



UPPSALA
UNIVERSITET

Genflödet från genetiskt modifierade grödor till vilda populationer

Isaias Afewerki

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2014
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

Tillämpningen av genetiskt modifierade (GM) grödor har varit utbredd över hela världen och har ökat markant sedan den första GM-grödan blev tillgänglig för kommersiellt bruk 1996. Sedan starten har det tillkommit mycket forskning kring risken för spridning av transgener från grödor till vilda populationer. För att en transgen ska kunna etableras i en vild population så måste tidiga generationer av hybrider överleva för att kunna återkorsas upprepade gånger med den vilda arten, det gör att det genetiska materialet från grödan succesivt reduceras i varje generation tills det att transgenen är det enda DNA från grödan kvar hos avkomman. För att denna process ska vara stabil krävs det en stark selektion för transgenen. Det här sättet för en gen att etableras i en population kallas för introgression och tros ha spelat en stor roll i växternas evolution. Hos vete så har man observerat introgression i ett tidigt skede med det besläktade ogräset bockvete där man även observerade en ökande fertilitet i efterföljande generationer. Hos odlad majs har man lyckats visa att majs kunnat anpassa sig till kallare klimat i nya habitat genom introgression från inhemska besläktade arter. Tecken på hybridisering och introgression har observerats hos flera grödor där selektionen har visat sig vara en av de viktigaste faktorerna för en nyintroducerad transgens fortlevnad inom en population. Migration mellan två populationer av besläktade arter, i form av pollen och fröspridning, påverkar kraftigt utsträckningen av hybridisering medan migration mellan subpopulationer inom en metapopulation påverkar effektiviteten av introgression. Om en transgen ger en förhöjd fitness till en sådan grad att hybrider framgångsrikt kan konkurrera med andra individer och reproducera sig så leder det till en spridning av genen. Transgenens interaktion med miljön påverkar också plantans fitness. En gen för insektresistens kommer att ge en ökad fitness när insektspopulationerna är stora, om insektspopulationen reduceras kraftigt så kommer genen stå för en onödig kostnad och utsättas för en negativ selektion. Den selektion som råder på åkern är anpassad för att möta våra behov av hög kvalitativ produktion av livsmedel och råvaror medan den naturliga selektionen väljer de individer som är bäst anpassade att överleva i den miljön. Sannolikheten för fixering av en transgen, skapad för att möta våra behov, i en vild population är låg, men den risken kräver ändå en noggrann utvärdering där man ser till de olika faktorerna i varje enskilt fall.

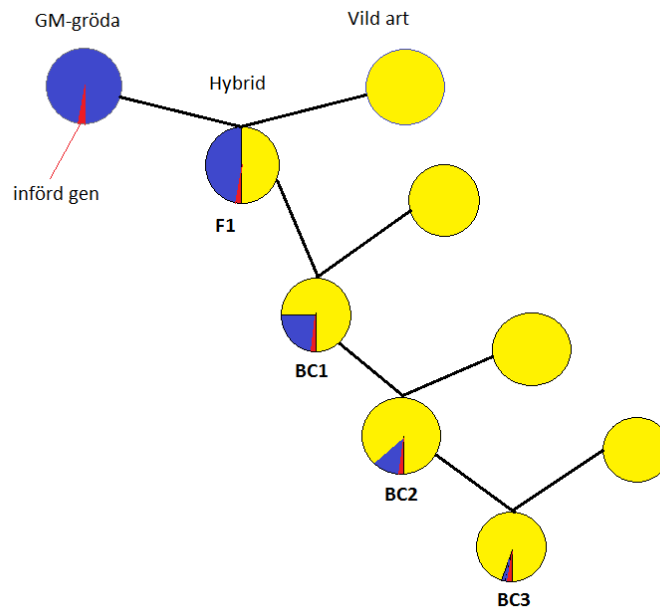
Inledning

Genetiskt modifierade (GM) grödor började användas kommersiellt 1996 och har växt i popularitet bland bönder sedan dess. Från att ha odlats på 1,7 miljoner hektar 1996, så odlas de idag på 175,2 miljoner hektar över hela världen och av den globala arealen står USA ensam för 70,1 miljoner hektar (James, 2013). De länderna där det odlas mest är USA, Brasilien, Argentina, Indien, Canada, Kina, Sydafrika, Paraguay och Pakistan. Under 2013 planterade 27 länder GM-grödor, av dessa 27 var 19 u-länder, där 94 miljoner hektar odlades (54 % av den globala arealen), och 8 i-länder, där 81 miljoner hektar odlades (46 % av den globala arealen). GM-grödor har lett till ett minskat utsläpp av växthusgaser genom ett kraftigt reducerat användande av bekämpningsmedel och ett minskat behov av plöjning av marken detta gör att mindre fossila bränslen förbrukas inom jordbruket. GM-grödor har även lett till en mer utbredd tillämpning av ”no-till farming” som innebär att man inte plöjer eller bearbetar marken. Den här typen av jordbruk gör att kol i marken inte avdunstar upp i atmosfären och bevaras istället i marken. Med en minskad förbränning av fossila bränslen och minskad användning av bekämpningsmedel så har kostnaderna för jordbruk minskat samtidigt som produktionen har ökat, detta har lett till en ökad vinst för både företag och bönder. GM-tekniken har effektiviserat dagen jordbruk vilket gör att man kan producera mer på samma area, det har lett till att natur och biodiversiteten bevarats genom en minskad utbredning av jordbruksmark (James, 2013). De grödor där GM-teknik tillämpas mest är majs, sojaböner, bomull, raps, sockerbetor, papaya och squash, dessa grödor används till livsmedelsprodukter, foder, biobränsle etc. (James, 2013). Det är väl känt att växter kan bilda hybrider mellan närbesläktade arter och att hybridisering är ett sätt för nya alleler att introduceras in i närbesläktade populationers genpooler (Harrison, 1993). Den här typen av genflöden har observerats och bekräftats i ett flertal studier för grödor och dess vilda släktingar (Allainguillaume *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2001; Hufford *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2009; Whitton *et al.*, 1997; Whitney *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2011). Risken finns att en transgen sprider sig till vilda populationer via dessa naturliga genflöden. Matematiska modeller visar att stabiliseringen kan ske om tidiga generationer av hybrider lyckas överleva och reproducera sig till efterföljande generationer (Meirmans *et al.*, 2009; Haygood *et al.*, 2003).

Hybridisering och genflöde sker redan i naturen

För att en transgen ska inkorporeras i en vild arts genom krävs det först att en hybrid produceras mellan GM-grödan och den art den är sexuellt kompatibel med, dem av hybriderna som har transgenen kommer sedan att behöva reproduceras med den vilda föräldern. Detta är en metod som används inom växtförädling, där selektion och korsning sker artificiellt, och kallas för återkorsning (Chrispeels *et al.*, 2003). Grundprincipen för detta sätt att framställa sorter är att det genetiska materialet från den föräldern med den önskade egenskapen reduceras hos avkomman efter varje återkorsning med den andra föräldern, tills det att generna som kodar för den önskade egenskapen är det enda som finns kvar av den första föräldern i avkommans genom, förutsatt att det under processens gång selekteras för egenskapen av intresse (Chrispeels *et al.*, 2003). Avkomman från den första korsningen kommer att ha 50 % av sitt genom från GM-föräldern och 50 % från den vilda, men genom upprepade korsningar mellan avkomman och den vilda sorten så kan man minska det genetiska materialet från GM grödan till mindre än 2 % hos avkomman (figur 1) (Chrispeels *et al.*, 2003). Det som krävs för att uppkomsten av denna process ska ske i naturen är förekomsten av två populationer av sexuellt kompatibla arter inom samma område, en frekvens av de två

olika arterna inom detta område optimal för hög sannolikhet för hybridisering och en stark selektion för hybriderna (Hansen *et al.*, 2001). Selektionen är den avgörande faktorn för att hybriderna ska kunna överleva länge nog för att reproduceras med individer från en av de två ursprungliga populationerna och att överkomma hindren av hybriders låga livsduglighet och sterilitet. Efter första generationen hybrider så återhämtar sig fertiliteten successivt i varje generation (Wang *et al.*, 2009), en allel kan då stabiliseras genom fortsatt återkorsning med individer från den population som allelen introduceras till, denna process kallas för introgression (figur 1).



Figur 1. Schematisk bild som beskriver introgression. Den blå cirkeln representerar DNA från grödorna medan den gula cirkeln representerar DNA från de vilda populationerna. Rött representerar en införd gen som det selekteras för i det vilda habitatet. Bilden beskriver återkorsning i ett tidigt skede av introgression.

Richard G. Harrison skriver i sin bok *Hybrid Zones and the Evolutionary Process* (1993), “We concur and suggest that introgression can appropriately describe gene exchange between species, subspecies, races or any other differentiated population systems. Given these considerations, introgression can be defined as the permanent incorporation of genes from one set of differentiated populations into another, i.e., the incorporation of alien alleles into a new, reproductively integrated population system”. Uppkomsten av hybrider bidrar till variationen inom populationer som sedan genom selektion och återkorsning introducerar en ny allel till populationens gen-pool. Introgression tros ha spelat en stor roll i växternas evolution (Harrison, 1993). Den låga livsdugligheten och steriliteten hos hybrider är ett exempel på en så kallad postzygotisk barriär. Faktorer som hindrar själva uppkomsten av hybrider är säsongsskillnader, habitatskillnader och skillnader i genetisk konstruktion (Harrison, 1993). Även om sannolikheten att en allel fullständigt etableras i en populations genpool kan verka väldigt låg så är det en befintlig risk som måste evalueras fullständigt innan man kan börjar använda en GM-gröda, det är därför viktigt att man ser till de ekologiska omständigheterna och gör nya riskbedömningar för varje enskilt fall.

I den här uppsatsen kommer jag att från ett biologiskt perspektiv se på studier där man observerat och bekräftat förekomsten av hybridisering och introgression, jag kommer att se

på matematiska modeller där man tittat på dynamiken inom populationer och beräknat sannolikheterna för spridning och stabilisering av transgener i vilda populationer och vilka faktorer som påverkar dessa. Jag kommer även att kort ta upp exempel på metoder för att förhindra spridningen och vad för ekologiska effekter en spridning skulle kunna ha. Avslutningsvis kommer jag att diskutera om det faktiskt går att förhindra spridning av gener och huruvida en transgen är farlig för miljön med transgenens funktion i åtanke.

Genflödet i fält

Flera studier har gjorts där spridning av transgener har observerats i naturen och i fältexperiment och det är väl känt att hybridisering är vanligt förekommande inom växtvärlden. Något som är viktigt för att kunna uppskatta riskerna kring GM-tekniken är transgeners eventuella fortlevnad i en vild population och de faktorer som påverkar dess förutsättningar. Men även hur hybridisering och introgression går till i naturen med naturligt förekommande alleler är en process som är viktig att förstå fullt ut. Efter 18 år av kommersiellt bruk kan man göra uppskattningar och bedömningar genom extrapolering av data tagen från sådana observationer.

Vete (*Triticum aestivum*)

Wang *et al.* (2009) utförde ett experiment på vete och det besläktade ogräset, *Aegilops cylindrica* (bockvete), som visar hur hybriders fertilitet förändras över de tidiga generationerna under introgression. Det är känt att vete hybridiseras med bockvete och det finns fall där hybrider, resistent mot växtbekämpningsmedel (framställd med konventionella växtförädlingsmetoder), hittats vid försöksfält och där man även lyckats få livsdugliga frön i första återkorsningsgenerationen (Wang *et al.*, 2009). Tester gjorda i kontrollerade försök har visat att fertiliteten succesivt ökar hos individerna i de tidiga återkorsningsgenerationerna. Första generationens hybrider var fullt hanligt sterila, de kunde inte heller självpollineras, men de kunde bli pollinerade av andra. Första generationens hybrider hade en honlig fertilitet som motsvarade 0,87 % av vetets honliga fertilitet, detta var tillräckligt för att pollineras av bockvete och skapa en första återkorsningsgeneration som hade ökad hanlig, honlig och självfertilitet (Wang *et al.*, 2009). I andra återkorsningsgenerationen självpollinerades blommorna och den resulterande avkomman hade en självfertilitet på 55,6 % vilket är en stor ökning från 6,9 % hos föräldragenerationen. Självfertiliteten ökade ytterligare efter vidare självpollinering till 78,9 % (Wang *et al.*, 2009). Även om fertiliteten ökar i varje efterföljande generation hos dessa avkommor så är den fortfarande otillräcklig för att kunna konkurrera med de vilda arterna och grödorna på åkern. Med en stark positiv selektion på en eventuell överförd gen ökar sannolikheten för stabilisering av genen i en population, vilket skulle kunna vara fallet för en gen som ger insektresistans eller sjukdomsresistans som uppenbarligen skulle kunna vara fördelaktig i miljöer utanför åkern.

Raps (*Brassica napus*)

Hansen *et al.* (2001) visar i sin studie, på raps och det besläktade ogräset *Brassica rapa*, att hybridisering och introgression sker i vilda *B. rapa* populationer som lever i närheten eller på jordbruksmark där raps odlas. Testerna utfördes på åkermark som tidigare hade använts för konventionell odling men där man sedan valt att övergå till organisk odling sedan elva år vid undersökningens start. På en tre m^2 yta fann man 102 plantor men endast en hybrid medan det fanns 44 plantor som visade sig ha genetiska markörer specifika för både raps och *B. rapa*. Den låga andelen hybrider och höga andel plantor som hade båda markörerna tolkades som att introgressionen hade pågått i flera år. En hybrid av *B. napus* och *B. rapa* överlever sällan till nästa säsong eftersom att deras frön inte är lika livskraftiga som de rena arterna. Detta gör att frön från hybridarten som inte skördats aldrig överlever de konventionella metoder som används inom jordbruket som till exempel besprutning med växtbekämpningsmedel eller andra medel (Hansen *et al.*, 2001). Hansen *et al.* (2001) påstår att det är först efter övergången till organisk odling, där man undviker användan av bekämpningsmedel, som hybriderna faktiskt hade en chans att överleva och etableras till en sådan grad att introgression kunde ske. Hansen *et al.* (2001) säger också att de mönster som markörerna visar tyder på att introgressionen har pågått i några år, detta kan betyda att när introgression väl börjat så är det en stabil, kontinuerlig process där individer från alla de olika korsningsgenerationerna kan finnas närvarande i en och samma population.

I en annan studie, där man undersökte fitness hos hybrider av genetiskt modifierad raps och *B. Rapa* i vilda populationer, observerades en lägre fröproduktion hos hybriderna men ett högre antal skidor per planta (Allainguillaume *et al.*, 2006). Andelen av frön producerade av hybrider som klarade sig till groningen var nästan lika stor som hos *B. rapa* (85,6 %), men den totala produktionen av livskraftiga frön som klarade sig till groningen hos hybriderna var 46,9% av den hos *B. rapa* (Allainguillaume *et al.*, 2006). Hybriderna producerade en lägre andel pollen än *B. rapa* men kompenserade för detta genom att utveckla fler blommor, vilket gjorde att den totala pollen produktionen hamnade på lika nivåer.

Solros (*Helianthus annuus*)

Helianthus annuus (Solros) har visat sig gett upphov till underarten *Helianthus a. texanus* genom hybridisering och introgression med den besläktade arten *Helianthus debilis* (Whitney *et al.*, 2006). Den allel som har inkorporerats i *H. a. texanus* genom är en allel som ger resistans mot insekter (allelen har tillkommit genom evolution) och kommer från *H. debilis*. Whitney *et al.* (2006) visar i sitt experiment att individer från de första generationerna av återkorsade hybrider mellan *H. a. annuus* och *H. debilis* har i snitt lägre fitness än *H. a. annuus*, medan enskilda individer av hybriderna hade upp till dubbelt så bra fröproduktion än *H. a. annuus* snittproduktion. I detta fall så var det en liten grupp av hybrider som genom upprepade återkorsningar kunde öka sin fitness samtidigt som dem behöll insektresistans allelen p.g.a. selektion. Detta gjorde att den stabila underarten *H. a. texanus* kunde etablera sig och spridas till habitat där de två ursprungliga arterna inte kan överleva (Whitney *et al.*, 2006). Om en transgen skulle spridas på samma sätt så finns risken att den gör en art så konkurrenskraftig att den kan utgöra ett hot mot biodiversiteten i närliggande miljöer. Det har även observerats att hybrider mellan vilda och kultiverade solrosor är vanligt förekommande kring åkrar (Whitton *et al.*, 1997). Frekvensen av hybrider var då som högst bara några meter från åkern, men förekom fortfarande i avstånd på upp till 400 meter men i betydligt lägre frekvens (Whitton *et al.*, 1997). Frekvensen av vissa specifika alleler från den kultiverade

solrosen ökade hos efterföljande hybridgenerationer även på de längre avstånden, men genomsnittet visade fluktuationer i allelfrekvensen men ingen tydlig minskning eller ökning (Whitton *et al.*, 1997). De alleler som användes i försöken var neutrala genetiska markörer som var specifika för den kultiverade arten. Med tanke på neutrala allelers förmåga att klara sig i vilda populationer, så kan man tänka sig utkomsten av samma scenario med en transgen där det tillkommit en stark selektion. För att förstå detta så måste man inkludera ändringar i fitness som en transgen kan medföra.

Ris (*Oryza sativa*)

Genflödet mellan ris och besläktade ogräs är väl dokumenterat i ett flertal studier (Yang *et al.*, 2011). Yang *et al.* (2011) utförde ett experiment där de undersökte effekten av en transgen för insektresistans på fekunditeten (en organisms potentiella fortplantningskapacitet) hos individer i den andra och tredje hybridgenerationen mellan kultiverat ris och ogräset *Oryza sativa spontanea* (rött ris), man testade även skillnader mellan hög och normal insektspress. De transgener som studerades var *CpTI*, som kommer från *Vigna unguiculata* (Ögonböna) och inhiberar Trypsin hos insekter och gör det omöjligt för insekter att bryta ner proteiner (Yang *et al.*, 2011), och en *Bt/CpTI* konstruktion med genen från den marklevande bakterien *Bacillus thuringiensis*. *Bt*-toxinet aktiveras när det kommer ner i insekters tarmar och fäster på cellytan hos de celler som utgör insekters tarmkanal, detta gör att tarmkanalen paralyseras och insekten svälter ihjäl. Förutom att studera effekterna av transgenen på fekunditet så gjorde de även tester där de undersökte om det var någon skillnad mellan fält där man blandade GM med icke-GM grödor och fält där de två grödorna odlades på separata fält. I den tredje generationen, på de fält där de två grödorna odlades separat under normal insektspress, kunde man se en tydlig skillnad, där GM-grödorna hade 79 % lägre skada och 47 % fler frön än icke-GM (Yang *et al.*, 2011). Stora skillnader syntes redan i den andra generationen, i de rena fälten hade plantor med transgenen en klart lägre andel skador och högre fröproduktion, men under låg insektspress så presterade de 2 olika plantorna ganska likt varandra (Yang *et al.*, 2011). Man observerade även en skillnad beroende på om plantorna odlades separat eller tillsammans. I de fält där plantorna odlades blandat så var skillnaden betydligt lägre mellan GM och icke-GM, skadorna från insekterna var högre på de plantor som hade transgenen när de odlades tillsammans med icke-GM grödor och ingen signifikant skillnad i fröproduktion syntes (Yang *et al.*, 2011). Yang *et al.* (2011) föreslår i sin artikel att om ett fält med icke-GM grödor odlades i anslutning till GM-grödor så blir effekten av transgenen mycket starkare. Yang *et al.* (2011) spekulerar vidare att förekomsten av transgener i fält kan reducera insektspressen och därmed kraftigt reducera den fördel transgenen medför, också att den reducerade insektspopulationen öppnar upp för andra insektsarter att expandera och öka i antal som kanske inte påverkas i samma utsträckning av insektsresistansen hos grödorna.

Majs (*Zea mays*)

Majs är en av de äldsta kända kultiverade grödorna och uppskattas ha domesticerats för ca 9000 år sedan i sydvästra Mexiko (Hufford *et al.*, 2013). Majs är en förädlad sort av den vilda släktingen *Zea mays ssp. parviglumis*. Hufford *et al.* (2013) utförde en studie där man undersökte introgression mellan majs och *Zea mays ssp. mexicana*, en släkting som lever upp på höglandet i centrala Mexiko. Man använde sig av genetiska markörer för att se i vilken utsträckning gener hade inkorporerats i de två arternas genom från respektive art

(Hufford *et al.*, 2013). Man tror att majs med hjälp av introgression från *mexicana* har kunnat anpassa sig till de låga temperaturerna och torkan på höglandet (Hufford *et al.*, 2013). Det man kunde observera i de resultaten man erhöll var att genflödet från *mexicana* till odlad majs var större än det i motsatt riktning, resultaten visade även att introgressionen från *Mexicana* till odlad majs är äldre än introgressionen i motsatt riktning (Hufford *et al.*, 2013). Anledningen till att genflödet är större mot majs kan vara på grund av hur blomningen är synkroniserad mellan arterna. *Zea mays* har hanblommor i toppen av plantan medan honblomman växer i bladvecken och spridningen av pollen sker först medan honblommor blommar senare (Hufford *et al.*, 2013), detta är en evolutionär anpassning för att öka sannolikheterna för korspollinering. Det man tror är att blomningen av honblommorna hos majs överlappar med blomningen av hanblommorna hos *mexicana*, medan hanblommorna hos majs redan har hunnit vissna när honblommorna hos *mexicana* är mottagliga för pollen (Hufford *et al.*, 2013), spridningen av pollen från *mexicana* till majs tros alltså vara betydligt större än den i motsatt riktning. *Zea mays* ssp. *parviglumis* divergerade från *mexicana* ca 60 000 år sedan och delade habitat igen först när det domesticerade majset introducerades till det mexikanska höglandet (Hufford *et al.*, 2013). Släktskapet bidrar till de positiva förutsättningarna för hybridiseringen. Bland de prezygotiska barriärerna mellan arter av majs är habitatskillnader en av de största. Hufford *et al.* (2013) skriver i sin artikel att människans spridning, därmed spridningen av domesticerade växter, har gjort att grödor kommer i kontakt med många släktingar som dem aldrig hade kommit i kontakt med på annat sätt och öppnar upp för nya möjligheter av hybridisering.

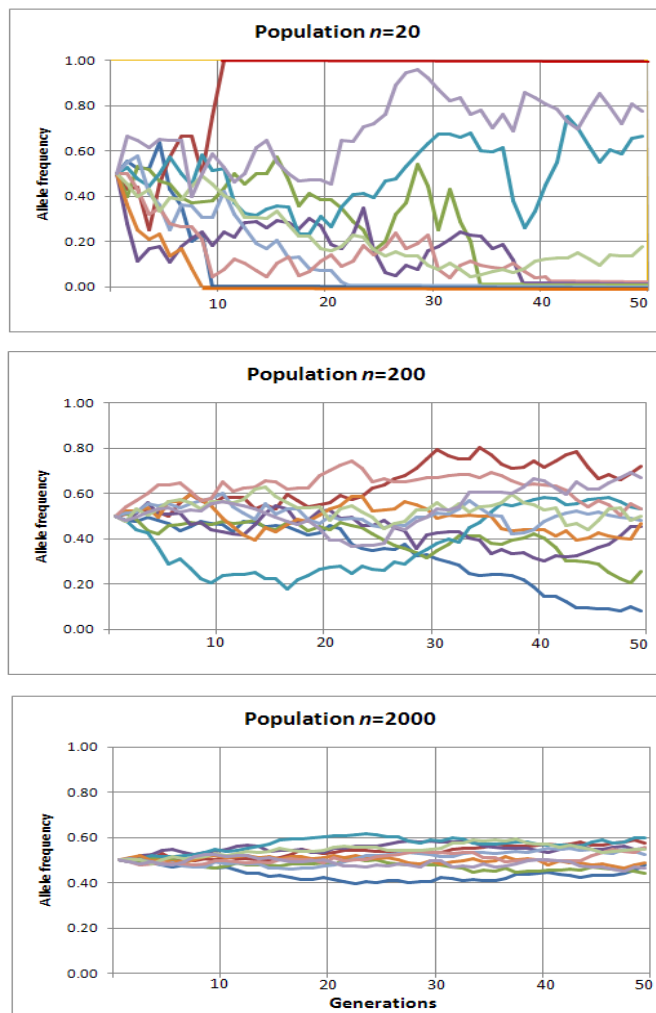
Datorsimulering som hjälpmedel för att förstå introgression och genflöde

Det finns fler faktorer som behöver tas i beräkning för att förstå dynamiken kring genflödet mellan grödor och andra växter. Riktningen av hybridisering kan göra skillnad för egenskaper och beteende hos hybridarten, som till exempel hos betan (*beta vulgaris*) i Frankrike. Riktningen av hybridisering mellan vilda, ogräs och kultiverade arter har visat sig påverka vilka egenskaper den resulterande plantan har, när pollen från den vilda sorten befruktade kultiverade betor så gav det efter introgression upphov till ett ogräs som konkurrerade med grödorna på åkern, medan vilda arter befruktade av den kultiverade sorten verkade ha resulterat i en vild art med alleler från den kultiverade arten (Desplanque *et al.*, 1999). Tecken på introgression skulle kunna vara en indikation för risk för spridning av en eventuell transgen. Utöver riktningen på genflöde måste man även ta hänsyn till populationsstruktur och migration av pollen och frön mellan och inom populationer av olika arter. Att observera dessa processer i fält kan vara svårt eftersom att det ofta handlar om processer som sker över väldigt lång tid. Men med hjälp av datorsimulering kan man mata in data tagen från fältet och extrapolera dessa siffror för att få en förståelse av hur de olika faktorerna påverkar varandra.

Modellering av genflödet

Genflödet från konventionella grödor till vilda populationer har pågått lika länge som vi har brukat domesticerade plantor och även om fertiliteten hos hybrider kan variera så är det de som driver genflödet från åkern till vilda populationer (Haygood *et al.*, 2003). Men vad är de potentiella konsekvenserna av genflödet och vilka faktorer spelar roll för att dessa

konsekvenser ska förverkligas? För att kunna förstå detta måste vi först se till den slumpmässighet som råder hos förändringar i allelfrekvens. Denna slumpmässighet kallas för genetisk drift och är en stokastisk process där allelfrekvensen ändras över tid utan påverkan av naturligt urval (Ricklefs, 2008). Utan naturligt urval så har en låg allelfrekvens en liten chans att nå fixering och en högre en stor chans att nå fixering. Populationsstorleken har en stabiliserande effekt på variationen i allelfrekvens från generation till generation, dvs. en stor population har relativt stabil variation medan hos en liten är den mer fluktuerande (figur 2). Läger man till selektion som ensam faktor i denna process så är det stor sannolikhet att en allel med en låg frekvens försvinner från en liten populations genpool trots en stark positiv selektion, men sannolikheten för fixering ökar med populationsstorleken på grund av en stabilisering av den slumpmässiga driften (Meirmans *et al.*, 2009). Detta kan antas relevant för arter med mindre populationer på grund av konkurrens från andra arter eller specialiserad nisch. Utifrån detta kan man med matematisk modellering räkna med de övriga faktorer som avgör en gens spridning i naturen.



Figur 2. Bilden visar hur populationsstorleken påverkar slumpmässig variation i allelfrekvens. Från översta bilden till nedersta är populationsstorleken 20, 200 och 2000. Linjernas olika färger representerar olika alleler (tagen från http://en.wikipedia.org/wiki/File:Random_genetic_drift_chart.png, 2014-05-12)

Modellering av variationer av allelfrekvens

En konsekvens som ett kontinuerligt genflöde från en population av grödor till en vild population kan ha är genetisk assimilering som beskrivs av Haygood *et al.* (2003) som en ersättning av vilda gener med gener från grödor. En konsekvens som är relaterad till genetisk assimilering är demografisk översvämmning som beskrivs som ett väldigt utbredd bildande av hybrider med lägre fertilitet än de vilda föräldrarna som leder till att den vilda populationen minskar på grund av en större andel av hybrider än rena arter hos avkomman (Haygood *et al.*, 2003). Haygood *et al.* (2003) beskriver i sin modell hur frekvensen av en gen beteras beroende på faktorer som migration via pollen och selektion. Vissa antaganden måste göras för att modellen ska fungera, varav vissa är lämpliga och kan tänkas gälla även i fält, medan andra inte kan tillämpas i praktiken.

Vi antar en årlig vild population med diskreta generationer, dvs. att frön från en generation uteslutande ger upphov till efterföljande generation och kan inte ligga vilande i marken, detta antagande kan inte antas i praktiken. Den allel som representerar transgenen är permanent fixerad i populationen av grödor, detta kan antas gälla för dagens jordbruk eftersom att vissa företag förser gårdar årligen med utsäde för kommersiellt bruk medan man vanligtvis sparar en del av skörden och använder det som utsäde till nästa säsong. Ytterligare antaganden är att hybriderna och den vilda populationen blommar samtidigt och inte självpollineras. Antal individer som överlever till att bli fullt mogna varierar inte genom generationerna och selektionen verkar endast på en enda allel. Dessa antaganden kan inte tillämpas i praktiken, dock så kan andelen överlevande individer till vuxen ålder vara ganska konstant genom generationer hos vissa arter (Haygood *et al.*, 2003). I modellen så representerar en allel, för det loci under selektion, närvaron av transgenen medan den andra allelen representerar frånvaron av denna transgen. Haygoods *et al.* (2003) modell visar att allelfrekvensen för transgenen i den vilda populationen alltid går mot en jämvikt och denna jämvikt varierar beroende på vidden av immigration, i form av pollenflöde från grödorna, och selektionen för denna allel. Under positiv selektion så kommer jämvikt alltid att uppnås vid full fixering av transgenen. Under negativ selektion så kommer jämvikten att uppnås vid varierande allelfrekvenser beroende på immigrationens storlek (Haygood *et al.*, 2003). När immigrationen är tillräckligt stor för att motverka den negativa selektionen så kan jämvikt, trots den negativa selektionen, uppnås vid full fixering.

Utifrån de resultat som erhöles av Haygood *et al.* (2003) så blir den demografiska översvämmningen ett resultat av kraftigt pollenflöde samtidigt som pollenflödet från den ökande andelen hybrider, i sig, ytterligare adderar till det ökande pollenflödet och påskyndar den genetiska assimileringen. Det är dock viktigt att ha i åtanke att det i denna modell bortsetts från många faktorer som kan spela in och kraftigt förändra utfallet. Haygood *et al.* (2003) betonar att om en gen från en gröda påträffas i en vild population så kan man inte anta att en liten ökning i pollenflöde leder till en liten ökning i allelfrekvens. Man kan heller inte anta att om en liten ökning i pollenflöde leder till en stor ökning i allelfrekvens så skulle en minskning av pollenflödet till det ursprungliga värdet leda till en återhämtning av allelfrekvensen. En modell som beskriver effekterna av selektion och migration endast mellan två populationer kan bara ge oss en grundläggande förståelse av hur dessa faktorer verkar på spridningen av en allel. I fält så är populationer sammankopplade i ett nätverk via pollenflöde och fröspridning, dessa nätverk av populationer kallas för metapopulationer och utgörs av subpopulationer som kan vara sammankopplade både direkt eller indirekt.

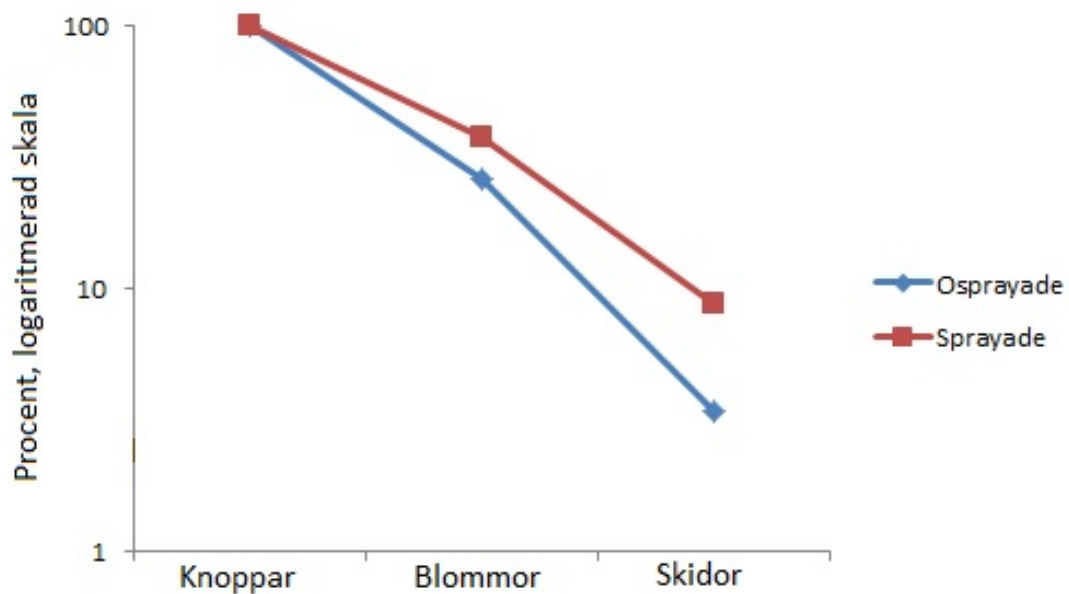
Metapopulationer – ett nätverk av populationer

Meirmans *et al.* (2009) gjorde en studie för att se effekten av introgression, från flera plantager, på hela metapopulationen av en vild art. I sin modell så bortser Meirmans *et al.* (2009) från postzygotiska barriärer och antar att pollinering av den vilda arten från GM-grödan är lika framgångsrik som pollinering inom arterna, vilket kan vara fallet mellan grödor och närbesläktade vilda arter, ytterligare ett antagande som görs är att all migration sker endast genom spridning av frön. En tillämpning av metapopulation som populationsstruktur påverkar inte sannolikheten för fixering om man ser till genetisk drift, dock så kan introgression tillsammans med en svag positiv selektion öka frekvensen av en transgen inom metapopulationen till en sådan nivå att selektionen för den överstiger effekten av den slumpmässiga genetiska driften (Meirmans *et al.*, 2009). I denna modell undersöks bara en gen med två alleler, wild-type och transgenen. Enligt resultaten som erhöles så visade sig migration mellan subpopulationerna påverka allelfrekvensen i hela metapopulationen, när migrationen mellan subpopulationerna var hög så var den totala allelfrekvensen ca dubbelt så stor efter 15 generationer jämfört med ingen migration mellan subpopulationerna. Detta kan förklara genom att den höga migrationen håller allelfrekvensen i de enskilda subpopulationerna på en relativt låg nivå vilket i sin tur ökar chansen för en individ inom en subpopulation som har transgenen att korsas med en som inte har den, korsning mellan två individer som har transgenen leder inte till någon ökad allelfrekvens. För att introgression ska fortsätta och vara effektiv krävs det att det finns individer utan transgenen som hybriden kan korsas med, med en ökad migration ökar effektiviteten av introgression. Precis som i Haygoods *et al.* (2003) studie så visar det sig i Meirmans *et al.* (2009) metapopulation att sannolikheten att en allel fixeras i en population kan vara väldigt stor om det råder en hög migration, med en hög migration så räcker det med bara en svag positiv selektion för att allelen ska fixeras. Skillnaden mellan dessa modeller är att i Meirmans *et al.* (2009) modell så blir den totala effektiva populationsstorleken större eftersom att i en metapopulation så blir det en addering av effektiv populationsstorlek beräknad på varje enskild subpopulation istället för en effektiv populationsstorlek räknad på hela metapopulationen (Ricklefs, 2008). Detta gör att antalet individer som reproducerar sig och bidrar till efterföljande generationer är högre inom en metapopulation än i en enskild population trots att andelen är den samma om man jämför den enskilda populationen med en slumpmässig subpopulation tagen från metapopulationen.

I Meirmans *et al.* (2009) modell så är selektionen densamma i hela metapopulationen vilket inte är fallet i naturen där habitatet kan variera väldigt mycket inom de stora områden som en metapopulation kan täcka. Selektionen i de enskilda subpopulationerna beror på den fitness som en gen medför och interaktionen mellan den genen och miljön. Om man överväger en transgen som ger resistans mot växtbekämpningsmedel så är det uppenbart att selektionen är som starkast på åkern eller i nära anslutning till den, väl ute i naturen så kommer transgenen stå för en kostnad som minskar individens fitness och därmed ha en negativ selektion. En transgen som kodar för resistans mot sjukdomar är fördelaktig i alla habitat, medan en transgen som medför insektsresistans kommer bara vara fördelaktig när insektspressen är stor och stå för en onödig kostnad när insektspressen är låg (Yang *et al.*, 2011). Trots att Meirmans *et al.* (2009) antog att migration skedde endast genom fröspridning i sin modell så kan resultaten kring migrationens påverkan på introgression antas gälla eftersom att migration genom pollen eller frön inte gör någon större skillnad för de resultat som erhöles.

Selektion – en avgörande faktor?

En ökad migration mellan populationer har visat sig öka effektiviteten av introgression och öka sannolikheten för fixering av en nyintroducerad allel i en population, är migrationen tillräckligt hög ökar den sannolikheten för fixering även vid negativ selektion. Meirmans *et al.* (2009) antog i sin modell att pollinering mellan arter var lika framgångsrik som inom arterna och att hybriderna var lika livsdugliga som de rena arterna, men så är inte alltid fallet i naturen. Om man ser till den låga fertilitet hos hybrider så har vi sett att selektionen är avgörande för att hybriderna ska ha en chans att konkurrera med de andra arterna (Wang *et al.*, 2009). Meier *et al.* (2013) visade i sin studie skillnaden i skidutveckling, blomutveckling och fröproduktion hos *Raphanus raphanistrum* (åkerrettika) mellan plantor besprutade med insektsmedel och obehandlade plantor. Insekten av intresse för studien var *Meligethes* spp. (Rapsbagge), en art av skalbaggar som är en viktig pest som årligen orsakar skador på raps som leder till stora ekonomiska förluster. 12 grupper om 12 plantor av *R. raphanistrum* planterades i anslutning till en åker med raps. På ett avstånd av 0,5 m planterades 8 grupper, på ett avstånd av 20 m planterades 2 grupper och på 200 m planterades ytterligare 2 grupper. I varje grupp besprutades 6 plantor med insektsmedel och de andra 6 lämnades obehandlade. Syftet var att se vilken skillnad en transgen för insektsresistans skulle kunna ha på fekunditet i det vilda. Meier *et al.* (2013) planterade även 3 grupper om 10 plantor av *R. raphanistrum* på 3 separata fält av kommersiellt odlad raps. I varje grupp så planterades 4 par i direkt anslutning till fälten på ett avstånd på ca 0,5 m och ett par planterades mitt i fältet, i varje par var en planta besprutad medan den andra var obehandlad. Även hos dessa plantor undersökte man skillnad i antal blommor och antal skidor. I det första fältexperimentet där plantor placerades i grupper på 0,5, 20 och 200 meter så hade besprutade plantor mer än dubbelt så många utvecklade skidor än de obehandlade på samtliga avstånd, även om skillnaden varierade på de olika avstånden var skillnaden som störst 0,5 meter från fältet och lägre på 200 meter. Hos de plantor som planterades i direkt anslutning och mitt i fälten så var antalet utvecklade skidor ungefär 3 gånger så många hos de plantor som behandlades med insektsmedel jämfört med dem som var obehandlade. Dessa plantor visade även en skillnad i överlevnad av reproduktionsorgan till färdiga skidor. Hos de obehandlade plantorna utvecklades 26 % av knopparna till blommor varav 3,4 % utvecklades till skidor, hos de sprayade plantorna utvecklades 38 % av knopparna till blommor varav 8,7 % utvecklades till skidor (figur 3).



Figur 3. Schematisk bild av diagram taget från Meier *et al.* (2013) som visar skillnad i procentuell överlevnad av knoppar till blommor och skidor mellan besprutade och obehandlade plantor.

Av de erhållna resultaten ser man att effekten av transgenen, i form av en förhöjd fitness hos vilda arter, är tydligast i anslutning till åkern och under utveckling av reproduktions organ, som blommor och skidor. Under experimentets gång så undersökte man även antalet rapsbaggar på varje planta på de olika avstånden och gjorde ett diagram över genomsnittet. Det visade sig att antalet var högst på ett avstånd av 20 meter men även plantorna på de andra avstånden visade sig ha ett högt genomsnitt av antal rapsbaggar. I experimentet så framstår det som att den stora populationen av rapsbaggar uppehålls av rapsen på åkern vilket gör att selektionen blir hårdare för de vilda arterna som lever i närheten av rapsfält på grund av en ökad predation (Meier *et al.*, 2013). I experimentet använde man insektsmedel istället för genetiskt modifierade plantor, om plantorna istället hade en transgen hade det gett bättre skydd för hela plantan genom alla utvecklingsstadier.

Om en transgen hade spridit sig till vilda populationer och stabiliserats i genpoolen via introgression så kan den, med den starka selektionen, förse arten med en kraftigt förhöjd fitness. Samtidigt så skulle ett användande av transgena grödor eventuellt kunna reducera populationen av rapsbaggar och därmed minska predationen på vilda arter omkring fältet vilket i sin tur minskar selektionen för vilda arter med transgenen (Meier *et al.*, 2013). Meier *et al.* (2013) skriver även att om populationen av rapsbaggar skulle vara fortsatt stor trots en tillämpning av transgen raps, vilket skulle kunna vara fallet om det bara tillämpades av vissa bönder i regioner där många fortfarande använder sig av konventionella grödor, så skulle en transgen kunna sprida sig väldigt snabbt genom en population av *R. raphanistrum*. För att detta skulle kunna vara fallet så måste fitnesskostnaden för *R. raphanistrum* att ha en transgen vara så liten att man kan bortse från den (Meier *et al.*, 2013).

Metoder för att förhindra genflöde

Hybridisering mellan kultiverade och vilda arter är ett faktum, men för en fullständig förståelse för hur spridning av en transgen går till och vilka faktorer som är avgörande för dess framgång i de vilda behövs det mer forskning. Vi vet att populationers struktur och hybriders livsduglighet är avgörande för uppkomsten av introgression, vilket i sin tur kan ge upphov till en vild art med en transgen fullständigt inkorporerad i dess genom, om introgression får pågå i flera generationer. Den risk som GM-grödor skulle kunna utgöra för arter som förekommer i mindre bestånd kan verka liten i betraktande av alla de faktorer och omständigheter som måste sammanfalla, men för att en teknik eller produkt ska kunna tas i bruk så krävs det att eventuella risker minimeras. Det är inte bara riskerna för vilda arter som måste evalueras, även risken för spridning till ogräs är viktig. En gröda som är resistent mot växtbekämpningsmedel gör ingen nytta om ogräset har samma egenskap och kommer då bara att leda till ekonomisk förlust. Metoder för att hindra spridning har utvecklats och tar hjälp från flera områden som till exempel bioteknik, växtfysiologi, växtekologi mm.

Minimering av spridning genom genetisk konstruktion

En metod att stoppa genflöde via spridning av pollen är att transformera kloroplastgenomet, genflödet kan fortfarande ske om en planta blir pollinerad, spridning av transgenen kommer då att ske via fröspridning eftersom att kloroplaster, precis som mitokondrier ärvs moderligt (Daniell *et al.*, 1998). En annan fördel med kloroplast transformation är att kloroplaster finns i stor mängd i växtcellen vilket ger ett högre genuttryck. En annan fördel med denna metod är att prokaryotiskt DNA består av alternativa kodon i större utsträckning än eukaryotisk DNA, om genen då inkorporeras i cellkärnan så kommer uttrycket av denna gen vara betydligt lägre och fortfarande ge ett bra skydd mot genflöde via pollenspridning (Daniell *et al.*, 1998). Kloroplastens prokaryotiska DNA gör det också enklare att producera stora mängder av den genetiska konstruktionen eftersom att man då kan odla *E. coli*, transformerad med transgenen, som är billig och har en kort generations tid och få stora mängder med DNA (Daniell *et al.*, 1998). Ett annat sätt att mildra selektionen för en transgen i vilda populationer är att konstruera genskvansen av intresse så att genen som ger grödan den önskade egenskapen sitter ihop med en gen som är skadlig eller som neutraliserar den fördelaktiga genen. Hos samma planta så inkorporerar man en gen, som inhiberar den skadliga genen, på en helt annan position i genomet helst på en annan kromosom (Gressel, 1999). Eftersom att den skadliga genen sitter så tätt ihop med den fördelaktiga transgenen är sannolikheten för rekombination mellan dessa två så låg att de inte kommer att separeras under celledelning, medan den gen som inhiberar den skadliga genen med väldigt stor sannolikhet kommer att separeras från de andra två generna vid korsning, vilket aktiverar uttrycket av den skadliga genen och kraftigt mildrar den selektion den skulle kunna ha i vilda populationer (Gressel, 1999).

Synkroniserad blomning ökar sannolikheten för hybridisering

En av de viktigaste faktorer som avgör sannolikheten för hybridisering är överlappning av blomning mellan grödor och vilda arter, särskilt hos arter som delar pollinatörer (Ohigashi *et al.*, 2014). Genom att studera vilda släktingar till grödor och deras blomnings period och även blomningen av grödorna så kan man anpassa blomningen hos grödan så att den inte sammanfaller med de vilda arterna, genom att välja arter som har en viss blomningsperiod

eller genom att ändra datum för sådden (Ohigashi *et al.*, 2014). Man vet redan att det finns ett samband mellan avstånd mellan grödor och vilda populationer och utsträckningen av hybridisering som har visat sig vara exponentiellt, dvs. hybridiseringen avtar när avståndet till åkern ökar (Ohigashi *et al.*, 2014). Betydelsen som överlappningen av blomning har för hybridiseringen är svår att tydliggöra. I en studie utförd av Ohigashi *et al.* (2014) så undersöktes effekten av dissynkronisering av blomning på hybridisering mellan olika sorter av kultiverade sojaböner och vilda sojaböner. Av de 5 kultiverade sorter som undersöktes så observerades hybridisering hos endast 2 sorter och en effekt av dissynkronisering av blomning på hybridiseringen kunde bara ses hos en av de två sorterna. Fler studier krävs för att på ett lyckat sätt kunna isolera blomningssäsonger hos grödor från vilda arter för att minimera risken för spridning av transgener. Blomning hos växter påverkas också av väder, temperatur och ljuskoncentrationen, så blomningen kan variera från säsong till säsong, om denna metod ska kunna tillämpas i framtiden måste man även ta hänsyn till dessa variationer (Ohigashi *et al.*, 2014).

Hur påverkar vi gener i naturen?

Människa påverkar biologiska system genom fragmentering av ekosystem och en global blandning av arter (Thrall *et al.*, 2011), men vi påverkar även hur arter interagerar med varandra. Genom avling och förädling har vi styrt vilka gener och egenskaper som ska fortplantas och dominera inom arter för vår egen nytta, gener som kanske inte hade förekommit i samma utsträckning inom de populationer vi nyttjat om de hade fått förbli vilda. Introduktionen av nya gener och egenskaper till jordbruket, som inte hade skett på naturlig väg, är det senaste i ledet av nya tekniker för att kunna försörja en ökande befolkning. Bland de gener och egenskaper som introducerats finns resistans mot växtbekämpningsmedel, insektsresistens, sjukdomsresistens, ökad fröproduktion, ökad tolerans mot torka och höga salthalter mm. Spridningen av dessa gener till vilda arter kommer att ske i någon utsträckning, att förhindra detta helt och hållet är väldigt svårt och ganska osannolikt.

Hybridisering och introgression är ett viktigt inslag i växternas evolution och beror till stor del av selektion där de mer anpassade alleler hos inhemska arter sprids till mindre anpassade nyintroducerade arter (Currat *et al.*, 2008). För att en asymmetrisk introgression, till den invaderande artens fördel, ska ske så måste frekvensen av korsningar mellan arterna ske i en sådan hög utsträckning att det bildas en hybridiserings zon i utkanten av den invaderande artens utbredningsområde, innanför denna zon så sker introgression inom arten, detta gäller förutsatt att det finns en konkurrens mellan arterna (Currat *et al.*, 2008). Utan konkurrens mellan arterna så kommer asymmetrisk introgression att ske till den invaderande artens fördel tills det att populationen är fullt etablerad, då kommer introgression att ske i lika stor utsträckning åt båda hållen. Hur framgångsrik expanderingen av hybridiserings zonen är avgörs av selektion, och som det redan förklarats så kan miljön variera väldigt mycket inom en populations utbredningsområde, och därmed selektionen (Currat *et al.*, 2008). Ser man nu till jordbruket, där det är vi själva som står för selektionen hos de arter vi domesticerat, så spelar ogräs rollen som den invaderande arten medan grödorna är den inhemska, så de transformerade allelerna hos grödorna kommer att med en överhängande sannolikhet spridas till ogräs vid konkurrens med grödorna eftersom att de utsätts för samma selektion, dvs. den som råder på åkern. När spridning sker genom pollenflöde eller fröspridning till områden bortom åkern så utsätts resulterande individer för en naturlig selektion, det minskar sannolikheten för etablering och fortplantning av en allel i intilliggande populationers genpool. I de fall då transformerade alleler står för en kvantitativ egenskap, så som fröproduktion, blomutveckling, längd eller utnyttjande av näringsämnen i marken, så är det viktigt att förstå att en förbättrad kvantitativ egenskap står för en fitnesskostnad som leder till en kompromiss av andra egenskaper, sådana allelers fortlevnad beror på huruvida denna kostnad är gynnsam. En planta som blir väldigt lång och kan konkurrera om solljus kanske har en lägre fröproduktion, eller är sämre på att ta vara på näringen i marken, samma sak gäller för alleler som ger resistans mot olika typer av pester. Inom jordbruk så selekteras det för homogenitet av kvantitativa egenskaper inom en population av grödor, detta görs för att undvika att plantorna konkurrerar sinsemellan. Den selektion för kvantitativa egenskaper som vi utsätter grödorna för görs även för att möta marknadens behov av en hög kvalitativ produktion. I naturen så selekteras det bland kvantitativa egenskaper för att effektivt kunna konkurrera med individer inom den egna populationen, populationer emellan och för att överföra sina gener till nästa generation, detta kräver en helt annan avvägning mellan de olika egenskaperna för framgång än den på åkern.

Utmaningar för framtidens jordbruk

Jordens befolkning växer med 73 miljoner människor per år samtidigt som köttkonsumtion i u-länderna ökar vilket ställer högre krav på produktion av foder och livsmedel, trots detta förväntas ingen markant ökning i tillgänglig jordbruksmark (Mumm, 2013). Strävan efter en hållbar utveckling inom jordbruket kommer att kräva en minskning av koldioxidutsläpp och en minskad användning av syntetiska gödningsmedel samtidigt som klimatförändringar utsätter våra grödor för extrema väderförhållanden som torka, översvämning och kraftiga temperatursvängningar (Mumm, 2013). Allt detta sker samtidigt som sötvattenreserver minskar världen över. Vi har kommit till den punkt då konventionell växtförädling inte räcker till längre. Med hjälp av bioteknik får vi tillgång till helt nya gener och egenskaper som aldrig kunnat inkorporeras i grödors DNA genom växtförädling, med biotekniken kan vi även kontrollera dessa egenskaper och göra dem specifika för vissa stadier i grödornas utveckling eller för specifika vävnader, när dessa grödor framställts så kan man då tillämpa metoder från växtförädling för att introducera de nya egenskaperna med redan befintliga sorter av grödor (Mumm, 2013). Under utvecklingen av en genetiskt modifierad gröda så utsätts plantorna för ständig utvärdering och analys, det man undersöker är genens stabilitet, uttryck, specifikt uttryck för vävnad eller utvecklingsstadier, konsekvent uttryck, stabiliteten hos uttrycket av genen genom generationer och om genen har någon negativ effekt på uttryck av andra gener (Mumm, 2013). Grödorna testas även i fält i olika regioner, miljöer, jordtyper och olika jordbruksmetoder, dessa tester sträcker sig över flera år. I dessa tester skulle man kunna inkorporera utvärdering av ekologiska effekter för att undersöka grödans effekt på intilliggande populationer av vilda arter, detta är särskilt intressant om grödan är tänkt att odlas i regioner där det finns hotade arter.

Jordbruksmark bildar, tillsammans med den omringande naturen, ett biologiskt ekosystem som utsätts för selektion utefter våra behov. Ekosystem inom jordbruk har studerats under väldigt lång tid och har gett oss kunskap om de evolutionära processer som sker kring åkrar (Thrall *et al.*, 2011), tillsammans med utvecklingen av nya metoder inom genteknik och teorier inom populationsgenetik blir de evolutionära processerna kring jordbruksmark tydligare och leder till bättre riskbedömningar och en effektivare minimering av eventuella risker. En djupare förståelse för den ekologiska strukturen kring åkrar kan även hjälpa oss att skapa ekosystem som tar tillvara på biodiversiteten genom att minska utbredningen av jordbruksmark och genom att inkorporera arter i konstruerade ekosystem samtidigt som produktionen effektiviseras och möter kriterier för ett hållbart jordbruk.

Referenser

- Allainguillaume, J., Alexander, M., Bullock, J.M., Saunders, M., Allender, C.J., King, G., Ford, C.S. & Wilkinson, M.J.. 2006. Fitness of hybrids between rapeseed (*Brassica napus*) and wild *Brassica rapa* in natural habitats. *Molecular Ecology* 15(4): 1175-1184.
- Chrispeels, M. J., & Sadava, D. E. 2003. From Classic Plant Breeding to Modern Crop Improvement. *Plants, genes, and crop biotechnology*, ss. 362-389. Jones & Bartlett Learning.
- Currat, M., Ruedi, M., Petit, R. J., & Excoffier, L. 2008. The hidden side of invasions: massive introgression by local genes. *Evolution* 62(8): 1908-1920.
- Desplanque, B., Boudry, P., Broomberg, K., Saumitou-Laprade, P., Cuguen, J., & Van Dijk, H. 1999. Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of *Beta vulgaris* L.(Chenopodiaceae), assessed by RFLP and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics* 98(8): 1194-1201.
- Daniell, H., Datta, R., Varma, S., Gray, S., & Lee, S. B. 1998. Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature biotechnology* 16(4): 345-348.
- dos Reis Goulart, I. C. G., Pacheco, M. T., Nunes, A. L., & Merotto Jr, A. 2012. Identification of origin and analysis of population structure of field-selected imidazolinone-herbicide resistant red rice (*Oryza sativa*). *Euphytica* 187(3): 437-447.
- Gressel, J. 1999. Tandem constructs: preventing the rise of superweeds. *Trends in Biotechnology* 17(9): 361-366.
- Hansen, L. B., Siegismund, H. R., & Jørgensen, R. B. 2001. Introgression between oilseed rape (*Brassica napus* L.) and its weedy relative *B. rapa* L. in a natural population. *Genetic Resources and Crop Evolution* 48(6): 621-627.
- Haygood, R., Ives, A. R., & Andow, D. A. 2003. Consequences of recurrent gene flow from crops to wild relatives. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1527): 1879-1886.
- Harrison, R. G. (Ed.). 1993. *Introgression and Its Consequences in Plants. Hybrid zones and the evolutionary process*, ss. 70-109. Oxford University Press.
- Hufford, M. B., Lubinsky, P., Pyhäjärvi, T., Devengenzo, M. T., Ellstrand, N. C., & Ross-Ibarra, J. 2013. The genomic signature of crop-wild introgression in maize. *PLoS genetics* 9(5), e1003477.
- James, Clive. 2013. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013. ISAAA Brief No. 46*. ISAAA: Ithaca, NY.
- Meier, M. S., Trtikova, M., Suter, M., Edwards, P. J., & Hilbeck, A. 2013. Simulating evolutionary responses of an introgressed insect resistance trait for ecological effect assessment of transgene flow: a model for supporting informed decision-making in environmental risk assessment. *Ecology and evolution* 3(2): 416-423.

- Meirmans, P. G., Bousquet, J., & Isabel, N. 2009. A metapopulation model for the introgression from genetically modified plants into their wild relatives. *Evolutionary Applications* 2(2): 160-171.
- Mumm, R. H. 2013. A look at product development with genetically modified crops: examples from maize. *Journal of agricultural and food chemistry* 61(35): 8254-8259.
- Ohigashi, K., Mizuguti, A., Yoshimura, Y., Matsuo, K., & Miwa, T. 2014. A new method for evaluating flowering synchrony to support the temporal isolation of genetically modified crops from their wild relatives. *Journal of plant research* 127(1): 109-117.
- Ricklefs, R. E. 2008. The distribution and spatial structure of populations. *The economy of nature*, ss. 198-221. Macmillan.
- Thrall, P. H., Oakeshott, J. G., Fitt, G., Southerton, S., Burdon, J. J., Sheppard, A., ... & Ford Denison, R. 2011. Evolution in agriculture: the application of evolutionary approaches to the management of biotic interactions in agro-ecosystems. *Evolutionary Applications* 4(2): 200-215.
- Wang, Z., Zemetra, R. S., Hansen, J., & Mallory-Smith, C. A. 2009. The fertility of wheat×jointed goatgrass hybrid and its backcross progenies. *Weed Science* 49(3): 340-345.
- Whitney, K. D., Randell, R. A., & Rieseberg, L. H. 2006. Adaptive introgression of herbivore resistance traits in the weedy sunflower *Helianthus annuus*. *The American Naturalist* 167(6): 794-807.
- Whitton, J., Wolf, D. E., Arias, D. M., Snow, A. A., & Rieseberg, L. H. 1997. The persistence of cultivar alleles in wild populations of sunflowers five generations after hybridization. *Theoretical and Applied Genetic* 95(1-2): 33-40.
- Yang, X., Xia, H., Wang, W., Wang, F., Su, J., Snow, A. A., & Lu, B. R. 2011. Transgenes for insect resistance reduce herbivory and enhance fecundity in advanced generations of crop–weed hybrids of rice. *Evolutionary Applications* 4(5): 672-684.