

# Begleitforschung an Freisetzungen gentechnisch veränderter Pflanzen in Sachsen

AZ: 13.8802.35ufo/3.2/96GEN,FZ: 01/01-96-81

## Abschlußbericht



# **Begleitforschung an Freisetzungen gentechnisch veränderter Pflanzen in Sachsen**

AZ: 13.8802.35ufo/3.2/96GEN

FZ: 01/01-96-81

## **Abschlußbericht**

über den Bewilligungszeitraum vom 01. 09. 1996 bis 31. 08. 1998

Prof. Dr. W. Reißer  
Universität Leipzig  
Institut für Botanik/Allgemeine  
und Angewandte Botanik  
Johannisalle 22-23  
04103 Leipzig

Prof. Dr. Martin Schlegel  
Universität Leipzig  
Institut für Zoologie/Spezielle Zoologie  
Talstraße 33  
04103 Leipzig

## 1. Ziele des Vorhabens

Im Rahmen der Begleitforschung zur Freisetzung von transgenem Raps (*Brassica napus*) durch die Firma AgrEvo auf dem Gelände der Agrargemeinschaft Gnaschwitz, Gemeinde Gaußig, Sachsen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Auskreuzungshäufigkeit des Herbizidresistenz-Gens (Phosphinotricin-Acetyltransferase-Gen: *pat*-Gen) auf nicht transgenen Raps und auf Rübsen (*Brassica napa*).
- Ermittlung der blütenbesuchenden Insekten im Versuchsfeld und im angrenzenden Gebiet
- Untersuchung der blütenbesuchenden Insekten auf Pollenfracht
- Analyse der Pollenfracht auf Anwesenheit des *pat*-Gens

## 2. Vorversuche im Labor

### 2.1 Isolierung von Gesamt-DNA

Raps-Saatgut der Sorte Falcon wurde sowohl nicht-gentechnisch verändert, als auch mit dem *pat*-Gen erworben. Von beiden wurde DNA isoliert (Edwards K et al. 1991) Es wurde eine ausführliche Suche nach *pat*-Gensequenzen in den Genbanken GenBank, EMBL, DDBJ u. PDB durchgeführt. Mit Hilfe eines Alignierungsprogrammes (Align) wurde ein Paar Amplifikationsprimer konstruiert:

PAT 1: 5'- GGA GAG GAG ACC AGT TGA GAT TAG - 3'

PAT 2: 5'- GTA ACT GGC CTA ACT GGC CT - 3'

Diese Primer weisen die empfohlene Übereinstimmung in Länge und GC-Gehalt von ca. 50% auf und haben somit in etwa gleiche Hybridisierungsbedingungen. Sie sind zu Regionen des 5'- und 3'-Endes des *pat*-Genes homolog und ergeben ein 534 Basenpaar langes DNA-Fragment in der PCR (Abb. 1).

Weitere Primer wurden vom Institut für Molekulargenetik, Fachbereich Biologie der Universität Mainz bezogen. Diese stammen aus verschiedenen Bereichen des *pat*-Gens und erlauben es, auch kleinere Fragmente zu amplifizieren: Das Primerpaar P1, P2 stammt aus der Promotorregion des synthetischen *pat*-Gens, die Primer T1, T2 aus der Terminatorseite. Ein drittes Primer-Paar ist von der Sequenz der 35-s-CaMV-Promotors des Transgen-Konstrukts abgeleitet. Genaue Versuchsprotokolle zur Durchführung der *pat*-Gen-Amplifikation mit Hilfe der PCR wurden ebenfalls vom Institut für Molekulargenetik zur Verfügung gestellt.

Ziel war es, auszutesten, welche Primer am sensitivsten sind, d. h. mit möglichst wenig Ausgangsmaterial Amplifikationsprodukte erhalten werden, und andererseits, welche der Primer am spezifischsten sind, also möglichst wenige Co-Amplifikationsprodukte ergeben. Die Konstruktion eigener Primer war hierbei schon deshalb nötig,

da aufgrund einer Vereinbarung der Universität Mainz mit dem Landesamt für Umwelt und Gewerbeaufsicht (Rheinland-Pfalz) die Sequenz der erworbenen Primer nicht mitgeteilt wurde. **Auch wir haben uns entschlossen, die Sequenzen unserer Amplifikationsprimer vorerst nicht zu veröffentlichen.**

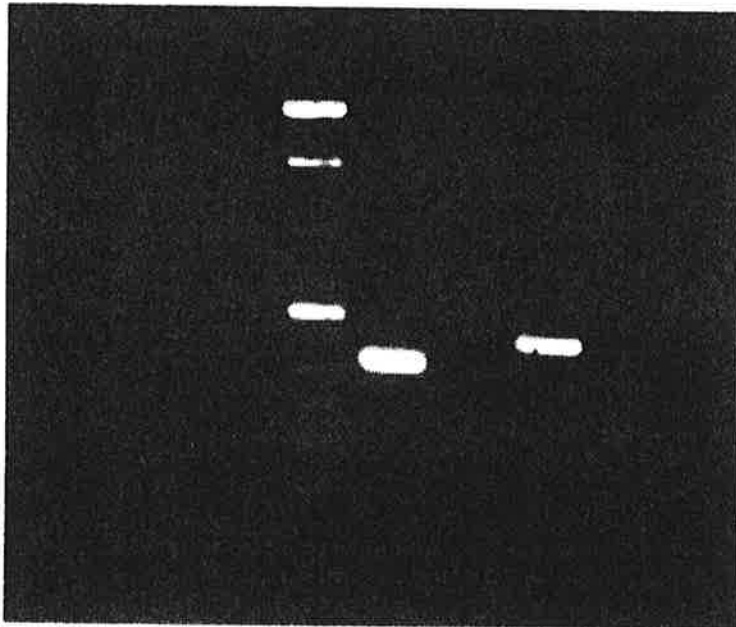


Abbildung 1: PCR amplifizierte *pat*-Genfragmente nach Auftrennung im 1%igen Agarosegel und Anfärbung mit Ethidiumbromid. Linke Spur: Molekulargewichtsmarker, untere prominente Bande entspricht 600 Basenpaaren; mittlere Spur: PCR-Produkt unter Verwendung der Primer P2 und T2; rechte Spur: PCR-Produkt unter Verwendung der Primer PAT 1 und PAT 2.

Das mit unseren Primern amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pGEMT kloniert und sequenziert. Es ergab sich eine 100%ige Sequenzübereinstimmung mit der *pat*-Gen-Sequenz der Firma AgrEvo (Abb. 2). Somit amplifizieren die gewählten Primer spezifisch das *pat*-Gen. Für spätere Hybridisierungszwecke wurde mit Hilfe von Digoxigenin-11-dUTP eine hochsensitive nicht-radioaktive Sonde hergestellt, um zur PCR eine alternative und komplementäre Nachweismethode in der Hand zu haben.

03/14/97

ALIGNED SEQUENCE PRINTOUT

Page 1

Reference molecule: PAT 9 - 542 ( 534 bps) Homology  
 Sequence 2: PAT12 1 - 534 ( 534 bps) 100%  
 Parameters set: Mismatch = 2; Open Gap = 0; Extend Gap = 2

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
PAT   GGAGAGGAGACCAGTTGAGATTAGGCCAGCTACAGCAGCTGATATGGCCGCGGTTTGTGA
PAT12 .....

      70      80      90      100     110     120
      *      *      *      *      *      *
PAT   TATCGTTAACCATTACATTGAGACGCTCTACAGTGAACCTTAGGACAGAGCCACAAACACC
PAT12 .....

     130     140     150     160     170     180
     *     *     *     *     *     *
PAT   ACAAGAGTGGATTGATGATCTAGAGAGGTTGCAAGATAGATACCCTTGGTTGGTTGCTGA
PAT12 .....

     190     200     210     220     230     240
     *     *     *     *     *     *
PAT   GGTTGAGGGTGTGTGGCTGGTATTGCTTACGCTGGGCCCTGGAAGGCTAGGAACGCTTA
PAT12 .....

     250     260     270     280     290     300
     *     *     *     *     *     *
PAT   CGATTGGACAGTTGAGAGTACTGTTTACGTGTCACATAGGCATCAAAGGTTGGGCCTAGG
PAT12 .....

     310     320     330     340     350     360
     *     *     *     *     *     *
PAT   ATCCACATTGTACACACATTTGCTTAAGTCTATGGAGGCGCAAGGTTTAAAGTCTGTGGT
PAT12 .....

     370     380     390     400     410     420
     *     *     *     *     *     *
PAT   TGCTGTTATAGGCCTTCCAAACGATCCATCTGTTAGGTTGCATGAGGCTTTGGGATACAC
PAT12 .....

     430     440     450     460     470     480
     *     *     *     *     *     *
PAT   AGCCCGGGGTACATTGCGCGCAGCTGGATACAAGCATGGTGGATGGCATGATGTTGGTTT
PAT12 .....

     490     500     510     520     530     540
     *     *     *     *     *     *
PAT   TTGGCAAAGGGATTTTGAAGTTGCCAGCTCCTCCAAGGCCAGTTAGGCCAGTTAC
PAT12 .....
  
```

Abbildung 2: Sequenzvergleich des mit den PAT 1 und PAT 2 Primern amplifizierten Fragmentes (PAT 12) mit der *pat*-Gensequenz (PAT) nach Angaben der Firma AgrEvo. Die Sequenzübereinstimmung beträgt 100%.

### 3. Untersuchungen zur Übertragung des *pat*-Gens von transgenen Pflanzen auf unveränderten Raps und Rüben

#### 3.1 Untersuchungen aus dem Jahr 1997

Das Versuchsfeld war 36 x 125 m groß und in einem Abstand von 3 Metern von einer 8 m breiten Mantelsaat aus nicht-transgenem Raps umgeben (Abb. 3). Konzentrisch um das Versuchsfeld wurden an 35 Punkten jeweils 100 getopfte Pflanzen von Raps, Rüben und Hederich (*Raphanus raphanistrum*) in 50 bis 400m Entfernung entsprechend den Vorgaben des Robert-Koch-Instituts auf stabilen Plastikfolien ausgebracht und regelmäßig gegossen (Abb. 4 und 5).

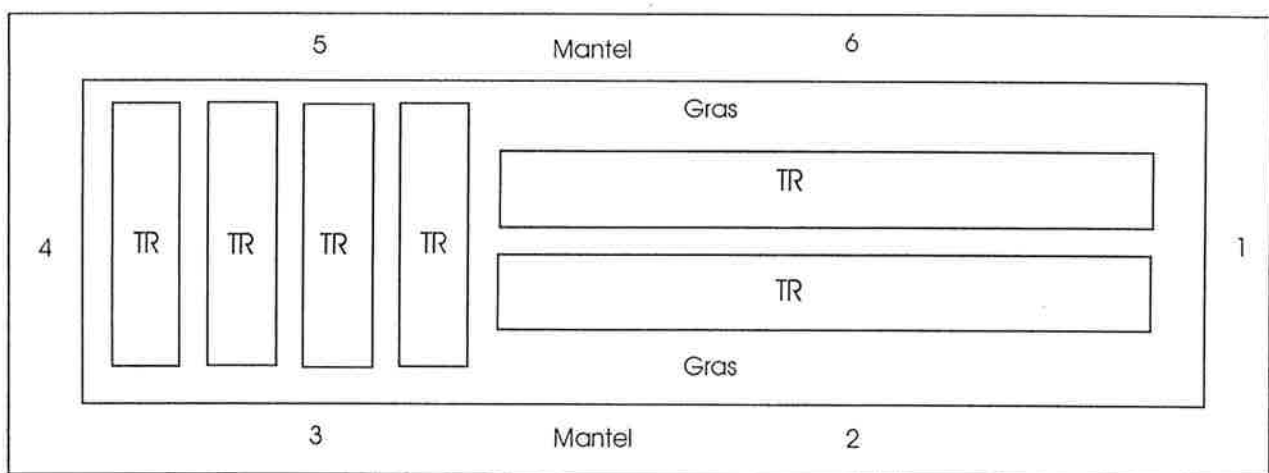


Abbildung 3: Versuchsfeld mit transgenem Raps (TR) und nicht-transgener Mantelsaat. Die Zahlen im Mantel geben die sechs Punkte an, an denen Samen zur Testung auf das *pat*-Gen entnommen wurden. Der Entnahmepunkt 1 liegt in nördlicher Richtung (vgl. mit Abb. 4).

Die Pflege dieser Akzeptorpflanzen („Fangpflanzen“) erwies sich als sehr aufwendig und teuer. Es gelang jedoch, eine hohe Blühsynchronisation bei Raps und Rüben mit den Pflanzen im Versuchsfeld zu erreichen. Hederich kam nur vereinzelt zur Blüte und konnte bei den weiteren Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt werden. Dies könnte durch die Sorte bedingt sein, die verwendet wurde. Da in Deutschland keine Samen erhältlich waren, mußte auf englisches Saatgut ausgewichen werden, das vielleicht bei uns nicht optimal gedeiht. Vor Erreichen der Vollreife wurden Raps und Rüben geerntet. Die verbliebenen Pflanzen wurden in das Versuchsfeld eingebracht und durch die Firma AgrEvo mit den Versuchspflanzen fachgerecht entsorgt. Aus der Mantelsaat wurden ebenfalls an 6 Punkten Samen entnommen (Abb. 3). Insgesamt standen aus dem Versuchsansatz von 1997 ca. 1,75 Mill. Rapssamen aus der Mantelsaat, 6 Mill. Rapssamen aus den Topfpflanzen, und 6,5 Mill. Rübensamen aus den Topfpflanzen zur Verfügung.

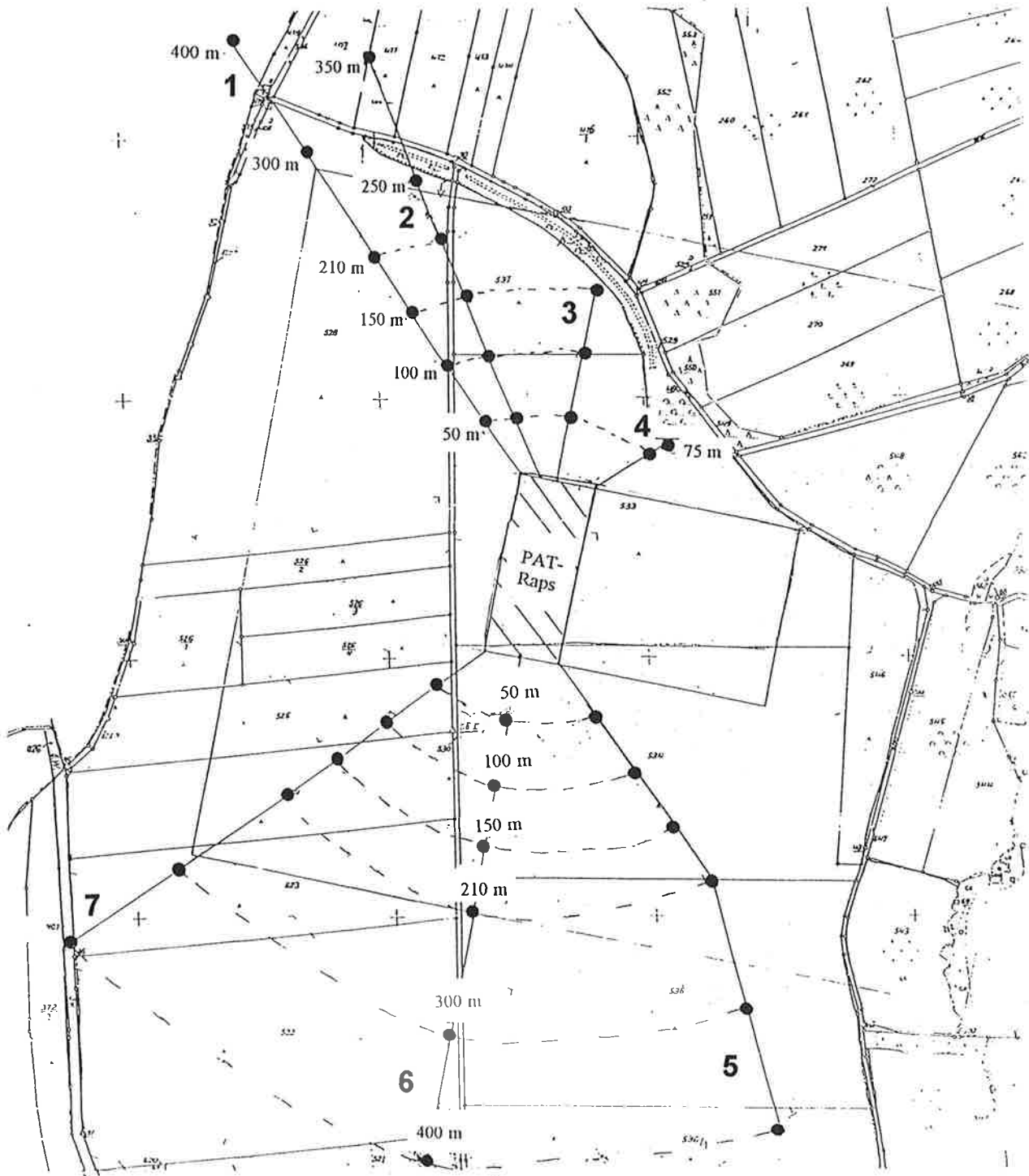


Abbildung 4: Anordnung der Meßpunkte entlang der Meßstrecken 1 bis 7 um das Versuchsfeld im Jahr 1997.



Abbildung 5: In Töpfen auf Plastikfolien ausgebrachte Raps und Rübsenpflanzen im Jahr 1997.

### 3.1.1 Untersuchungen an Rübsen

#### 3.1.1.1 Resistenzbonitur

Das Saatgut wurde ab Oktober 1997 systematisch in Gewächshäusern der Universität Leipzig angekeimt (Genehmigung als S1 Labor liegt vor). Nach Austrieb von 1-2 Laubblättern erfolgte eine Resistenzbonitur mit dem Herbizid Basta nach Angaben des Herstellers (1%ige Lösung:  $450\mu\text{l}$  in  $30\text{ml H}_2\text{O/m}^2$ ). Die überlebenden Pflanzen (Abb. 6) wurden ausgezählt und für weitere Untersuchungen tiefgefroren. Als Kontrolle dienten Samen transgener und nicht-transgener Rapspflanzen, die in eigenen Schalen angezogen und ebenfalls der Resistenzbonitur unterzogen wurden. Zum Berichtszeitpunkt sind die Rapspflanzen aus der Mantelsaat und bis auf einige Ausnahmen (300m-Abstand) von allen Meßpunkten untersucht. Einige Meßpunkte wurden zweimal bearbeitet, da Keimung der Pflanzen und Erfolg der Resistenzbonitur auch im Gewächshaus durchaus witterungsabhängig waren. Von den einzelnen Meßpunkten wurden in der Regel zwischen 50.000 und 100.000 Pflanzen angekeimt und auf ihre Resistenz getestet. Hinter dieser im Gegensatz zu anderen Untersuchungen ungewöhnlich hohen Zahl stand die Überlegung, eine Auskreuzungshäufigkeit von 0,05 % noch einigermaßen sicher nachweisen zu können: Bei ca. 50% Keimung waren dann noch  $0,05 \times 250 = 12$  bis 13 resistente Pflanzen zu erwarten. Die Ergebnisse zeigen, daß diese Berechnung sinnvoll war und an der Peripherie des Versuchsaufbaus tatsächlich solche Werte erhalten wurden. Von manchen Punkten konnten nur erheblich weniger Samen gesammelt werden, da durch Wildverbiß viele Pflanzen vernichtet worden waren. Die Ergebnisse zur Übertragungshäufigkeit des *pat*-Gens sind in Tabelle 1 zusammengestellt.





Abbildung 6: Resistenzbonitur der Keimlinge aus dem Mantel und von den verschiedenen Meßpunkten im Gewächshaus. Je 500 Samen wurden in Schalen angekeimt und nach Austrieb von 1 bis 2 Laubblättern mit Basta behandelt. Grüne Pflanzen: vor der Basta Behandlung; braune Pflanzen: nach der Basta Behandlung, einzelne grüne überlebende sind zu erkennen.

Die wesentlichen Ergebnisse sind:

- Insgesamt ist eine deutliche Ausbreitung des *pat*-Gens festzustellen. Die Daten müssen zudem vor dem Hintergrund gesehen werden, daß keine cms („cytoplasmic male sterile“) sondern „fertile“ Rapspflanzen als Akzeptorpflanzen verwendet wurden, die in der Regel selbstbestäubend sind und Bestäubung durch Fremdpollen, Voraussetzung der Resistenzübertragung, nur bis zu 20% vorkommt.
- Im 50 m Abstand wurden genauso viele resistente Pflanzen (0,84% +/- 0,56) gefunden wie in der Mantelsaat (0,84% +/- 0,67). Erst mit zunehmender Entfernung nimmt die Zahl der resistenten Pflanzen ab. Dieses Ergebnis wirft die Frage nach der Effektivität der Mantelsaat als Ausbreitungsbarriere auf.
- Im Gegensatz zu den ersten Ergebnissen scheint sich trotz weiterhin auftretender Schwankungen im Gesamtbild eine gewisse Differenzierung der Ausbreitungshäufigkeit zu ergeben: Im nördlichen Bereich des Versuchsfeldes (Mantel 6, 1 und 2; Meßstrecken 1, 2, und 4) ist die Übertragungshäufigkeit höher als im südlichen Bereich (v. a. Meßstrecke 6 zeigt durchgehend die niedrigsten Werte). Ein verteilungsfreier statistischer Vergleich mit Hilfe eines Mann-Whitney U-Tests ergibt eine signifikante Ungleichverteilung zwischen nördlichen und südlichen Meßpunkten ( $p < 0,05$ )<sup>1</sup>. Dies könnte durch die Exposition zum nördlich gelegenen Waldbereich bedingt sein, aus dem wahrscheinlich mehr Insekten einfliegen als aus dem südlichen Wiesenbereich.
- Auch in 400 m Entfernung ließen sich noch transgene Pflanzen in einer Häufigkeit von 0,1% nachweisen. Dies ist nach unserem Wissen der entfernteste Meßpunkt, von dem zuverlässige Daten vorliegen. In früheren Studien (Dale et al. 1993) wurden bereits ab 70 m Entfernung keine resistenten Pflanzen mehr gefunden. Allerdings war hier das Versuchsfeld mit 9 m Durchmesser wesentlich kleiner. Auch die Werte der Niedersächsischen Arbeitsgruppe liegen unter den hier dargestellten. In 200m Entfernung wurden 1996 0% bis 0,03%, 1997 0,01% bis 0,02% (mit einem Extrem von 0,8%) resistente Pflanzen festgestellt. Allerdings waren hier die Zahlen der aufgestellten „Fangpflanzen“ pro Meßpunkt mit 4 (1996) und 6 (1997) um Größenordnungen geringer als in unserem Versuch. Im Rahmen des Verbundprojektes FORBIOSICH-Projekt Bayern wurden ebenfalls geringere Werte erzielt. Bei 45 m Entfernung vom Versuchsfeld waren es nur 0,03% resistente Pflanzen, mehr als eine Größenordnung geringer als unsere Werte. Die Autoren selbst sehen jedoch ihre Werte an der Untergrenze der in der Literatur angegebenen Fremdbefruchtungsraten. Die Unterschiede in den Ergebnissen könnten durch die verschiedenen Stichproben bedingt sein. Eine besondere Exposition zu der nahegelegenen Waldfläche in unserem Versuch könnte ebenfalls zu den höheren Werten beitragen. Gestützt wird diese Annahme durch die Untersuchungen zu den blütenbesuchenden Insekten, die ergaben, daß vor allem Wildbienen und Schwebfliegen die aus dem Umland einfliegen als Pollentransporteur in Frage kommen (s. 5.1). Weiterhin stützen diese Ergebnisse die Hypothese, daß die Ausbreitungshäufigkeit des *pat*-Gens auch mit der Größe des Versuchsfeldes korreliert ist.

<sup>1</sup> Eine Berechnung nach dem t-Test ist in diesem Fall nicht zulässig, da die Werte nicht normalverteilt sind, sondern asymmetrisch, nach außen abnehmend (Nortz 1985).

Tabelle 1: Übertragungshäufigkeit des *pat*-Gens von transgenen Pflanzen im Versuchsfeld auf nicht genetisch veränderte Rapspflanzen

Meßpunkt	Ausgesäte Samen	% gekeimt	Zahl der Überl.	% Überl./ Gekeimte	Durchschnitt
Kontrolle	1000	50	0	0	
Transgene	1000	50	ca. 500	100	
Mantel 1	135.000	40	925	1,71	0,84 +/- 0,67
Mantel 2	65.500	50	337	1,03	
Mantel 2 wh	74.500	50	185	0,50	
Mantel 3	70.000	50	131	0,37	
Mantel 3 wh	66.500	50	157	0,47	
Mantel 4	64.500	50	91	0,28	
Mantel 5	67.000	50	128	0,38	
Mantel 6	65.000	50	649	2,00	
Raps1 50m	93.000	70	556	0,85	0,84 +/- 0,56
Raps2 50m	44.000	70	629	2,04	
Raps3 50m	102.000	70	477	0,67	
Raps4 50m	68.000	50	238	0,70	
Raps5 50m	102.500	50	319	0,62	
Raps6 50m	102.000	50	128	0,25	
Raps7 50m	95.000	45	332	0,78	
Raps4 75m	86.000	70	284	0,47	0,56
Raps4 75m wh	95.500	50	308	0,65	
Raps1 100m	102.000	50	285	0,56	0,43 +/- 0,12
Raps2 100m	108.000	50	252	0,47	
Raps3 100m	108.500	50	287	0,53	
Raps5 100m	98.500	50	195	0,40	
Raps6 100m	108.000	50	133	0,25	
Raps7 100m	67.500	60	140	0,35	
Raps1 210m	37.500	60	49	0,22	
Raps2 210m	27.000	60	26	0,16	
Raps5 210m	36.000	60	25	0,12	
Raps5 210 wh	102.000	60	144	0,24	
Raps6 210m	102.000	60	40	0,07	
Raps7 210m	4.000	60	15	0,63	
Raps2 250m	6.000	60	8	0,22	
Raps2 350m	20.500	60	8	0,07	

Raps1 400m	8.000	60	11	0,23	0,11
Raps5 400m	94.000	60	50	0,09	
Raps6 400m	108.000	75	45	0,06	
Raps7 400m	102.000	75	56	0,07	

### 3.1.1.2 Nachweis des *pat*-Gens in Basta resistenten Pflanzen

Zum Nachweis des *pat*-Gens wurde DNA aus den tiefgefrorenen resistenten Pflanzen isoliert und das Gen entweder durch PCR (Abb. 7) oder „dot-blot“-Hybridisierung nachgewiesen (Abb. 8). Von allen Meßpunkten wurden bislang mindestens fünf Pflanzen getestet und in den meisten Fällen das *pat*-Gen nachgewiesen. In manchen Fällen waren die Signale in der „dot-blot“ Hybridisierung schwach und dann auf der Fotografie schlecht zu sehen (Abb. 8). Dennoch gehen wir davon aus, daß auch in diesen Fällen das *pat*-Gen vorhanden ist. Die PCR des *pat*-Gens mit unseren Primern liefert hier fotografisch leichter zu dokumentierende Ergebnisse (Abb. 7), ist aber teurer und viel zeitaufwendiger. Für die geplante Veröffentlichung werden noch entsprechende PCR Amplifikationen durchgeführt.



Abbildung 7: PCR-amplifiziertes *pat*-Genfragment aus Rapspflanzen nach Auftrennung im 1%igen Agarosegel und Anfärbung mit Ethidiumbromid. Spur 1, 2: DNA transgener Pflanzen (Positivkontrolle); Spur 3, 4: DNA Basta resistenter Pflanzen (50 m Meßpunkt); Spur 5, 6: Kontrollpräparation ohne DNA; Spur 7, 8: DNA Basta resistenter Pflanzen (100 m Meßpunkt); Spur 9 – 15: DNA Basta resistenter Pflanzen (50 m Meßpunkt); Spur 16 – 23: DNA Basta resistenter Pflanzen (75 m Meßpunkt); Spur 24: Kontrollpräparation ohne DNA.