6
Iegūtās īpašības: Herbicīda glifosfāta tolerance
Paredzētais pielietojums: Pārtika un dzīvnieku barība
Ievietotie gēni: *epsps* gēns (*Agrobacterium tumefaciens* līnija CP4)
Transformācija: NK603
Transformācijas metode: Biolītiskā metode (auga šūnu apšaušana ar mikrodaļiņām)
Informācija par firmu: Monsanto, ASV.

Tabula 3-1. Ģenētiski modificētajā līnijā ievietotie gēni, to produkti, donororganisms, iegūtā īpašība, kā arī gēna promoters, terminators un kopiju skaits.

Gēns	Nosaukums	Donororganisms	Īpašība	Promoters	Terminators	Kopijas
CP4 <i>epsps</i>	5-enolpiruvilšiki -māt-3-fosfāta sintetāze	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> CP4	Herbicī- da glifosfā- ta tolerance	P-ract1/ract1 introns, kas satur rīsu aktīna 1 promoteru, transkripcijas starta vietu un <i>epsps</i> gēna hloroplastu transporta proteīnu (CTP2).	<i>A. tumefaciens</i> nopalīna sintāzes (<i>nos</i>) 3'- poliadenilācij as signāls	1
CP4 <i>epsps</i>	5-enolpiruvilšiki -māt-3-fosfāta sintetāze	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> CP4	Herbicī- da glifosfā- ta tolerance	Uzlabots CaMV 35S, kukurūzas HSP70 introns un <i>A. thaliana</i> <i>epsps</i> gēna hloroplastu transporta proteīns (CTP2)	<i>A. tumefaciens</i> nopalīna sintāzes (<i>nos</i>) 3'- poliadenilācij as signāls	1

CaMV – Ziedkāpostu mozaīkas vīruss

HSP70 – kukurūzas karstuma šoka proteīna introns

Ģenētiskās modifikācijas raksturojums:

Kukurūzas līnija NK603 iegūta transformējot hibrīdu kukurūzas līniju LH82xB73 ar DNS fragmentu, kas satur divas EPSPS ekspresijas kasetes, kuras katra satur vienu gēna *cp4* kopiju ar atšķirīgām regulācijas sekvencēm. Abās kasetēs atrodas arī hloroplastu transporta proteīns (CTP2, izolēts no *Arabidopsis thaliana* EPSPS) CP4 EPSPS proteīna nogādāšanai no kodola uz hloroplastiem. Vektors satur arī *nptII* baktēriju selekcijas marķieri (kanamicīna rezistencei, kas iegūts no prokariotu transpozona *Tn5*) un replikācijas rajonu (*ori*).

Ģenētiskās modifikācijas rezultāts:

Vienā NK603 inserta galā ir daži molekulārie pārkārtojumi, bez tam inserts ietver hloroplastu DNS fragmentu.

- Šie pārkārtojumi un hloroplastu DNS insercija nenoved pie jaunām īpašībām. Maz ticams, ka insercijas rezultātā veidotos jauni proteīni, turklāt bioinformātikas analīzes parāda, ka šiem proteīniem nebūtu homoloģijas ar zināmiem toksīniem vai alergēniem
- Ģenētiskās modifikācijas rezultātā, NK603 sastāv no diviem nedaudz atšķirīgiem CP4 EPSPS proteīniem, kas ir ekspresēti no divām gēna *cp4 epsps* kopijām, izmantojot atšķirīgus promoterus. Pirmā kopija ir identiska oriģinālajai plazmīdai, ko izmantoja transformācijā, bet otra atšķiras par 2 nukleotīdiem, kas izraisa vienas aminoskābes nomaiņu. Šīs izmaiņas ietekmes analīze ar bioinformātikas metodēm, *in vitro* eksperimenti un eksperimenti ar laboratorijas dzīvniekiem norāda, ka nav notikušas nekādas saskatāmas izmaiņas proteīna struktūrā, aktivitātē, toksicitātē vai alergenitātē.
- Ņemot vērā, ka hloroplastu un mitohondriju gēnu pārnese uz kodola genomu notiek arī dabiski, Eiropas Pārtikas nekaitīguma iestādes (EPNI) Ģenētiski Modificēto Organismu Zinātniskā Grupa (The Scientific Panel on Genetically Modified Organisms) neuzskata, ka jebkuram NK603 organellu gēnam vai gēna produktam var būt palielināts risks salīdzinot ar organellu gēniem nemodificētajās līnijās.
- Deviņu paaudžu segregācijas dati liecina, par ievietotā DNS stabilitāti.

Uztveršanas metode: Gadījuma specifiska reālā laika kvantitatīvā PĶR (Event specific real-time quantitative PCR)

Vides riska novērtējums:

Informācija par auga bioloģiju un agronomiskajām īpašām kalpo kā references punkts, lai noteiktu modificētās līnijas potenciālo izmaiņu līmeni.

LH82 x B73 (B73) var tikt lietots kā kontroles hibrīds NK603 līnijai, jo tā ģenētiskais fons ir salīdzināms ar NK603 līniju molekulārajām un sastāva analīzēm, bet tam trūkst gēni, kas kodē CP4 EPSPS proteīnus.

Kukurūzas *Zea mays* reprodukcijas īpatnības:

- Krustošanās pašapputes ceļā ar vēja starpniecību.
- Putekšņu dzīvotspēja ir apmēram 30 minūtes.
- Putekšņi ir apaļi, smagi un satur daudz ūdens.
- Kukurūza ir tiktāl domesticēta, ka tā nav spējīga izdzīvot vidē bez kultivēšanas.
- Eiropā kukurūzai nav krustošanai saderīgu savvaļas radnieku.

Šīs kukurūzas reproduktīvās īpatnības ierobežo putekšņu izplatību un līdz ar to ģenētiskās modifikācijas potenciālo pārnesanu uz citiem augiem.

Ietekme uz konkurētspēju:

Izņemot herbicīda glifosfāta rezistenci NK603 neuzrāda nekādas citas priekšrocības attiecībā uz invazitāti vai dzīvotspēju salīdzinot ar tradicionālajām līnijām.

Ietekme uz ne mērķa organismiem:

Nekādi videi bīstami toksiski savienojumi līnijā NK603 nav novēroti. Nav sagaidāmi nekādi nelabvēlīgi efekti uz ne mērķa organismiem, kas būtu atšķirīgi no konvencionālajām kukurūzas līnijām.

Veselības riska novērtējums:

Uzturvērtība. Sastāva analīze parāda, ka līnija NK603 un kontroles līnija atšķiras ar sešām aminoskābēm un stearīnskābes līmeni. Tomēr šīs atšķirības nav konstantas visās izmēģinājumu vietās un tās var uzskatīt par nejaušām variācijām. Visas sastāva analīzes variācijas iekļaujas netransformētu komerciālo līniju rādītāju robežās. Tiek uzskatīts, ka uzturvērtība NK603 modifikācijai ir ekvivalenta tā nemodificētajai vecāku līnijai, kā arī sastāva ziņā tā ir līdzvērtīga nemodificētām kukurūzas līnijām.

Toksigenitāte. CP4 EPSPS gēns kodē 455 aminoskābju garu polipeptīdu, kuram ir 50% aminoskābju līdzība ar analogu augu EPSPS enzīmu. EPSPS enzīms ir sastopams lielā daļā augu, sēņu un konkrētos mikroorganismos, tādēļ cilvēkiem ir gara vēsturiska pieredze saskarsmē ar šo proteīnu. Nekādi nelabvēlīgi efekti saistībā ar tā uzņemšanu nav identificēti. CP4 EPSPS proteīna salīdzināšana ar zināmiem toksīniem un alergēniem neatklāja nekādu līdzību proteīnu starpā.

Alerģenitāte. Proteīnu CP4 EPSPS kodējošais gēns nav cēlies no organisma, kas izraisītu zināmas alergiskas reakcijas, kā arī tam nav sekvenču līdzība ar zināmiem alergēniem.

Projekta darba grupas slēdziens par kukurūzas līniju NK 603

Izvērtējot EPNI riska novērtējuma ziņojumu, darba grupa pievienojas secinājumam, ka NK 603 kukurūzas līnijai nepiemīt nekādi vides vai veselības riski, kas būtiski atšķirtos no konvencionālās kukurūzas. Uz doto brīdi nav datu, ka NK 603 kukurūzas līnijai būtu kādi Latvijai specifiski vides vai veselības riski. Krustošanās riski ar citām augu sugām Eiropā un Latvijā nepastāv kukurūzas reproduktīvo īpatnību un radniecīgu sugu trūkuma dēļ. Krustošanās riski ar citām nemodificētām kukurūzas šķirnēm pastāv un to novēršanai nepieciešams ievērot MK noteikumus Nr.30 no 15.01.2008 noteiktās buferjoslas. Kukurūzas apputeksnēšanās dabā normāli notiek ar vēja palīdzību. Tādējādi kukurūzai nav pielāgojumu apputeksnējošo kukaiņu pievilināšanai, tādu kā nektāra ražošana. Bites un citi kukaiņi var nonākt kontaktā ar kukurūzas putekšņiem, kas satur B.t. toksīnu, tomēr eksperimentāli izpētīts, ka B.t. toksīns nav toksisks bitēm un to kāpuriem koncentrācijās, kādās tas varētu tikt uzņemts kāpuru augšanas procesā (<http://www.gmo-safety.eu/en/news/527.docu.html>). Kukurūzas līnija NK 603 nesatur B.t. toksīnu, savukārt toleranci pret herbicīdu glifosfātu nosakošajam enzīmam nav zināmas kaitīgas ietekmes uz bitēm vai citiem kukaiņiem. Inserta stabilitāte transgēnajā kukurūzas līnijā NK 603 ir pārbaudīta 9 paaudžu garumā, kas ir pārlicinošs pierādījums šīs līnijas stabilitātei. Plazmīda, kuru izmantoja ģenētiskajā modifikācijā saturēja kanamicīna rezistences gēnu *nptII*, taču transgēnā NK 603 līnija šo antibiotiku rezistences gēnu nesatur.

Kukurūza 59122x1507xNK603

Komerčiālais nosaukums: Herculex XTRA™ x NK603
Identifikātors: DAS-Ø15Ø7-1 x DAS-59122-7 x MON-ØØ6Ø3-6
Iegūtās īpašības: Rezistence pret noteiktiem vaboļu un tauriņu kārtas (*Coleoptera* un *Lepidoptera*) kaitēkļiem un glifosfāta un glufozināta amonija tolerance.

Paredzētais pielietojums: Pārtika un dzīvnieku barība

Ievietotie gēni:

cry1F - **Lepidoptera rezistence**

Donororganisms: *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*

cp4 epsps - **Glifosfāta tolerance**

Donororganisms: *Agrobacterium tumefaciens* līnija CP4

pat - **Glifosfāta tolerance**

Donororganisms: *Streptomyces viridochromogenes*

cry34Ab1 - **Coleoptera rezistence**

Donororganisms: *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*

cry35Ab1 - **Coleoptera rezistence**

Donororganisms: *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*

Transformācija: TC1507 x DAS-59122 x NK603

Transformācijas metode: Biolītiskā metode (auga šūnu apšaušana ar mikrodaļiņām)

Informācija par firmu: DOW AgroSciences LLC and Pioneer Hi-Bred International Inc.

Tabula 3-2. Ģenētiski modificētajā līnijā ievietotie gēni, to produkti, donororganisms, iegūtā īpašība, kā arī gēna promoters, terminators un kopiju skaits.

Gēns	Produkts	Donororganisms	Īpašība	Promoters	Terminātors	Kopijas
<i>Pat</i>	Fosfinotricīna N-acetiltransferāze	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Herbicīda glofozināta amonija tolerance	Ziedkāposta mozaīkas vīruss CaMV 35S	CaMV 35S 3' poliadenilācijas signāls	1 funkcionāla
CP4 <i>epsps</i>	5-enolpiruvilšikimāt-3-fosfāta sintēze	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> CP4	Herbicīda glifosfāta tolerance	P-ract1/ract1 introns, kas satur rīsu aktīna 1 promoteru, transkripcijas starta vietu un <i>epsps</i> gēna hloroplastu transporta proteīnu (CTP2).	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> nopalīna sintāzes (<i>nos</i>) 3'-poliadenilācijas signāls	1

Gēns	Produkts	Donororganisms	Īpašība	Promoters	Terminātors	Kopijas
CP4 <i>epsps</i>	5-enolpiruvilšikimāt-3-fosfāta sintetāze	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> CP4	Herbicīda glifosfāta tolerance	Uzlabots CaMV 35S, kukurūzas HSP70 introns un <i>A. thaliana epsps</i> gēna hloroplastu transporta proteīns (CTP2)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> nopalīna sintāzes (nos) 3'-poliadenilācijas signāls	1
<i>cryIFa</i> 2	Kriptohroms 1F, delta-endotoksīns	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Aizawai</i>	Rezistence pret Eiropas kukurūzas svilni (<i>Ostrinia nubilalis</i>) un citām noteiktām tauriņu kārtas (<i>Lepidoptera</i>) sugām	Kukurūzas (<i>Zea mays</i>) ubikvitīna (<i>ubi</i>) gēna promoters un pirmais eksons un introns	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ORF25 3' poliadenilācijas signāls	1 funkcionāla; 1-2 daļēji;
<i>cry34Ab1</i>	Cry34Ab1 delta-endotoksīns	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain PS149B1	Rezistence pret vaboļu kārtas (<i>Coleoptera</i>)	Kukurūzas (<i>Zea mays</i>) ubikvitīna gēna promoters, introns and 5' UTR	<i>Solanum tuberosum</i> proteīnāzes inhibitors II (PINII)	1 funkcionāla
<i>cry35Ab1</i>	Cry35Ab1 delta-endotoksīns	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain PS149B1	Rezistence pret vaboļu kārtas (<i>Coleoptera</i>) sugām	Kviešu (<i>Triticum aestivum</i>) peroksidāzes gēna sakņu specifiskais (root-preferred) promoters	<i>Solanum tuberosum</i> proteīnāzes inhibitors II (PINII)	1 funkcionāla

CaMV – Ziedkāpostu mozaīkas vīruss

HSP70 – kukurūzas karstuma šoka proteīna introns

Ģenētiskās modifikācijas raksturojums:

Insektu rezistentā un herbicīdu tolerantā kukurūzas līnija 59122x1507xNK603 ir hibrīds, kas iegūts, krustojot modificētās kukurūzas līnijas DAS-59122-7xDAS-01507 un MON-00603-6, izmantojot tradicionālās krustojšanas metodes. Hibrīds satur piecus jaunus proteīnus: insektu rezistence panākta ievieojot *cry34Ab1*, *cry35Ab1* un *cryIF* gēnus no augsnes baktērijas *Bacillus thuringiensis*, bet herbicīdu glifosfāta un glufozināta amonija rezistence ievieojot *cp4 epsps* gēnu no

Agrobacterium ssp. līnijas CP4 un *pat* gēnu no *Streptomyces viridochromogenes*. Proteīni Cry34Ab1 un Cry35Ab1 hibrīdā iegūti no modificētās līnijas DAS-59122-7, proteīns Cry1F no līnijas TC1507, proteīnu PAT satur līnijas DAS-59122-7 un TC1507, bet proteīnu CP4 EPSPS satur līnija NK603.

Tradicionālajā krustošanā iesaistītās modificētās līnijas:

Kukurūza 59122 iegūta transformācijā ar *Agrobacterium* starpniecību. Transformācijas iznākums ir stabila T-DNS insercija kukurūzas genomā. T-DNS reģions satur gēnu *cry34Ab1*, *cry35Ab1* un *pat* kodējošās sekvences un gēnu ekspresijai nepieciešamos regulatoros komponentus.

Kukurūza 1507 iegūta ievietojot lineāru DNS fragmentu (inserts PHI8999A) ar mikrodaļiņu bombardēšanas metodi, kas satur *cry1F* un *pat* kodējošās sekvences un nepieciešamās regulatoros komponentus. Kukurūza 1507 ekspresē proteīnus Cry1F un PAT, kas piešķir rezistenci pret noteiktiem *Lepidoptera* kaitēkļiem, piemēram, Eiropas kukurūzas svilni (*Ostrinia nubilalis*) un *Sesamia* spp. un herbicīda glufozināta amonija toleranci.

Kukurūzas līnija NK603 iegūta ievietojot lineāru DNS fragmentu (inserts PVZMGT32L), kas satur divas *cp4 epsps* gēna kopijas, kas izolētas no augsnes baktērijas *Agrobacterium tumefaciens* CP4 līnijas izmantojot mikrodaļiņu bombardēšanas metodi. Transformācijas rezultātā kukurūzas līnija NK603 ekspresē CP4 EPSPS proteīnu, kas piešķir herbicīda glifosfāta toleranci.

Vektors satur antibiotiku rezistences marķiergēnus – *tet*, *spc* un *nptII* gēnus, lai atlasītu mikroorganismus, kas satur transformētās plazmīdas. Gēns *tet* piešķir rezistenci pret antibiotiku tetraciklīnu, gēns *spc* piešķir rezistenci pret antibiotiku spektinomīcīnu, bet gēns *nptII* piešķir rezistenci pret antibiotiku kanamicīnu. Šie antibiotiku rezistences gēni nav ienesti recipientorganismā.

Ģenētiskās modifikācijas rezultāts:

Southern blotting analīzes pierāda, ka visi gēni hibrīdā ir ienesti tikai vienā kopijā un visas modificēto vecāku līniju pazīmes ir stabili iedzimstošas hibrīdā 59122x1507xNK603. Proteīni Cry34Ab1, Cry35Ab1, Cry1F, PAT un CP4 EPSPS hibrīdā 59122x1507xNK603 tiek ekspresēti lapās, saknēs, stublājā un graudos. Eksperimentos apstiprināts, ka visi proteīni hibrīdā tiek stabili ekspresēti.

Uztveršanas metode:

Kukurūzas līnija 59122x1507xNK603 iegūta, izmantojot tradicionālās krustošanas metodes un tajā nav ienestas jaunas ģenētiskās modifikācijas. Tādēļ 59122x1507xNK603 uztveršanai izmanto tās pašas PĶR metodes kā kukurūzas līnijām 59122, 1507 un NK603.

Vides riska novērtējums:

Kukurūzas *Zea mays* reprodukcijas īpatnības:

- Krustošanās pašapputes ceļā ar vēja starpniecību.
- Putekšņu dzīvotspēja ir apmēram 30 minūtes.
- Putekšņi ir apaļi, smagi un satur daudz ūdens.
- Kukurūza ir tiktāl domestificēta, ka tā nav spējīga izdzīvot vidē bez kultivēšanas.
- Eiropā kukurūzai nav krustošanai saderīgu savvaļas radnieku.

Šīs kukurūzas reprodukcijas īpatnības ierobežo putekšņu izplatību un līdz ar to ģenētiskās modifikācijas potenciālo pārnesanu uz citiem augiem.

Ietekme uz konkurētspēju:

Veicot pētījumus secināts, ka hibrīds 1507x9122xNK603 būtiski neatšķiras no nemodificētajām vecāku līnijām, morfoloģisko un augšanas īpatnību, aukstuma tolerances, pārziemošanas spējas, auglības un putekšņu izmēra ziņā, rezistence pret

noteiktiem *Lepidoptera* un *Coleoptera* kaitēkļiem nav pietiekama, lai kukurūza varētu izdzīvot ārpus lauksaimniecības platībām, un plaša spektra herbicīdi glufozināta amonijs un glifosfāts netiek normāli lietoti ārpus lauksaimniecības zemēm. Secināts, ka 59122x1507xNK603 nepiemīt paaugstināta konkurētspēja, salīdzinot ar nemodificētajām kukurūzas līnijām.

Ietekme uz ne mērķa organismiem:

Konstatēts, ka nav sagaidāmi nekādi nelabvēlīgi efekti uz ne mērķa organismiem, kas būtu atšķirīgi no konvencionālajām kukurūzas līnijām.

Veselības riska novērtējums:

Ievietotajiem gēniem un to produktiem ir drošas pielietošanas vēsture un tie ir izgājuši pārbaudi un apstiprināšanu vairākās ĢMO uzraudzības iestādēs. Hibrīdā nav novērota mijiedarbība starp gēnu produktiem un negatīvi sinerģiski efekti nav sagaidāmi.

Uzturvērtība. 59122x1507xNK603 sastāva analīze parādīja, ka modificētajai līnijai proteīnu, šķiedrvielu, ogļhidrātu, taukvielu, minerālvielu, vitamīnu un pārējo vielu sastāvs ir ekvivalents nemodificēto līniju sastāvam un atrodas literatūrā minēto normu robežās.

Toksigenitāte. Līnija 59122x1507xNK603 ir tradicionālās krustošanas rezultāts un tajā nav ieviesta jauna ģenētiskā modifikācija. Tādējādi 59122x1507xNK603 ekspresēto proteīnu drošums jau iepriekš ir novērtēts un apstiprināts vairāku zinātnisko pētījumu gaitā.

Proteīniem Cry34Ab1 un Cry35Ab1 piemīt specifiska toksicitāte tikai pret noteiktiem *Coleoptera* kaitēkļiem un nav liecības par to kaitīgo ietekmi uz cilvēku vai dzīvnieku veselību. Proteīnam Cry1F piemīt specifiska toksicitāte pret noteiktām *Lepidoptera* kaitēkļu sugām, un toksicitātes pētījumi apstiprinājuši šī proteīna drošumu cilvēku un dzīvnieku veselībai. Gēns *pat* iegūts no *Streptomyces viridochromogenes* Tū494 līnijas, kurai nav zināms toksisks vai patogēns potenciāls un toksicitātes pētījumi pierādījuši tā nekaitīgumu. Gēns *cp4 epsps* oriģināli iegūts no *Agrobacterium* sp. CP4 līnijas, kurai nav zināms toksisks vai patogēns potenciāls.

Alerģenitāte. Pētījumu rezultāti apstiprina, ka nevienam no proteīniem Cry34Ab1, Cry35Ab1, Cry1F, PAT un CP4 EPSPS nepiemīt risks būt potenciāli alergēniem. Turklāt, ne *Bacillus thuringiensis* (gēnu *cry34Ab1*, *cry35Ab1* un *cry1F* avots), ne *Streptomyces viridochromogenes* (gēna *pat* avots), ne arī *Agrobacterium* sp. CP4 līnijai nav fiksēti alergijas izraisīšanas gadījumi.

Projekta darba grupas slēdziens par kukurūzas līniju 59122x1507xNK603

Izvērtējot EPNI riska novērtējuma ziņojumu, darba grupa pievienojas secinājumam, ka 59122x1507xNK603 kukurūzas līnijai nepiemīt nekādi vides vai veselības riski, kas būtiski atšķirtos no konvencionālās kukurūzas. Uz doto brīdi nav datu, ka 59122x1507xNK603 kukurūzas līnijai būtu kādi Latvijai specifiski vides vai veselības riski. Krustošanās riski ar citām augu sugām Eiropā un Latvijā nepastāv kukurūzas reproduktīvo īpatnību un radniecīgu sugu trūkuma dēļ. Krustošanās riski ar citām nemodificētām kukurūzas šķirnēm pastāv un to novēršanai nepieciešams ievērot MK noteikumos Nr.30 no 15.01.2008 noteiktās buferjoslas. Kukurūzas apputeksnēšanās dabā normāli notiek ar vēja palīdzību. Tādējādi kukurūzai nav pielāgojumu apputeksnējošo kukaiņu pievilināšanai, tādu kā nektāra ražošana. Bites un citi kukaiņi var nonākt kontaktā ar kukurūzas putekšņiem, kas satur B.t. toksīnu, tomēr eksperimentāli izpētīts, ka B.t. toksīns nav toksisks bitēm un to kāpuriem koncentrācijās, kādās tas varētu tikt uzņemts kāpuru augšanas procesā (<http://www.gmo-safety.eu/en/news/527.docu.html>). Toleranci pret herbicīdu glifosfātu nosakošajam enzīmam nav zināmas kaitīgas ietekmes uz bitēm vai citiem kukaiņiem. Līnija 59122x1507xNK603 iegūta no trijām dažādām transgēnās

kukurūzas līnijām tradicionālās krustošanas ceļā. Katrai no šīm izdejas līnijām ir drošas lietošanas vēsture. Līnija 59122x1507xNK603 ir autorizēta izmantošanai pārtikā un dzīvnieku uzturā, kā arī audzēšanai vairākās valstīs, piemēram, Lielbritānijā. Plazmīda, kuru izmantoja ģenētiskajā modifikācijā saturēja spektinomicīna, tetraciklīna un kanamicīna rezistences gēnus *spc*, *tet* un *nptII*, taču transgēnā līnija 59122x1507xNK603 nevienu no šiem antibiotiku rezistences gēniem nesatur.

Kukurūza T25

Komerčiālais nosaukums: Liberty Link™ Maize
Identifikators: ACS-ZM003-2
Iegūtās īpašības: Glufozināta amonija tolerance, kas ir aktīvs savienojums fosfīnotricīna (phosphinothricin (PPT)) herbicīdos.
Paredzētais pielietojums: Pārtika, pārstrāde (ciete, eļļa, milti) un dzīvnieku barība
Ievietotie gēni: *pat* – glufozināta tolerance (*Streptomyces viridochromogenes*)
Transformācija: T25
Transformācijas metode: Protoplastu transformācija
Informācija par firmu: Bayer CropScience, Francija

Tabula 3-3. Ģenētiski modificētajā līnijā ievietotie gēni, to produkti, donororganisms, iegūtā īpašība, kā arī gēna promoters, terminators un kopiju skaits.

Gēns	Nosaukums	Donororganisms	Īpašība	Promoters	Terminators	Kopijas
<i>Pat</i>	Fosfīnotricīna N-acetiltransferāze	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Herbicīda glufozināta amonija tolerance	CaMV 35S	CaMV 35S 3' poliadenilācijas signāls	1

CaMV – Ziedkāpostu mozaīkas vīruss

Vektors satur arī gēnu *bla* (beta laktamāzes gēns), kuru izmanto kā selekcijas marķieri.

Ģenētiskās modifikācijas raksturojums:

Līnija T25 satur vienu *pat* gēna kopiju; saīsinātu, nefunkcionējošu baktērijas *AmpR* gēna kopiju (gēns, kas kodē beta-laktamāzi – enzīmu, kas nodrošina rezistenci pret dažām beta-laktāma antibiotikām, ieskaitot vidēja spektra penicilīna un ampicilīna antibiotikas), kā arī *E.coli* plazmīdas pUC18 replikācijas rajonu.

Ģenētiskās modifikācijas rezultāts:

Pētījumi pierāda, ka notikusi stabila ienestā DNS fragmenta integrācija auga genomā un stabila pārmantojamība nākamajās paaudzēs.

Modificētajā līnijā T25 apmēram 25% *ampR* gēna ir trūkstošs un tādēļ ampicilīna rezistences proteīna ekspresija nenotiek. Gēna *pat* produkts fosfīnotricīna acetiltransferāze nav sastopama cilvēku, dzīvnieku, zarnu mikroorganismu vai tradicionālajos pārtikā vai dzīvnieku barībai izmantojamajos augos.

Uztveršanas metode: Gadījuma specifiska reālā laika kvantitatīvā PĶR (Event specific real-time quantitative PCR).

Vides riska novērtējums:

Kukurūzas *Zea mays* reprodukcijas īpatnības:

- Krustošanās pašapputes ceļā ar vēja starpniecību.
- Putekšņu dzīvotspēja ir apmēram 30 minūtes.
- Putekšņi ir apaļi, smagi un satur daudz ūdens.
- Kukurūza ir tiktāl domestificēta, ka tā nav spējīga izdzīvot vidē bez kultivēšanas.
- Eiropā kukurūzai nav krustošanai saderīgu savvaļas radnieku.

Šīs kukurūzas reprodukcijas īpatnības ierobežo putekšņu izplatību un līdz ar to ģenētiskās modifikācijas potenciālo pārvešanu uz citiem augiem.

Ietekme uz konkurētspēju:

Nemot vērā, ka neviena cita reproduktīvā vai augšanas īpašība līnijai T25 netika mainīta un rezistence pret glufozināta amoniju dabiskajā vidē nedod nekādas priekšrocības, tiek uzskatīts, ka modificētajai līnijai T25 nav paaugstinātas konkurētspējas salīdzinot ar nemodificētajām kukurūzas līnijām. Kā arī nav novērotas kvalitatīvas atšķirības uzņēmībā pret insektiem un slimībām starp T25 un nemodificētām līnijām.

Ietekme uz ne mērķa organismiem:

PAT enzīmam, kas atbild par glufozināta amonija toleranci, ir ļoti specifiska enzimatiskā aktivitāte, kas neietekmē paša auga metabolismu. Modificēto augu degradācijas un pazemes ūdeņu piesārņošanas rezultātā potenciāli radītais risks augsnes mikroorganismiem un augsnes funkcionēšanai tiek uzskatīts par ļoti zemu. .

Veselības riska novērtējums:

Augsnes bakērija *Streptomyces viridochromogenes* nav patogēna cilvēkam vai dzīvniekiem.

Sastāva analīze un uzturvērtība. Vispārējais proteīnu saturs līnijas T25 graudos un visā augā kopumā ir būtiski augstāks nekā nemodificētajās kontrolēs. Bet statistiskās atšķirības tiek skaidrotas ar faktu, ka transformētā līnija nebija pilnīga kontroles augu izolīnija un tādējādi variācijas cēlušās no ģenētiskajām atšķirībām, kas ar transformāciju nav saistītas. Visos gadījumos proteīnu un arī uzturvielu saturs ir kukurūzas publicēto rādītāju normas robežās.

Alerģenitāte un toksicitāte. Sekvenču salīdzinājums norāda, ka PAT proteīnam nav homologijas ar zināmiem alergēniem, kā arī nav pierādījumu par PAT proteīna toksicitāti.

Projekta darba grupas slēdziens par kukurūzas līniju T25

Izvērtējot EPNI riska novērtējuma ziņojumu, darba grupa pievienojas secinājumam, ka T25 kukurūzas līnijai nepiemīt nekādi vides vai veselības riski, kas būtiski atšķirtos no konvencionālās kukurūzas. Uz doto brīdi nav datu, ka T25 kukurūzas līnijai būtu kādi Latvijai specifiski vides vai veselības riski. Krustošanās riski ar citām augu sugām Eiropā un Latvijā nepastāv kukurūzas reproduktīvo īpatnību un radniecīgu sugu trūkuma dēļ. Krustošanās riski ar citām nemodificētām kukurūzas šķirnēm pastāv un to novēršanai nepieciešams ievērot MK noteikumus Nr.30 no 15.01.2008 noteiktās buferjoslas. Kukurūzas apputeksnēšanās dabā normāli notiek ar vēja palīdzību. Tādējādi kukurūzai nav pielāgojumu apputeksnējošo kukaiņu pievilināšanai, tādu kā nektāra ražošana. Bites un citi kukaiņi var nonākt kontaktā ar kukurūzas putekšņiem, kas satur B.t. toksīnu, tomēr eksperimentāli izpētīts, ka B.t. toksīns nav toksisks bitēm un to kāpurim koncentrācijās, kādās tas varētu tikt uzņemts kāpuru augšanas procesā (<http://www.gmo-safety.eu/en/news/527.docu.html>). Līnija T25 nesatur B.t. toksīnu, bet toleranci pret herbicīdu glufozināta amoniju nosakošajam enzīmam fosfīnotrisīna acetiltransferāzei nav zināmas kaitīgas ietekmes uz bitēm vai citiem kukaiņiem. Līnija T25 satur daļu ampilīna rezistences gēna, taču tas ir nepilnīgs, bez tam tā ekspresiju regulē baktēriju promoters, kurš nedarbojas augu (eikariotu) šūnās. Tādējādi ampilīna rezistences ekspresija T25 līnijā nav sagaidāma. PAT proteīnam, kurš katalizē L-glufozināta acetilēšanu, ir augsts substrāta specifiskums, kas nozīmē, ka tas nespēj saistīties ar citām šūnā sastopamām molekulām. Tādējādi sagaidāms, ka tā ietekme uz nemērķa organismiem būs nebūtiska.

Kartupeļi EH92-527-1

Komerčiālais nosaukums: Modified starch Potato

Identifikātors: BPS-25271-9

Iegūtās īpašības: Palielināts amilopektīna saturs cietē
Kanamicīna rezistence

Ievietotie gēni:

- *gbss* - *Solanum tuberosum*
- *nptII* - *Escherichia coli*

Vecāklīnija: *Solanum tuberosum* šķirne Prevalent

Transformācija: EH92-527-1

Transformācijas metode: Ar *Agrobacterium tumefaciens* starpniecību veikta transformācija

Paredzētais pielietojums: Amilopektīna ražošanai (blakusprodukti – dzīvnieku barībai)

Informācija par firmu: Amylogen HB (BASF Plant Science), Zviedrija.

Tabula 3-4. Ģenētiski modificētajā līnijā ievietotie gēni, to produkti, donororganisms, iegūtā īpašība, kā arī gēna promoters, terminators un kopiju skaits.

Gēns	Nosaukums	Donororganisms	Īpašība	Promoters	Terminators	Kopijas
<i>gbss</i>	Granulām piesaistīta cietes sintāze	<i>Solanum tuberosum</i> (pretējā virzienā ievietots gēns)	Samazināts amilozes saturs cietē	<i>Solanum tuberosum</i> <i>gbss</i> gēna promotera fragments	<i>A. tumefaciens</i> nopalīna sintāzes (<i>nos</i>) 3'-poliadenilācijas signāls	1

Vektors satur arī gēnu *nptII* (neomicīna fosfotransferāzes gēns no *Escherichia coli*) kanamicīna rezistencei, ko izmanto kā baktēriju selekcijas marķieri.

Ģenētiskās modifikācijas raksturojums:

Izmainīts cietes sastāvs - augstāka amilopektīna/amilozes attiecība.

- samazināts amilozes saturs un līdz ar to palielināts amilopektīna saturs kartupeļa bumbuļos

gbss gēns – ievietots pretējā virzienā (antisense direction), kas inaktivē natīvo gēnu, izraisot cietes produkciju, kura satur maz vai nesatur amilozi vispār.

Molekulārās analīzes liecina, ka EH92-527-1 satur divas daļējas DNS fragmenta kopijas, jo inserts, ieskaitot flankējošos rajonus ir dublicēts un ievietots apgrieztā orientācijā.

Ģenētiskās modifikācijas rezultāts:

Amilozes saturs modificētajā līnijā EH92-527-1 ir 2% salīdzinot ar ~15% vecāku šķirnē Prevalent, amilopektīna saturs ir 98% salīdzinot ar 85% nemicētajā Prevalent. Gēna *nptII* ienešanas rezultātā, EH92-527-1 piemīt kanamicīna rezistence un iespējams arī rezistence pret neomicīnu un geneticīnu. Pētījumi rāda, ka nekādas citas vektora DNS sekvences daļas nav ienestas auga genomā ārpus T-DNS. Sekvenējot ievietoto DNS sekvenci atrada trīs bāzes, kas atšķīrās no vektora sekvences, no kurām viena ir aminoskābi mainošā aizvietošana. Ģenētiskās

modifikācijas rezultātā EH92-527-1 producē tikai vienu jaunu proteīnu neomicīna fosfotransferāzi, bet gēns *gbss* apgrieztā orientācijā tikai bloķē natīvā gēna aktivitāti.

Uztveršanas metode: Gadījuma specifiska reālā laika kvantitatīvā PQR (Event specific real-time quantitative PCR).

Vides riska novērtējums:

Kartupeļi pieder pie zema riska kultūraugiem gēnu pārneses ziņā.

Kartupeļu *Solanum tuberosum* reprodukcijas īpatnības:

- pašappute: 80-100% gadījumu
- samazināta putekšņu fertilitāte vai pat sterilitāte
- ziedi attīstās ļoti reti (pat ja attīstās tie ir sīki un izkropļoti)
- neražo nektāru: bites neietekmē; kamesnes piesaista putekšņi, bet tās lido tikai nelielus attālumus
- krustošanās ar citām kartupeļu šķirnēm: iespējama
- lai gan Latvijas teritorijā ir kartupeļu savvaļas radnieki (*Solanum nigrum* (Melnā naktene) un *Solanum dulcamara* (Bebrukārklis)) krustošanās nav iespējama, jo *S.tuberosum* ir tetraploīds.

EH92-527-1 un mātes klonam Prevalent ziedi attīstās nepilnīgi un tie tiek priekšlaicīgi nomesti, kā arī putekšņlapas gandrīz neražo putekšņus.

Ietekme uz konkurētspēju:

Kartupeļiem ir ļoti zema konkurētspēja ārpus lauka, kurā tie tiek audzēti, tādēļ tā invazitāte praktiski nav iespējama. Palielināts amilopektīna saturs un samazināts amilozes saturs cietē netiek uzskatīts par iemeslu, lai palielinātos EH92-527-1 konkurētspēja. No otras puses, palielināts cukura saturs teorētiski varētu palielināt sala izturību. Palielināta sala izturība var dot bumbuļiem uzlabotu spēju pārdzīvot ziemu un tādējādi konkurēt ārpus lauka apstākļos. Tomēr uz lauka veiktie sala tolerances eksperimenti parādīja, ka EH92-527-1 un Prevalent izturas vienādi, EH92-527-1 nav nekādas priekšrocības attiecībā uz izturību pret salu, dzīvotspēju vai dīgļspēju. Atšķirības, kas novērotas klonam EH92-527-1 attiecībā uz vitamīna C un glikoalkaloīdu saturu ir citu kartupeļu šķirņu variācijas robežās, tādēļ šo vielu izmainītais saturs nevarētu ietekmēt EH92-527-1 konkurētspēju, salīdzinot ar konvencionālajiem kartupeļiem. Klona EH92-527-1 uzņēmība un izturība pret slimībām un kaitēkļiem identiska kā šķirnei Prevalent.

Ietekme uz mērķa organismiem:

EH92-527-1 nav mērķa organismu.

Ietekme uz ne mērķa organismiem:

Neviens pētījums nav pierādījis jebkādu būtisku atšķirību starp Prevalent un EH92-527-1 ietekmi uz ne mērķa organismiem. Tomēr Zviedrijas Lauksaimniecības padome (Swedish Board of Agriculture) uzskata, ka izmainītam cietes sastāvam varētu būt iespējama ietekme uz noteiktiem augsnes mikroorganismiem. Palielināts cukura saturs un samazināts glikoalkaloīdu saturs iespējami var izraisīt lielākus kaitēkļu uzbrukumus kartupeļiem. Tomēr vairāku gadu lauka izmēģinājumi nav norādījuši uz šādām atšķirībām.

Ietekme uz bioģeokīmiskajiem procesiem:

Ir rezultāti, kas norāda, ka atšķirīgs cietes sastāvs var radīt nelielas augsnes mikrofloras sastāva izmaiņas.

Veselības riska novērtējums:

Uzturvērtība. Analizējot EH92-527-1 sastāvu, netika atrastas statistiski būtiskas atšķirības lielākajā daļā pārbaudīto vielu. EH92-527-1 satur vairāk cukuru un

vitamīna C un mazāk glikoalkoloīdu salīdzinot ar šķirni Prevalent. Visu pārējo parametru analīzē nenovēroja atšķirības.

Risks cilvēka veselībai. EH92-527-1 nav paredzēts izmantot pārtikai, tādēļ būtiski ir to turēt ārpus pārtikas ķēdes. Ciete, kas bagāta ar amilopektīnu nerada veselības risku veselam normālam patērētājam. Tomēr sazarotā cietes molekula (amilopektīns) tiek sagremota ātrāk nekā atbilstošā nezarotā cietes molekula (amiloze). Tas varētu radīt nevēlamus efektus piemēram, diabēta pacientiem, kam notiktu straujāka glikozes līmeņa celšanās asinīs nekā lietojot citus kartupeļus. EH92-527-1 producē tikai vienu jaunu proteīnu – NptII, kas neuzrāda ne toksiskas, ne alergēnas īpašības un tiek uzskatīts par drošu cilvēku patēriņam.

Dzīvnieku veselības risks. Amilopektīna ražošanas blakusprodukti, kurus paredzēts izmantot dzīvnieku barībai, tiek uzskatīti par ekvivalentu nemodificētajiem produktiem, un tiek uzskatīts, ka nekāds risks dzīvnieku veselībai nepastāv.

Projekta darba grupas slēdziens par kartupeļu līniju EH92-527-1

Izvērtējot EPNI riska novērtējuma ziņojumu, darba grupa pievienojas secinājumam, ka EH92-527-1 kartupeļu līnijai nepiemīt nekādi vides vai veselības riski, kas būtiski atšķirtos no konvencionāliem kartupeļiem. Uz doto brīdi nav datu, ka EH92-527-1 kartupeļu līnijai būtu kādi Latvijai specifiski vides vai veselības riski. Tomēr EPNI riska novērtējuma ziņojumā norādīts, ka atšķirīgais amilozes saturs var ietekmēt augsnes mikroorganismus. Šo novērojumu būtu nepieciešams pārbaudīt eksperimentāli. Kartupeļi ir pārsvarā pašapputes augs, kas introducēts no Dienvidamerikas, un tiem tuvu radniecību sugu Latvijā nav. Kultivētie kartupeļi ir tetraploīdi atšķirībā no citām attāli radniecīgajām nakteņu (*Solanum*) dzimtas sugām, tādējādi pat pieļaujot krustošanās iespēju, šādi hibrīdi būtu neauglīgi (skat. 4. pielikumu). Tādējādi var uzskatīt, ka krustošanās riski ar savvaļas sugām ir nebūtiski. Izejas šķirne Prevalent un transgēnā līnija EH92-527-1 veido ļoti nelielu skaitu ziedu ar samazinātu putekšņu daudzumu, bez tam kartupeļi ir pašapputes augi. Tādējādi krustošanās riski ar nemodificētām kartupeļu līnijām ir nelieli. Krustošanās risku tālākai novēršanai nepieciešams ievērot MK noteikumus Nr.30 no 15.01.2008 noteiktās buferjoslas. Jāņem vērā, ka kartupeļu pavairošana notiek ar bumbuļiem, nevis sēklām. Tātad gadījumā, ja arī notiktu nemodificēto kartupeļu apputeksnēšana ar EH92-527-1 putekšņiem, šādi augi atstātu tikai normālus, nemodificētus bumbuļus. Līnija EH92-527-1 satur kanamicīna rezistenci piešķirošo neomicīna fosfotransferāzes gēnu *nptII*, kas tika izmantots transgēno augu atlasei. Tādējādi transgēnajiem augiem ir selektīvas priekšrocības, augot uz substrāta, kas satur kanamicīnu un, iespējams, arī citas aminoglikozīdu antibiotikas, piemēram, neomicīnu vai geneticīnu, taču normālos kultivēšanas apstākļos šai īpašībai nav nozīmes. Baktērijām piemīt spēja sintezēt dažādas antibiotikas, kas tām nodrošina selektīvas augšanas priekšrocības, ja tām vienlaicīgi piemīt rezistence pret konkrēto antibiotiku. Antibiotiku rezistence ir normāla parādība dažādās mikroorganismu grupās, tai skaitā izturība pret kanamicīnu (<http://www.gmo-compass.org/eng/glossary/>). Līnijā EH92-527-1 ievadītais kanamicīna rezistences gēns ir pielāgots ekspresijai auga šūnās, kas nozīmē, ka atšķirīgo regulācijas elementu dēļ, nonākot baktēriju šūnās tas nevarētu veidot proteīnu. Iespēja, ka kanamicīna rezistence no transgēnajiem kartupeļiem tiks pārnesta uz augsnes vai gremošanas trakta mikroorganismiem horizontālās gēnu pārnesei ir ļoti neliela un ja arī šāda pārnese notiktu, tad baktērijas nekļūtu rezistentas pret kanamicīnu. Transgēnās līnijas izplatīšanās riskus mazina arī agronomiskā prakse. Augsnē saglabājušies transgēno kartupeļu bumbuļi visdrīzāk nepārcietīs ziemu, taču gadījumā, ja tie izdzīvotos līdz pavasarim, tie vai nu ies bojā augsnes sagatavošanas laikā citai kultūrai, vai arī neatstās pēcnācējus augot, piemēram, rapša laukā.

Pielikums Nr. 4. Krustošanās risku ar Latvijas savvaļas augiem novērtējums

Novērtējums tika veikts sekojošām ĢMO līnijām:

1. kukurūzas līnija – NK 603;
2. kukurūzas līnija - 59122 x 1507 x NK 603;
3. kukurūzas līnija – T25;
4. kartupeļu līnija - EH92-527-1.

Latvijas florā nav natīvu vai introducētu augu sugu, kuras varētu krustoties ar kukurūzu (*Zea mays*). Lai gan kukurūza pieder pie graudzāļu dzimtas *Poaceae*, kuras pārstāvji ir plaši sastopami Latvijā gan savvaļā, gan kā lauksaimniecības kultūraugi, tomēr kukurūzas radniecība ar pārējām Latvijā sastopamajām *Poaceae* sugām ir attāla un pieejamie literatūras dati liecina, ka krustošanās risks dabiskos apstākļos nepastāv.

Ar kartupeli (*Solanum tuberosum*) potenciāli varētu krustoties vienīgi citi *Solanaceae* dzimtas augi. *Solanaceae* dzimtā starpģinšu krustošanās savvaļā notiek reti. Lielāka iespēja ir savstarpējai krustošanai starp vienas ģints sugām. Tā kā kartupelis ir *Solanum* ģintī, tad potenciāli krustošanās varētu notikt ar savvaļas *Solanum* sugām. Tādas Latvijā ir piecas:

1. bebrukārklīšs (*Solanum dulcamara*);
2. dzeltenā naktene (*S. luteum*);
3. melnā naktene (*S. nigrum*);
4. ragainā naktene (*S. cornutum*);
5. žodzeņlapu naktene (*S. sisymbriifolium*).

No šīm sugām trīs Latvijā sastopamas ļoti reti vai konstatētas tikai vienu reizi, konkrēti, dzeltenā naktene, ragainā naktene, žodzeņlapu naktene. Tādējādi krustošanās risku ar šīm sugām var novērtēt kā ārkārtīgi zemu. Bebrukārklīšs un melnā naktene ir bieži sastopamas sugas, to ziedēšanas laiks sakrīt ar kartupeļa ziedēšanas laiku, taču biotopi ir dažādi, galvenokārt nesaistīti ar kultivētām platībām. Ir ziņojumi, ka abas sugas atrastas arī sakņu dārzos un grāvmalās, kas potenciāli varētu robežoties ar lauksaimniecības zemēm. Abas sugas atrodamas botāniskā dārza indigo augu kolekcijā, tādējādi sēklas vai spraudēni augu materiāla pavairošanai krustošanās riska novērtējumam iegūstami LU Botāniskajā dārzā.

Bez *Solanum* ģints, *Solanaceae* dzimtā Latvijā sastopamas vēl 8 ģintis, no kurām četras, *Nicandra*, *Lycium*, *Atropa* un *Scopalia*, Latvijā sastopamas ļoti reti, bet *Lycopersicon* un *Physalis* ir viengadīgi dārzeņģī. Tādējādi krustošanās riski ar šo ģinšu sugām vērtējami kā zemi. No atlikušajām 2 ģintīm Latvijā sastopamas vēl 2 sugas, melnā driģene (*Hyoscyamus niger*) un parastais velnābols (*Datura stramonium*). Par šo sugu krustošanās risku ar *Solanum tuberosum* dati netika atrasti, taču ņemot vērā, ka kultivētais kartupelis (arī ĢMO) ir tetraploīds, var paredzēt, ka krustošanās risks ir zems. Abas sugas pieejamas LU Botāniskā dārza kolekcijā, tādējādi vajadzības gadījumā pastāv iespēja novērtēt krustošanās risku ar *Solanum tuberosum*.

Sēklu gatavības periodā ir ievāktas bebrukārklīņa *Solanum dulcamara*, melnās naktenes *Solanum nigrum*, melnās driģenes *Hyoscyamus niger* un parastā velnābola *Datura stramonium* sēklas. Līdz sēšanai sēklas tiks uzglabātas LU Botāniskā dārza Sēklu laboratorijā piemērotos apstākļos.

Sēklas plānots iesēt 2009. gada pavasarī, martā – aprīlī, LU Botāniskā dārza siltumnīcā. Optimālais kolekcijas apjoms tiks konkretizēts un atbilstoši tam tiks sagatavots nepieciešamais skaits stādu. Ir sagatavots lauks kolekcijas izstādīšanai āra apstākļos.

Pielikums Nr. 5. ĢMO siltumnīcu un laboratoriju standarti – ārzemju pieredze

Komandējuma laikā 2008. gada jūnijā projekta vadītājs N. Rostoks iepazinās ar siltumnīcu un laboratorijas telpu kompleksu darbam ar ĢMO Skotijas Lauksaimniecības augu pētniecības institūtā (SCRI). Laboratoriju un siltumnīcu korpuss darbam ar transgēniem organismiem SCRI tika izveidots 2000. gadā. Komplekss ir vairāk nekā 500 m² liels un tā kopējas izmaksas bija vairāk nekā 1.5 miljoni Lielbritānijas mārciņu. Ēku komplekss nodrošina pilnu ciklu darbam ar transgēniem augiem. Laboratoriju korpusā ir kameras darbam ar augu audu kultūrām, kā arī augu audzēšanas klimata kameras. Kopā ar siltumnīcām tādējādi tiek nodrošināts pilns augu audzēšanas cikls. Siltumnīcas ir slēgtas – gaisa apmaiņu un dzesēšanu vasarās nodrošina ventilācijas sistēma. Izejošais gaiss tiek filtrēts, lai novērstu augu sēklu un putekšņu nonākšanu apkārtējā vidē. Siltumnīcā ir trīs drošības līmeņi. Pirmais līmenis ir visi koridori, kā arī telpas transgēno augu audzēšanai, kuru riski ir novērtēti kā zemi (piemēram, ĢM augi, kas satur citu augu gēnus). Notekūdeņi no pirmā līmeņa netiek īpaši apstrādāti. Notekūdeņi no otrā un trešā drošības līmeņa telpām tiek savākti un nepieciešamības gadījumā tos iespējams apstrādāt pirms novadīšanas kopējā kanalizācijas sistēmā. Otrais un trešais drošības līmenis piemērots darbam ar ĢM augiem, kuri satur citu organismu gēnus, kā arī ar transgēniem augu patogēniem, kas nonākot vidē varētu radīt nozīmīgu kaitējumu videi. Otrā un trešā līmeņa telpās tiek nodrošināts pazemināts spiediens, lai novērstu sēklu un putekšņu izplatīšanos. Visas augu atliekas un augsne pēc eksperimenta beigām tiek apstrādātas autoklāvā pirms nonākšanas ārvidē. Mitruma un elektrības sistēmu kontroles elementi un pievadi novietoti ārpus augu audzēšanas telpā koridoros, tādējādi nodrošinot tiem vienkāršu pieeju apkopes vajadzībām. Taču jāņem vērā, ka katrai siltumnīcas telpai iekārtojot atsevišķu apūdeņošanas, kanalizācijas un apgaismojuma sistēmas tiek ievērojami sadārdzinātas siltumnīcas būvniecības izmaksas. Vairākās telpās ir ierīkotas apūdeņošanas sistēmas, lai novērstu telpu pārkaršanu vasaras sezonā.

Siltumnīcas darbu nodrošina speciāli apmācīti darbinieki. Zinātniskā personāla, kas izmanto transgēno organismu laboratorijas un siltumnīcas apmācību nodrošina tās laboratorijas vadītājs, kura veic atbilstošo eksperimentu. Katram eksperimentam, kas tiek veikts siltumnīcā tiek piešķirts noteikts drošības līmenis. Drošības līmeni nosaka speciāla komiteja, kas darbojas institūta līmenī.

Komandējuma laikā 2008. gada septembrī LU BF 2. kursa maģistratūras studente Baiba Ieviņa iepazinās ar laboratorijas telpām SCRI institūtā Ģenētikas laboratorijā, kā arī apguva molekulārās ģenētikas metodes ģenētiskās daudzveidības analīzei prof. *Andrew J. Flavell* vadībā.

**Pielikums Nr. 6. References materiāls kvantitatīvai un kvalitatīvai ĢMO
uztveršanai**

References materiālu katalogs pieejams <http://irrm.jrc.ec.europa.eu>

Tabula 6-1. Konkrētām ĢMO līnijām atbilstošie references materiāli un to cenas.

ĢMO līnija	References materiāls	Daudzums un cena
kartupeļu līnija – EH92-527-1	ERM-BF421a (kontrolē bez modifikācijas) ERM-BF421b (ar ģenētisko modifikāciju)	Katrs RM – 0.5 g – 32 eiro
kukurūzas līnija – NK603	ERM-BF415 (ar 6 dažādām modificētās kukurūzas masas daļām kvantitatīvai uztveršanai)	Katrs RM – 1 g – 55 eiro
kukurūzas līnija - 59122 x 1507 x NK603	Satur 3 dažādas modifikācijas. RM pieejams katrai modifikācijai atsevišķi	
kukurūzas līnija - NK603	Skat. augstāk	Katrs RM – 1 g – 55 eiro
kukurūzas līnija – 1507	ERM-BF418 (ar 4 dažādām modificētās kukurūzas masas daļām kvantitatīvai uztveršanai)	Katrs RM – 1 g – 55 eiro
kukurūzas līnija – 59122	ERM-BF424 (ar 4 dažādām modificētās kukurūzas masas daļām kvantitatīvai uztveršanai)	Katrs RM – 1 g – 55 eiro
kukurūzas līnija – T 25	Nav pieejama no ES <i>Institute for Reference Materials and Measurements</i> Pieejama no Molecular & Biochemical Analytical Services Bayer BioScience N.V. Technologiepark 38 B- 9052 Gent, Belgium	

References materiāli pieejami no kompānijas Sigma, kuru Latvijā pārstāv SIA Labochema.

Pielikums Nr.7. Savvaļas augu bioloģiskās daudzveidības monitoringa plāns un protokols

Monitoringa metode	Teritorijas un parauglaukumu atrašanās vietas	Norises laiks un periods
Priekšizpēte	Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūta apkārtējā teritorija konvencionālo lauku un eksperimentālo lauku tuvumā	2009. gada jūnijs - jūlijs
parauglaukumu/transektu metodes aprobācija		
Parauglaukumu metode vai transektu metode		3 gadus (no 2009. līdz 2011. gadam) 2 reizes veģetācijas sezonā - no jūnija līdz jūlijam un no augusta līdz septembrim
pastāvīgie parauglaukumi, 1 x 1 m, sastopamība pēc Brauna-Blankē skalas, fotoattēls vizuālai novērtēšanai, GPS koordinātes katram parauglaukumam		

Savvaļas augu bioloģiskās daudzveidības monitoringa protokols

datums ____ . ____ . _____

pētnieks _____

GPS koordinātes: _____ Parauglaukuma Fotouzņēmums _____
 _____ numurs: _____

Npk	Augu sugu saraksts	Br-BI
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

Piezīmes

- a) vizuāls *Solanum* dzimtas augu novērtējums: vitalitāte, ziedu/augļu daudzums un kvalitāte
- b) parauglaukuma raksturojums: attālums līdz kultivētam laukam, traucējums, būtiskas veģetācijas izmaiņas

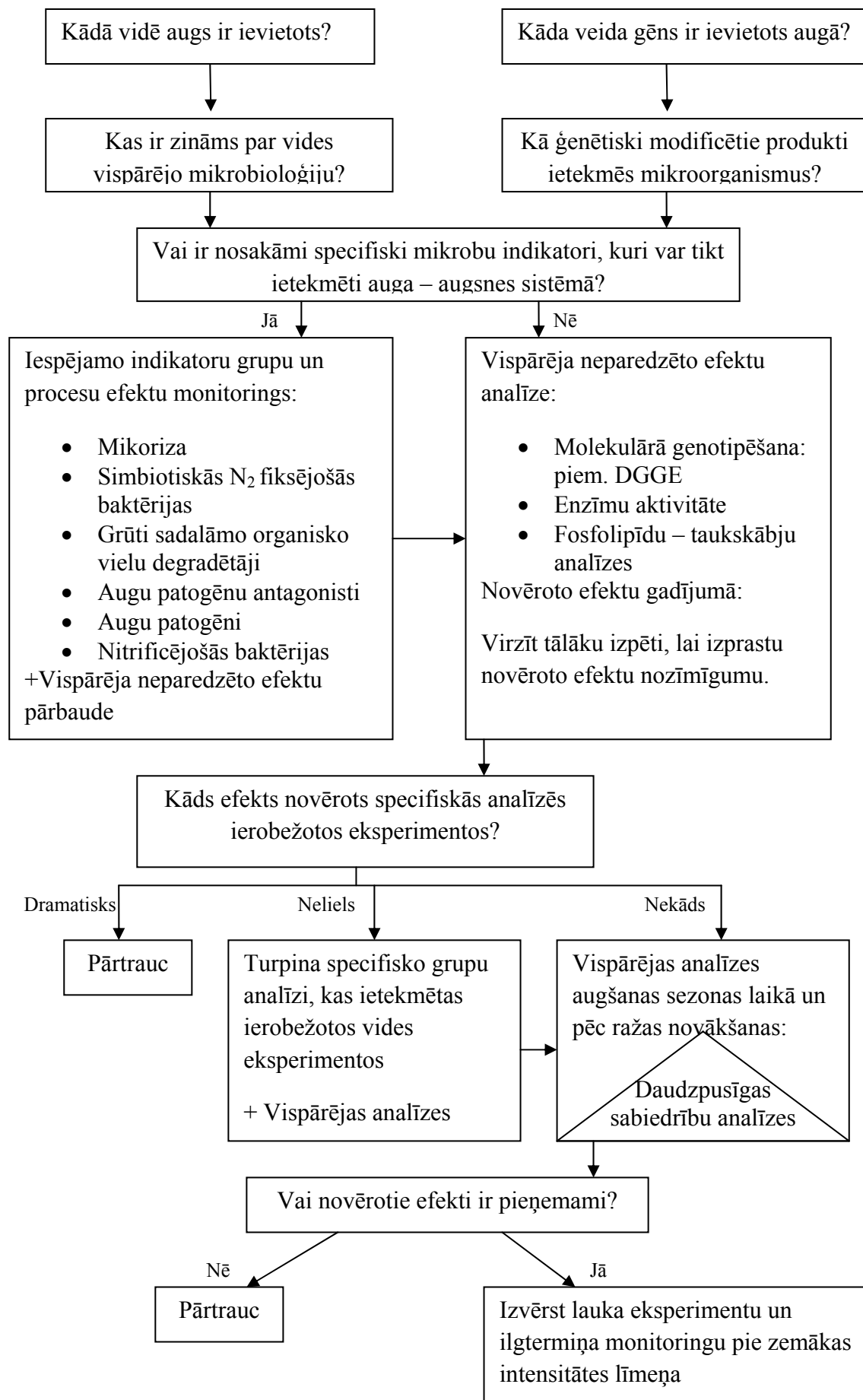
Brauna-Blankē skala: **x** < 1 %, **1** < 5 %, **2** - 5...25 %, **3** - 25...50 %, **4** - 50...75 %, **5** - 75...100 %

**Pielikums Nr. 8. Augsnes indikatormikroorganismi un to analīzes metodes
(Lielbritānijas, Vācijas un Ungārijas pieredze)**

Pētījumā, kuru Lielbritānijā pēc Vides, pārtikas un lauksaimniecības lietu departamenta (*Department for Environment, Food and Rural Affairs* (Defra)) pasūtījuma 2004. gadā veica kompānija „*Atkins Environment*” sadarbībā ar Oksfordas Ekoloģijas un hidroloģijas centru (*Centre for Ecology and Hydrology*), ir izstrādāta lēmumu pieņemšanas shēma (attēls 8-1), kura ietver algoritmu, kas parāda analizējamās parametru augsnē atkarībā no ģenētiskās modifikācijas veida un nepieciešamās darbības, kas jāveic, vadoties pēc analīžu rezultātiem.

Ja ir nosakāmi specifiski mikrobu indikatori, kuri var tikt ietekmēti auga – augsnes sistēmā, tad veic šo indikatoru monitoringu. Šie indikatori jeb mikroorganismu grupas ir:

- 1) Mikorizas sēnes;
- 2) Augu augšanu veicinošās rizobaktērijas;
- 3) Simbiotiskās slāpekli fiksējošās baktērijas;
- 4) Rekalitrantu organisko materiālu noārdītāji, piemēram, koksnes lignīnu noārdošās sēnes;
- 5) Augu patogēnu antagonisti;
- 6) Augu patogēni;
- 7) Nitrificējošās baktērijas.



Attēls 8-1. Lēmumu pieņemšanas un attiecīgo darbību izvēles shēma, lai noteiktu ĢMO ietekmi uz augsnes mikroorganismu grupām un to funkcijām (Kowalchuk *et al.* (2003))

Mikorizas sēnes analizē mikroskopiski, nosakot kolonizēto sakņu īpatsvaru, kā arī daudzveidību ar molekulārajām metodēm (terminālā restrikcijas fragmenta garuma polimorfisms (T-RFLP)). Iespējamie eksperti Latvijā, kas strādā ar mikorizas sēnēm ir Tālis Gaitnieks (Latvijas Valsts mežzinātnes institūts „Silava”) un Ligita Liepiņa (LU Bioloģijas institūts).

Augu augšanu veicinošās rizobaktērijas – paaugstina augu vitalitāti, nodrošinot to aizsardzību pret patogēniem. Tā ir daudzveidīga baktēriju grupa, no kurām daļa augu aizsardzību pret patogēniem nodrošina ar augu augšanu stimulējošu savienojumu (auksīni, giberelīni, citokinīni) veidošanu, daļa ar pretsēņu vielu veidošanu, daļa ar vēl citiem mehānismiem. Tā kā šī ir daudzveidīga grupa, jāizvēlas konkrētas baktērijas atbilstoši analizējamajiem apstākļiem. Viens no rizobaktēriju aktivitātes rādītājiem ir indola-3-etiķskābes produkcija. Kopumā šīs mikroorganismu grupas raksturošanai nav piemērotu metožu.

Koksnes lignīnu noārdošās sēnes ir piemēroti indikatororganismi, jo tām ir zema daudzveidība un lignīna noārdīšanas process ir ar zemu dublēšanos (nav daudz citu organismu, kas noārda lignīnu). Šie indikatororganismi ir piemēroti ilgtermiņa pētījumiem. Lignīnu noārda baltās trupes sēnes (*Basidiomycotina*). Pazīme, kas liecina, ka lignīnu noārdošo sēņu daudzums ir samazināts, ir lignīna uzkrāšanās augsnē. Viena no metodēm ir lignīna sastāvā esošo fenolu noteikšana ar CuO oksidāciju un gāzes hromatogrāfiju – masas spektrometriju (Otto and Simpson, 2006). Latvijā Koksnes Ķīmijas institūta Lignīna laboratorijā analizē lignīna saturu nobirās. Par augsni tika izteikts viedoklis, ka būtu iespējams noteikt kopējo ciklisko savienojumu daudzumu augsnē.

Slāpekli fiksējošās baktērijas – gumiņu veidojošo baktēriju *Rhizobiaceae* izžušana no augsnes vai gumiņu veidošanas aktivitātes samazināšanās var būt uzmanības vērts apstāklis. Klasiska metode kādas konkrētas mikroorganismu grupas daudzuma noteikšanai augsnē ir visiespējamākā skaita tests. Var izmantot arī molekulārās metodes.

Nitrificējošās baktērijas – visvairāk izpētītas ir amoniju oksidējošās baktērijas, kas taksonomiski pieder pie β un γ -proteobaktērijām (*Nitrosomonas*, *Nitrospira*). Var analizēt ar polimerāzes ķēdes reakciju (PĶR) un denaturējošā gradienta gela elektroforēzes (DGGE) metodēm.

Ja nav nosakāmi specifiski mikrobu indikatori, kuri var tikt ietekmēti auga – augsnes sistēmā, tad veic vispārēju iepriekš neparedzamu ĢMO efektu uz augsni pārbaudi. Minētajā Lielbritānijas pētījumā tiek ieteiktas šādas metožu grupas:

- 1) Uz DNS balstītas metodes (sīkāku šo metožu uzskaitījumu skatīt tālāk);
- 2) Enzīmu aktivitāte;
- 3) Fosfolipīdu taukskābju analīze (Atkins Environment, Ltd. 2004; Bakonyi, 2007).

Uz DNS analizēm balstītas metodes:

1. Guanīna + citozīna procentuālais sastāvs – no augsnes izdala kopējo mikrobiālo DNS; izmanto termālo kušanu, lai noteiktu guanīna un citozīna

saturu; metodes mīnusi – ja tiek noteiktas atšķirības starp paraugiem, nevar izskaidrot šo atšķirību cēloni;

2. Klonu bibliotēkas – darbietilpīgi; ja samazina no parauga analizēto klonu skaitu, tad tiek zaudēta metodes jēga monitoringā;
3. PĶR fragmentu raksturojums (*PCR fragment patterns*) – fragmenti tiek iegūti ar taksonomiski specifiskiem praimeriem, kas aptver šaurākas vai plašākas taksonomiskās grupas; tālāk analizē ar DGGE vai temperatūras gradienta gēla elektroforēzi (TGGE).

Piemērs. Analizējot 16S rDNS fragmentus no rizosfēras paraugiem, tika noteikta transgēnu glifosināta tolerantu rapšu un herbicīdu pielietošanas ietekme uz eubaktēriju un *Pseudomonas* ģints baktēriju sabiedrībām. Tika konstatētas nelielas atšķirības transgēno rapšu rizosfēras baktēriju sabiedrībās, bet šī atšķirības bija niecīgas salīdzinājumā ar izmaiņām, ko radīja dažādi ar augu augšanu saistīti aspekti.

4. Vienpavediena konformācijas polimorfisma analīze (SSCP) – analizējot PĶR paraugus ar šo metodi, gēlā ir apmēram 50 joslas, kas parāda statistiski būtiskas atšķirības starp dažādām lauka vietām, kā arī sezonāli.
5. Amplificētas rDNS restrikcijas analīze (ARDRA) – rāda mikroorganismu sabiedrības fingerprintingu, ko iegūst no dažāda garuma fragmentiem, kas rodas ar endonukleāzēm sašķeļot PĶR produktus. Atbilstoši izvēlētajiem PĶR praimeriem iegūst sēņu, baktēriju vai arhebaktēriju daudzveidības rakturojumu.

DGGE, TGGE, SSCP un ARDRA trūkumi – nedod informāciju par taksonomiskajām vienībām, nevar kvantificēt mikroorganismu relatīvo sastopamību. Šos trūkumus atrisina T-RFLP. Līdzīga metode ir garuma heterogenitātes PĶR (*length heterogeneity PCR (LH-PCR)*) (Atkins Environment, Ltd. 2004).

Izmantotā literatūra:

1. Atkins Environment, Ltd. 2004. Mechanisms for Investigating Changes in Soil Ecology due to GMO Releases. Final Report. Part of the Department for Environment, Food and Rural Affairs (Defra) *Genetically Modified Organisms Research Programme*. 132 p.
2. Bakonyi G. 2007. On the results of the tender entitled 'Assessment of the soil biological effects of genetically modified organisms' (No. NTE-1030/2006). Research Report. *Principal*: Ministry for Environment Protection and Water Management Department of Community and International Affairs. *Contractor*: Szent István University, Department of Zoology and Animal Ecology, Budapest, Hungary. 51 p
3. Otto A. and M. Sympton. 2006. Evaluation of CuO oxidation parameters for determining the source and stage of lignin degradation in soil. *Biochemistry*. 80:121-142

**Pielikums Nr. 9. Pārbaudāmo līniju ietekme uz augsnes mikroorganismiem un to monitorings
(pēc Liebritānijas un Vācijas monitoringa programmas)**

Kukurūza ar glufosināta amonija toleranci - Schmalenberger un Tebbe (2002) analizējot kopējo bakteriālo sabiedrību ģenētisko daudzveidību, nekonstatēja atšķirības starp ģenētiski modificēto augu un kontroles augu ietekmi tajā pašā laukā, tajā pašā augšanas sezonā (Atkins Environment, Ltd. 2004).

B.t.-toksīnu veidojoša kukurūza – proteīns tiek ekspresēts augu sakņu šūnās, un ar sakņu eksudātu palīdzību nonāk augsnē. Toksīns augsnē nonāk arī ar augu atliekām. Augsnē tas adsorbējas uz māla minerāliem, humīnskābēm un māla-humusa kompleksiem. Šo savienojumu veidā toksīns ir pasargāts no mikrobiālas noārdīšanas, bet līdz ar to var saglabāties augsnē ilgu laiku un atkal nonākt aprītē. Toksīna ietekme uz augsnes mikroorganismiem ir plaši pētīta, bet rezultāti ir neviennozīmīgi un neviendabīgi (Züghart un Breckling, 2003). Analizējamie parametri, metodes un analīžu biežums doti 9-1. tabulā.

Kartupeļi ar izmainītu ogļhidrātu spektru – domājams, ka šādiem kartupeļiem var būt paaugstināta uzņēmība pret bakteriālām un sēņu slimībām (Züghart un Breckling, 2003). Analizējamie parametri, metodes un analīžu biežums doti 9-1. tabulā.

Tabula 9-1. Analizējamie parametri, metodes un analīžu biežums B.t.-toksīnu veidojošas kukurūzas un kartupeļu ar izmainītu ogļhidrātu spektru ietekmes kontrolei (Züghart un Breckling, 2003)

Parametrs	Metode	Biežums
Mikroorganismu biomasa	Substrāta inducēta elpošana (Anderson un Domsch, 1978, Heinemeyer <i>et al.</i> 1989) DIN ISO 14 240-1 Fumigācijas ekstrakcijas metode (Vance <i>et al.</i> 1987) DIN ISO 14 240-2 (kūdras un māla augsnēm)	Katru gadu pavasarī
Mikroorganismu bazālā elpošana	Caurplūdes metode (Domsch, 1962), kuru aprakstījis Heinemeyer <i>et al.</i> (1989) vai O ₂ uzņemšanas noteikšana (Schinner <i>et al.</i> , 1993), DIN 19 737	Katru gadu pavasarī
Metaboliskais iedalījums	Anderson un Domsch, 1990	Katru gadu pavasarī
N-Mineralizācija	Schinner <i>et al.</i> , 1993	Katru gadu pavasarī
Augsnes mikroorganismu daudzveidība	<i>DNA-Fingerprintinga metodes:</i> TGGE, DGGE, SSCP analīzes, T-RFLP	Katru gadu pavasarī
Rekombinantā DNS augsnē	PĶR, DNS-čipu tehnoloģijas	Katru gadu pavasarī

Secinājumi

Izvērtējot literatūrā ieteiktos indikatorus un tiem piemērotākās metodes un līdzšinējās iestrādes, praktiskajai daļai kā analizējamais parametrs tika izvēlēta augsnes

mikroorganismu daudzveidība. Šī parametra raksturošanai tika izvēlēta kultivējamo mikroorganismu (baktēriju un sēņu) daudzveidības analīze ar Petri plašu metodi, bet kultivējamo un nekultivējamo sēņu daudzveidības raksturošanai no DNS fingerprintinga metodēm kā lēta un vienkārša tika izvēlēta ARDRA.

Izmantotā literatūra

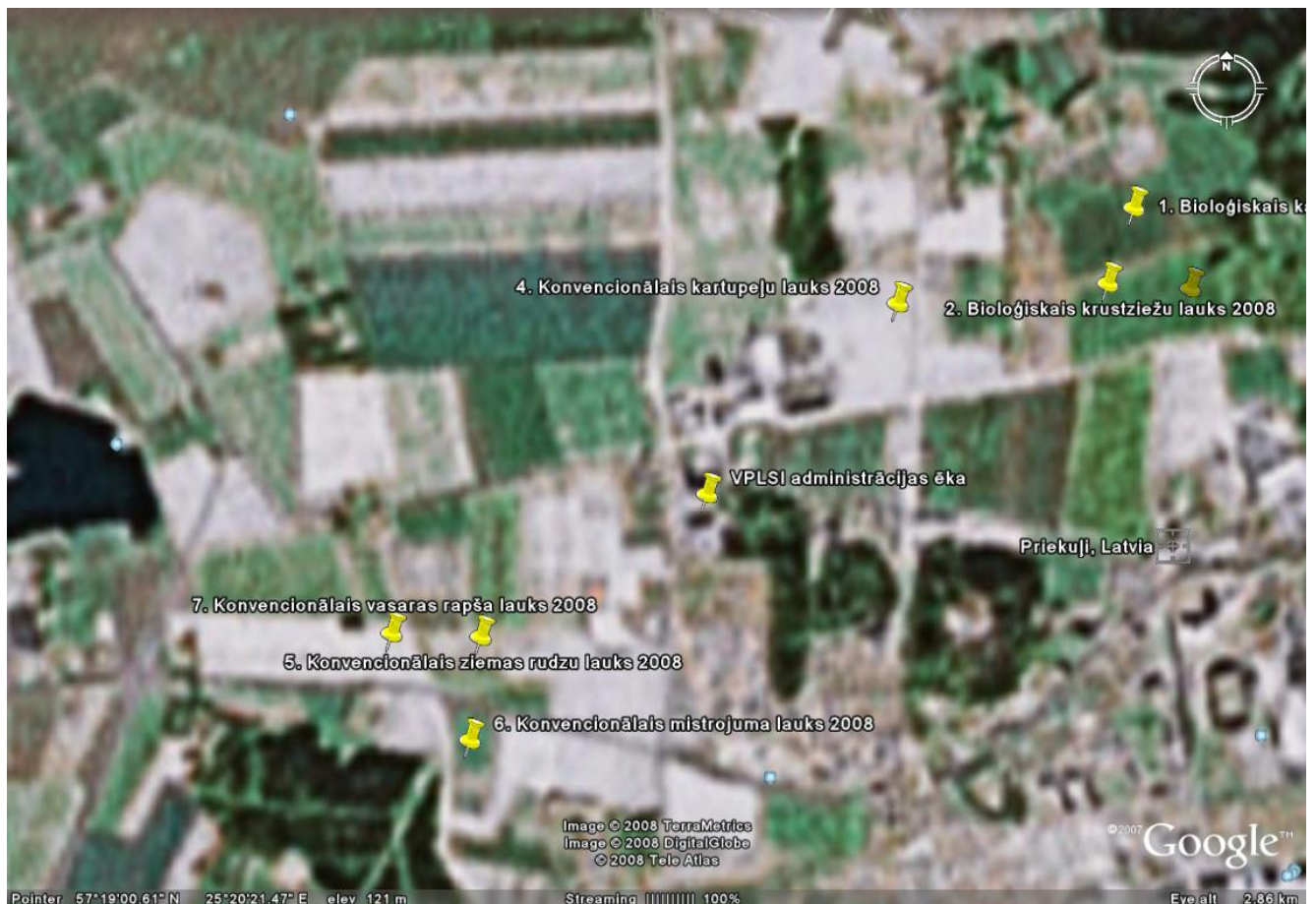
1. Anderson, J.P.E.; Domsch, K.H. 1990. Application of ecophysiological quotients (QCO₂ and Qd) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. *Soil biology and biochemistry* 22: 251-255.
2. Atkins Environment, Ltd. 2004. Mechanisms for Investigating Changes in Soil Ecology due to GMO Releases. Final Report. Part of the Department for Environment, Food and Rural Affairs (Defra) *Genetically Modified Organisms Research Programme*. 132 p.
3. Domsch, K.H. 1962. Bodenatmung - Sammelbericht über Methoden und Ergebnisse. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten Abt. II* 116: 33-78.
4. Heinemeyer, O.; Insam, H.; Kaiser, E.A.; Walenzik, G. 1989. Soil microbial biomass and respiration measurements: An automated technique based on infrared gas analysis. *Plant and Soil* 116: 191-195
5. Schinner, F.; Öhlinger, R.; Kandeler, E.; Margesin, R. 1993. *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*, 2. Aufl., Berlin, Springer. 389 S
6. Schmalenberger, A. and Tebbe, C.C. 2002. Bacterial community composition in the rhizosphere of a transgenic, herbicide-resistant maize (*Zea mays*) and comparison to its non-transgenic cultivar Bosphore. *FEMS Microbiology Ecology*, 40(1): p. 29-37.
7. Vance, E.D.; Brookes, P.C.; Jenkinson, D.S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*. 19: 703-707.
8. Züghart W., Breckling B., 2003. Konzeptionelle Entwicklung eines Monitoring von Umweltwirkungen transgener Kulturpflanzen. Teil 1. Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Forschungsbericht 299 89 406 UBA-FB 000500/1. 201 p.

Pielikums Nr. 10. Paraugu ievākšana augsnes mikroorganismu analīzei VPLSI

Augsnes paraugi sezonas laikā tika ievākti divas reizes – 16. jūnijā un 28. augustā. Kopējais paraugu skaits katrā ievākšanas reizē bija 21. Paraugi tika ņemti ar tīru (ar 70% etanolu notīrītu) lāpstiņu no 10 – 15 cm dziļuma. Katrs paraugs sastāv no augsnes, kas paņemta 3 vietās, apmēram 1 metra attālumā viena no otras. Paraugi tika ņemti pa diagonāli šķērsojot lauku – vienā stūrī, vidū un pretējā stūrī.

Paraugu ievākšanas vietas (skat. arī attēlu 10-1):

1. Bioloģiskais kartupeļu lauks – Nr. 1 – 3;
2. Bioloģiskais krustziežu (eļļas rutku) lauks – Nr. 4 – 6 (nākamgad kartupeļu lauks);
3. Bioloģiskais ziemas rudzu lauks – Nr. 7 – 9;
4. Konvencionālais kartupeļu lauks – Nr. 10 – 12;
5. Konvencionālais ziemas rudzu lauks – Nr. 13 – 15;
6. Konvencionālais mistrojuma lauks (vīķes ar miežiem) – Nr. 16 – 18;
7. Konvencionālais vasaras rapša lauks – Nr. 19 – 21.



Attēls 10-1. Paraugu ievākšanas vietas Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūtā augsnes mikroorganismu analīzei.

Pielikums Nr.11. Augsnes paraugu molekulāro analīžu rezultāti

11.1. Metodes

11.1. Kopējās DNS izdalīšana no augšnes

Kopējā DNS no augšnes tika izdalīta ar PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, USA) atbilstoši minētā komplekta protokolam, kas ir piemērots DNS izdalīšanai no augšnes paraugiem, kuros ir augsts humīnskābju saturs vai no sarežģītiem augšnes paraugiem, kā komposts, nogulsnes, mēslojums u.c. augšņu paraugiem. DNS izdalīšana veikta no visiem paraugiem divas reizes .

11.1.2.DNS šķīdumu koncentrāciju noteikšana

Izdalītās DNS šķīdumu koncentrācijas tika noteiktas spektrofotometriski ar spektrofotometru „Ultrospec 3100 Pro”. Adsorbcija tika noteikta pie 260 nm un 280 nm, nosakot DNS un proteīnu attiecību šķīdumā. Par tīru DNS šķīdumu var uzskatīt tādu DNS šķīdumu, kam attiecība 260 nm/280 nm ir augstāka par 1,7 (Yeates *et al.*, 1998).

11.1.3.Polimerāzes ķēdes reakcija (PĶR)

PĶR reakcijai tika izmantoti praimeris, kas amplificē šādas sēņu grupas: *Ascomycota*, *Basidiomycota* un *Zygomycota*: ITS1F – 1 (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') un ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

Reāģenti PĶR reakcijai uz 50µl kopējā reakcijas tilpuma:

- 32,6 µl ddH₂O;
- 5 µl 10x PĶR buferis;
- 5 µl 2 mM dNTP;
- 4 µl 25 mM MgCl₂;
- 1 µl praimeris (koncentrācija 25 nM);
- 1 µl praimeris (koncentrācija 25 nM);
- 0,4 µl Hot Start *Taq* DNS polimerāze;
- 1 µl DNS

Amplifikācija tika veikta pie sekojošiem PĶR aparāta uzstādījumiem:

- 1)Sākotnējā denaturācija 95.0 °C – 4 min;
- 2)Denaturācija 95.0 °C - 40s;
- 3)Praimeru hibridizācija 52.0°C;
- 4)Sintēze 72.0 °C – 1 min;
- 2.-4. solis tiek atkārtots 30 x
- 5) Beigu elongācija 72.0°C – 10 min;

6) Glabāšana 4.0°C.

Pēc reakcijas veic amplificēto fragmentu elektroforēzi 1% agarozes gēlā.

11.1.4.DNS paraugu sakoncentrēšana

Pēc PĶR reakcijas tika veikta paraugu izgulsnēšana, lai iegūtu augstākas koncentrācijas šķīdumus.

Darba gaita:

1. 40µl parauga 0,5 ml ependorfa mēģenē pievieno 400 µl etanola/ Na acetāta šķīduma (9,5 ml 96% etanola pievieno 0,5 ml 3M CH₃COONa).
2. Izgulsnē 15 minūtes -20°C temperatūrā.
3. Centrifugē 15 minūtes pie maksimālā ātruma. Uzmanīgi atsūc supernatantu.
4. Nogulsnes mazgā ar 70% etanolu. Centrifugē 5 minūtes pie maksimālā ātruma. Uzmanīgi atsūc supernatantu.
5. Nogulsnes žāvē vienu stundu 37°C temperatūrā.
6. Nogulsnes šķīdina ar 16 µl destilēta ūdens. Katru paraugu minūti vorteksē.

11.1.5.Amplificētās ribosomālās DNS restrikcijas analīze (ARDRA)

Izmantotās restriktāzes: *EcoRI* (5' - G'AATTC – 3') un *BsuRI* (5' - GGCC – 3')

Reakcijas maisījums uz 10 µl :

8µl DNS šķīduma;

1µl restrikcijas bufera;

1µl restriktāzes.

Paraugus inkubē 1 stundu 20 min 37°C temperatūrā (Maniatis et al., 1982). Kad reakcija beigusies, veic fragmentu elektroforēzi 2% agarozes gēlā (Chabrerie et al., 2003).

11.1.6.Gēlu analīze un statistiskās analīzes metodes

Gēlu attēlu apstrāde tika veikta ar programmu KODAK 1D 3.5, nosakot no augsnes izdalītās DNS fragmentāciju (Bürgmann et al., 2001), precīzu amplificēto un sagriezto fragmentu garumu, kā arī intensitāti.

Shannon – Weaver daudzveidības indeksa (H^P) aprēķināšanai tika izmantota formula:

$$H^P = -\sum p_j \log_2 p_j, \text{ kur}$$

p_j – katra atsevišķā fragmenta intensitāte.

Šis indekss iekļauj gan dažādu DNS fragmentu skaitu, gan to intensitāti (Gabor et al., 2003). Izmantojot *Shannon – Weaver* daudzveidības indeksu var salīdzināt paraugus vienā gēlā, kā arī vairākus gēlus savā starpā, ja statistiski būtiski neatšķiras molekulāro marķieru fragmentu intensitāte un PĶR reakcijā izmantotās pozitīvās kontroles restrikcijas fragmentu intensitāte.

Iegūto datu statistiskā analīze tika veikta ar Microsoft Excel 2007, izmantojot datu analīzes rīku *z-test: Two Sample for Means* divu paraugkopu vidējo aritmētisko

salīdzināšanai un t-testu divu paraugkopu dispersiju salīdzināšanai (pie varbūtības 0,05). Divas paraugkopas tiek uzskatītas kā piederošas pie dažādām ģenerālkopām (statistiski būtiski atšķirīgas), ja būtiski atšķiras šo paraugkopu vidējie aritmētiskie un/vai dispersijas rādītāji.

Korelācijas aprēķināšanai tika izmantota Excel funkcija CORREL.

11.1.7. Augsnes pH noteikšana

No katra lauka vienam augsnes paraugam tika noteikts pH potenciometriski augsnes – ekstragēnta suspensijā (tilpuma attiecība 1:5). Kā ekstragēnts tika izmantots destilēts ūdens. Metode ISO 10390 izmantojama organiskajiem horizontiem un minerālaugsnei.

Ņem vismaz 5 ml neizžāvētas augsnes (ISO 10390 metodē – gaissausas augsnes) parauga un ieber pudelē vai kolbā. Pielej 5 reizes lielāku tilpumu destilētā ūdens. Suspensiju sajauc un krata uz kratītāja 2 stundas.

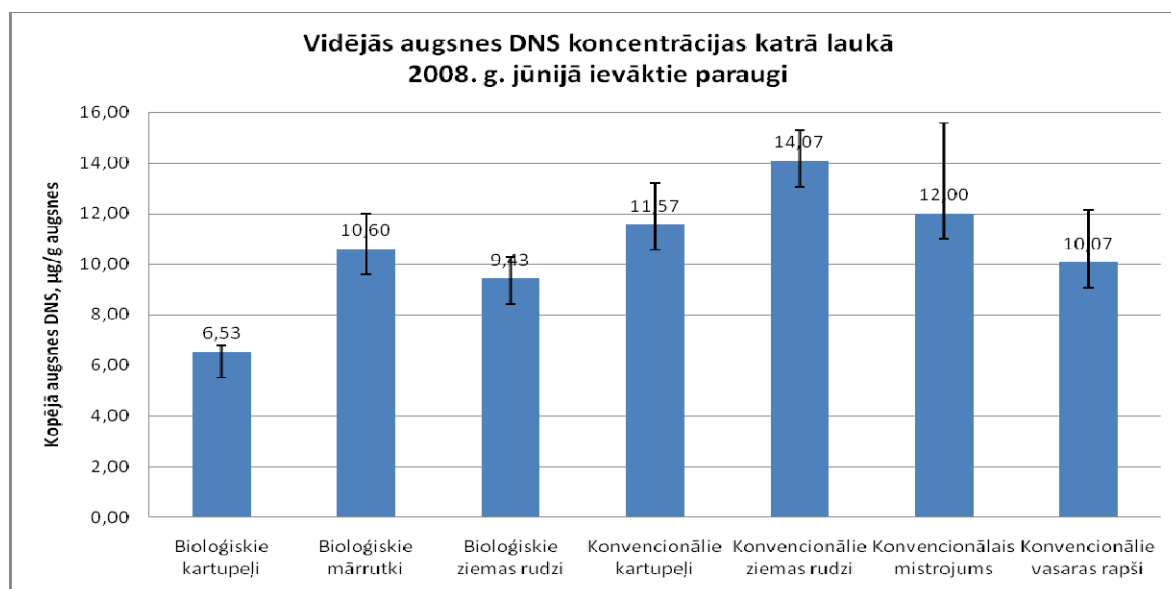
pH metru kalibrē atbilstoši iekārtas ražotāja rekomendācijām, izmantojot buferšķīdumus (pH 4 un 7). Saskalo suspensiju tieši pirms pH noteikšanas. Nosaka pH suspensijā pirms augsnes daļiņas paspējušas nosēsties. pH nolasa pēc tam, kad iekārtas rādījums ir nostabilizējies.

11.2. Rezultāti

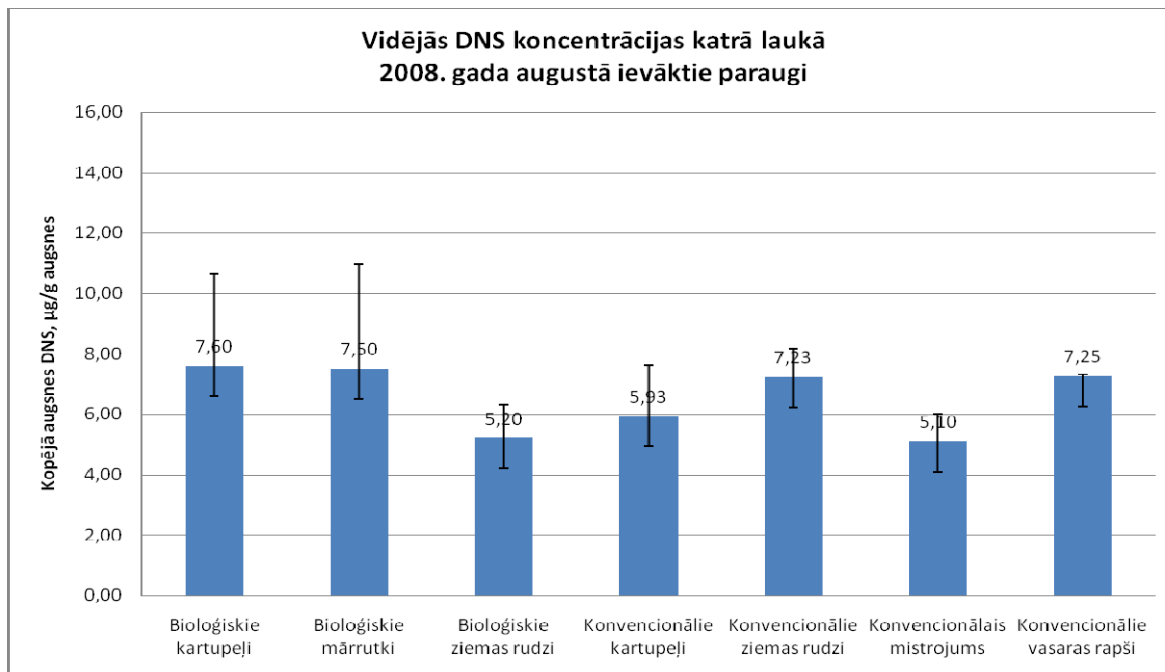
11.2.1. Izdalītās kopējās augsnes DNS kvantitāte un kvalitāte

Informācija par DNS kvantitāti, kas iegūta no analizētajiem paraugiem redzama 11-1. un 11-2. attēlā. DNS koncentrācijas, kas iegūtas no augustā ievāktajiem paraugiem ir zemākas. Tas ir izskaidrojams ar to, ka šiem paraugiem bija augstāks mitruma saturs.

No jūnijā ievāktajiem augsnes paraugiem iegūto DNS šķīdumu attiecība 260 nm /280 nm variē no 1,4 līdz 1,7 (vidēji 1,5). Augustā ievāktajiem augsnes paraugiem šī attiecība ir no 1,2 līdz 1,8 (vidēji 1,3).



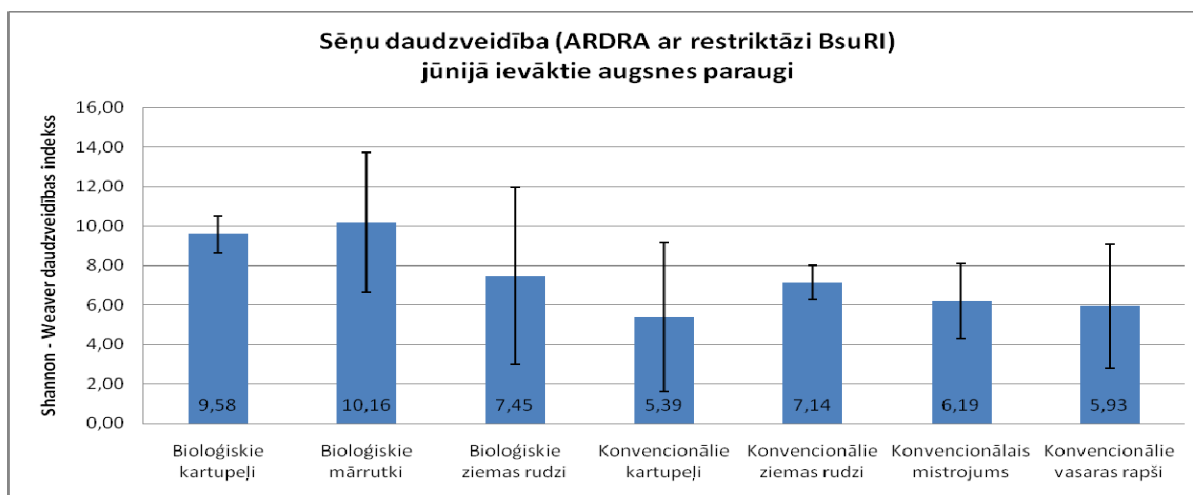
Attēls 11-1. 2008. gada 16. jūnijā ievāktu augsnes paraugu DNS koncentrācijas (atkārtojumu skaits no katra lauka n=6, vektors parāda standartnovirzi).



Attēls 11-2. 2008. gada 28. augustā ievāktu augsnes paraugu DNS koncentrācijas (atkārtojumu skaits no katra lauka n=6, vektors parāda standartnovirzi).

11.2.2. Sēņu daudzveidība

Sēņu daudzveidības rezultāti jūnijā ievāktajiem paraugiem ir redzami attēlā 11-3. (ARDRA ar restriktāzi BsuRI), attēlā 11-4. (ARDRA ar restriktāzi EcoRI konvencionālās lauksaimniecības kultūru laukiem) un attēlā 11-5., kur dots bioloģiskās un konvencionālās lauksaimniecības lauku sēņu daudzveidības indeksa salīdzinājums.

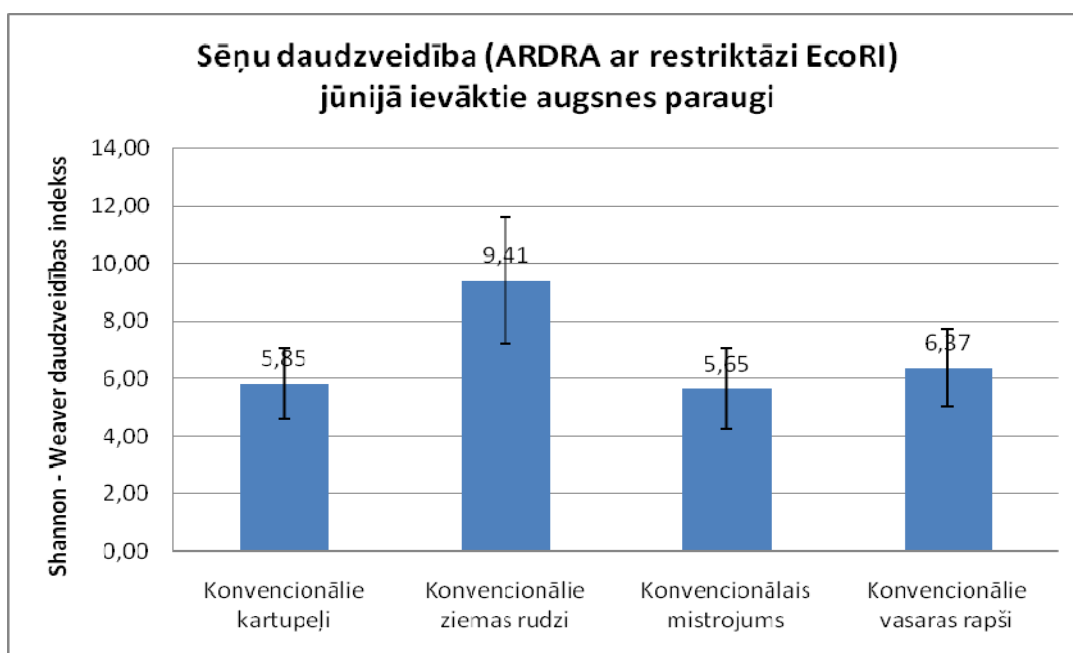


Attēls 11-3. 2008. gada 16. jūnijā ievāktu augsnes paraugu sēņu daudzveidība ar ARDRA metodi, izmantojot restriktāzi BsuRI (n=5-6).

Datu dispersijas analīze rāda, ka sēņu daudzveidība, kas iegūta ar ARDRA metodi, izmantojot restriktāzi BsuRI (Attēls 11-3), būtiski neatšķiras bioloģisko mārrutku un bioloģisko ziemas rudzu lauka augsnē, bet šo abu lauku augsnes sēņu daudzveidība būtiski atšķiras no bioloģisko kartupeļu lauka sēņu daudzveidības. Konvencionālo kartupeļu lauka augsnes sēņu daudzveidības indekss būtiski atšķiras no konvencionālo ziemas rudzu un konvencionālā mistrojuma lauku augsnes sēņu

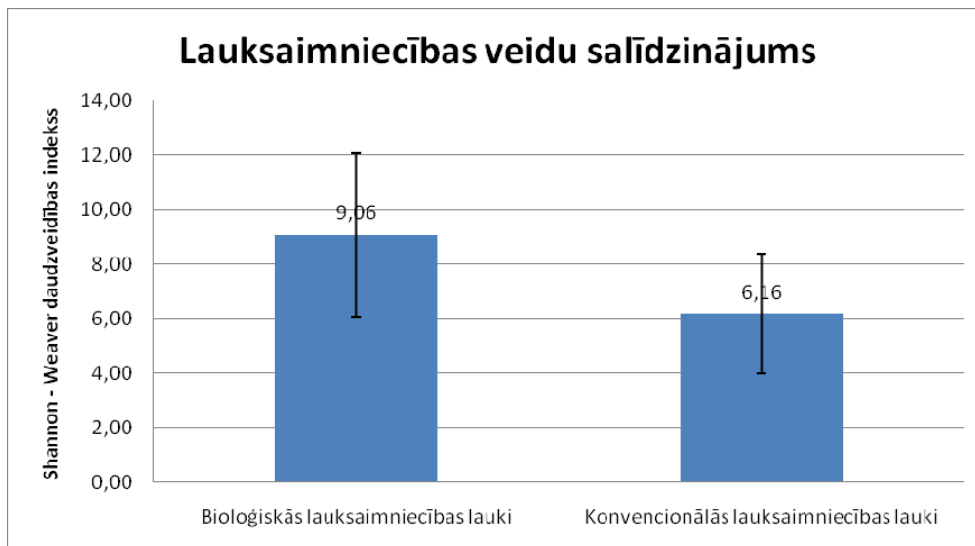
daudzveidības, bet neatšķiras no konvencionālo vasaras rapšu lauka augsnes analīžu rezultātiem. Savukārt, konvencionālo ziemas rudzu lauka augsnes sēņu daudzveidība būtiski atšķiras no konvencionālajiem vasaras rapšiem, bet neatšķiras no konvencionālā mistrojuma lauka augsnes sēņu daudzveidības.

Augstākā sēņu daudzveidība ir novērota bioloģisko mērrutku lauka augsnes paraugos, bet zemākā – konvencionālo kartupeļu lauka augsnes paraugos.



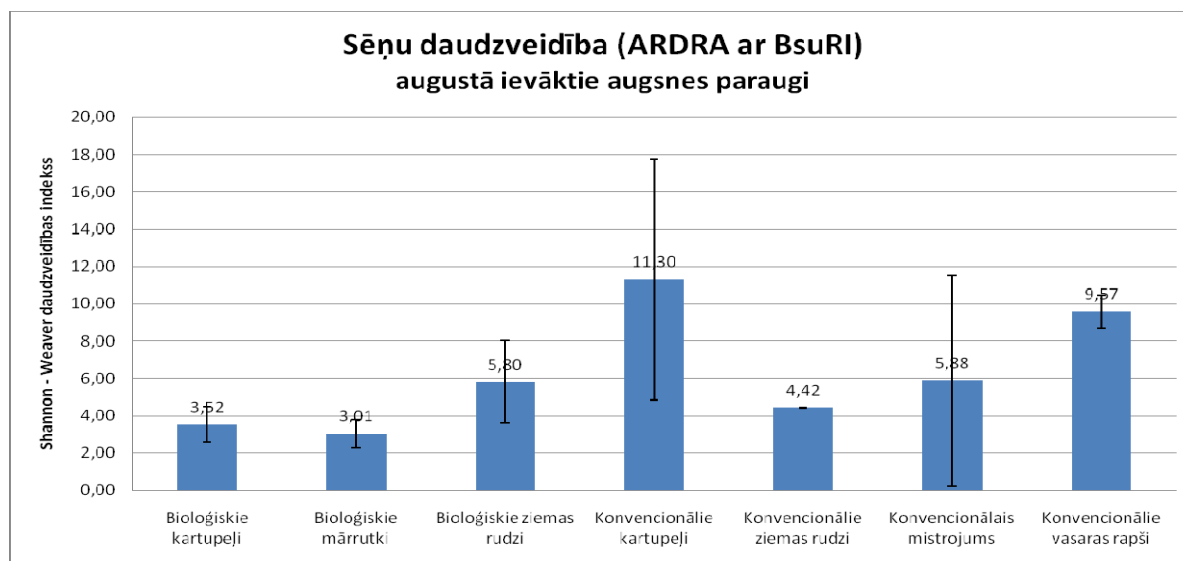
Attēls 11-4. 2008. gada 16. jūnijā ievāktu konvencionālās lauksaimniecības lauku augsnes paraugu sēņu daudzveidība ar ARDRA metodi, izmantojot restriktāzi EcoRI (n=5-6).

Salīdzinot savā starpā tikai konvencionālās lauksaimniecības kultūru lauku augsnes paraugus, sēņu daudzveidība, kas iegūta ar ARDRA metodi, izmantojot restriktāzi EcoRI (attēls 11-4), tika konstatēts, ka, tāpat kā ar restriktāzi BsuRI iegūtie rezultāti rāda, konvencionālā mistrojuma lauka augsnes sēņu daudzveidība būtiski neatšķiras no konvencionālo vasaras rapša lauka augsnes sēņu daudzveidības. Savukārt pārējo lauku augsnes pēc sēņu daudzveidības indeksa savstarpēji būtiski atšķiras.



Attēls 11-5. 2008. gada 16. jūnijā ievāktu augsnes esošo sēņu daudzveidība ar ARDRA metodi, izmantojot restriktāzi BsuRI, salīdzinot abus analizētos lauksaimniecības veidus.

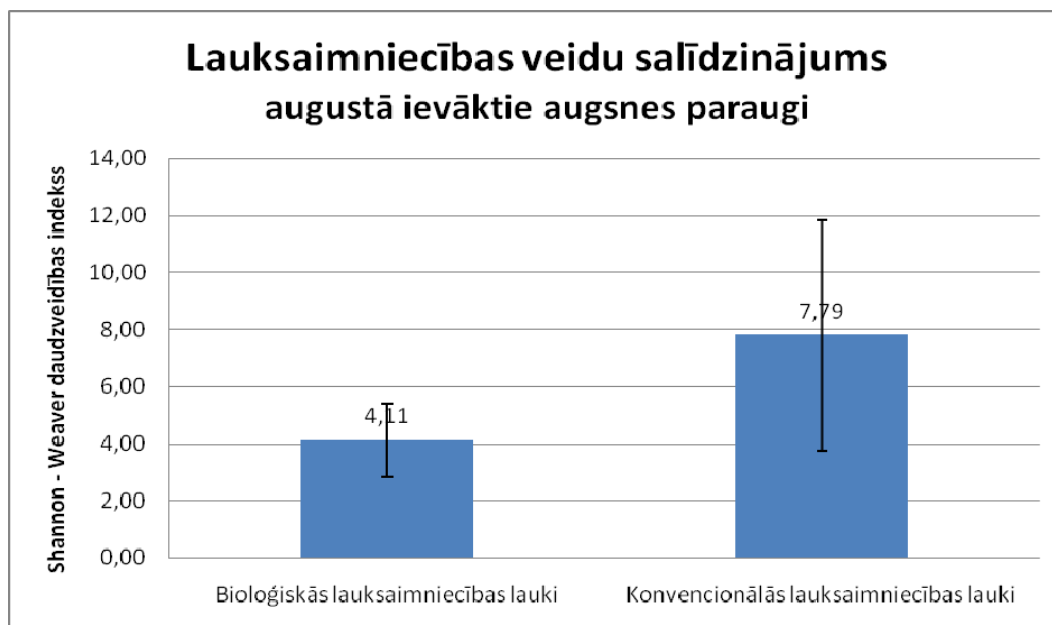
Jūnijā ievāktajos paraugos sēņu daudzveidība ar ARDRA metodi, izmantojot restriktāzi BsuRI statistiski būtiski augstāka ir bioloģiskās lauksaimniecības laukos (Attēls 11-5) salīdzinājumā ar konvencionālās lauksaimniecības laukiem (pēc z-testa, skat. 11.1.6. nodaļu).



Attēls 11-6. 2008. gada 28. augustā ievāktu augsnes paraugu sēņu daudzveidība ar ARDRA metodi, izmantojot restriktāzi BsuRI (n=2-6).

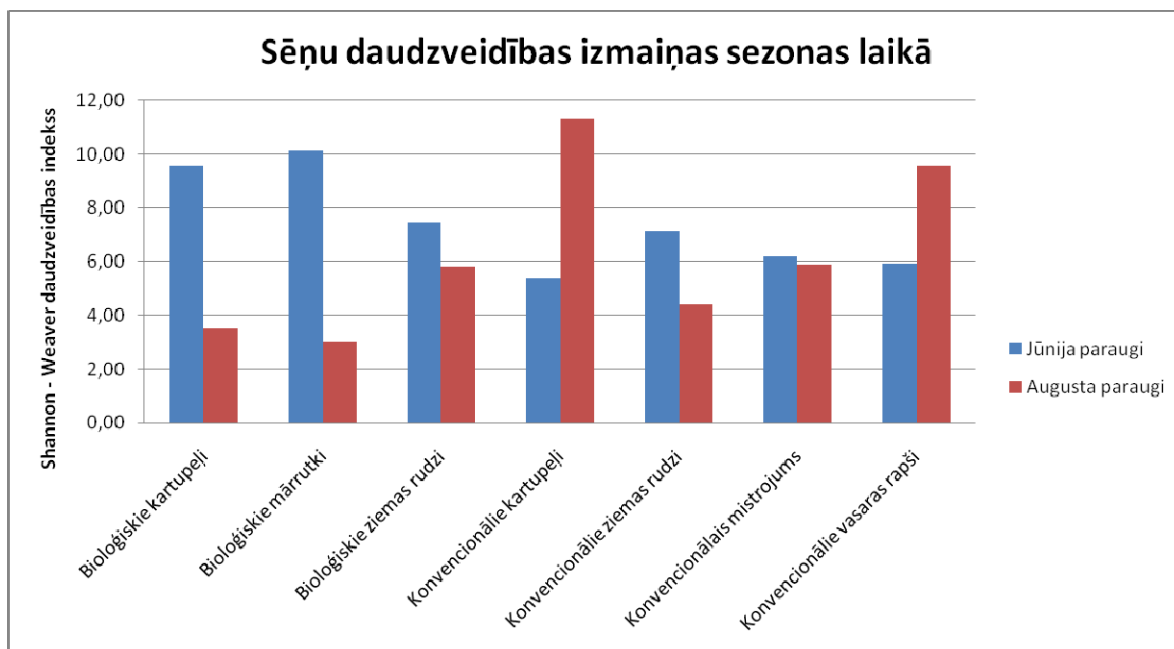
Statistiskie aprēķini rāda, ka augustā ievāktajiem augsnes paraugiem sēņu daudzveidība, kas iegūta ar ARDRA metodi, izmantojot restriktāzi BsuRI, būtiski neatšķiras salīdzinot bioloģisko kartupeļu lauku ar bioloģisko mārrotku lauku un konvenciālo kartupeļu lauku ar konvenciālo mistrojuma lauku. Starp visiem pārējo lauku paraugiem ir statistiski būtiskas atšķirības.

Augstākā sēņu daudzveidība starp augustā ievāktajiem paraugiem ir novērota konvencionālo kartupeļu lauka augsnes paraugiem, kur iepriekš tā bija viszemākā. Savukārt, zemākā sēņu daudzveidība starp augustā ievāktajiem paraugiem ir novērota bioloģisko mārrotku lauka augsnes paraugiem, kur vasaras sākumā tā bija visaugstākā.



Attēls 11-7. 2008. gada 28. augustā ievāktos augsnes paraugos esošo sēņu daudzveidība ar ARDRA metodi, izmantojot restriktāzi BsuRI, salīdzinot abus analizētos lauksaimniecības veidus.

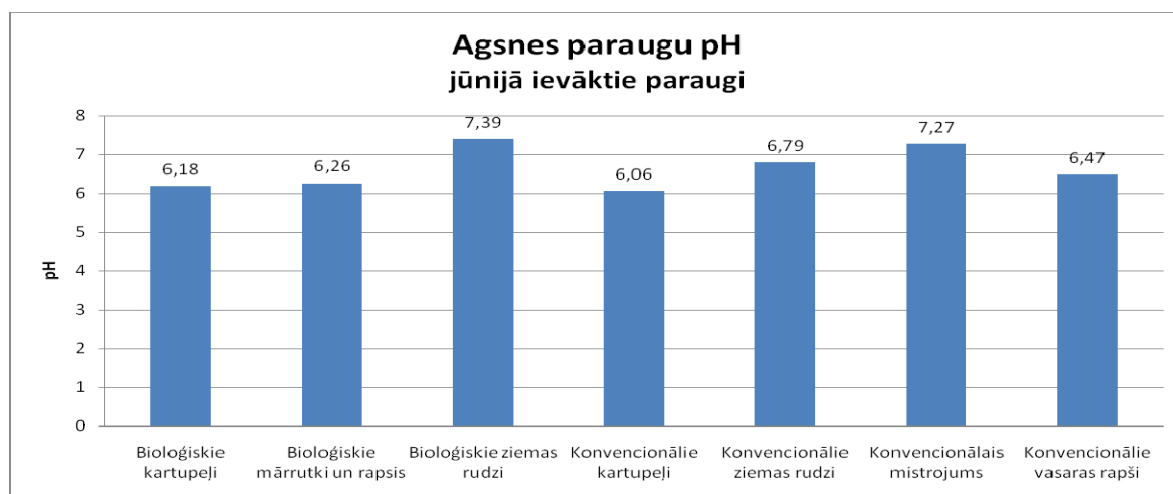
Atšķirībā no jūnijā ievāktajiem augsnes paraugiem augustā ievāktos augsnes paraugu sēņu daudzveidība ar ARDRA metodi, izmantojot restriktāzi BsuRI statistiski būtiski augstāka ir konvencionālās lauksaimniecības laukos (Attēls 11-7) salīdzinājumā ar bioloģiskās lauksaimniecības laukiem (gan pēc z-testa, gan pēc t-testa).



Attēls 11-8. Sēņu daudzveidības izmaiņas sezonas laikā.

11.2.3. Sēņu daudzveidības salīdzinājums ar fizikāli ķīmiskajiem rādītājiem

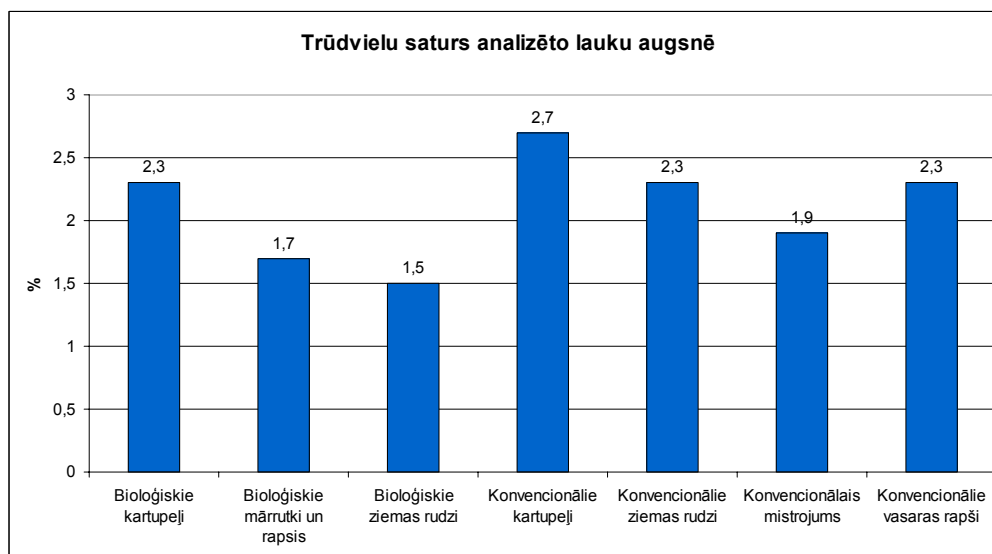
Informācija par augsnes paraugu pH apkopota attēlā 11-9. pH variē robežās no 6,06 (konvencionālie kartupeļi) līdz 7,39 (bioloģiskie ziemas rudzi). Vidējās pH vērtības bioloģiskās lauksaimniecības laukiem un konvencionālās lauksaimniecības laukiem būtiski neatšķiras – attiecīgi 6,61 un 6,65.



Attēls 11-9. Jūnijā ievāktu augsnes paraugu pH.

Informācija par trūdvielu saturu augsnē ir apkopota attēlā 11-10. Zemākais trūdvielu saturs ir bioloģisko ziemas rudzu laukā (1,5 %), bet augstākais – konvencionālo kartupeļu laukā (2,7 %).

Aprēķinot jūnijā ievāktu augsnes paraugu ARDRA rezultātu korelāciju ar augsnes pH un trūdvielu saturu rādītājiem, izteiktāka ir korelācija starp sēņu daudzveidību un trūdvielu saturu (-0,44), kas norāda uz vāju negatīvu korelāciju. Augsnē ar augstāku trūdvielu saturu ir zemāka sēņu daudzveidība. Augustā ievāktajiem augsnes paraugiem, savukārt, novrojama pozitīva korelācija ar trūdvielu saturu augsnē (0,57). Vasaras beigās augsnē ar augstāku trūdvielu saturu ir augstāka sēņu daudzveidība.



Attēls 11-10. Trūdvielu saturs analizēto lauku augsnē (Valsts Priekuļu Laukaugu selekcijas institūta dati).

Secinājumi

1. Gan jūnijā, gan augustā ievāktu paraugu sēņu daudzveidība vairumā gadījumu statistiski būtiski atšķiras starp dažādiem laukiem.
2. Atsevišķu lauku augsnes paraugu sēņu daudzveidības rādītājiem ir augstas standartnovirzes starp vienā laukā paņemtajiem trīs paraugiem un to diviem atkārtojumiem, kas norāda, ka izmantotajā metodikā nepieciešams ieviest papildus augsnes paraugu homogenizēšanas procesu pirms DNS izdalīšanas protokola, vai arī palielināt augsnes paraugu skaitu no viena lauka.
3. Jūnijā ievāktajiem augsnes paraugiem ir novērojama tendence, ka bioloģiskās lauksaimniecības laukos augsnes sēņu daudzveidības indekss ir augstāks nekā konvencionālās lauksaimniecības laukos. Augustā ievāktajiem augsnes paraugiem šī tendence ir pretēja, jo visos bioloģiskās lauksaimniecības laukos sezonas laikā sēņu daudzveidība ir samazinājusies, bet daļā konvencionālās lauksaimniecības lauku – paaugstinājusies.
4. Augsnes pH ir samērā līdzīgs visiem paraugiem. Nepastāv korelācija starp augsnes paraugu pH un sēņu daudzveidību.
5. Vāja korelācija novērojama starp sēņu daudzveidības indeksu un trūdvielu saturu augsnē. Jūnijā augsnē ar augstāku trūdvielu saturu ir zemāka sēņu daudzveidība. Vasaras beigās augsnē ar augstāku trūdvielu saturu ir augstāka sēņu daudzveidība.
6. Tā kā ir novērojamas statistiski būtiskas atšķirības gan starp lauksaimniecības veidiem un kultūrām, gan arī statistiski būtiskas atšķirības starp dažādos augšanas sezonas laikos paņemtiem paraugiem, viena gada vienas sezonas analīzes nevar izmantot kā atskaites punktu augsnes mikroorganismu daudzveidības raksturošanai. Turpinot uzsākto augsnes mikroorganismu analīzi nākamajā projekta realizācijas etapā tiks pārbaudīts, vai iegūtās statistiski būtiskās atšķirības saglabājas vairāku lauka sezonu garumā.

Izmantotā literatūra

1. Chabrierie, O., K. Laval, P. Puget, S. Desaire and D. Alard. 2003. Relationship between plant and soil microbial communities along a successional gradient in a chalk grassland in north-western France. *Applied Soil Ecology* 24 (2003) 43-56.
2. Gabor E. M., E. J. de Vries, and D. B. Janssen. 2003. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44:153-163.
3. Maniatis T., E. F. Fritsch, J. Sambrook. 1982. „Molecular cloning” a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
4. Bürgmann H., M. Pesaro, F. Widmer and J. Zeyer. 2001. A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. *Journal of Microbiological Methods* 45 (2001), 7–20 pp.
5. Yeates, C., Gillings, M. R., Davison, A. D., Altavilla, N., Veal, D. A. 1998. Methods for microbial DNA extraction from soil for PQR amplification. *Biol. Proced. Online* 1: 40 – 47.

Pielikums Nr.12. Augsnes mikrobioloģiskās analīzes rezultāti

16.06.2008. ievāktu augšņu paraugu mikrobioloģiskās izpētes rezultāti

Augsnes paraugi:

- 1.-3. Bioloģiskais kartupeļu lauks – A;
- 4.-6. Bioloģiskais krustziežu (mārrutku) lauks – B;
- 7.-9. Bioloģiskais ziemas rudzu lauks – C;
- 10.-12. Konvencionālais kartupeļu lauks – D;
- 13.-15. Konvencionālais ziemas rudzu lauks – E;
- 16.-18. Konvencionālais mistrojuma lauks (vīķes ar miežiem) – F;
- 19.-21. Konvencionālais vasaras rapša lauks – G.

12-1. tabulā apkopoti dati par sēņu un baktēriju kolonijas veidojošo vienību (kvv) daudzumu gramā mitras augsnes katrā analizētajā paraugā, bet 12-2. tabulā – katrā laukā. 12-1. tabulā saskatāms arī lauku paraugu nevienmērīgums, jo, piemēram, F un G laukos trīs rādītājos (no pieciem) vērojamas būtiskas atšķirības ($p < 0,05$) starp visiem trim augsnes paraugiem; citu lauku paraugi ir viendabīgāki.

Baktēriju kvv/g noteikts, augsnes suspensiju atšķaidījumus uzsējot un kultivējot agarizētā rauga ekstrakta-peptona barotnē *Nutrient broth 'E'* (*Int. Diagnostics Group*, Lielbritānija). Baktēriju kolonijas skaitītas pēc 3 un 10 dienu ilgas inkubācijas 20 ± 2 °C temperatūrā. Pēc 3 dienām izaugušās kolonijas pieder ātri augošu baktēriju sugām – *r*-stratēģistiem, bet vēlāk (4.-10. dienā) izaugušās – lēni augošām – *K*-stratēģistiem. Baktēriju kvv kopskaits noteikts, saskaitot kolonijas pēc 10 dienu ilgas inkubācijas.

Sēņu kvv/g noteikts, augsnes suspensiju atšķaidījumus uzsējot un kultivējot agarizētā iesala ekstrakta barotnē. Kolonijas skaitītas pēc 3 dienu ilgas inkubācijas 20 ± 2 °C temperatūrā. Pēc 10 dienu ilgas inkubācijas noteiktas augsnē dominējošo un iesala agara barotnē kultivējamo sēņu ģintis, un analizētajos paraugos tās bija *Absidia*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Mortierella*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* un *Verticillium*, kā arī sterilu micēliju veidojošas sēnes. Nevienā paraugā netika konstatētas *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Geotrichum* un *Rhizopus* spp., tādēļ secinām, ka šo sēņu ir mazāk nekā 100 kvv/g (noteikšanas robeža). Iesala agara barotnē noteikts arī to baktēriju kvv daudzums, kas aug uz iesala, kur par galveno oglekļa barības avotu kalpo maltoze.

Tabula 12-1. Sēņu un baktēriju kvv/g mitras augsnes analizētajos paraugos*

Lauki un paraugi	Sēnes ^a	Baktērijas ^a	Baktērijas ^{b,c}		
			3 dienas	10 dienas	aktinomicētes
A 1	(1,5±0,5)x10 ⁴	(4,3±1,5)x10⁵	(1,3±0,5)x10 ⁶	(5,2±1,1)x10 ⁶	(1,0±0,1)x10⁵
A 2	(1,0±0,3)x10 ⁴	(7,0±2,0)x10⁴	(6,2±1,8)x10⁵	(2,5±0,1)x10⁶	(1,0±0,1)x10⁴
A 3	(2,0±1,0)x10 ⁴	(1,6±0,5)x10⁵	(1,2±0,1)x10 ⁶	(4,2±0,2)x10 ⁶	(2,0±0,1)x10⁵
B 4	(2,0±1,0)x10 ³	(6,9±5,3)x10 ⁴	(1,4±0,2)x10 ⁶	(7,0±1,0)x10 ⁶	(2,0±0,1)x10⁵
B 5	(5,0±3,0)x10 ³	(1,0±0,1)x10 ⁵	(9,5±3,5)x10 ⁵	(5,1±0,8)x10 ⁶	<1x10 ⁵
B 6	(9,0±1,0)x10³	(2,1±0,3)x10⁴	(3,9±1,0)x10⁶	(1,1±0,7)x10 ⁷	(1,0±0,1)x10 ⁴
C 7	(3,5±2,5)x10 ⁴	(1,3±0,4)x10 ⁵	(1,1±0,2)x10⁶	(3,2±0,1)x10⁶	(1,0±0,1)x10 ⁶
C 8	(2,6±0,3)x10 ⁴	(1,1±1,0)x10 ⁵	(2,4±0,2)x10 ⁶	(5,0±0,2)x10⁶	(7,0±3,0)x10 ⁵
C 9	(3,5±1,5)x10 ⁴	(1,0±0,3)x10 ⁵	(2,9±1,1)x10 ⁶	(5,8±0,1)x10⁶	(2,5±0,5)x10⁶
D 10	(2,5±0,5)x10 ³	(3,3±0,1)x10 ⁴	(1,1±0,1)x10⁶	(2,3±0,3)x10⁶	(2,0±1,0)x10 ⁵
D 11	(3,0±0,1)x10 ³	(1,1±0,3)x10⁴	(8,5±0,5)x10⁵	(1,3±0,3)x10⁶	(3,0±0,1)x10 ⁵
D 12	(5,0±1,0)x10³	(3,5±0,8)x10 ⁴	(5,9±1,9)x10⁵	(3,7±0,3)x10⁶	(4,5±0,5)x10⁵
E 13	(2,5±0,5)x10 ³	(3,4±0,1)x10 ⁵	(4,4±0,1)x10⁶	(4,9±0,1)x10⁶	(1,0±0,1)x10 ⁵
E 14	(3,5±1,5)x10 ³	(3,6±0,3)x10 ⁵	(3,5±0,5)x10⁶	(6,3±0,7)x10 ⁶	(3,0±0,1)x10⁵
E 15	(2,5±0,5)x10 ³	(9,0±0,2)x10⁴	(5,9±0,9)x10⁵	(7,5±0,7)x10 ⁶	(1,0±0,2)x10 ⁵
F 16	(5,5±0,5)x10 ³	(2,4±0,3)x10⁶	(4,5±0,1)x10⁶	(3,9±1,0)x10⁷	(2,0±0,1)x10 ⁵
F 17	(5,0±1,0)x10 ³	(5,8±0,9)x10⁴	(6,3±1,1)x10⁵	(9,3±1,2)x10⁵	(2,5±0,5)x10 ⁵
F 18	(4,5±0,5)x10 ³	(2,7±0,1)x10⁴	(1,3±0,3)x10⁶	(2,6±0,5)x10⁶	(2,0±1,0)x10 ⁵
G 19	(1,5±0,3)x10³	(6,3±0,6)x10 ⁴	(9,5±1,9)x10⁵	(2,4±0,1)x10⁶	(2,5±0,5)x10 ⁵
G 20	(1,0±0,1)x10³	(5,4±2,6)x10 ⁴	(4,3±0,1)x10⁵	(6,0±1,0)x10⁵	(2,5±0,5)x10 ⁵
G 21	(8,0±5,0)x10³	(8,5±3,0)x10 ⁴	(1,8±0,1)x10⁶	(3,4±0,1)x10⁶	(3,0±2,0)x10 ⁵

* Treknrakstā (*bold*) iezīmēti rādītāji, kas būtiski ($p < 0,05$) atšķiras no abiem pārējiem konkrētā lauka rādītājiem.

^a Kultivētas iesala agara barotnē.

^b Kultivētas rauga ekstrakta-peptona agara barotnē.

^c Baktēriju kvv daudzums noteikts pēc augsnes suspensiju uzsējumu 3 un 10 dienu ilgās inkubācijas. Atsevišķā grupā iedalītas aktinomicētes.

Tabula 12-2. Sēņu un baktēriju kvv/g mitras augsnes analizētajos laukos

Lauki	Sēnes ^{a,d}	Baktērijas ^{a,d}	Baktērijas ^{b,c,d}		
			3 dienas	10 dienas	aktinomicētes
A	(1,5±0,4)x10 ⁴ B,C,D,E,F,G	(2,2±1,5)x10 ⁵ D,F	(1,0±0,3)x10 ⁶	(3,9±1,1)x10 ⁶ B,E,F,G	(1,3±0,5)x10 ⁵ C,D,F,G
B	(5,3±2,9)x10 ³ A,C,G	(6,4±3,3)x10 ⁴ C,D,E	(1,7±1,0)x10 ⁶	(7,8±2,6)x10 ⁶ A,D,F,G	(1,2±0,6)x10 ⁵ C,D,F,G
C	(3,2±0,4)x10 ⁴ A,B,D,E,F,G	(1,1±0,1)x10 ⁵ B,D,E,F,G	(2,1±0,8)x10 ⁶	(4,6±1,1)x10 ⁶ D,F,G	(1,4±0,8)x10 ⁶ A,B,D,E,F,G
D	(3,5±1,1)x10 ³ A,C,G	(2,6±1,1)x10 ⁴ A,B,C,E,G	(8,5±2,1)x10 ⁵	(2,4±1,0)x10 ⁶ B,C,E	(3,2±1,0)x10 ⁵ A,B,C
E	(2,8±0,5)x10 ³ A,C,F,G	(2,6±1,2)x10 ⁵ B,C,D,F,G	(2,8±1,6)x10 ⁶ G	(6,2±1,1)x10 ⁶ A,D,F,G	(1,7±0,9)x10 ⁵ C
F.	(5,0±0,4)x10 ³ A,C,E,G	(4,3±1,6)x10 ⁴ A,C,E	(9,6±3,4)x10 ⁵	(1,7±0,8)x10 ⁶ A,B,C,E	(2,2±0,2)x10 ⁵ A,B,C,G
G	(1,3±0,3)x10 ³ A,B,C,D,E,F	(6,7±1,3)x10 ⁴ C,D,E	(6,9±2,6)x10 ⁵ E	(2,1±0,5)x10 ⁶ A,B,C,E	(2,7±0,2)x10 ⁵ A,B,C,F

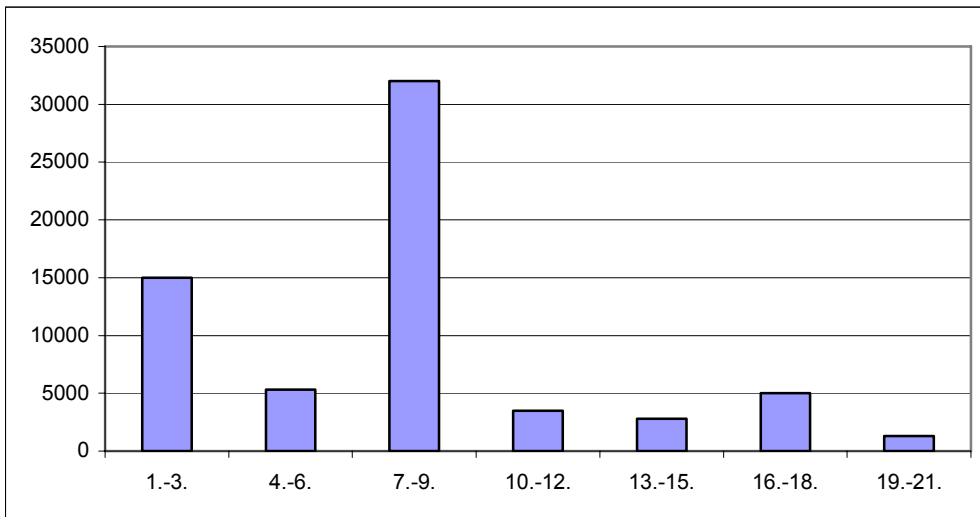
^a Kultivētas iesala agara barotnē.

^b Kultivētas rauga ekstrakta-peptona agara barotnē.

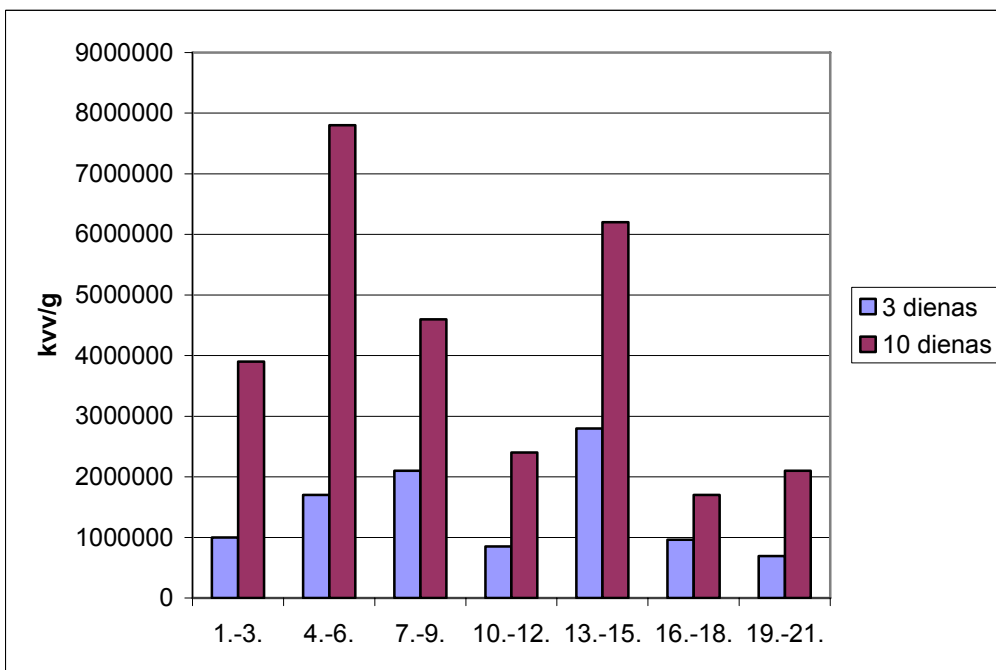
^c Baktēriju kvv daudzums noteikts pēc augsnes suspensiju uzsējumu 3 un 10 dienu ilgas inkubācijas. Atsevišķā grupā iedalītas aktinomicētes.

^d Ar burtiem A-G atzīmētas grupas, ar kurām dotajai grupai ir būtiskas atšķirības (p<0,05).

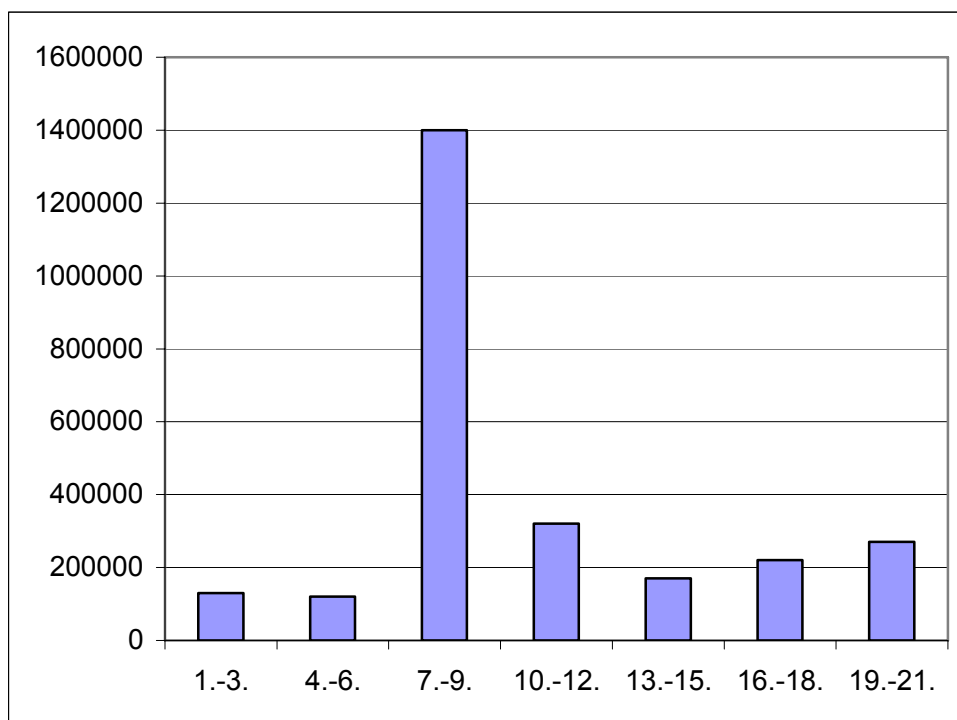
Iegūtie rezultāti ļauj salīdzināt visu augšņu mikrobioloģisko sastāvu (attēli 12-1.-12-4. , tabulas 12-3, 12-4.).



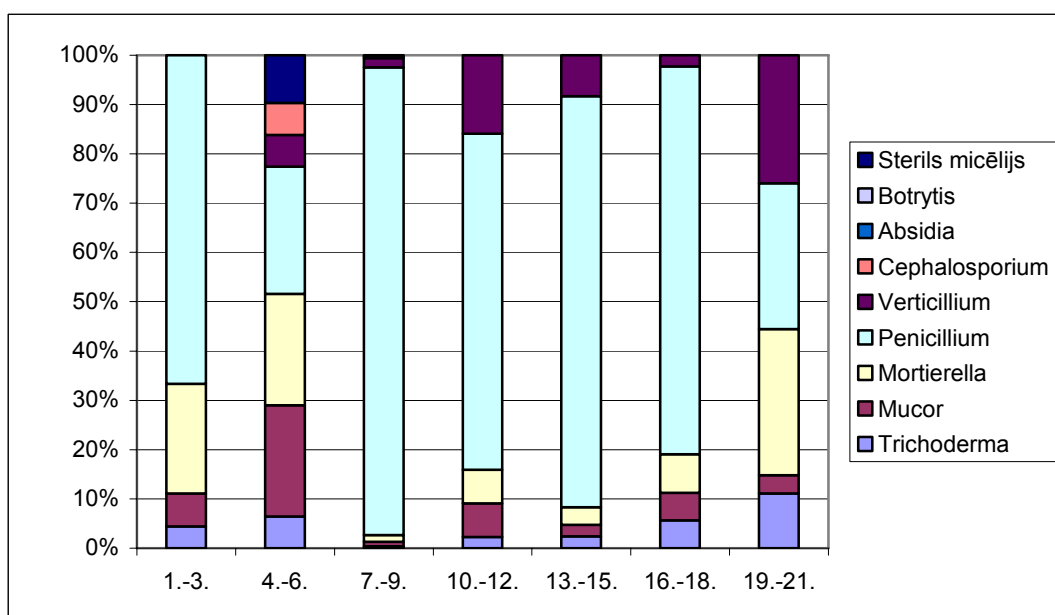
Attēls 12-1. Sēņu kvv/g augsnes



Attēls 12-2. Ātri augošo (3 dienas) baktēriju daudzums un baktēriju kopējais daudzums (10 dienas) augsnē, kvv/g.



Attēls 12-3. Aktinomicētu kvv/g augsnes.



Attēls 12-4. Dominējošo ģinšu sēņu īpatsvars augsnē.

Tabula 12-3. Baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība augsnē

Lauks	Baktērijas / sēnes*
A	260 (210-347)
B	1472 (1020-3500)
C	144 (91-192)

D	686 (433-920)
E	2214 (1800-3000)
F	340 (186-7090)
G	1615 (425-1600)

* Iekavās robežas, kurās iekļaujas visi trīs atsevišķie paraugi.

Tabula 12-4. Aktinomicētu īpatsvars baktēriju kvv kopskaitā

Paraugs	Aktinomicētes, % no visām baktērijām*
A	3,3 (0,4-4,8)
B	1,5 (<0,1-2,9)
C	30,4 (14,0-43,1)
D	13,3 (8,7-23,1)
E	2,7 (1,3-4,8)
F	12,9 (0,5-26,9)
G	12,9 (8,8-41,7)

* Iekavās robežas, kurās iekļaujas visi trīs atsevišķie paraugi.

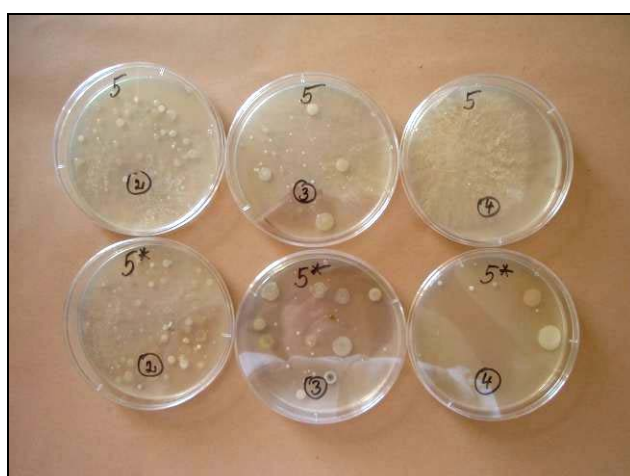
Bioloģiskā kartupeļu lauka (A lauks, 1.-3. paraugs) augsnē ir daudz sēņu – vēl vairāk ir tikai bioloģiskajā rudzu laukā (C), pie kam visos gadījumos atšķirības ir būtiskas ($p < 0,05$). Ātri augošo baktēriju daudzums līdzīgs ar visiem citiem laukiem, taču baktēriju kopskaits ir 1,6-2,0 reizes mazāks nekā konvencionālajā ziemas rudzu (E) un bioloģiskajā krustziežu (B) laukā un 1,9-2,3 reizes lielāks nekā konvencionālajā vasaras rapša (G) un konvencionālajā mistrojuma (F) laukā ($p < 0,05$). Maltozi izmantojošo (iesala agara barotnē augošo) baktēriju daudzums ir 5,1 reizes lielāks nekā konvencionālajā mistrojuma laukā (F) un 8,5 reizes lielāks nekā konvencionālajā kartupeļu (D) laukā; ar citiem laukiem nav būtisku atšķirību. Atsevišķi vērtējot tādu baktēriju grupu kā aktinomicētes, redzams, ka to ir apmēram tikpat daudz kā B un E laukos, bet 1,7 un 2,1 un 2,5 reizes mazāk nekā attiecīgi F, G un D laukos (konvencionālie mistrojuma, vasaras rapša un kartupeļu lauki) un 10,8 reizes mazāk nekā bioloģiskajā rudzu laukā (C). Aktinomicētu īpatsvars no visām baktērijām – 3,3 %. Pēc aktinomicētu un maltozi izmantojošo baktēriju daudzuma visi trīs augsnes paraugi ir samērā nevienmērīgi. Baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība ir samērā maza – 260. Augsnē dominē *Penicillium* ģints sēnes (67 % no visām sēņu kvv), bet otro vietu pēc izplatības ieņem *Mortierella* spp. (īpatsvars 22 %).



Attēls 12-5. 1., 2. un 3. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 2 atkārtojumiem).

Bioloģiskā krustziežu lauka (B lauks, 4.-6. paraugs) augsnē ir 2,8-6,0 reizes mazāk sēņu kvv nekā abos pārējos bioloģiskajos laukos (A un C), un šīs atšķirības ir būtiskas ($p < 0,05$), bet sēņu ir 4,1 reizi vairāk nekā konvencionālo vasaras rapšu laukā

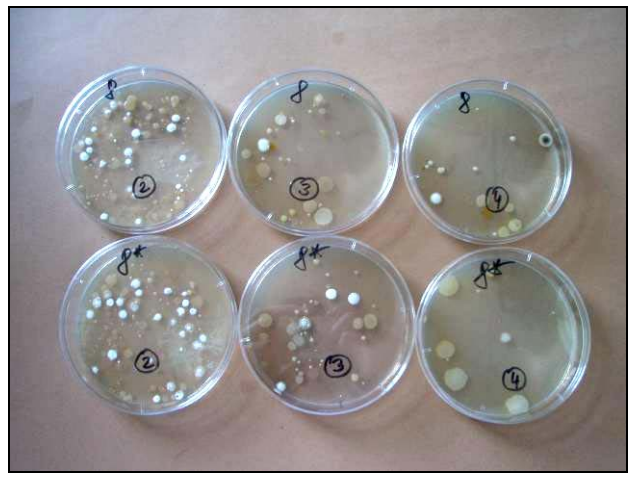
(G). Ātri augošo baktēriju daudzums līdzīgs ar visiem citiem laukiem, taču baktēriju kopskaits šeit ir vislielākais: 2,0-4,6 reizes lielāks nekā bioloģiskajā un konvencionālajā kartupeļu laukā (A, D), konvencionālajā mistrojuma (F) un vasaras rapša (G) laukā ($p < 0,05$). Maltozi izmantojošo baktēriju daudzums ir 2,5 reizes lielāks nekā konvencionālajā kartupeļu laukā (D), bet 1,7-4,1 reizi mazāks nekā abos ziemas rudzu laukos (C, E). Aktinomicētu ir apmēram tikpat daudz kā A un E laukos, bet 1,8-2,7 reizes mazāk nekā D, F un G laukos (konvencionālie kartupeļu, mistrojuma un vasaras rapša lauki) un 11,7 reizes mazāk nekā bioloģiskajā rudzu laukā (C). Aktinomicētu īpatsvars vismazākais – tikai 1,5 %. Visi trīs analizētie augsnes paraugi ir diezgan vienveidīgi. Baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība ir samērā liela – 1472. Augsnē ir daudzveidīgas sēņu populācijas, ar īpašu dominanci neizceļas neviena suga. Pa 23-25 % no sēņu kvv sastāda *Penicillium*, *Mortierella* un *Mucor* ģinšu sēnes, bet pa 6-10 % sastāda sterilu micēliju veidojošās sēnes un *Cephalosporium* spp. Bez tam šis ir vienīgais no analizētajiem laukiem, kurā konstatētas sterilu micēliju veidojošās sēnes un *Cephalosporium* spp.



Attēls 12-6. 4., 5. un 6. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 1-2 atkārtojumiem).

Bioloģiskā ziemas rudzu lauka (C lauks, 7.-9. paraugs) augsne izceļas ar lielu daudzumu sēņu kvv – to ir 2,1-24,6 reizes vairāk pārējos laukos ($p < 0,05$), kā arī ar lielu aktinomicētu daudzumu. Ātri augošo baktēriju daudzums līdzīgs ar visiem

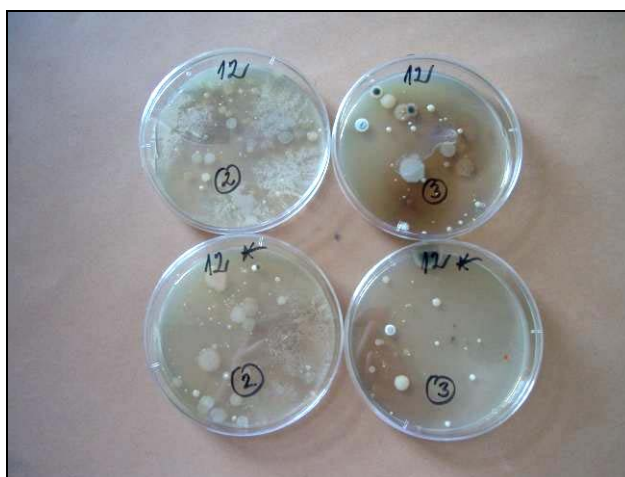
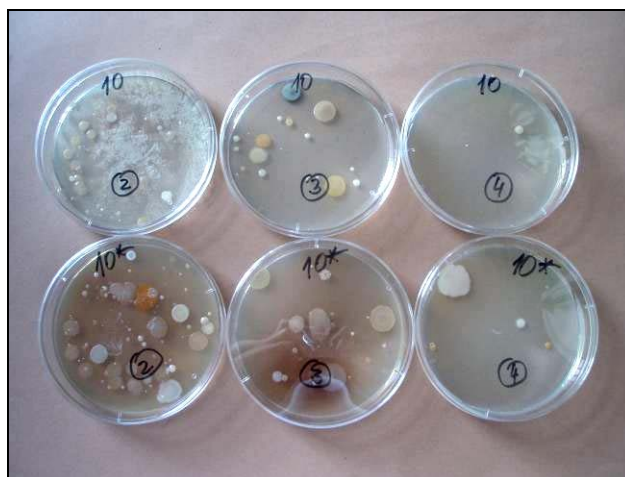
citiem laukiem, taču baktēriju kopskaits ir 1,9-2,7 reizes lielāks nekā konvencionālajā kartupeļu (D), konvencionālajā mistrojuma (F) un vasaras rapša (G) laukā ($p < 0,05$). Maltozi izmantojošo baktēriju daudzums ir 1,7-23,6 reizes lielāks nekā B, D, F un G laukos, bet nedaudz (2,4) reizes mazāks nekā konvencionālajā ziemas rudzu laukā (E). Aktinomicētu ir ievērojami (5,2-11,7 reizes) vairāk nekā pārējos pētītajos laukos. Aktinomicētu īpatsvars neparasti liels – 30,4 %. Visi trīs analizētie augsnes paraugi ir diezgan vienveidīgi, izņemot baktēriju kopskaitu (pēc 10 dienu ilgas inkubācijas). Baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība vismazākā no visiem analizētajiem laukiem – 144. Augsnē ir ļoti izteikta sēņu vienveidība – 95 % sastāda *Penicillium* spp. Šajā augsnē nelielā daudzumā konstatētas *Botrytis* ģints sēnes (100 kvv/g), kā arī šī ir vienīgā augsne, kur atrastas *Absidia* sp. (200 kvv/g). Uz *Botrytis* vēršam īpašu uzmanību, jo, kā zināms, *B. cinerea* (un droši vien mēs redzējām tieši šo sugu) izraisa pelēko puvi.



Attēls 12-7. 7., 8. un 9. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgus inkubācijas (foto 2 atkārtojumiem).

Konvencionālā kartupeļu lauka (D lauks, 10.-12. paraugs) augsnē ir 4,3-9,1 reizes mazāk sēņu kvv nekā bioloģiskajos kartupeļu un rudzu laukos (A un C), bet 24,6 reizes vairāk nekā konvencionālajā vasaras rapšu laukā (G). Ātri augošo

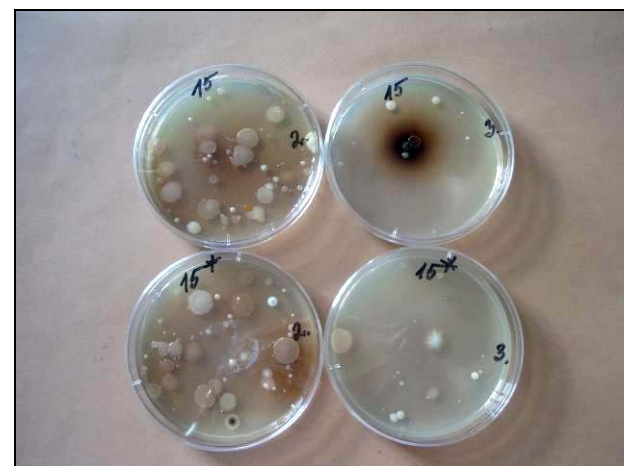
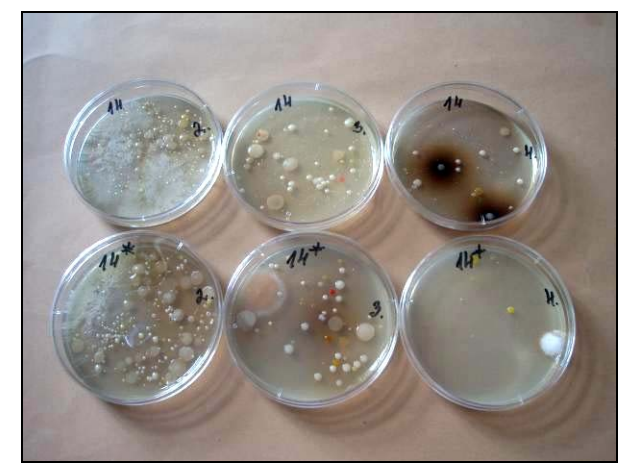
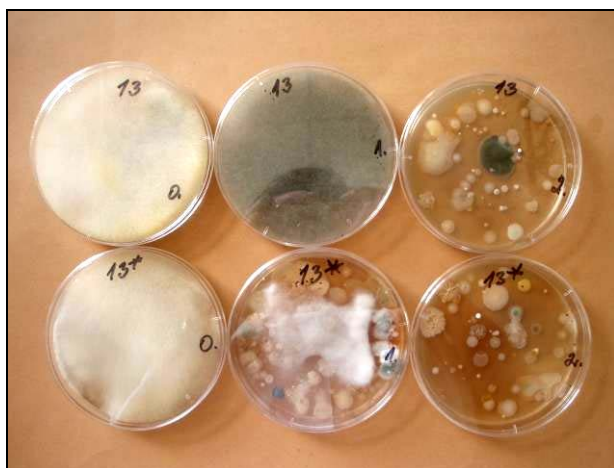
baktēriju daudzums līdzīgs ar visiem citiem laukiem, taču baktēriju kopskaits ir ievērojami (1,9-3,3 reizes) mazāks nekā bioloģiskajos krustziežu un rudzu laukos (B, C) un konvencionālajā rudzu laukā (E) ($p < 0,05$). Maltozi izmantojošo baktēriju daudzums ir 2,5-10,0 reizes mazāks nekā visos pētītajos laukos, izņemot konvencionālo mīroņuma lauku. Aktinomicētu daudzums ir nedaudz (2,5-2,7 reizes) lielāks nekā bioloģiskajos kartupeļu un krustziežu laukos (A, B), 4,4 reizes mazāks nekā bioloģiskajā rudzu laukā (C), bet būtiski neatšķiras no E, F un G laukiem Aktinomicētu īpatsvars liels – 13,3 %. Visi trīs analizētie augsnes paraugi ir samērā neviendabīgi pēc baktēriju daudzuma. Baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība ir vidēja – 686. Augsnē ir daudzveidīgas sēņu populācijas, kaut arī visu ģinšu kvv daudzums ir mazāks nekā bioloģiskajā kartupeļu laukā. Arī šeit, tāpat kā bioloģiskajā laukā, dominē *Penicillium* spp. (68 % īpatsvars). Atšķirībā no bioloģiskā lauka šeit ir ievērojams daudzums (16 %) *Verticillium* ģints sēņu.



Attēls 12-8. 10., 11. un 12. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgās inkubācijas (foto 2 atkārtojumiem).

Konvencionālā ziemas rudzu lauka (E lauks, 13.-15. paraugs) augsnē ir 5,4 un 11,4 reizes mazāk sēņu kvv nekā attiecīgi bioloģiskajos kartupeļu un rudzu laukos (A un C), nedaudz (1,8 reizes) mazāk nekā konvencionālajā mīroņuma laukā (F) un

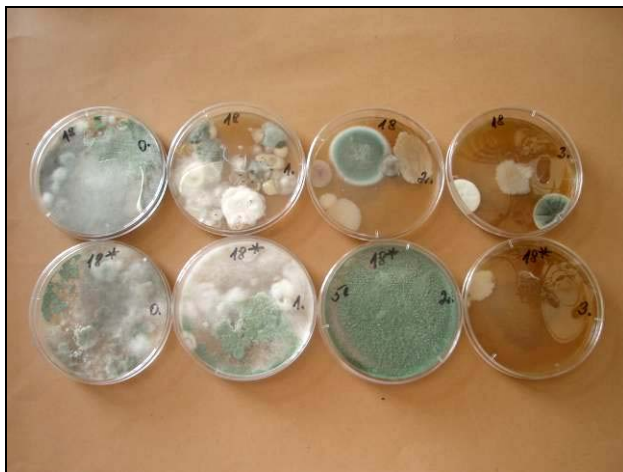
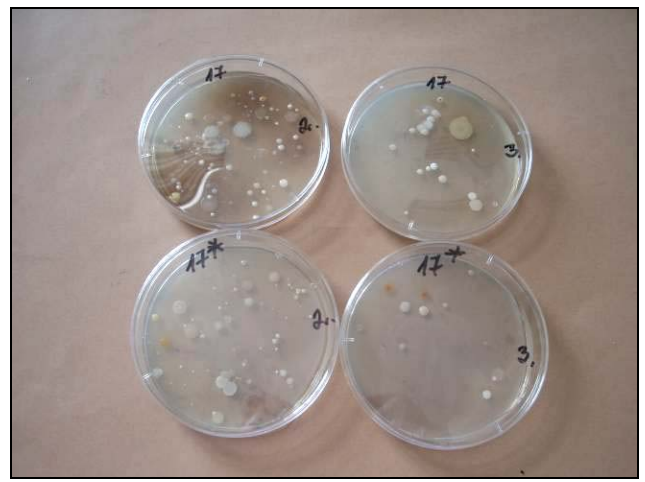
tikai 2,2 reizes vairāk nekā konvencionālajā rapša laukā (G). Ātri augošo baktēriju daudzums būtiski atšķiras tikai no konvencionālā rapša lauka (rudzu laukā tas ir apmēram 4 reizes lielāks), bet baktēriju kopskaits šeit ir 1,6-3,6 reizes lielāks nekā bioloģiskajā un konvencionālajā kartupeļu laukā (A un D), konvencionālajā mistrojuma (F) un vasaras rapša (G) laukā ($p < 0,05$). Arī maltozi izmantojošo baktēriju daudzums ir 3,9-10,0 reizes lielāks nekā visos citos konvencionālajos laukos, kā arī 4,1 reizi lielāks nekā bioloģiskajā krustziežu laukā (B), bet tas ir 2,4 reizes mazāks nekā bioloģiskajā rudzu laukā (C). Aktinomicētu ir apmēram tikpat daudz kā pārējos laukos, izņemot C lauku, kur to ir visvairāk, un aktinomicētu īpatsvars sastāda tikai 2,7 %. Visi trīs analizētie augsnes paraugi ir diezgan vienveidīgi, ja neskaita ātri augošo baktēriju kvv daudzumu. Šajā laukā ir vislielākā baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība – 2214. No sēnēm šajā augsnē dominē *Penicillium* ģinšu sēnes (īpatsvars 83 %), otrajā vietā ir *Verticillium* (8 %), bet pārējās ģintis katra sastāda ne vairāk par 4 %.



Attēls 12-9. 13., 14. un 15. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 2 atkārtojumiem).

Konvencionālā mistrojuma lauka (F lauks, 16.-18. paraugs) augsnē ir 3,0 un 6,4 reizes mazāk sēņu kvv nekā attiecīgi bioloģiskajos kartupeļu un rudzu laukos (A un C), bet 1,8 un 3,8 reizes vairāk nekā attiecīgi konvencionālajos rudzu un rapša laukos (E un G). Ātri augošo baktēriju daudzums ir līdzīgs ar visiem citiem laukiem,

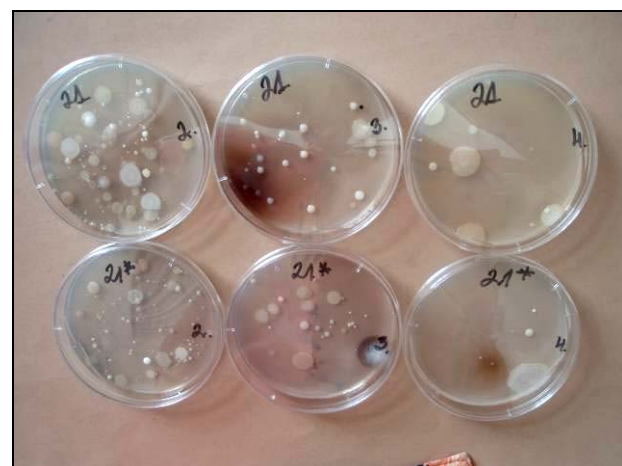
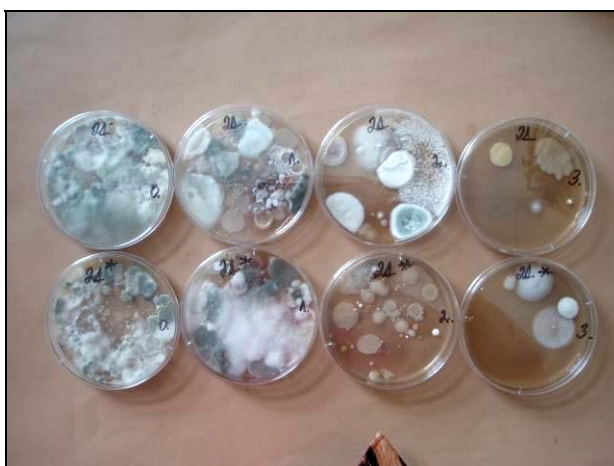
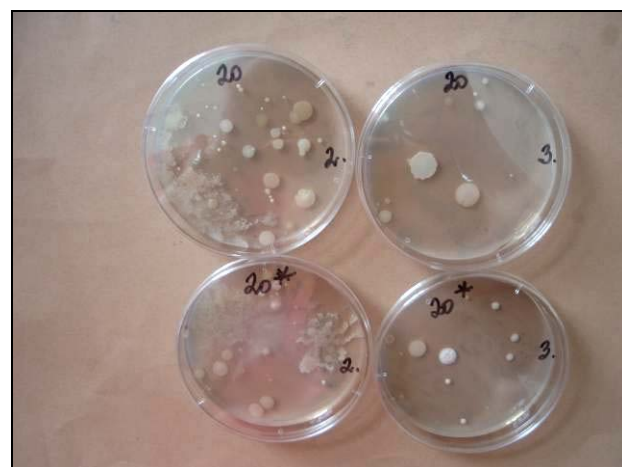
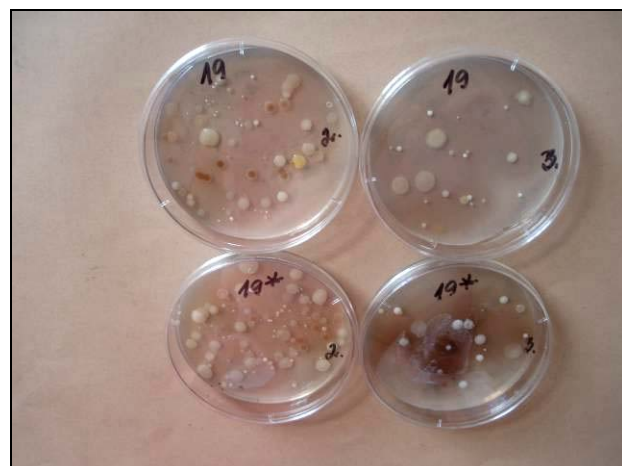
taču baktēriju kopskaits ir vismazākais: būtiski (2,3-4,6 reizes) mazāks nekā visos trijos bioloģiskajos laukos, kā arī nedaudz (1,2 reizes) mazāks nekā konvencionālajā rapša laukā (G) ($p < 0,05$). Arī maltozi izmantojošo baktēriju daudzums ir 1,6-5,1 reizes mazāks nekā bioloģiskajos kartupeļu un rudzu lakos (A, C) un konvencionālajā rapša laukā (G). Aktinomicētu ir apmēram tikpat daudz kā D un E laukos, bet 1,7-1,8 reizes vairāk nekā A un B laukos (bioloģiskie kartupeļu un krustziežu lauki), bet 1,2 un 6,4 reizes mazāks nekā attiecīgi konvencionālajā rapša laukā (G) un bioloģiskajā rudzu laukā (C). Aktinomicētu īpatsvars liels – 12,9 %. Visi trīs analizētie augsnes paraugi ir stipri nevienveidīgi pēc dažādu baktēriju kvv daudzuma. Baktēriju un sēņu kvv daudzuma vidējā attiecība ir neliela – 340, taču ir ļoti liela izkliede starp atsevišķajiem paraugiem. No augsnes sēnēm izteikti dominē *Penicillium* ģints sēnes (īpatsvars 79 %), bet pārējās ģintis katra sastāda ne vairāk par 8 %.



Attēls 12-10. 16., 17. un 18. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgās inkubācijas (foto 2 atkārtojumiem).

Konvencionālā rapša lauka (G lauks, 19.-21. paraugs) augsnē ir ļoti maz sēņu kvv – to ir ievērojami (2,2-24,6 reizes, $p < 0,05$) mazāk nekā pārējās pētītajās augsnēs. Arī ātri augošo baktēriju daudzums šajā laukā ir vismazākais, tomēr būtiski

atšķirīgs tikai no E lauka – rapša laukā šo baktēriju ir 2,5 reizes mazāk nekā konvencionālajā rudzu laukā, kur to ir visvairāk. Arī baktēriju kopskaits šeit ir viens no mazākajiem: 1,9-3,7 reizes mazāks nekā kā citos laukos, neskaitot konvencionālos kartupeļu un mistrojuma laukus (D un F). Arī maltozi izmantojošo baktēriju daudzums ir 1,6 un 3,9 reizes mazāks nekā attiecīgi bioloģiskajā rudzu laukā (C) un konvencionālajā mistrojuma laukā (E), bet nedaudz (2,6 reizes) lielāks nekā konvencionālajā kartupeļu laukā (D). Aktinomicētu ir apmēram tikpat daudz kā D un E laukos, 1,2-2,3 reizes vairāk nekā A, B, D un F laukos (visi trīs bioloģiskie lauki, kā arī konvencionālais mistrojuma lauks), taču to ir 5,2 reizes mazāk nekā bioloģiskajā rudzu laukā (C). Aktinomicētu īpatsvars liels – 12,9 %. Visi trīs analizētie augsnes paraugi savā starpā ievērojami atšķiras gan pēc sēņu, gan arī pēc baktēriju kvv daudzuma, pie tam visi pētītie rādītāji viszemākie ir 20. paraugā, kam seko 19, un pēc tam 21. paraugs. Baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība ir liela – 1615. Rapša lauka augsnē ar īpašu dominanci neizceļas neviena sēņu suga vai ģints. Pa 26-30 % no sēņu kvv sastāda *Penicillium*, *Mortierella* un *Verticillium* ģinšu sēnes, bet 4 % – *Mucor* un 11 % *Trichoderma* spp.



Attēls 12-11. 19., 20. un 21. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 2 atkārtojumiem).

Mēģinājām salīdzināt visu bioloģisko lauku augšņu un visu konvencionālo lauku augšņu vidējos mikrobioloģiskā sastāva rādītājus (tabula 12-5). Redzams, ka gan sēņu (pie tam – visu galveno grupu), gan arī visu baktēriju grupu rādītāji bioloģisko lauku augsnēs ir lielāki, tie atšķiras 1,2-5,4 reizes. Konvencionālajos

laukos ir būtiski ($p < 0,05$) samazināts vidējais sēņu un aktinomicētu kvv daudzums (attiecīgi 5,4 un 2,2 reizes). Līdz ar to konvencionālajās augsnēs ir aptuveni 3 reizes palielināta baktēriju un sēņu daudzuma attiecība. Statistiski nepierādās, taču novērojams, ka konvencionālajos laukos ir vairāk samazināts tieši baktēriju-K-stratēģistu daudzums salīdzinājumā ar baktērijām-r-stratēģistiem.

Salīdzinot augu sugu ietekmi, izpaužas arī krustziežu (mārrutku) un rapša ietekme uz sēņu sugām un to līdzsvarotību – šie ir vienīgie lauki, kuros nav vienas dominējošās sēņu sugas vai ģints, un te ir gan vismazākais sēņu kvv daudzums, gan arī atšķirībā no pārējiem laukiem te ir samazināts *Penicillium* spp. īpatsvars. Sēņu daudzuma samazināšanās un līdzsvara izmaiņas ir notikušas galvenokārt uz *Penicillium* ģints sugu kvv daudzuma samazināšanās rēķina.

Tabula 12-5. Bioloģisko un konvencionālo lauku augšņu mikrobioloģiskā sastāva salīdzinājums

Lauki, attiecība	Sēnes	Baktērijas ^a	Baktērijas ^{b,c}				Aktinomicētes, %	Baktērijas/ sēnes ^d
			3 dienas	10 dienas	aktinomicētes	K-stratēģisti		
Biol.	17400	130000	1600000	5400000	550000	3800000	10,2	310
Konv.	3200	99000	1300000	3100000	250000	1800000	8,1	970
Biol./ konv.	5,4	1,3	1,2	1,7	2,2	2,1	1,3	0,3

* Treknrakstā (*bold*) iezīmēti mikroorganismu skaita rādītāji, kas būtiski ($p < 0,05$) atšķiras.

^a Kultivētas iesala agara barotnē.

^b Kultivētas rauga ekstrakta-peptona agara barotnē.

^c Baktēriju kvv daudzums noteikts pēc augsnes suspensiju uzsējumu 3 un 10 dienu ilgas inkubācijas. Atsevišķā grupā iedalītas aktinomicētes. K-stratēģistu daudzums aprēķināts, no baktēriju kopskaita (10 dienu ilga inkubācija) atņemot r-stratēģistu skaitu (3 dienu ilga inkubācija).

^d Aprēķināta baktēriju un sēņu kopskaita attiecība.

Tomēr, savā starpā salīdzinot bioloģisko un konvencionālo rudzu lauku, kā arī bioloģisko un konvencionālo ziemas rudzu lauku, redzams, ka pats kultūraugs, tā suga, atstāj būtisku ietekmi uz mikroorganismu sastāvu augsnē. Sēņu daudzums ir būtiski samazināts šo abu augu sugu augšanas vidē (12-6., 12-7. tabula), kaut arī ziemas rudziem tas ir vairāk izteikts. Tā pati sakarība saglabājas arī baktēriju un sēņu kvv kopskaita attiecībā, bet pretēji rādītāji raksturo baktēriju kopskaita, kā arī atsevišķu grupu baktēriju daudzuma izmaiņas. Piemēram, konvencionālo kartupeļu augsnē, salīdzinājumā ar bioloģisko, ir būtiski samazināts maltozi izmantojošo baktēriju daudzums un būtiski palielināts aktinomicētu daudzums, bet attiecīgajos rudzu laukos šie abi rādītāji būtiski mainās pretēji.

Tabula 12-6. Bioloģisko un konvencionālo kartupeļu lauku augšņu mikrobioloģiskā sastāva salīdzinājums

Lauki, attiecība	Sēnes	Baktērijas ^a	Baktērijas ^{b,c}				Aktinomicētes, %	Baktērijas/ sēnes ^d
			3 dienas	10 dienas	aktinomicētes	K-stratēģisti		
Biol.	15000	220000	1000000	3900000	130000	2900000	3,3	260
Konv.	3500	26000	850000	2400000	320000	1550000	13,3	686
Biol./ konv.	4,3	8,5	1,2	1,6	0,4	1,8	0,3	0,4

* Treknrakstā (*bold*) iezīmēti mikroorganismu skaita rādītāji, kas būtiski ($p < 0,05$) atšķiras.

^a Kultivētas iesala agara barotnē.

^b Kultivētas rauga ekstrakta-peptona agara barotnē.

^c Baktēriju kvv daudzums noteikts pēc augsnes suspensiju uzsējumu 3 un 10 dienu ilgas inkubācijas. Atsevišķā grupā iedalītas aktinomicētes. K-stratēģistu daudzums aprēķināts, no baktēriju kopskaita (10 dienu ilga inkubācija) atņemot *r*-stratēģistu skaitu (3 dienu ilga inkubācija).

^d Aprēķināta baktēriju un sēņu kopskaita attiecība.

Tabula 12-7. Bioloģisko un konvencionālo ziemas rudzu lauku augšņu mikrobioloģiskā sastāva salīdzinājums

Lauki, attiecība	Sēnes	Baktērijas ^a	Baktērijas ^{b,c}				Aktinomicētes, %	Baktērijas/ sēnes ^d
			3 dienas	10 dienas	aktinomicētes	K-stratēģisti		
Biol.	32000	110000	2100000	4600000	1400000	2500000	30,4	144
Konv.	2800	260000	2800000	6200000	170000	3400000	2,7	2214
Biol./ konv.	11,4	0,4	0,8	0,7	8,2	0,7	11,3	0,1

* Treknrakstā (*bold*) iezīmēti mikroorganismu skaita rādītāji, kas būtiski ($p < 0,05$) atšķiras.

^a Kultivētas iesala agara barotnē.

^b Kultivētas rauga ekstrakta-peptona agara barotnē.

^c Baktēriju kvv daudzums noteikts pēc augsnes suspensiju uzsējumu 3 un 10 dienu ilgas inkubācijas. Atsevišķā grupā iedalītas aktinomicētes. K-stratēģistu daudzums aprēķināts, no baktēriju kopskaita (10 dienu ilga inkubācija) atņemot *r*-stratēģistu skaitu (3 dienu ilga inkubācija).

^d Aprēķināta baktēriju un sēņu kopskaita attiecība.

Augsnes paraugi:

- 1.-3. Bioloģiskais kartupeļu lauks – A;
- 4.-6. Bioloģiskais krustziežu (mārrutku) lauks – B;
- 7.-9. Bioloģiskais ziemas rudzu lauks – C;
- 10.-12. Konvencionālais kartupeļu lauks – D;
- 13.-15. Konvencionālais ziemas rudzu lauks – E;
- 16.-18. Konvencionālais mistrojuma lauks (vīķes ar miežiem) – F;
- 19.-21. Konvencionālais vasaras rapša lauks – G.

Tabulā 12-8 apkopoti dati par sēņu un baktēriju kolonijas veidojošo vienību (kvv) daudzumu gramā mitras augsnes katrā analizētajā paraugā, bet tabulā 12-9. – katrā laukā.

Baktēriju kvv/g noteikts, augsnes suspensiju atšķaidījumus uzsējot un kultivējot agarizētā rauga ekstrakta-peptona barotnē *Nutrient broth 'E'* (*Int. Diagnostics Group*, Lielbritānija); barotnes sastāvs (g/l): gaļas ekstrakts 1,0; rauga ekstrakts 2,0; peptons 5,0; NaCl 5,0; agars 20,0; divi atkārtojumi. Baktēriju kolonijas skaitītas pēc 3 un 10 dienu ilgas inkubācijas 20±2 °C temperatūrā. Pēc 3 dienām izaugušās kolonijas pieder ātri augošu baktēriju sugām – *r*-stratēģistiem, bet vēlāk (4.-10. dienā) izaugušās – lēni augošām – *K*-stratēģistiem. Baktēriju kvv kopskaits noteikts, saskaitot kolonijas pēc 10 dienu ilgas inkubācijas.

Sēņu kvv/g noteikts, augsnes suspensiju atšķaidījumus uzsējot un kultivējot agarizētā iesala ekstrakta barotnē (iesala ekstrakts d=1,028, agars 20,0 g/l). Kolonijas skaitītas pēc 3 dienu ilgas inkubācijas 20±2 °C temperatūrā. Pēc 10 dienu ilgas inkubācijas noteiktas augsnē dominējošo un iesala agara barotnē kultivējamo sēņu ģintis, un analizētajos paraugos tās bija *Mortierella*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma* un *Verticillium*, kā arī sterilu micēliju veidojošas sēnes. Nevienā paraugā netika konstatētas *Absidia*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Geotrichum* un *Rhizopus* spp., tādēļ secinām, ka šo sēņu ir mazāk nekā 100 kvv/g (noteikšanas robeža). Iesala agara barotnē noteikts arī to baktēriju kvv daudzums, kas aug uz iesala, kur par galveno oglekļa barības avotu kalpo maltoze.

Tabula 12-8. Sēņu un baktēriju kvv/g mitras augsnes analizētajos paraugos*

Lauki un paraugi	Sēnes ^a	Baktērijas ^a	Baktērijas ^{b,c}		
			3 dienas	10 dienas	aktinomicētes
A 1	(8,0±0,1)x10 ³	(1,2±0,2)x10 ⁵	(2,3±1,0)x10 ⁶	(2,1±0,2)x10 ⁶	<1x10 ⁵
A 2	(5,5±0,5)x10³	(7,5±3,5)x10 ⁴	(2,1±0,5)x10 ⁶	(2,3±0,5)x10 ⁶	<1x10 ⁵
A 3	(9,5±1,5)x10 ³	(1,4±0,1)x10 ⁵	(2,8±0,9)x10 ⁶	(3,8±1,0)x10 ⁶	(3,0±0,1)x10⁵

B 4	(1,0±0,1)x10⁴	(1,5±0,1)x10⁴	(2,9±0,8)x10 ⁶	(3,1±0,8)x10 ⁶	(2,0±1,0)x10 ⁴
B 5	(6,0±0,1)x10³	(1,7±0,9)x10 ⁵	(2,8±0,1)x10 ⁶	(3,6±0,3)x10 ⁶	(1,0±1,0)x10 ⁴
B 6	(3,5±0,5)x10³	(1,6±0,4)x10 ⁵	(2,1±0,7)x10 ⁶	(4,6±0,4)x10 ⁶	(2,0±1,0)x10⁶
C 7	(7,5±0,5)x10³	(1,4±0,7)x10 ⁵	(1,7±1,1)x10 ⁶	(2,7±1,2)x10 ⁶	(6,5±2,5)x10⁵
C 8	(1,6±0,3)x10⁴	(9,5±1,5)x10 ⁴	(1,7±0,3)x10 ⁶	(1,8±0,2)x10 ⁶	(2,3±0,5)x10 ⁵
C 9	(2,0±0,1)x10³	(2,3±1,0)x10 ⁵	(2,7±0,8)x10 ⁶	(3,8±1,1)x10 ⁶	(1,1±0,3)x10 ⁵
D 10	(6,5±3,5)x10 ³	(6,6±0,4)x10⁴	(1,1±0,1)x10⁶	(2,0±0,5)x10 ⁶	<1x10 ⁵
D 11	(1,5±0,3)x10 ⁴	(2,4±0,6)x10 ⁴	(2,9±0,5)x10⁶	(3,3±1,0)x10 ⁶	<1x10 ⁵
D 12	(1,9±0,3)x10 ⁴	(2,0±0,3)x10 ⁴	(2,0±1,0)x10⁵	(2,5±0,5)x10 ⁶	<1x10 ⁵
E 13	(3,0±1,0)x10³	(1,2±0,3)x10⁵	(2,8±0,4)x10 ⁶	(3,5±0,6)x10 ⁶	<1x10 ⁵
E 14	(6,5±0,5)x10³	(6,0±1,0)x10⁴	(2,5±0,3)x10 ⁶	(3,0±0,6)x10 ⁶	<1x10 ⁵
E 15	(5,0±0,1)x10³	(7,8±0,4)x10⁴	(3,2±0,2)x10⁶	(3,7±1,2)x10 ⁶	(1,0±0,2)x10⁴
F 16	(1,2±0,5)x10⁴	(1,1±0,3)x10 ⁵	(2,8±1,0)x10 ⁶	(3,8±0,5)x10 ⁶	<1x10 ⁵
F 17	(3,5±0,5)x10 ³	(7,3±0,5)x10 ⁴	(2,3±0,9)x10 ⁵	(2,7±1,0)x10 ⁶	<1x10 ⁵
F 18	(3,5±0,5)x10 ³	(1,9±0,4)x10⁵	(3,0±0,6)x10 ⁶	(3,3±0,7)x10 ⁶	>1x10 ⁵
G 19	(4,0±0,1)x10³	(5,7±0,1)x10⁴	(3,1±0,4)x10 ⁶	(4,3±0,1)x10⁶	<1x10 ⁵
G 20	(6,0±1,0)x10 ³	(1,5±0,1)x10⁵	(2,0±0,1)x10 ⁶	(2,4±0,7)x10 ⁶	(1,0±0,5)x10⁴
G 21	(7,5±0,5)x10 ³	(8,0±1,0)x10⁴	(2,2±0,5)x10 ⁶	(2,7±0,4)x10 ⁶	<1x10 ⁵

* Treknrakstā (*bold*) iezīmēti rādītāji, kas būtiski (p<0,05) atšķiras no abiem pārējiem konkrētā lauka rādītājiem.

^a Kultivētas iesala agara barotnē.

^b Kultivētas rauga ekstrakta-peptona agara barotnē.

^c Baktēriju kvv daudzums noteikts pēc augsnes suspensiju uzsējumu 3 un 10 dienu ilgas inkubācijas. Atsevišķā grupā iedalītas aktinomicētes.

Tabula 12-9. Sēņu un baktēriju kvv/g mitras augsnes analizētajos laukos

Lauki	Sēnes ^{a,d}	Baktērijas ^{a,d}	Baktērijas ^{b,c,d}		
			3 dienas	10 dienas	aktinomicētes
A	(7,7±1,6)x10 ³	(1,1±0,3)x10 ⁵	(2,4±0,3)x10 ⁶	(2,7±0,8)x10 ⁶	<1x10 ⁵
		D			B, C

B	$(6,5 \pm 2,7) \times 10^3$	$(1,2 \pm 0,7) \times 10^5$	$(2,6 \pm 0,4) \times 10^6$	$(3,2 \pm 0,8) \times 10^6$	$(6,8 \pm 6,8) \times 10^5$ A, D, E, F, G
C	$(8,5 \pm 5,7) \times 10^3$	$(1,6 \pm 0,5) \times 10^5$ D	$(2,0 \pm 0,5) \times 10^6$	$(2,8 \pm 0,8) \times 10^6$	$(3,3 \pm 2,3) \times 10^5$ A, D, E, F, G
D	$(1,4 \pm 0,5) \times 10^4$ E, G	$(3,7 \pm 2,1) \times 10^4$ A, C, F	$(1,4 \pm 1,1) \times 10^6$	$(2,6 \pm 0,5) \times 10^6$	$< 1 \times 10^5$ B, C
E	$(4,8 \pm 1,4) \times 10^3$ D	$(8,6 \pm 2,5) \times 10^4$	$(2,8 \pm 0,3) \times 10^6$	$(3,4 \pm 0,3) \times 10^6$	$< 1 \times 10^5$ B, C
F	$(6,3 \pm 4,0) \times 10^3$	$(1,2 \pm 0,5) \times 10^5$ D	$(2,0 \pm 1,3) \times 10^6$	$(3,3 \pm 0,4) \times 10^6$	$< 1 \times 10^5$ B, C
G	$(5,8 \pm 1,4) \times 10^3$ D	$(9,6 \pm 4,0) \times 10^4$	$(2,4 \pm 0,5) \times 10^6$	$(3,1 \pm 0,8) \times 10^6$	$< 1 \times 10^5$ B, C

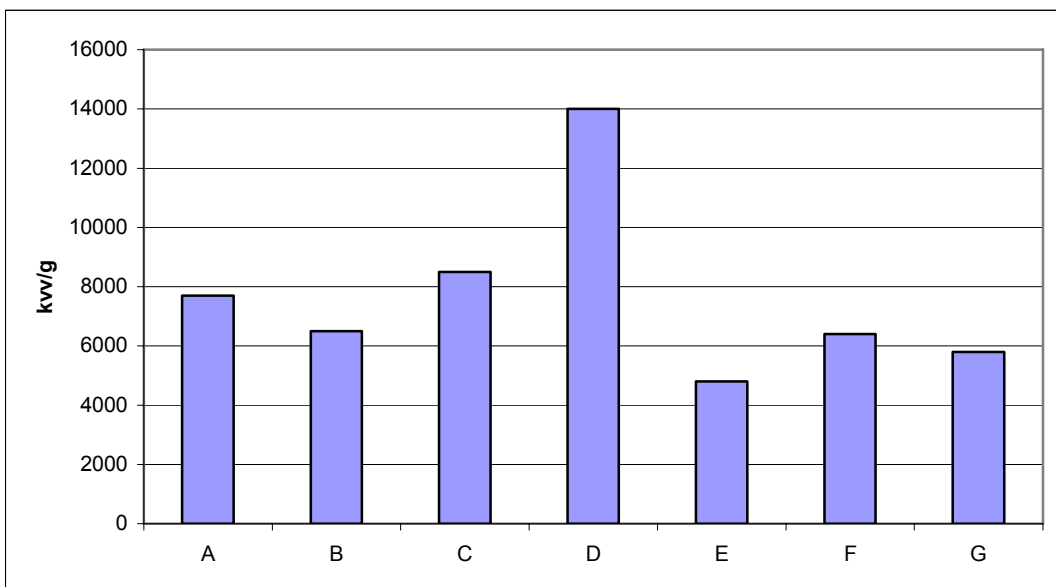
^a Kultivētas iesala agara barotnē.

^b Kultivētas rauga ekstrakta-peptona agara barotnē.

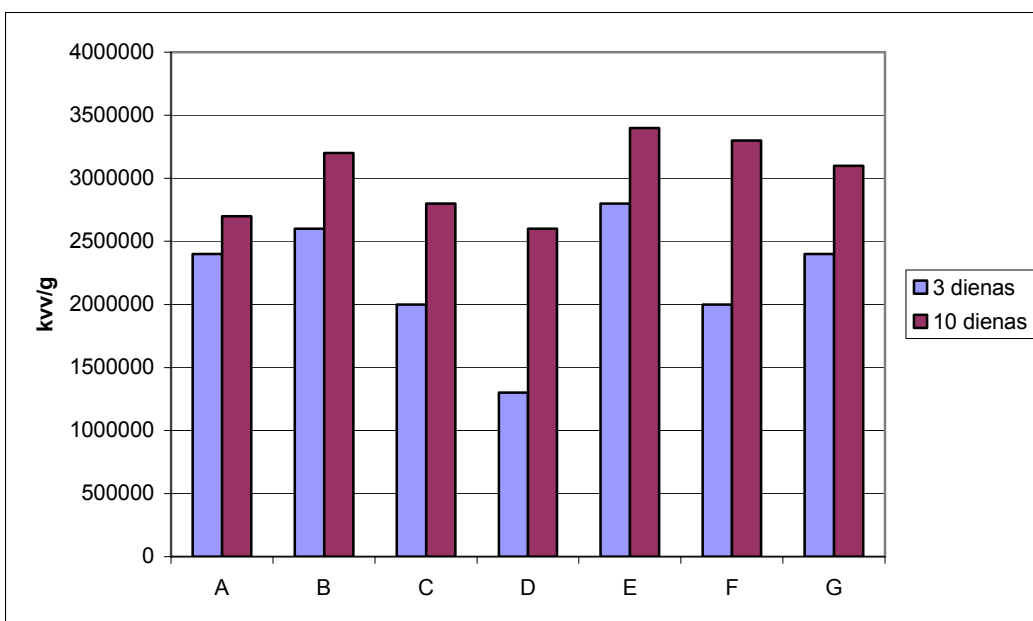
^c Baktēriju kvv daudzums noteikts pēc augsnes suspensiju uzsējumu 3 un 10 dienu ilgas inkubācijas. Atsevišķā grupā iedalītas aktinomicētes.

^d Ar burtiem A-G atzīmētas grupas, ar kurām dotajai grupai ir būtiskas atšķirības ($p < 0,05$).

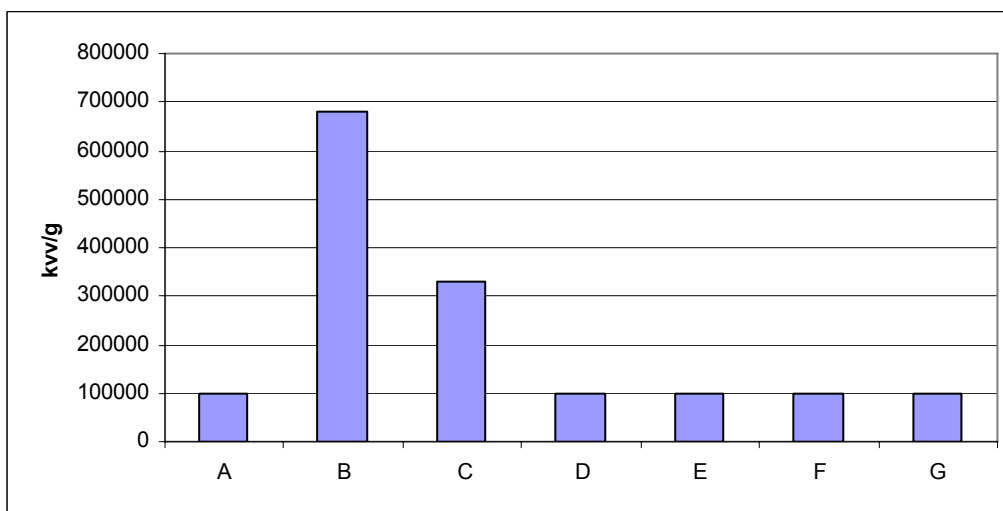
Iegūtie rezultāti ļauj salīdzināt visu augšņu mikrobioloģisko sastāvu (Attēli 12-12.-12-15., tabulas 12-10, 12-11).



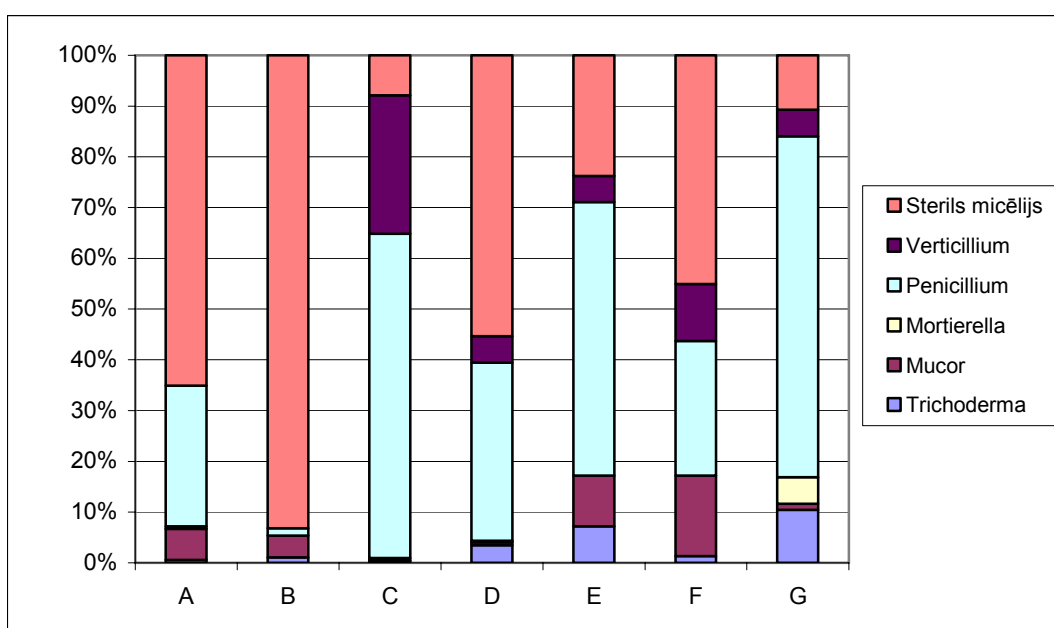
Attēls 12-12. Sēņu kvv/g augsnes



Attēls 12-13. Ātri augošo (3 dienas) baktēriju daudzums un baktēriju kopējais daudzums (10 dienas) augsnē, kvv/g.



Attēls 12-14. Aktinomicētu kvv/g augsnes.



Attēls 12-15. Dominējošo ģinšu sēņu īpatsvars augsnē.

Tabula 12-10. Baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība augsnē

Lauks	Baktērijas / sēnes*
A	351 (263-418)
B	492 (310-1314)
C	329 (113-1900)
D	186 (132-308)
E	708 (462-1167)
F	516 (317-943)
G	534 (360-1075)

* Iekavās robežas, kurās iekļaujas visi trīs atsevišķie paraugi.

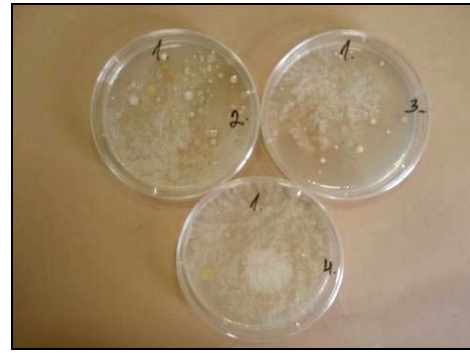
Tabula 12-11. Aktinomicētu īpatsvars baktēriju kvv kopskaitā

Paraugs	Aktinomicētes, % no visām baktērijām*
A	<3,6 (<3,6-7,9)
B	21,3 (0,3-43,5)
C	11,8 (2,9-24,1)
D	<3,8 (<3,0-<4,0)
E	<2,9 (0,3-<3,3)
F	<3,0 (<2,7-<3,7)
G	<3,2 (0,4-<3,7)

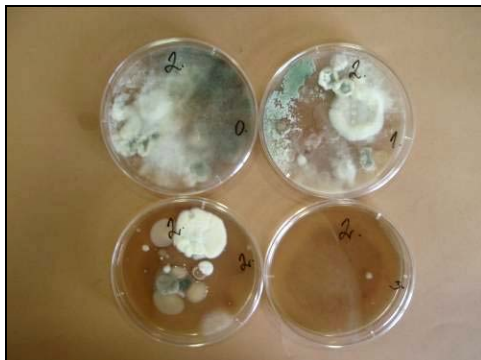
* Iekavās robežas, kurās iekļaujas visi trīs atsevišķie paraugi.

Bioloģiskā kartupeļu lauka (A lauks, 1.-3. paraugs) augsnē ir samērā daudz sēņu, tomēr nav būtiskas atšķirības ar citiem laukiem. Arī ātri un lēni augošo baktēriju daudzums līdzīgs ar visiem citiem laukiem. Maltozi izmantojošo (iesala agara barotnē augošo) baktēriju daudzums ir 1,5 reizes mazāks ($p < 0,05$) nekā konvencionālajā kartupeļu laukā (D); ar citiem laukiem nav būtisku atšķirību. Atsevišķi vērtējot aktinomicētes, redzams, ka to ir apmēram tikpat daudz kā D, E, F un G laukos, bet vismaz 3,3 un 6,8 reizes mazāk nekā attiecīgi C un B laukos (bioloģiskie ziemas rudzu un mārrutku lauki). Aktinomicētu īpatsvars no visām baktērijām mazs – mazāks par 3,6 %. Baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība ir neliela – 351. Augsnē dominē sterilu micēliju veidojošas sēnes (65 % no visām sēņu kvv), bet otro vietu pēc izplatības ieņem *Penicillium* spp. (īpatsvars 28 %).

Bioloģiskā krustziežu lauka (B lauks, 4.-6. paraugs) augsne pēc sēņu, ātri un lēni augošo baktēriju, kā arī maltozi izmantojošo baktēriju kvv daudzuma ievērojami neatšķiras no citiem laukiem. Atšķiras aktinomicētu daudzums – to ir daudz, apmēram tikpat, cik bioloģiskajā ziemas rudzu laukā C, bet vismaz 10 reizes vairāk nekā pārējos laukos. Aktinomicētu vidējais īpatsvars sasniedz 21,3 %. Baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība ir vidēji liela – 492. Augsnē dominē sterilu micēliju veidojošas sēnes (kvv īpatsvars 93 %).



Attēls 12-16. 1. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzņēmumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 2 atkārtojumiem).



Attēls 12-17. 2. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzņēmumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 2 atkārtojumiem).



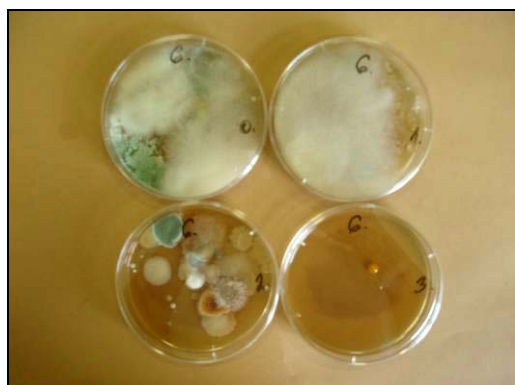
Attēls 12-18. 3. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgās inkubācijas (foto 2 atkārtojumiem).



Attēls 12-19. 4. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgās inkubācijas (foto 1-2 atkārtojumiem).



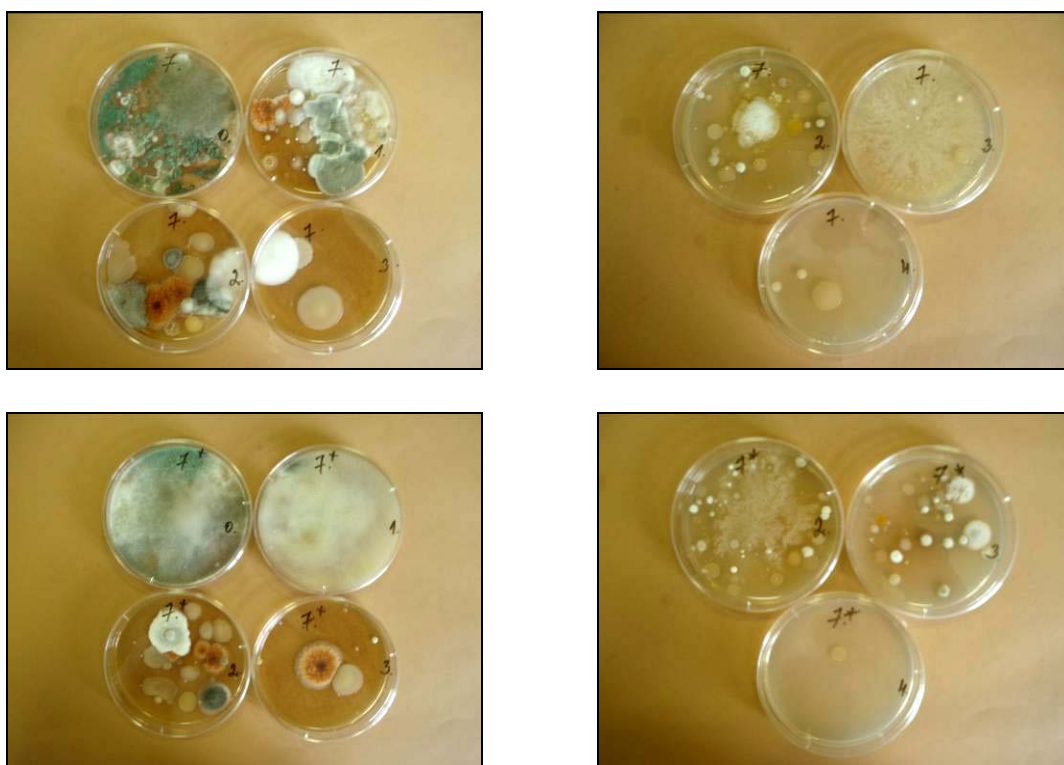
Attēls 12-20. 5. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 1-2 atkārtojumiem).



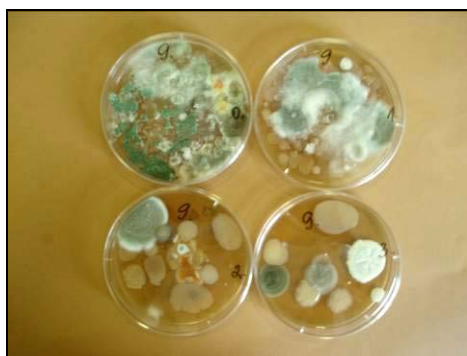
Attēls 12-21. 6. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 1-2 atkārtojumiem).

Bioloģiskā ziemas rudzu lauka (C lauks, 7.-9. paraugs) augsne pēc sēņu, ātri un lēni augošo baktēriju kvv daudzuma ievērojami neatšķiras no citiem laukiem. Atšķiras maltozi izmantojošo baktēriju kvv daudzums – tas ir 1,5 reizes lielāks nekā bioloģiskajā kartupeļu laukā (A). Atšķiras aktinomicētu daudzums – to ir daudz, apmēram tikpat, cik bioloģiskajā mārrutku laukā (B), bet vismaz 10 reizes vairāk nekā pārējos laukos. Ir liels aktinomicētu īpatsvars – 11,8 %. Baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība neliela – 329. Augsnē dominē *Penicillium* spp. (īpatsvars 64 %); otrajā vietā – *Verticillium* sp. (27 %).

Konvencionālā kartupeļu lauka (D lauks, 10.-12. paraugs) augsnē ir daudz sēņu kvv – 2,4-2,9 reizes vairāk nekā E un G laukos (konvencionālie ziemas rudzi un rapsis). Ievērojami neatšķiras ātri un lēni augošo baktēriju daudzums, vienīgi maltozi izmantojošo baktēriju daudzums ir 3,0-4,3 reizes mazāks nekā bioloģiskajos kartupeļu un ziemas rudzu laukos (A, C) un konvencionālajā mistrojuma laukā (F). Aktinomicētu daudzums ir mazs – $<10^5$ kvv/g un būtiski mazāks nekā B un C laukos. Aktinomicētu īpatsvars $<3,8$ %. Baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība ir ļoti maza – 186. Augsnē dominē sterili micēliju veidojošās sēnes (55 %), bet otrajā vietā ir *Penicillium* spp. (35 % īpatsvars).



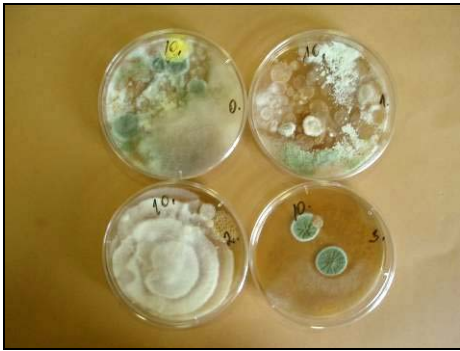
Attēls 12-22. 7. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 1-2 atkārtojumiem).



Attēls 12-23. 9. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzņēmumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 1-2 atkārtojumiem).



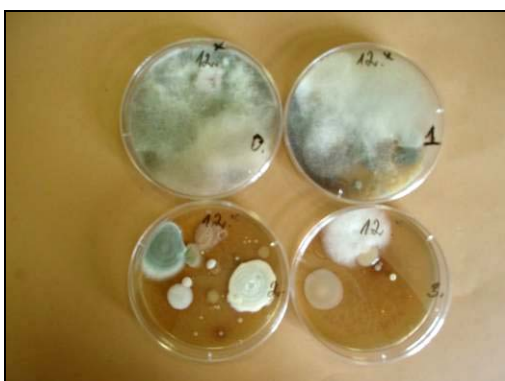
Attēls 12-24. 8. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzņēmumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 1-2 atkārtojumiem).



Attēls 12-25. 10. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 1-2 atkārtojumiem).



Attēls 12-26. 11. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 1-2 atkārtojumiem).



Attēls 12-27. 12. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 1-2 atkārtojumiem).

Konvencionālā ziemas rudzu lauka (E lauks, 13.-15. paraugs) augsnē ir 2,9 reizes mazāk sēņu kvv nekā konvencionālajā mistrojuma laukā (E), bet sēņu kvv daudzums ievērojami neatšķiras no citiem laukiem. Neatšķiras arī visu veidu baktēriju kvv daudzums, izņemot aktinomicētes, kuru ir mazāk nekā bioloģiskajos krustziežu un ziemas rudzu laukos (B, C). Aktinomicētu īpatsvars sastāda mazāk par 2,9 %. Šajā laukā ir vislielākā baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība – 708. No sēnēm šajā augsnē dominē *Penicillium* ģinšu sēnes (īpatsvars 54 %), otrajā vietā ir sterilu micēliju veidojošās sēnes (24 %), bet tālāk seko *Mucor* (10 %) un *Trichoderma* spp. (7 %).

Konvencionālā mistrojuma lauka (F lauks, 16.-18. paraugs) augsnē ir aptuveni tikpat daudz sēņu, kā arī ātri un lēni augošo baktēriju kvv/g kā citos laukos. Arī maltozi izmantojošo baktēriju daudzums ir līdzīgs un būtiski atšķiras (ir 3,2 reizes lielāks) tikai no konvencionālā kartupeļu lauka (D). Aktinomicētu ir maz – $<10^5$ kvv/g. Aktinomicētu īpatsvars mazs – $<3,0$ %. Baktēriju un sēņu kvv daudzuma vidējā attiecība sasniedz 516. No augsnes sēnēm pārsvarā izplatītas sterilu micēliju veidojošās sēnes (45 %), bet tālāk pēc izplatības seko *Penicillium* (26 %), *Mucor* (16 %) un *Verticillium* (11 %) ģinšu sugas.



Attēls 12-28. 13. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 1-2 atkārtojumiem).



Attēls 12-29. 14. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 1-2 atkārtojumiem).



Attēls 12-30. 15. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 1-2 atkārtojumiem).



Attēls 12-31. 16. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 1-2 atkārtojumiem).

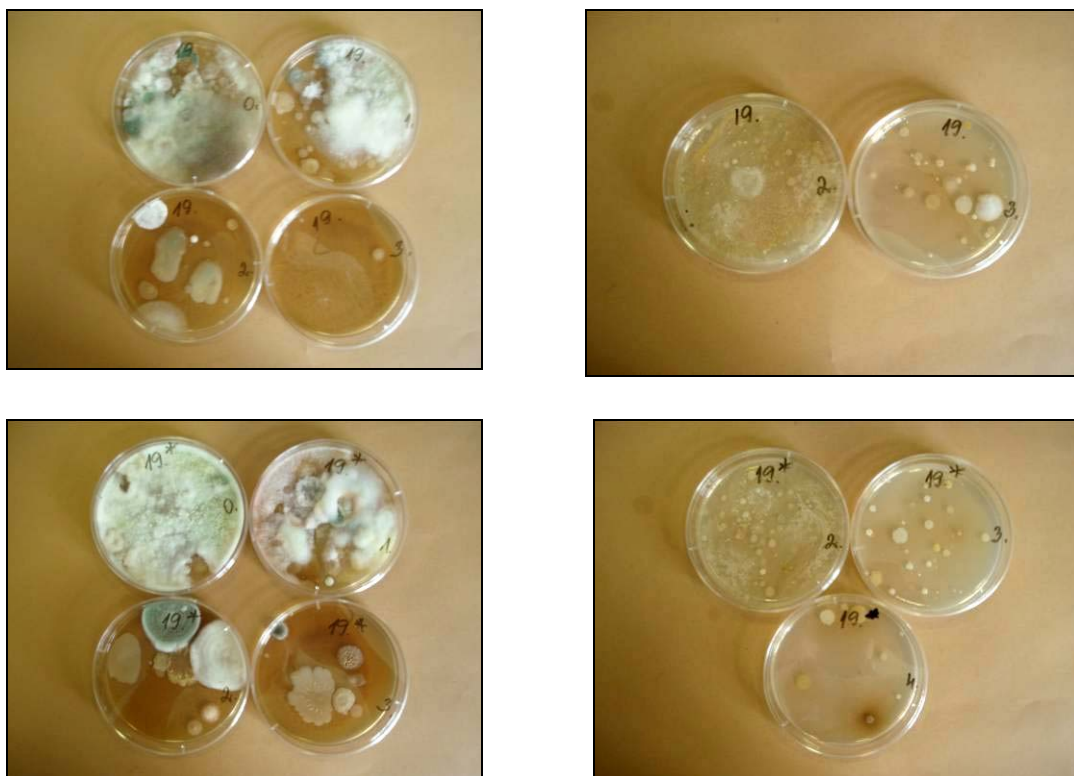


Attēls 12-32. 17. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgās inkubācijas (foto 1-2 atkārtojumiem)

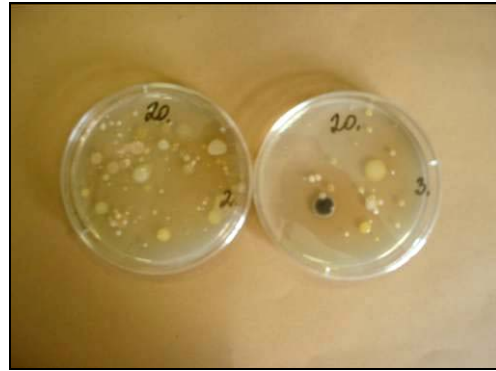
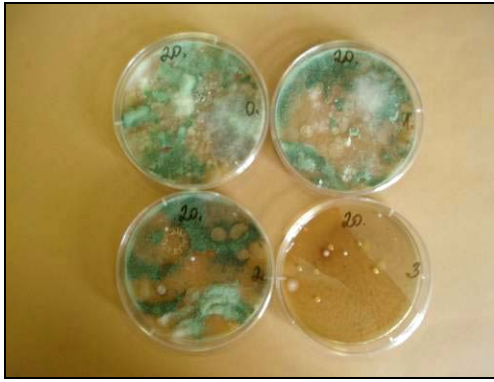


Attēls 12-33. 18. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgās inkubācijas (foto 1-2 atkārtojumiem).

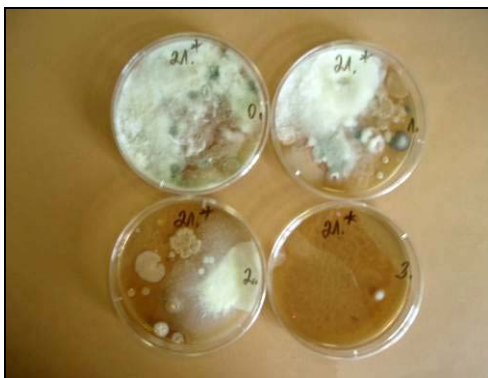
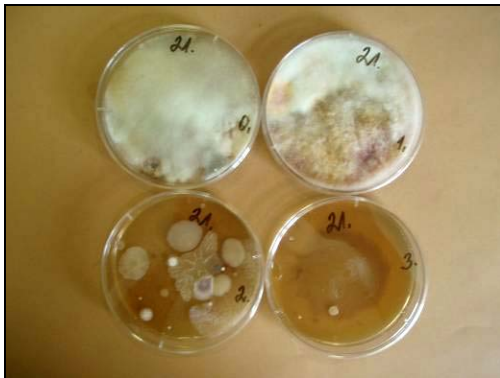
Konvencionālā rapša lauka (G lauks, 19.-21. paraugs) augsne pēc sēņu, ātri un lēni augošo baktēriju kvv daudzuma ievērojami neatšķiras no citiem laukiem, izņemot konvencionālo kartupeļu lauku (D), kurā ir 2,4 reizes vairāk sēņu kvv/g. Aktinomicētu daudzums ir mazāks nekā bioloģiskajos krustziežu (B) un ziemas rudzu (C) laukos, un aktinomicētu īpatsvars ir mazāks par 3,2 %. Baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība ir vidēji liela – 534. Rapša lauka augsnē dominē *Penicillium* spp. (67 %), bet sterilu micēliju veidojošo sēņu un *Trichoderma* sp. īpatsvars sastāda pa 10-11 %, bet *Mortierella* spp. – 5 %.



Attēls 12-34. 19. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 1-2 atkārtojumiem).



Attēls 12-35. 20. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 1-2 atkārtojumiem).



Attēls 12-36. 21. augsnes suspensijas 10-kārtīgo atšķaidījumu sērijas uzsējumi uz iesala agara barotnes (kreisajā pusē) un uz rauga ekstrakta-peptona barotnes (labajā pusē) pēc 10 dienu ilgas inkubācijas (foto 1-2 atkārtojumiem).

Visu bioloģisko lauku augšņu un visu konvencionālo lauku augšņu vidējie mikrobioloģiskā sastāva rādītāji apkopoti tabulā 12-12. Statistiski ticamas atšķirības nav novērojams nevienā mikroorganismu grupā, taču visvairāk atšķiras aktinomicētu daudzums un īpatsvars – bioloģiskajos laukos to ir vairāk, un arī to īpatsvars ir lielāks.

Tabula 12-12. Bioloģisko un konvencionālo lauku augšņu mikrobioloģiskā sastāv salīdzinājums

Lauki, attiecība	Sēnes	Baktērijas ^a	Baktērijas ^{b,c}				Aktinomicētes, %	Baktērijas/sēnes ^d
			3 dienas	10 dienas	aktinomicētes	K-stratēģisti		
Biol.	7600	130000	2300000	2900000	340000	600000	11,7	382
Konv.	7700	85000	2150000	3100000	<100000	950000	<3,2	403
Biol./konv.	1,0	1,5	1,1	0,9	>3,4	0,6	>3,7	0,9

^a Kultivētas iesala agara barotnē.

^b Kultivētas rauga ekstrakta-peptona agara barotnē.

^c Baktēriju kvv daudzums noteikts pēc augsnes suspensiju uzsējumu 3 un 10 dienu ilgās inkubācijas. Atsevišķā grupā iedalītas aktinomicētes. K-stratēģistu daudzums aprēķināts, no baktēriju kopskaita (10 dienu ilga inkubācija) atņemot r-stratēģistu skaitu (3 dienu ilga inkubācija).

^d Aprēķināta baktēriju un sēņu kopskaita attiecība.

Savstarpēji salīdzinot bioloģisko un konvencionālo rudzu lauku, kā arī bioloģisko un konvencionālo ziemas rudzu lauku, redzams, ka pats kultūraugs, tā suga, atstāj būtisku ietekmi uz mikroorganismu sastāvu augsnē. Konvencionālo kartupeļu augsnē, salīdzinājumā ar bioloģisko, ir būtiski (3,0 reizes) samazināts maltozi izmantojošo baktēriju daudzums. Konvencionālajā rudzu laukā, salīdzinājumā ar bioloģisko, ir būtiski samazināts (>3,3 reizes) aktinomicētu daudzums.

Tabula 12-13. Bioloģisko un konvencionālo kartupeļu lauku augšņu mikrobioloģiskā sastāva salīdzinājums

Lauki, attiecība	Sēnes	Baktērijas ^a	Baktērijas ^{b,c}				Aktinomicētes, %	Baktērijas/sēnes ^d
			3 dienas	10 dienas	aktinomicētes	K-stratēģisti		
Biol.	7700	110000	2400000	2700000	<100000	300000	<3,7	351
Konv.	14000	37000	1400000	2600000	<100000	1200000	<3,8	186
Biol./konv.	0,6	3,0	1,7	1,0	1,0	0,3	1,0	1,9

* Treknrakstā (*bold*) iezīmēti mikroorganismu skaita rādītāji, kas būtiski ($p < 0,05$) atšķiras.

^a Kultivētas iesala agara barotnē.

- ^b Kultivētas rauga ekstrakta-peptona agara barotnē.
- ^c Baktēriju kvv daudzums noteikts pēc augsnes suspensiju uzsējumu 3 un 10 dienu ilgas inkubācijas. Atsevišķā grupā iedalītas aktinomicētes. K-stratēģistu daudzums aprēķināts, no baktēriju kopskaita (10 dienu ilga inkubācija) atņemot *r*-stratēģistu skaitu (3 dienu ilga inkubācija).
- ^d Aprēķināta baktēriju un sēņu kopskaita attiecība.

Tabula 12-14. Bioloģisko un konvencionālo ziemas rudzu lauku augšņu mikrobioloģiskā sastāva salīdzinājums

Lauki, attiecība	Sēnes	Baktērijas ^a	Baktērijas ^{b,c}				Aktinomicētes, %	Baktērijas/sēnes ^d
			3 dienas	10 dienas	aktinomicētes	K-stratēģisti		
Biol.	8500	160000	2000000	2800000	330000	800000	11,8	329
Konv.	6300	86000	2800000	3400000	<100000	600000	<2,9	708
Biol./konv.	1,3	1,9	0,7	0,8	>3,3	1,3	>4,1	0,5

* Treknrakstā (*bold*) iezīmēti mikroorganismu skaita rādītāji, kas būtiski ($p < 0,05$) atšķiras.

- ^a Kultivētas iesala agara barotnē.
- ^b Kultivētas rauga ekstrakta-peptona agara barotnē.
- ^c Baktēriju kvv daudzums noteikts pēc augsnes suspensiju uzsējumu 3 un 10 dienu ilgas inkubācijas. Atsevišķā grupā iedalītas aktinomicētes. K-stratēģistu daudzums aprēķināts, no baktēriju kopskaita (10 dienu ilga inkubācija) atņemot *r*-stratēģistu skaitu (3 dienu ilga inkubācija).
- ^d Aprēķināta baktēriju un sēņu kopskaita attiecība.

2008. gada jūnijā un augustā ievāktu augsnes paraugu mikrobioloģisko rādītāju salīdzinājums

Bioloģiskā kartupeļu lauka augsnē no jūnija līdz augustam ir par 49-50 % samazinājies ($p < 0,05$) sēņu un maltozi izmantojošo baktēriju kvv daudzums, bet būtiski – 2,4 reizes – pieaudzis ātri augošo baktēriju daudzums. Aktinomicētu īpatsvars visu laiku ir mazs – nepārsniedz 3,6 %. Arī baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība visu laiku saglabājas neliela – 260-351. Veģetācijas laikā samazinājies *Penicillium* un *Mortierella* spp. īpatsvars, bet pieaudzis sterilu micēliju veidojošo sēņu īpatsvars.

Konvencionālā kartupeļu lauka augsnē ir 4 reizes palielinājies sēņu kvv daudzums, bet samazinājies aktinomicētu daudzums. Līdz ar to samazinājies arī aktinomicētu īpatsvars – no 13,3 līdz <3,8 %. Baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība ir samazinājusies no 686 līdz 186. Sezonas laikā no 68 līdz 35 % samazinājies *Penicillium* spp. īpatsvars, bet pieaudzis sterilu micēliju veidojošo sēņu daudzums un īpatsvars.

Bioloģiskā krustziežu lauka augsnē ievērojami izmainījies baktēriju kopskaits, tas samazinājies 2,4 reizes. Pieaudzis aktinomicētu īpatsvars – no 1,5 līdz 21,3 %. Samazinājusies baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība – no 1472 līdz 492. Izmainījies mikrocenozes sastāvs – jūnijā bija daudzveidīgas populācijas, bet augustā pārliecinoši dominē sterilu micēliju veidojošas sēnes (kvv īpatsvars 93 %), kas jūnijā sastādīja tikai 6-10 %.

Bioloģiskā ziemas rudzu lauka augsnē sezonas laikā par 73-76 % samazinājies sēņu un aktinomicētu kvv daudzums. Aktinomicētu īpatsvars visu laiku saglabājas augsts, kaut arī ir samazinājies no 30,4 līdz 11,8 %. Baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība visu laiku neliela, kaut arī nedaudz pieaug – no 144 līdz 329. Augsnē visu laiku dominē *Penicillium* spp. (īpatsvars jūnijā – 95 %, augustā – 64 %).

Konvencionālā ziemas rudzu lauka augsnē 1,7 reizes palielinājies sēņu kvv daudzums, bet par 67 % samazinājies maltozi izmantojošo baktēriju un par 45 % – baktēriju kopskaits. Samazinājies arī aktinomicētu daudzums, kaut gan īpatsvars ir mazs (2,7-2,9 %) un praktiski nemainīgs. Šajā laukā visu sezonu raksturīga liela baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība, tomēr tā samazinās no 2214 līdz 708. No sēnēm šajā augsnē visu laiku dominē *Penicillium* ģinšu sēnes (īpatsvars jūnijā 83 %, augustā – 54 %), bet vasaras laikā pieaug sterilu micēliju veidojošo sēņu kvv daudzums.

Konvencionālā mistrojuma lauka augsnē 2,8 reizes pieaudzis maltozi izmantojošo baktēriju kvv daudzums un 1,9 reizes – baktēriju kopskaits, bet samazinājies aktinomicētu daudzums, kā arī īpatsvars (no 12,9 līdz <3,0 %). Baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība nav liela, taču pieaug no 340 līdz 516. Vasaras laikā augsnē samazinājies *Penicillium* spp. īpatsvars (no 79 līdz 26 %), bet pieaudzis sterilu micēliju veidojošo sēņu īpatsvars.

Konvencionālā rapša lauka augsnē 4,5 reizes palielinājies sēņu un 3,5 reizes – ātri augošo baktēriju daudzums, bet samazinājies aktinomicētu daudzums un īpatsvars (no 12,9 līdz <3,2 %). Stipri samazinājusies jūnijā augstā baktēriju un sēņu kvv daudzuma attiecība – no 1615 līdz 534. Augsnē ir dažādu sēņu populācijas, un visu sezonu ar nelielu pārsvaru dominē *Penicillium* spp. (26-67 %). Visu sezonu

saglabājas ievērojams *Trichoderma* spp. daudzums (10-11 %), bet uz rudeni pieaug sterilu micēliju veidojošo sēņu īpatsvars.

Konstatēts, ka kultūrauga suga nozīmīgi ietekmē augsnes mikroorganismu populācijas, tādēļ, lai veiktu korektu salīdzināšanu, nepieciešams novērtēt arī iepriekšējā gadā audzēto sugu ietekmi, kā arī jāņem vērā agrotehnisko pasākumu ietekme.

Pielikums Nr. 13. Nezāļu daudzveidības analīze VPLSI

Lai noteiktu bāzes līnijas iespējamās ĢMO ietekmes uz Latvijas savvaļas augiem novērtēšanai, Valsts Priekuļu laukaugu selekcijas institūtā tika veikts pētījums par tīrumu nezāļu floru. Segetālo un kondicionālo nezāļu daudzveidības tīrumos fona stāvokļa novērtēšanai 2008. gadā VPLSI tika apsekoti divi dažādu saimniekošanas sistēmu lauki – bioloģiskā augseka un konvencionālais ilggadīgais augseku un mēslošanas stacionārs. Nevienā no šiem laukiem herbicīdi netika lietoti. Būtiskākā abu saimniekošanas sistēmu atšķirība bija tā, ka konvencionālajā izmantoti arī minerālmēsli un graudaugu sēkla tika kodināta.

Nezāļu uzskaitē tika veikta agrā laukaugu attīstības stadijā (labību sējumos to cerošanas laikā). Izmantota skaita metode, nosakot nezāļu skaitu gab. m⁻², analizēts nezāļu botāniskais sastāvs. Nezāles noteiktas sugu vai ģinšu līmenī.

Nezāļu taksonu un īpatņu skaits pa augseku laukiem variēja atkarībā no laukauga un tam pielietotajiem nezāles ierobežojošajiem agrotehniskajiem pasākumiem. Lielāka nezāļu sugu daudzveidība novērota bioloģiskās augsekas laukos. Te kopā tika identificēti 48 nezāļu taksoni, kamēr konvencionālajā laukā tikai 28. Bioloģiskajā augsekā starp dominējošām nezāļu sugām (par tādu tā tika uzskatīta, ja nezāļu īpatņu skaits ≥ 10 gab. m⁻²) bija tādas īsmūža nezāles, kā *Poa annua*, *Fumaria officinalis*, *Polygonum aviculare*, *Stellaria media*, *Stellaria graminea*, *Thlaspi arvense*, *Viola arvensis*, *Chenopodium spp.*, *Lamium spp.*, un daudzgadīgās nezāles – *Potentilla anserina*, *Sonchus spp.* un *Plantago spp.* Te tika reģistrēti arī pieci kondicionālo nezāļu taksoni – *Solanum tuberosum*, *Brasica napus*, *Raphanus sativus* var. *oleiformis*, *Trifolium spp.* un *Festuca spp.* Konvencionālajā laukā starp dominējošām bija tikai īsmūža nezāles – *Centaurea cyanus*, *Polygonum convolvulus*, *Spergula arvensis*, *Stellaria media*, *Thlaspi arvense*, *Chenopodium spp.*, *Galeopsis spp.*, *Matricaria spp.* un *Vicia spp.*

**Pielikums Nr. 14. N. Rostoka atskaite par dalību konferencē „1st Global
Conference on GMO Analysis”
Cernobbio, Itālija, 24. – 27. jūnijs, 2008**

Konferenci organizēja Eiropas Komisijas Joint Research Centre, kas atrodas Ispra, Itālija. Kā atzīmēja JRC Biotehnoloģijas un ĢMO nodaļas vadītājs *Guy Van den Eede*, šī ir pirmā globālā ĢMO analīzes konference vēsturē. Kopš pirmo ĢM lauksaimniecības augu šķirņu parādīšanās 90 gadu vidū, ir notikušas ievērojamas izmaiņas. Lai arī sabiedrības attieksme pret ĢM organismiem un no tiem iegūtās pārtikas vēl aizvien ir samērā negatīva, reālā situācija pasaulē ir izmainījusies un ĢM kultūraugi ir ieņēmuši stabilu un ievērojamu lomu daudzu valstu lauksaimniecībā un ekonomikā. Konference sniedza pragmatisku un daudzpusīgu ieskatu ĢMO analīzē no fermas līdz patērētāju galdam. Lielākais uzsvars tika likts uz ĢMO analīzi gan dažādās izcelsmes augu materiālā (sēklas, kartupeļu bumbuļi), gan arī apstrādātos pārtikas produktos izmantojot gan proteīnu, gan DNS uztveršanas metodes. Dažādu ĢMO vides risku analīze un novērtējums konferencē tieši apskatīti netika. Paralēli tehnisko un ētisko ĢMO analīzes aspektu apspriešanai, konferencē tika apskatīti arī ekonomiskie aspekti, it īpaši saistībā ar ES „zero tolerance” nostāju neatļauto ĢMO jomā.

Konferences trīs galvenās tēmas bija sekojošas:

1. Paraugu ievākšana visās ĢMO aprites stadijās;

Reprezentatīvu paraugu ievākšana ir ārkārtīgi svarīga, lai varētu noteikt reālo ĢMO saturu gan augu valsts lauksaimniecības produktos, gan arī apstrādātos pārtikas produktos.

2. Paraugu apstrādes un analīzes metodes;

Galvenās ĢMO analīzei pielietotās metodes ir modificētās DNS un tās kodēto proteīnu uztveršana izmantojot PĶR un imunoloģiskās metodes.

Konferencē piedalījās daudzas starptautiskas kompānijas, kuras piedāvā reaģentu komplektus proteīnu un DNS ekstrakcijai un noteiktu ĢMO analīzei.

3. References materiālu veidošana, ražošana un pieejamība.

References materiāls nepieciešams, lai kalibrētu ĢMO kvantitatīvo uztveršanu gan vienas laboratorijas ietvaros, gan arī starp dažādām laboratorijām dažādās valstīs. Konferencē gaitā tika iegūta informācija par iespējām iegādāties references materiālu, lai varētu veikt ĢMO analīzes Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultātē.

Konferencē tika apspriestas arī ar ĢMO analīzi saistītās problēmas.

1. Aizvien biežāk parādās ĢMO, kuros ir sastopamas vairākas ģenētiskās modifikācijas, piemēram, *B.t.* un herbicīdu rezistentā kukurūza. Tās tiek iegūtas krustojot sākotnējās ĢM līnijas. Šis jautājums svarīgs pieļaujamās

ĢMO klātbūtnes vai tehniskā piesārņojuma kopējās summas pārtikas paraugā (0.9%) gadījumā. Ja ĢMO tehniskais piesārņojums ir 0.9%, tad ĢMO gadījumā, kuros ir, piemēram, divas ģenētiskās modifikācijas, analīzes uzrādīs 1.8% ĢMO piemaisījumu.

2. „Zero tolerance” nosacījums importētajiem lauksaimniecības produktiem ir ekonomiski un bioloģiski bezjēdzīgs. Ņemot vērā ĢMO izplatību pasaulē un to, ka graudu kravas tiek veidotas no daudziem dažādiem fermeriem, neliels piejaukums ir neizbēgams.
3. Drīzumā parādīsies ĢMO veidi, kuros nebūs jaunas DNS molekulas, bet gan esošo auga gēnu ekspresijas samazināšana. Tā kā augs nesatur jaunu, ārēju DNS materiālu, rodas jautājums, kā veikt šādu ĢMO analīzi. Proteīnu analīzes metodes šai gadījumā nestrādās.

Konferencē tika iegūti dažādi informatīvie materiāli, kas saistīti ar ĢMO analīzes metodēm un laboratorijas protokoliem, kā arī multimediju materiāli par ĢMO analīzes procedūrām un likumdošanu Eiropas Savienībā. Informatīvie materiāli atrodas LU Bioloģijas fakultātē un ir pieejami sazinoties ar N. Rostoku.

**Pielikums Nr.15. L. Grantiņas atskaite par dalību kongresā EUROSOIL 2008
Vīnē, Austrijā (24.08.2008. – 30.08.2008.)**

Kongresa sesijā Augsne un ģenētiski modificētie organismi (*Soils and GMOs*) tika prezentēti septiņi referāti:

- 1) **Transgēno kartupeļu līniju ietekme uz rizosfēras mikroorganismu funkcijām (M. Schloter, Vācija)** – viena modificētā gēna (zeaksantīna uzkrāšanās bumbuļos) iedarbība uz auga fenotipu bija multipla, augi centās bloķēto gēnu kaut kā kompensēt; salīdzinot divas kartupeļu līnijas, gēnu izmaiņas bija dažādas; secinājumi – vispirms nepieciešams salīdzināt ar vecāku līniju, eksperimenti ir jāatkārto vairākus gadus dēļ iespējamām dažādiem laika apstākļiem; arī dažādi lauki deva dažādus rezultātus (atšķirīgākais abu lauku parametrs bija augsnes struktūra); transgēnās līnijas tika salīdzinātas ar konvencionālām kartupeļu šķirnēm; svarīgākās vietas (*hot spots*), kurās meklēt izmaiņas, ir rizosfēra, geokaulosfēra un nobiru slānis;
 - analizētie parametri rizosfērā – *nir* gēnu (*nirS* un *nirk*) sastopamība, *nir* (*nirS* un *nirk*) / *nosZ* attiecība rizosfērā (šī parametra noteikšanai ir nepieciešams liels paraugu skaits (30-40), jo citādi ir lielas standartklūdas); amonija un nitrātu daudzums; aktinomicēšu daudzveidība;
 - analizētie parametri geokaulosfērā – svarīgu kartupeļu patogēnu anatagonisti;
 - analizētie parametri nobiru slānī – lakāzes gēna kopiju skaits; nobiru degradācija pēc dažādiem laika periodiem.
- 2) **Ar kartupeļiem saistītu baktēriju izolātu molekulārā daudzveidība ar *in vitro* antagonistisku aktivitāti, ko ietekmē augšanas vieta, kultivārs un ģenētiskā modifikācija (K. Smalla, Vācija)** – tika analizēta kartupeļu līnijas, kam modificēta karotenoīdu veidošanās; tās tika audzētas kopā ar piecām konvencionālajām kartupeļu šķirnēm divos laukos; vispirms tika noteikts baktēriju KVV kopskaits rizosfērā (rizosfēras paraugs ir visa augu sakņu sistēma, no kuras iegūst 5 apakšparaugus); lai noteiktu antagonistisko baktēriju esamību un daudzveidību, tika izmantota kultivēšana, kas sasaistīta ar baktēriju skrīningu; no katra lauka tika izanalizētas apmēram 2000 baktēriju izolātas no kartupeļu rizosfēras un geokaulosfēras analizējot to antagonismu pret *Rhizoctonia solani* un *Verticillium dahliae*; tika noteikta *in vitro* antagonistu proporcija starp dominējošām kultivējamām rizosfēras baktērijām, *in vitro* antagonistu tika genotipēti ar ARDRA (ar restriktāzēm *Hin6I* un *13sh1236I*) un BOX-PKĶR; molekulārais raksturojums parādīja izteiktu vietas un mikrovides ietekmi; no kultivēšanas neatkarīgas DGGE analīzes arī parādīja būtisku audzēšanas vietas ietekmi, kas dominēja pār atšķirībām starp dažādiem kultivāriem un kloniem; galvenie secinājumi: antagonistisko baktēriju sastopamība bija atkarīga no audzēšanas vietas; *P. infestans* antagonistu proporcija bija augsta abos laukos; nākotnē pētījumos jāizmanto qPKĶR.
- 3) **Antibakteriālu vielu veidojošu transgēno kartupeļu ietekmes uz ar augiem saistītām mikroorganismu sabiedrībām salīdzinājums ar citu parametru radītiem efektiem (A. Sessitsch, Austrija)** – tika veikti siltumnīcas eksperimenti, lai noteiktu antibakteriālu vielu (atacīns/cekropīns (Merkur, CaMV 35S promoters), T4 lizozīms (Desire, nopalīna sintāzes promoters)) veidojošu transgēno kartupeļu un to netransformētu vecāku līniju

ietekmi uz rizosfēru un endofītiskajām baktēriju sabiedrībām; augi tika audzēti divos kontrastējošos augsnes tipos (Luvisol un Chernozem); rizosfēras augsnes un endofītu paraugi tika ņemti lakstu augšanas un agrīnās ziedēšanas laikā; tika izmantotas no kultivēšanas atkarīgas un neatkarīgas metodes; dažādu ekstracelulāro rizosfēras enzīmu, kas iesaistīti C, P un N vielu ciklos, aktivitātes tika noteiktas kā enzīmātiski hidrolizētu fluorescentu savienojumu (4-MUF vai 7-AMC) saturošu substrātu fluorescences līmenis; baktēriju sabiedrību strukturālā daudzveidība tika noteikta ar 16S RNS T-RFLP analīzi; ziedošai konvencionālajai un T4 lizozīmu veidojošai Desire līnijai, kas tika audzēta Chernozem Soils, tika izveidota klonu bibliotēka, gan ar *Erwinia carotovora* ssp. *Atroseptica* apstrādātiem, gan neapstrādātiem augiem; abi analizētie ģenētiskās transformācijas gadījumi radīja enzīmu aktivitātes un baktēriju sabiedrību izmaiņas; kopumā izteiktāks efekts bija T4 lizozīma līnijai salīdzinājumā ar atacīna/cekropīna līniju; tomēr salīdzinājumā ar citiem analizētajiem faktoriem (augšnes tips, auga genotips, veģetācijas posms un patogēna iedarbība) ģenētiskajai modifikācijai bija tikai neliela ietekme. Šim pētījumam ir turpinājums lauka apstākļos, kas tika veikts 2002. un 2003. gadā Spānijā. Pirmajā eksperimenta gadā audzēja konvencionālos tipus, lai noteiktu bāzes līnijas datus. Rezultāti publicēti Rasche et al., 2006, J. Appl. Ecol.

- 4) **Ģenētiski modificētu augu ietekmes uz rizosfēru noteikšana ar molekulāri ķīmisko skrīningu salīdzinājumā ar konvencionālām metodēm (A. Schlichting, Vācija)** – patlaban joprojām neeksistē standartprotokoli, lai noteiktu GMO iespējamo ietekmi uz vidi; pētījumā konvencionālās metodes tika apvienotas ar jaunu un ātru rizodepozītu molekulāru raksturošanas metodi - *Field Ionisation Mass Spectrometry* (Py-FIMS), kas ļauj noteikt pat nelielu *Vicia hirsuta* transgēno sakņu ietekmi; analizētajiem augiem bija *wild-type* dzinums un ar *Agrobacterium rhizogenes* inficētas transgēnas saknes (ARqual, nptII (kanamicīna rezistence), and PsbYcyl); eksperimenti tika veikti siltumnīcas apstākļos; pēc rizodepozītu izskalošanas Py-FIMS analīzēm tika noteikta arbuskulārās mikorizas (AM) kolonizācija, AM sporu blīvums un fosfolipīdu taukskābju gāzu hromatogrāfija; tika konstatēts, ka piemērotākā metode ir Py-FIMS (iekārta Finnigan MAT900), kuru var izmantot ar dažādiem marķiera signāliem (pagaidām nav marķiermolekulas, kas parādītu gēnu pārnesi augsnē); analizējamā parauga lielums 5 mg, nepieciešami vismaz 3 atkārtojumi. Secinājums – rekombinantiem proteīniem ir niecīga ietekme uz augsnes mikroorganismiem.
- 5) **Ģenētiski modificētu *Pseudomonas fluorescens* transports un uzglabāšana piesātinātās porainās vidēs (E. Klumpp, Vācija);**
- 6) **Monomērā B.t. (*Bacillus thuringiensis*) Cry1Aa toksīna adsorbcijas un desorbcijas uz diviem references minerāliem: montmorilonīta un kaolinīta (N. Helassa, Francija)** – joprojām nav pilnībā skaidrs, kas notiek ar ģenētiski modificēto augu veidotajiem B.t. toksīniem augsnē, kur tie nonāk ar augu sakņu eksudātiem un augu atliekām; paaugstinoties pH no 6,5 līdz 9, adsorbcija uz abiem māla minerāliem samazinājās; uz montmorilonīta adsorbcija bija 40 reizes lielāka nekā un kaolinīta; 14 % adsorbētā toksīna desorbējās ūdens vidē, bet 36 % - augsta pH buferos.
- 7) **Lauka apstākļos audzētas GMO kukurūzas atsevišķu augsnes atkarīgu tiešu un netiešu, iekšējās un ārējās mikorizosfēras parametru novērtējums (B. Biro, Ungārija)** - trīs gadus pēc kārtas tika ievākti augsnes un sakņu paraugi; analizētie parametri: kolonizācija ar AM sēnēm, r, k un l heterotrofo stratēģistu, oligotrofu un sporulējošo baktēriju skaits, mikrobiālā biomasa ar fluorescento diacetāta hidrolīzi, saprofitisko *Trichoderma* sēņu sastopamība un sugu sastāvs augsnes virsējos slāņos, brīvi dzīvojošie N

fiksētāji u.c. Secinājumi: kultivējamo mikroorganismu skaits rādīja, ka transgēnās B.t. kukurūzas eksudātiem nebija būtiskas ietekmes uz rizosfēras mikrobiotu, bet tika konstatēta izteikta sezonālā un gada variabilitāte; mikrobiālā aktivitāte bija augstāka modificētās kukurūzas laukos; AM sēņu atšķirības trešajā augšanas gadā jau bija nebūtiskas; netika konstatētas atšķirības *Trichoderma* sēņu sastopamībai un sugu daudzveidībai; rizosfēras sastāvs modificētās kukurūzas un nemodificētās kukurūzas laukos bija atšķirīgs; tika konstatēts, ka toksīns ietekmē nemērķa faunu (kolembolu aktivitāte B.t. kukurūzas laukā bija zema).

Kongresa posteru sesijā tika prezentēti arī divi posteru:

- 1) **B.t.-kukurūzas (MON810) Cry1Ab proteīna ceļš skābbarības un biogāzes gatavošanas procesos un to atlikumu izmantošanas lauksaimniecībā konsekvences (U. Schoebinger, Vācija)** –pieņemot, ka nākotnē B.t. kukurūza varētu tikt izmantota biogāzes ražošanā tika veikts eksperiments, lai noskaidrotu, kas laboratorijas apstākļos biogāzes ražošanas procesā notiek ar vairāku B.t. kukurūzas līniju veidotajiem Cry1Ab proteīniem un sintētisku Cry1Ab toksīnu; izmantotās metodes - DAS-ELISA un *western-blotting*. Pētījumā tika aplūkota arī iespēja biogāzes ražošanas atlikumus izmantot lauksaimniecībā kā mēslojumu.
- 2) **Mineralizējamais un kopējais augsnes C un kopējais N augsnes virskārtā nebija ietekmēts 7 gadus audzējot B.t. kukurūzu (A. Kravchenko, ASV)** – augsnes paraugi tika ievākti 0 – 7,5 cm dziļumā. Tika konstatēts, ka ne kopējais augsnes C un N, ne pēc 37 dienu inkubācijas mineralizētais kopējais C būtiski neatšķīrās starp B.t. kukurūzas un konvencionālās kukurūzas laukiem.

Galvenās kongresā gūtās atziņas:

- 1) Joprojām nav standartmetožu, lai analizētu ĢMO ietekmi uz augsnes mikroorganismiem;
- 2) Vairākiem pētījumiem kopīga iezīme – augsnes (arī rizosfēras) mikroorganismu sabiedrību analīzei tiek izmantotas gan uz kultivēšanu balstītas, gan no kultivēšanas neatkarīgas metodes;
- 3) Bieži tiek konstatēts, ka ĢMO ietekmē kādu augsnes mikroorganismu populāciju raksturojošu parametru, bet šīs atšķirības ir nenozīmīgas salīdzinājumā ar augsnes tipa, sezonālās un laika apstākļu ietekmi, salīdzinot vairākas augšanas sezonas.

Konferences ietvaros L.Grantina prezentēja posteru „Characterization of soil fungal communities in samples representing different agricultural and forest soils” (autoti: Grantina L., Kenigshalde K., Muiznieks I., Nikolajeva V., Seile E.)

**Pielikums Nr.16. N. Rostoka atskaite par dalību konference Plant GEM 7
Albenā, Bulgārija, 24. – 27. septembris, 2008**

Eiropas 7. Augu genomikas konference ir ikgadējs pasākums, kurā piedalās pazīstamākie Eiropas speciālisti augu ģenētikā un genomikā, kā arī vieslektori no ASV, Austrālijas, Japānas un Ķīnas. Konferencē tika apskatītas vairākas aktuālas augu ģenētikas un genomikas problēmas, piemēram, jaunākās genomikas tehnoloģijas, modeļorganismu un kultūraugu genoma struktūra, salīdzinošā genomika, genomu evolūcija un domestikācija, bioinformātika, augu atbilde uz biotisko un abiotisko stresu. Transgēni (ģenētiski modificēti) augi tiek tradicionāli izmantoti fundamentālos augu ģenētikas pētījumos stingri kontrolējamos apstākļos, lai veicinātu gēnu funkciju izpēti un potenciāli jaunu augu šķirņu veidošanu, kuras nebūtu ģenētiski modificētas. Šajā konferencē uzskatāmi parādījās, kā dažādas ģenētisko modifikāciju tehnoloģijas var palīdzēt identificēt gēnus, kas nodrošina izturību pret sausuma un aukstuma stresiem, vai arī pret dažādām slimībām.

Atzīstot ĢMO jautājuma nozīmi Eiropas Savienībā, nozīmīga konferences sekcija bija veltīta bioloģiskās drošības problēmai modernajā biotehnoloģijā. Konferencē bija paredzēta EK JRC (*Joint Research Center*) vadītāja *Guy Van den Ende* dalība, taču viņa vietā uzstājās JRC pārstāvis *Marco Mazzara* ar referātu „*Scientific and technical support for the implementation of EU GMO Policies*”. Viņš īsumā ieskicēja ES pastāvošo likumdošanu un regulācijas sistēmu ĢMO jomā, kā arī EK un dalībvalstu kompetences. Tālāk tika detalizēti izskaidrota JRC, CRL (*Community Reference Laboratory*) un ENGL (*European Network of Genetically Modified Organisms Laboratories*) loma ĢMO uztveršanas metožu izstrādes un validācijas jomā. ĢMO uztveršana iespējama DNS un proteīnu līmenī. Patlaban tiek plaši pielietotas polimerāzes ķēdes reakcijas (PĶR) ģenētiskās modifikācijas uztveršana augu genomā, kā arī imunoloģiskās metodes (ELISA) proteīnu uztveršanai. Izstrādes stadijā ir arī uz DNS čipu tehnoloģijas balstītas metodes, kas ļautu vienlaicīgi detektēt dažādus ĢMO. JRC piedāvā datubāzi, kurā apkopota informācija par visiem ES veiktajiem ĢMO lauka izmēģinājumiem. Datubāze pieejama internetā, JRC mājas lapā (<http://gmoinfo.jrc.ec.europa.eu/>).

Tālāk uzstājās *Ruud de Maagd* no Vageningenas universitātes Holandē par tēmu „*Biological containment strategies for transgenic crops*”. Referātā tika apskatītas iespējas samazināt ĢMO riskus apkārtējai videi izmantojot bioloģiskus risinājumus. Divi galvenie ĢMO izplatīšanās riski ir a) to sajaukšanās (krustošanās vai piemaisījumu ceļā) ar radniecīgiem kultūraugiem un b) to nokļūšana apkārtējā vidē krustojoties ar radniecīgiem savvaļas augiem. Pastāv divi galvenie veidi, kā novērst ĢMO nekontrolētu izplatību – a) fiziski ierobežot ĢMO izplatīšanos (buferzonas, izolācijas joslas, putekšņu uztveršanas barjeras) un b) bioloģiski ierobežot ĢMO izplatīšanos. Otrās iespējas izpētei ES 6. Ietvara programmā tiek realizēts projekts *TransContainer* (<http://www.transcontainer.org>).

Kristina Gruden (Lubļana, Slovēnija) uzstājās ar referātu „*GMO traceability in view of expanding GMO market*”. Viņa norādīja uz faktu, ka ĢMO izplatība pasaulē nepārtraukti palielinās, kas nosaka nepieciešamību pēc atbilstošiem kontroles pasākumiem. Tālākajā referātā lektore apskatīja dažādas jaunas tehniskas iespējas ĢMO uztveršanai un kvantitatīvai uztveršanai. Īpašu interesi izraisīja divas jaunas tehnoloģijas, *NASBA* (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*) un *NAIMA* (*NASBA Implemented Microarray Analysis*), kas piedāvā ātru un jutīgu ĢMO uztveršanu dažādas izcelsmes paraugos. Metode ir izotermiska, t.i., tā nav balstīta uz

PĶR. Tāpat auditorija tika iepazīstināta ar speciāli izveidotu datorprogrammu GMOTrack, kuru var izmantot, lai noteiktu nepieciešamo analīžu veidus noteiktu ĢMO uztveršanai, kā arī, lai aprēķinātu šo analīžu izmaksas.

Dr. I. Holme savā referātā iepazīstināja ar cisģenēzes principiem un perspektīvām dzīvnieku barības kvalitātes uzlabošanai. Cisģenēze, atšķirībā no tradicionālajām ĢMO izveides metodēm izmanto tikai augu gēnus no tās pašas sugas, lai piešķirtu organismam jaunas īpašības īsākā laikā nekā varētu panākt ar tradicionālās selekcijas metodēm. Tāpat šajā procesā organismā netiek ievadīti nekādi citi ģenētiski elementi, piemēram, antibiotiku izturības gēni. Dānijā tiek realizēts projekts, lai noteiktu ar cisģenēzi saistītos sociālos un ekonomiskos faktoros. Tika uzsvērts, ka cisģenēzes veidā iegūtie organismi patlaban tomēr atbilst ĢMO definīcijai saskaņā ar EK direktīvu 2001/18/EC.

Pielikums Nr.17. EK JRC CRL (Joint Research Center, Community Reference Laboratory) validētās ĢMO uztveršanas metodes konkrētajām līnijām

ĢMO līnija	Validētā metode	Metodes interneta vietne
<i>Kukurūza</i>		
Visas līnijas	DNS izdalīšana no kukurūzas sēklām ar <i>Dellaporta</i> atvasināto metodi.	http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/T25_DNAextraction.pdf
Visas līnijas	CTAB/Wizard metode DNS izdalīšanai no kukurūzas sēklām.	http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/59122_DNAExtr_sampl.pdf
Kukurūza NK603	Gadījuma specifiskā metode kukurūzas līnijas NK603 kvantitēšanai, izmantojot reālā laika PĶR.	http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/NK603-WEB-Protocol%20Validation.pdf
Kukurūza 59122x1507xNK603	Gadījuma specifiskā metode kukurūzas līnijas TC1507 kvantitēšanai, izmantojot reālā laika PĶR.	http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/TC1507-WEB-Protocol-Validation.pdf
	Gadījuma specifiskā metode kukurūzas līnijas NK603 kvantitēšanai, izmantojot reālā laika PĶR.	http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/NK603-WEB-ProtocolValidation.pdf
	Gadījuma specifiskā metode kukurūzas līnijas 59122 kvantitēšanai, izmantojot reālā laika PĶR.	http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/59122-ProtocolValidation.pdf
Kukurūza T25	Gadījuma specifiskā metode kukurūzas līnijas T25 kvantitēšanai, izmantojot reālā laika PĶR.	http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/T25-Protocol.pdf
<i>Kartupeļi</i>		
Visas līnijas	CTAB/Microspin metode DNS izdalīšanai no liofilizētiem kartupeļu bumbuļiem	http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/EH92-527-1_DNAExtr_sampl.pdf
Kartupeļi EH92-527-1	Gadījuma specifiskā metode kartupeļu līnijas EH92-527-1 amilopektīna kvantitēšanai, izmantojot reālā laika PĶR.	http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/EH92-527-Validated_method.pdf