

Weiterhin wurde untersucht, ob verschiedene Refugial Designs sich unterschiedlich auf das Überleben der Larven auswirken würden. Ein "refuge in a bag design" würde deutlich häufiger eine *Bt*-Pflanze neben einer Nicht-*Bt*-Pflanze stehen lassen, als ein "block design" wo nur bei zwei Reihen dieser Pflanzen nebeneinander stehen. Dies führt dazu, dass bei „refuge in a bag design“ deutlich mehr Larven überlebten als beim „block design“, da diese zwischen den Pflanzen überwechselten. Die Ergebnisse werden im Zusammenhang mit dem optimalsten Refugialdesign diskutiert, um eine Resistenz des Westlichen Maiswurzelbohrers gegen MON 88017 möglichst effizient hinauszuzögern.

04-5-Nguyen Thu, H.; Jehle, J.A.

Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinland, Phytomedizin

#### **Validierung eines ELISA zur quantitativen Bestimmung von Cry3Bb1 in verschiedenen Geweben der *Bt*-Maislinie MON88017**

Validation of ELISA to quantify Cry3Bb1 in *Bt* maize plant tissues

Die gentechnisch veränderte Maislinie MON88017 ist eine biotechnologische Alternative zur konventionell-chemischen bzw. biologischen Bekämpfung gegen den Westlichen Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera virgifera*). Dieser *Bt*-Mais bildet in verschiedenen Pflanzenteilen ein Cry3Bb1-Toxin, dessen Gen aus *Bacillus thuringiensis* spp. *kumamotoensis* stammt. Ein quantitativer Nachweis des Toxins ist für verschiedene Bereiche eines Monitoringverfahrens notwendig, in dem die Wirkung des Toxins auf Zielorganismen und Nichtzielorganismen überwacht werden soll. Daher war die Zielsetzung unserer Untersuchung die Entwicklung und Validierung einer quantitativen Nachweismethode. Mit diesem Verfahren wurde die Expressionshöhe von Cry3Bb1 in transgenem *Bt*-Mais der Linie MON88017 bestimmt.

Anhand des standardisierten Cry3Bb1-Toxins, welches aus Bakterien exprimiert und gereinigt wurde, und des qualitativen ELISA-Kits (PathoScreen-Kit) wurde ein quantitativer ELISA-Kit optimiert. Insgesamt wurden über 1.000 *Bt*-Pflanzenproben in unterschiedlichen Entwicklungsstadien des MON88017 (BBCH 19, 30, 63 und 83) in den drei aufeinander folgenden Versuchsjahren (2005 - 2007) am Standort bei Würzburg gesammelt. Als Kontrollpflanze diente die isogene Linie DKC 5143. Die Expression des Cry3Bb1-Toxins wurde in verschiedenen Pflanzengeweben wie Wurzel, Stängel, unteres Blatt, oberes Blatt, Antheren, Pollen, Fruchtfäden und Kolben mittels des optimierten ELISA quantitativ erfasst.

Die Ergebnisse des ELISA zeigen, dass die Cry3Bb1-Gehalte in den Blättern gegenüber Stängeln und Wurzeln, sowie Antheren und Körnern am höchsten waren. Der Gehalt des Toxins war in dem früheren Entwicklungsstadium BBCH19 am höchsten (Blätter: 23 - 43 µg/g Frischgewicht (FG), Wurzel: 16 µg/g FG, Stängel: 14 µg/g FG, Kolben: 21 µg/g FG). Die Menge an Toxin in den Antheren war 1,5-fach höher als in den Fruchtfäden. Im Gegensatz zu Cry1Ab nahm die Cry3Bb1-Toxinexpression in den späteren Entwicklungsstadien in Wurzeln und Stängeln deutlich ab. Die Expressionsmuster der Jahre 2005, 2006 und 2007 sind ähnlich. Die Variabilität der Toxin-Gehalte von Pflanze zu Pflanze war nicht hoch. Eine Ausnahme war die Toxinmenge in den älteren Blättern im Entwicklungsstadium BBCH 63, die im Versuchsjahr 2006 fast doppelt so hoch wie in den Jahren 2005 und 2007 war. Weiterhin wird in diesem Beitrag die Abschätzung des Cry3Bb1-Gehaltes pro Hektar *Bt*-Anbaufläche während der Vegetationsperiode vorgestellt.

Die Ergebnisse der saisonalen und gewebespezifischen Expression des Cry3Bb1-Toxins dienen als wichtige Datengrundlage für die Sicherheits- und Monitoringuntersuchungen und sind Teil des Freisetzungversuches von *Bt*-Mais MON88017 des BMBF-Verbundprojektes.

04-6-Njontie, C.W.; Hüskens, A.

Julius Kühn-Institut, Institut für Sicherheit in der Gentechnik bei Pflanzen

#### **Auswirkungen von gentechnisch veränderten Saatgutbeimengungen auf das Erntegut beim Mais (*Zea mays* L.)**

Consequences of GMO seed admixture on the harvest product in maize (*Zea mays* L.)

Die gleichberechtigte Koexistenz verschiedener landwirtschaftlicher Produktionssysteme mit und ohne Nutzung gentechnisch veränderter (GV) Pflanzen ist ein Anliegen europäischer und nationaler Regelungen. Bisher gibt es in der EU noch keinen rechtlich verbindlichen Schwellenwert für GV-Bestandteile im konventionellen Saatgut. Es werden für die Kulturpflanze Mais verschiedene Saatgutschwellenwerte zwischen 0,1 und 0,5 % diskutiert. Da das Saatgut am Anfang der Produktionskette steht, liegt in der Festschreibung

eines solchen Schwellenwertes eine wichtige Weichenstellung für die Koexistenz. Im EU-geförderten Forschungsverbund Co-Extra ("GM and non-GM supply chains: their Co-Existence and Traceability") werden im Teilprojekt 1 "Biological approaches for gene flow mitigation" umfangreiche Feldversuche (9 Wiederholungen a 168 m<sup>2</sup> in zwei Jahren) zu den Konsequenzen von unterschiedlichen GV-Saatgutbeimengungen (0,3 %, 0,5 %, 1 % Bt-Mais-Samen (PR39V17)) in Weißmaissaatgutpartien (DSP 17007) auf die Einkreuzungsrate im Erntegut durchgeführt. Darüber hinaus wurden verschiedene GV-Detektionmethoden (visuelle Detektion und quantitative PCR) auf ihre Vergleichbarkeit hin überprüft. Die visuelle GVO-Detektion (% GV-Samen) ergab im Durchschnitt GV-Gehalte von 0,24 %, 0,47 % und 0,80 % (Standardabweichungen: 0,11, 0,13 bzw. 0,22) im Erntegut. Die Variation des GV-Gehaltes im Erntegut hängt stark von der Blühsynchronität zwischen GV- und Nicht-GV-Pflanzen, von der Heterogenität des Feldbestandes, dem Standort und den klimatischen Bedingungen während der Blühperiode ab. Die Ergebnisse der real time PCR (% GV-DNA) stimmen weitestgehend ( $R^2 = 0,82$ ) mit den Ergebnissen der visuellen Detektion (% GV-Samen) überein, wenn auch die real time PCR konsistent niedrigere Werte lieferte. Die Steigung der Regressionskurve beträgt 0,4, der Erwartungswert liegt bei 0,5. Eine mögliche Erklärung für die Abweichung vom Erwartungswert ist, dass das verwendete Referenzmaterial (ERM-BF413f) für die Herstellung der Standardkurven das Transgen hemizygot maternal trägt, während die Ernteproben das Transgen hemizygot paternal tragen. Dies führt zu einer permanenten Unterschätzung des GV-Gehaltes in den Ernteproben. Des Weiteren wird das verwendete Referenzmaterial über Massenanteile (% GV-Gewicht) hergestellt, indem GV-haltiges Mehl mit Nicht-GV-Mehl vermischt wird. Die % GV-Massenanteile reflektierten die %-GV-DNA Gehalte in den als Standard verwendeten Proben nicht akkurat. Diese beschriebenen Unsicherheiten in der GV-Analyse beim Mais zeigen, dass die Verwendung von homozygotem GV-Referenzmaterial bzw. die Verwendung von Plasmiden als Referenzmaterial zu verlässlicheren Ergebnissen führt und zukünftig angestrebt werden sollte.

04-7-Kopertekh, L.<sup>1)</sup>; Broer, I.<sup>1)</sup>; Schieman, J.<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Universität Rostock, Agrar- und Umwelt-wissenschaftliche Fakultät, Institut für Landnutzung

<sup>2)</sup> Julius Kühn-Institut, Institut für Sicherheit in der Gentechnik bei Pflanzen

### **Entwicklungsspezifische Eliminierung von Markergenen aus transgenen Pflanzen**

Während einer Pflanzentransformation wird ein Markergen benötigt, um transformierte Pflanzen zu erhalten. Nach der Selektion ist die Anwesenheit des Transformationsmarkers überflüssig und er kann mittels sequenzspezifischer Rekombination aus dem Pflanzengenom eliminiert werden.

Um markergenfreie Tabak- und Raps-Pflanzen zu erzeugen, wurde die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines samenspezifischen Napin-Promotors entwicklungspezifisch exprimiert. Zuerst wurde das bar-Markergen von zwei Rekombinationssequenzen flankiert und zusammen mit dem cre-Gen -in Tabak und Raps transformiert. Die markergenfreien Pflanzen konnten in der ersten Nachkommenschaft der untersuchten Tabak- und Raps-Linien detektiert werden. Der Wegfall des bar-Markergens wurde durch PCR-Amplifikation unter Verwendung von Primern außerhalb der lox-Sequenzen und Sequenzanalyse des Amplifikationsproduktes bestätigt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der samenspezifische Napin-Promotor für eine funktionsfähige Cre-Expression in Tabak und Raps geeignet ist. Markergenfreie Tabak- und Raps-Pflanzen konnten durch entwicklungspezifische Expression der Cre-Rekombinase ohne sexuelle Kreuzung erzeugt werden.

Dieses Verfahren sollte generell für die Eliminierung von Markergenen aus generativ propagierten transgenen Kulturpflanzen anwendbar sein.