

Untersuchungen zur Auskreuzung von Herbizidresistenzgenen beim großflächigen Anbau von Rapspflanzen mit unterschiedlichen Herbizidresistenzen

Antje Dietz-Pfeilstetter¹ und Peter Zwerger²

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA),

¹Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit,

²Institut für Unkrautforschung,

Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig

Zusammenfassung

Weltweit ist eine zunehmende Vermarktung von gentechnisch verändertem Raps zu beobachten. So wurde 1998 in Kanada bereits auf 2,1 Millionen ha transgener, herbizidresistenter Raps angebaut. Auch in der EU besitzen verschiedene gentechnisch veränderte Rapslinien eine Genehmigung zum Inverkehrbringen. Sowohl die Frequenzen als auch die Folgen der beim großflächigen landwirtschaftlichen Anbau zu erwartenden Auskreuzungen aus transgenem Raps auf andere Rapsfelder sind nur unzureichend untersucht. Besonders geeignet für modellhafte Untersuchungen zur Auskreuzung sind Herbizidresistenzgene, da es sich dabei um leicht zu untersuchende monogene Merkmale handelt. Es ist daher ein Projekt geplant, um

1. die Frequenz der Einkreuzung von Herbizidresistenzgenen auf benachbarte Rapsfelder unter landwirtschaftlichen Anbaubedingungen,
 2. die Stabilität der Genexpression bei doppelt herbizidresistenten Pflanzen sowie
 3. die Bekämpfbarkeit von doppelt herbizidresistentem Ausfallraps
- zu untersuchen.

Abstract

Marketing and cultivation of genetically modified oilseed rape is increasing worldwide. In Canada, for instance, an area of about 5,2 million acres was planted with transgenic herbicide tolerant oilseed rape in 1998. Within the EU several transgenic rape seed lines have the approval for placing on the market. The frequencies as well as the consequences of outcrossing events that are likely to occur during large-scale cultivation, are examined insufficiently. Herbicide tolerance genes are especially suitable for model experiments exploring outcrossing, because they are easily detectable monogenic traits. We are therefore planning a research project in order to investigate

1. outcrossing frequencies of herbicide tolerance genes to neighbouring rape seed fields under agricultural practice,
2. the stability of gene expression in plants with two herbicide tolerance genes,
3. the ability to combat volunteer rape containing two herbicide tolerance genes.

Einleitung

Innerhalb der nächsten Jahre ist mit einem großflächigen Anbau gentechnisch veränderter Rapspflanzen mit unterschiedlichen Eigenschaften - insbesondere Herbizidresistenz, männlicher Sterilität und veränderter Ölzusammensetzung - zu rechnen. Verschiedene transgene Rapslinien sind bereits nach der Richtlinie 90/220/EWG innerhalb der EU in-verkehrgebracht, weitere werden voraussichtlich in nächster Zeit auf den Markt kommen.

Obwohl Raps hauptsächlich selbstbefruchtend ist, kann auch in beträchtlichem Ausmaß Auskreuzung durch Insekten und Wind stattfinden (Hühn und Rakow, 1979; Rakow und Woods, 1987). In bisherigen Untersuchungen wurden Auskreuzungsraten nicht unter praxisnahen landwirtschaftlichen Anbaubedingungen bestimmt. In ersten Veröffentlichungen zur Häufigkeit der Pollenverbreitung bei transgenem Raps, die nur auf sehr kleinen Feldgrößen basierten, wurde nur über sehr geringe Auskreuzungsraten und -entfernungen berichtet (Manasse und Kareiva, 1991; Scheffler *et al.*, 1993). Wie jedoch neuere Untersuchungen an größeren transgenen Rapsfeldern und unter Verwendung von Pollenfängerpflanzen zeigten, ist bei einem großflächigen, kommerziellen Anbau gentechnisch veränderter Rapspflanzen mit einer Verbreitung der eingeführten Transgene auf benachbarte Rapsfelder zu rechnen (Timmons *et al.*, 1995; Pfeilstetter *et al.*, 1999).

Auch die gleichzeitige Auskreuzung zweier verschiedener Herbizidresistenzgene und die Frage der Neukombination zweier Transgene in einer Pflanze wurde bisher nicht ausreichend berücksichtigt. De la Taille (1997) in Frankreich untersuchte zwar die Auskreuzung eines fremden Herbizidresistenzgens auf benachbarte Felder mit anderen transgenen herbizidresistenten Rapspflanzen, das Felddesign bei diesen Freisetzungsexperimenten beinhaltete jedoch keine Flächen mit nicht-transgenem Raps und damit keinen nicht-transgenen Pollendruck.

Die Einkreuzung eines Herbizidresistenzgens in nicht-resistente Rapspflanzen oder in Raps, der bereits tolerant ist gegen ein anderes Herbizid, könnte die Bekämpfbarkeit von Ausfallraps in den Folgejahren erschweren. Rapssamen können, wenn sie in tiefere Bodenschichten gelangen, viele Jahre im Boden persistieren und dabei keimfähig bleiben (Fuchs, 1987; Schlink, 1989).

Als Folge der Neukombination zweier Transgene in einer Pflanze ist es auch denkbar, dass aufgrund von DNA-Sequenzhomologien (z.B. im Promotorbereich) die Genexpression abgeschaltet wird. Nur die einfach resistenten Ausgangspflanzen wurden auf Stabilität der Expression getestet. Trans-Inaktivierung wird beobachtet, wenn Einzelkopie-Transgene, die teilweise homologe DNA-Sequenzen haben, beispielsweise durch Kreuzung in einer Pflanze vereinigt werden (Matzke *et al.*, 1993; Meyer und Saedler, 1996).

Arbeitsplan

1. Feldversuch

Zur Bestimmung des Auskreuzungsverhaltens wird ein 3-jähriger Feldversuch unter praxisüblichen Bedingungen angelegt. Es werden zwei Versuche mit einem Jahr Abstand auf zwei verschiedenen benachbarten Flächen angelegt. Im ersten Jahr (Versuch 1) bzw. im zweiten Jahr (Versuch 2) wird in ca. 0,5 ha großen Parzellen Winterraps mit Glufosinat-ammonium-Resistenz (Liberty Link; pat-Gen) und mit Glyphosat-Resistenz (Roundup Ready; epsps- und gox-Gen) nebeneinander angebaut, umgeben von ca. 8 ha nicht-transgenem Raps.

Die Parzellen werden dabei so angelegt, dass jede Variante einmal unmittelbar an eine andere grenzt und einmal durch einen etwa 10 m breiten Weg getrennt ist (Abb. 1). Die gesamte Anbautechnik erfolgt praxisüblich, wobei im Herbst zwei Applikationen der betreffenden Komplementärherbizide vorgesehen sind. Um die anfallende, zu inaktivierende Samenmenge deutlich zu reduzieren, werden in und um die Parzellen mit transgenem Raps 2 m breite Streifen mit zunehmender Entfernung angelegt. Die Pflanzen zwischen den Teilstreifen werden nach abgeschlossener Blüte vor der Samenreife gemulcht. Das Einmessen der Kernparzellen und Teilstreifen sowie die Positionsbestimmung für die Probenahme erfolgen mit Hilfe eines GPS-Systems (Global Positioning System).

2. Bestimmung der Auskreuzungsrate

Die Beerntung der Streifen erfolgt mit einem Parzellenmähdrescher, wobei alle 14 m Samenproben aus dem Dreschgut entnommen werden. Die Frequenz der Einkreuzung eines fremden Herbizidresistenzgens wird an den entnommenen Samen mittels Herbizid-Keimungs- bzw. Herbizid-Applikationstests sowie durch Resistenzgen-spezifische PCR untersucht. Durch die Rasterbeprobung lässt sich das Auskreuzungsverhalten in Abhängigkeit vom Rand der jeweils anderen Parzelle sowie in Abhängigkeit vom Abstand zum umgebenden nicht-transgenen Feld bestimmen. Um den auf der Stoppel auflaufenden Ausfallraps hinsichtlich seiner Herbizidresistenz zu untersuchen, wird der Ausfallraps in den Kernparzellen mit dem jeweils anderen Komplementärherbizid behandelt. Um doppelt resistenten Ausfallraps von verschlepptem einfach resistentem unterscheiden zu können, wird 3 bis 4 Wochen später mit dem jeweiligen Komplementärherbizid nachbehandelt. Von den danach noch auf dem Feld vorhandenen Pflanzen werden Proben entnommen und die zweifache Herbizidresistenz durch ELISA oder PCR verifiziert.

Nach einer nicht-wendenden Grundbodenbearbeitung wird auf der gesamten Fläche Winterweizen gesät und der Auflauf von Ausfallraps bestimmt. Nach der Beprobung der Parzellen zwecks Untersuchung auf die beiden Herbizidresistenzgene erfolgt dann eine praxisübliche Bekämpfung der Verunkrautung. Für den Versuch 1 werden auch im zweiten Jahr nach dem Rapsanbau diese Untersuchungen durchgeführt, wobei dann auf der Fläche Wintergerste angebaut wird.

3. Bekämpfbarkeit von doppelt resistentem Ausfallraps

Zur Untersuchung der Bekämpfbarkeit von doppelt resistentem Ausfallraps wird vor jeder Applikation der Komplementärherbizide und ca. 2-4 Wochen nach den Behandlungen die Anzahl der Rapspflanzen auf den Flächen bestimmt. Entsprechende Zählungen werden auch im Rahmen der Unkrautbekämpfung in den Folgekulturen durchgeführt. Dadurch lassen sich Aussagen zur Bekämpfbarkeit der jeweiligen Rapspflanzen auf der Stoppel und in den Folgekulturen ableiten. Der Feldversuch wird durch Modellversuche unter Gewächshaus- und Halbfreilandbedingungen ergänzt, in deren Rahmen an Referenzpflanzen mit beiden Herbizidresistenzen die Verträglichkeit der Pflanzen gegenüber den Komplementärherbiziden und anderen Raps-herbiziden sowie die Bekämpfbarkeit mittels üblicher Getreideherbizide untersucht wird.

4. Expressionsstabilität

Durch manuelle Kreuzungen zwischen Pflanzen einer Glyphosat-resistenten und einer Glufosinat-ammonium-resistenten Linie werden doppelt resistente Rapspflanzen hergestellt. Als Kontrolle dient einfach resistenter Raps. Die Stabilität der Expression der Resistenzgene wird im Gewächshaus untersucht, indem an statistisch repräsentativen Stichproben doppelt resistenter Pflanzen während verschiedener Stadien der Pflanzenentwicklung sowie nach Anzucht bei unterschiedlichen Temperaturen (22°C und 35°C) definierte Blattproben entnommen werden.

Die Blattproben werden geteilt und

- a) zur Herstellung von Proteinextrakten verwendet, die im ELISA zur Bestimmung des Expressionsniveaus der Resistenzgene eingesetzt werden,
- b) nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -70°C gelagert.

Falls in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand oder von der Temperatur eine Inaktivierung eines oder beider Resistenzgene gefunden wird, wird aus den tiefgefrorenen Blattproben DNA isoliert. Durch Schneiden mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen wird die DNA auf eventuelle Methylierungen im Promotor- bzw. Genbereich untersucht.

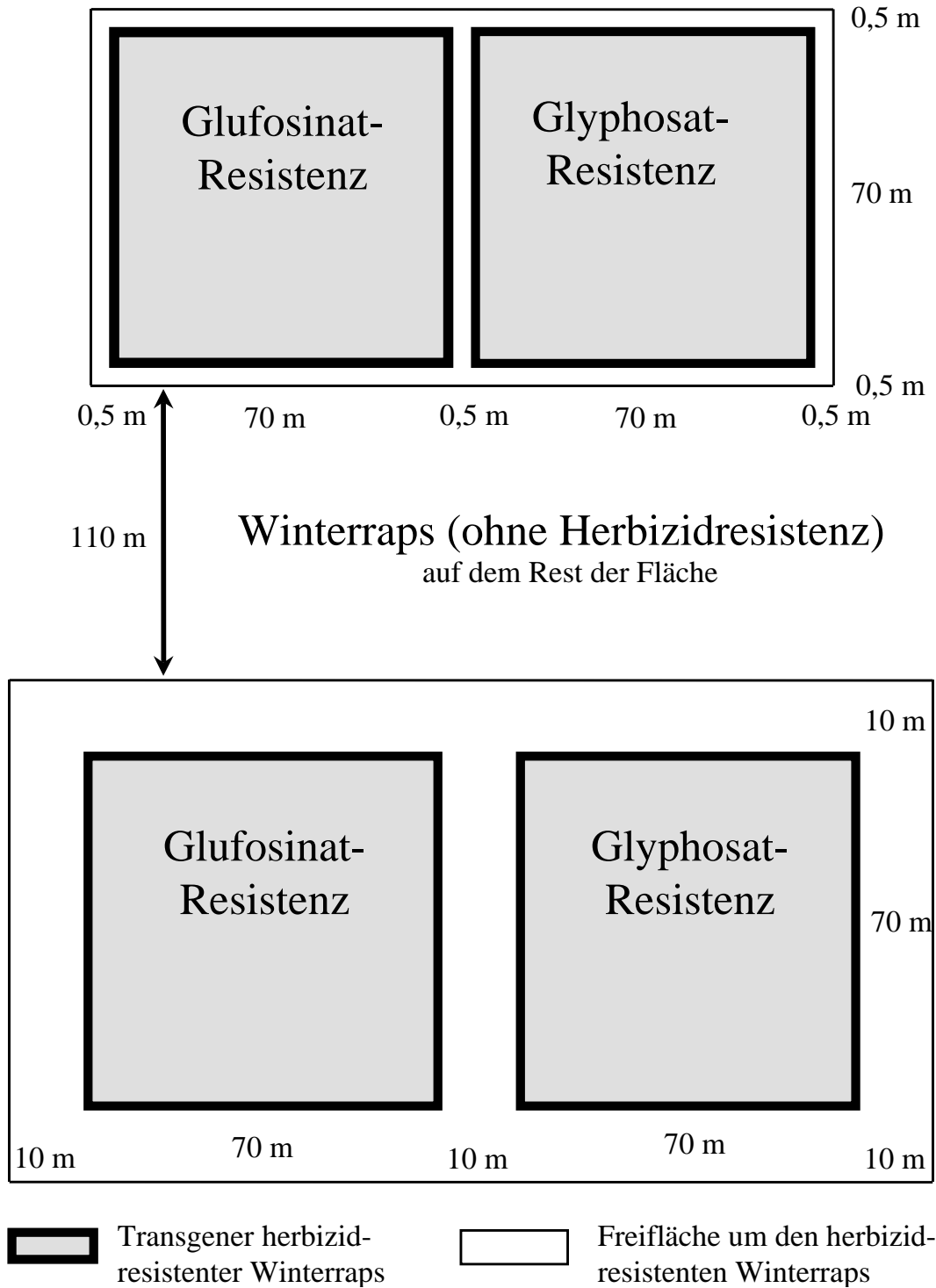


Abb. 1: Lageplan der Teilflächen mit transgenem Glufosinat- und Glyphosat-resistentem Winterraps auf einer insgesamt ca. 10 ha großen Versuchsfläche (nicht maßstabsgerecht).

Literatur

de la Taille, G.:

Étude des flux de gènes. CETIOM-Oléoscope no 41, 18–21, 1997.

Fuchs, H.:

Wie lange bleiben Raps-Samen im Ackerboden lebensfähig? RAPS 5, 140–141, 1987.

Hühn, M., Rakow, G.:

Einige experimentelle Ergebnisse zur Fremdbefruchtungsrate bei Winterraps (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) in Abhängigkeit von Sorte und Abstand. Z. Pflanzenzüchtg. 83, 289–307, 1979.

Manasse, R., Kareiva, P.:

Quantifying the spread of recombinant genes and organisms. In: L. Ginzburgh (Ed.). Assessing ecological risks of biotechnology, pp. 215–231. Butterworth-Heinemann, Boston, 1991.

Matzke, M.A., Neuhuber, F., Matzke, A.J.M.:

A variety of epistatic interactions can occur between partially homologous transgene loci brought together by sexual crossing. Mol. Gen. Genet. 236, 379–389, 1993.

Meyer, P., Saedler, H.:

Homology-dependent gene silencing in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47, 23–48, 1996.

Pfeilstetter, E., Matzk, A., Schiemann, J., Feldmann, S.D.:

Untersuchungen zum Auskreuzungsverhalten von Liberty-tolerantem Winterraps auf nicht-transgenen Raps. In: Schiemann, J. (Hrsg.): Biologische Sicherheit – Proceedings zum BMBF-Workshop, Braunschweig, 1998. Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen, Braunschweig, Jülich, BEO (Projekträger Biologie, Energie, Umwelt des BMBF). S. 175–182, 1999.

Rakow, G., Woods, D.L.:

Outcrossing in rape and mustard under Saskatchewan prairie conditions. Can. J. Plant Sci. 67, 147–151, 1987.

Scheffler, J.A., Parkinson, R., Dale, P.J.:

Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). Transgenic Res. 2, 356–364, 1993.

Schlink, S.:

Keimruhe bei Körnerraps (*Brassica napus* L.) in Abhängigkeit von Sorte, Jahr und Tiefenlage im Boden. Mitt. Ges. Pflanzenbauwiss. 2, 133–136, 1989.

Timmons, A.M., O'Brien, E.T., Charter, Y.M., Dubbels, S.J., Wilkinson, M.J.:

Assessing the risks of wind pollination from fields of genetically modified *Brassica napus* ssp. *oleifera*. Euphytica 85, 417–423, 1995.