

Sächsische Landesanstalt für Landwirtschaft

Fachbereich Pflanzliche Erzeugung

Waldheimer Str. 219, 01683 Nossen

Internet: <http://www.landwirtschaft.sachsen.de/lfl>

Bearbeiter: Prof.* Dr. Christian Schiefer

E-Mail: Christian.Schiefer@smul.sachsen.de

Tel.: 035242/63-205 Fax: 035242/63-103

Auskreuzungsverhalten von Bt-Mais im Exaktversuch und unter Produktionsbedingungen

1. Einleitung
2. Material und Methoden
3. Ergebnisse und Diskussion
4. Zusammenfassung
5. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

Insektizidexprimierende Pflanzen stehen nach den herbizidresistenten transgenen Nutzpflanzen weltweit auf Platz zwei hinsichtlich ihres Anbauumfanges. Ihr Vorteil besteht darin, dass gegenüber dem Einsatz chemischer und biologischer Insektizide insektenwirksame Toxine nicht großflächig ausgebracht werden müssen, sondern dass sie im Gewebe transgener Pflanzen selbst produziert werden. Dadurch erhöht sich die Wirkungsstabilität, ein aufwendiges Überwachen der Anbauflächen und die Notwendigkeit einer terminlichen Übereinstimmung der Anwendung des Insektizides mit dem Lebenszyklus der Schädlinge wird einfacher bzw. kann entfallen. Außerdem werden von Blättern bedeckte oder im Pflanzeninneren auftretende Schädlinge, die bei konventioneller Spritzung nicht erreicht werden, eliminiert (siehe auch MARQUARD und DURKA, 2005). Tabelle 1 zeigt Vorteile und Risiken beim Anbau Insektizidexprimierender Pflanzen auf.

- * Naturwissenschaftliche Universität Wrocław (Breslau) PL

Tabelle 1: Insektizid-Expression (nach HAILS, 2000, modifiziert)

Potentielle Vorteile	Potentielle Risiken
<ul style="list-style-type: none"> • Verringerung des Einsatzes chemischer Insektizide • Verringerung der negativen Effekte auf Nicht-Zielorganismen • Effektivere Schädlingsbekämpfung • Leichtere Handhabung 	<ul style="list-style-type: none"> • Evolution von Insektizidresistenzen, was zu dem Verlust wichtiger alternativer Wirkstoffe und zum verstärkten Einsatz von chemischen Insektiziden führen würde • Negative Effekte auf Nicht-Zielorganismen • Verbreitung der Transgene durch Genfluss

Eine Folge des Anbaus von Bt-Mais könnte sein, dass die Belastung von Böden und Gewässern mit Wirkstoffen von Pflanzenschutzmitteln sinkt und der Wirkungsbereich des Bt-Toxins nur auf den entsprechenden Anbauflächen vorhanden ist. Außerdem können bei konventionellen Insektizidspritzungen mit Bodenmaschinen bzw. bei Flugzeugeinsatz auch nicht gewollte Verdriftungen auftreten. Das Hauptrisiko beim Anbau von Bt-Mais besteht im eventuellen Genfluß, das heißt in der Verbreitung von transgenem Pflanzenmaterial (Pollen, Samen oder andere Pflanzenteile) auf andere Feldfrüchte bzw. Wildpflanzen. Zu beachten ist aber, dass die auf Hochleistung gezüchteten Kulturpflanzensorten meist die Fähigkeit verloren haben, in natürlichen Habitaten zu überleben (RAYBOULD und GRAY, 1994). Vertikaler Genfluß von Bt-Mais auf Wildpflanzenarten wird (DE VRIES et. al. 1992, PASCHER und GOLLMANN 1999) als minimal eingestuft, da in Mitteleuropa keine nahen Verwandten von Mais heimisch sind. Das sächsische GVO-Projekt widmet deshalb dem Auskreuzungsverhalten von Bt-Mais besondere Aufmerksamkeit.

2. Material und Methoden

- *Versuchsanlage:*

Im Versuch werden 3 Varianten (Tabelle 2) als Langparzellen in dreifacher Wiederholung geprüft.

Tabelle 2: Versuchsvarianten

Variante 1	konventionelle Sorte unbehandelt
Variante 2	konventionelle Sorte mit Insektizid
Variante 3	Bt-Mais

Als Saatgut wurde für die Varianten 1 und 2 die konventionelle Sorte „**DKC 3420**“, für die Variante 3 die Bt-Maisorte „**DKC3421YG**“ verwendet. Beide Sorten gehören der mittelfrühen Reifegruppe an (Körnerreifezahl: K 230 bis K 250). Die beiden Sorten sind mit Ausnahme des Bt-Resistenzgens genetisch identisch (isogen).

Die Gestaltung der Versuchsanlage wurde den örtlichen Bedingungen, d. h. der gegebenen Flächengestaltung angepasst. Die Anbautechnologie entsprach der langjährigen betrieblichen Praxis. Die Langparzellen haben entsprechend der Schlagbreite unterschiedliche Längen. Zwischen den Langparzellen liegt jeweils ein Trennstreifen von 1,5 m bzw. 3 m Breite. Der 3-m Streifen ist für den Einsatz der Spritztechnik erforderlich. Die Entfernung von den Parzellen zum Feldrand beträgt 24 m und von der Bt-Mais-Parzelle zum Nachbarschlag über 150 m. Die Flächengrößen der einzelnen Langparzellen sind aufgrund der variierenden Schlaglänge unterschiedlich (von ca. 4200 bis 6400 m²). Die gesamte Restfläche des Schlages ist mit der konventionellen Sorte bestellt.

In die Untersuchung der Auskreuzungsproblematik konnte neben dem Versuchsfeld im Lehr- und Versuchsgut Köllitsch auch das Feld eines Praxisbetriebes einbezogen werden, da auch an diesem Standort in unmittelbarer Nachbarschaft zum Bt-Mais (5 ha) konventioneller Mais (9 ha) stand.

- Probenahme

Die Probenahme der Körnermaisproben im Exaktversuch und im Praxisschlag erfolgte kurz vor der Körnerernte. Der Laborprobenumfang betrug zwischen 5,5 kg und 6,6 kg. In der Tabelle 3 sind die Ernteproben zusammengestellt

Tabelle 3: Ernteproben (Körnermais) zur Untersuchung der Auskreuzungsrate

Abstand zum Bt-Mais (in m) in Richtung Ost bzw: West	Gewicht der Untersuchungsprobe in g	Körnerzahl in der Untersuchungsprobe
Standort LVG Köllitsch		
25 O	3100,5	7749
50 O	3061,8	7988
75 O	3126,4	7737
100 O	3027,5	7745
150 O	2463,4	6665
ca. 180 O ^x	3196,4	8119
25 W	3047,5	7400
50 W	3009,2	7165
75 W	3154,6	7618
100 W	3060,7	7642
150 W	3029,3	7410

Praxisschlag

25 W	2943,1	9314
50 W	3077,0	9436
75 W	3059,5	9633
100 W	3136,1	9931
150 W	3028,5	10068

^x Probeentnahme außerhalb des Versuchsfeldes auf benachbarter Maisfläche

Um Aussagen zur Auskreuzung der gentechnischen Veränderung in Abhängigkeit vom Abstand des Donorfeldes zu erhalten, wurden an beiden Standorten Proben in Abständen von 25 m, 50 m, 75 m, 100 m und 150 m im konventionellen Mais gezogen. Die Probenahme erfolgte parallel zu den Bt-Maisreihen über drei Reihen, wobei die mittlere Reihe den jeweils festgelegten Abstand hatte. Im Abstand von je 1 m wurde ein Kolben im „Zickzack-Muster“ genommen. Alle Kolben eines Abstandes wurden als Sammelprobe vereinigt. Die Länge der beprobten Reihen entsprach der Länge der Bt-Maisreihen.

In Abbildung 1 ist das Probenahmeschema graphisch dargestellt.

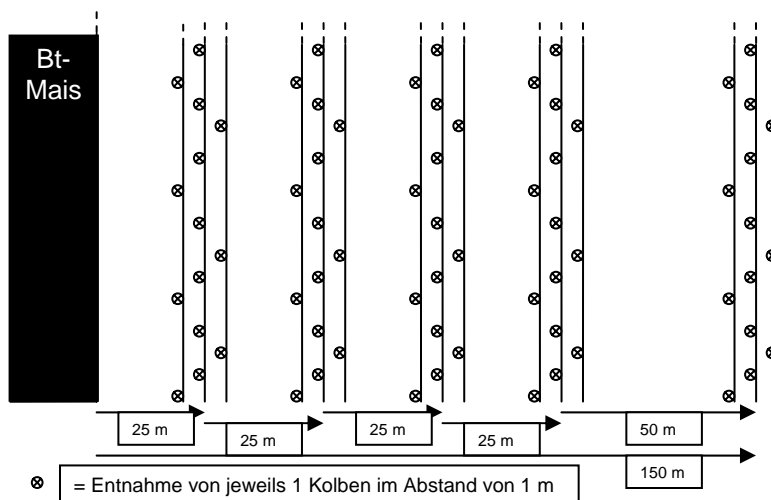


Abbildung 1: Probenahmeschema für die Untersuchung der Auskreuzung

Die Probenahme wurde am Versuchsstandort Köllitsch nach diesem Schema in östlicher und westlicher Richtung durchgeführt (Abbildung 1). In östlicher Richtung konnte zusätzlich eine Probe von einem konventionellen Maisfeld des benachbarten Landwirtschaftsbetriebes in einem Abstand von ca. 180 m gewonnen werden.

Da am untersuchten Praxisschlag lediglich in westlicher Richtung zum Bt-Maisfeld konventioneller Mais angebaut war, konnte hier die Probenahme nur in dieser Richtung erfolgen (Abbildung 2).

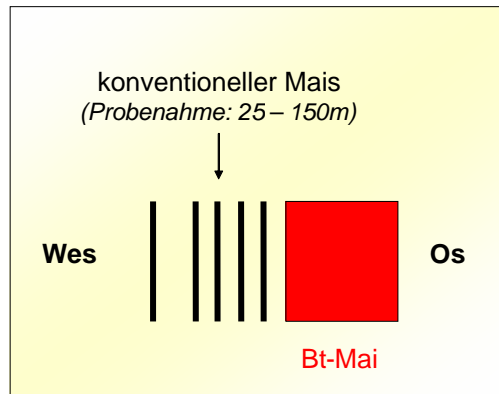


Abbildung 2: Probenahme am Standort des Praxisschlages

- Probenvorbereitung und DNA Extraktion

Aus den Laborproben wurde jeweils eine Untersuchungsprobe mit den in Tabelle 3 stehenden Körnerzahlen hergestellt. Die Anzahl der Körner lag zwischen 6665 und 10168. Anschließend wurden die Untersuchungsproben mit einem Thermomixer der Fa. Vorwerk zerkleinert. Zur Isolierung und Aufreinigung der DNA wurde die CTAB-Methode (in Anlehnung an prEN ISO/FDIS 21571:2004) verwendet. Aus den zerkleinerten Untersuchungsproben wurden 2 x 2g Proben (Doppelansatz) eingewogen, im CTAB-Puffer lysiert und nach dem Arbeitsprotokoll der Fa. Qiagen über DNeasy Säulen aufgereinigt. Die Bestimmung der Menge an extrahierter DNA und ihrer Reinheit erfolgten mittels UV-Spektrometrie. Anhand der ermittelten DNA-Konzentrationen in den Extrakten konnten für die PCR geeignete DNA-Verdünnungen hergestellt werden.

Die Bestimmung der GVO-Einträge in den konventionellen Mais erfolgte an den Ernteproben mit Hilfe der Real Time PCR. Für die Quantifizierung des Anteils der gentechnisch veränderten DNA (MON810) an der Gesamt-Mais-DNA kam die eventspezifische Methode für die Maislinie MON810 (nach prEN ISO 21570:2005) zur Anwendung. Nähere Angaben zur Methode sind in der Tabelle 4 festgehalten.

Tabelle 4: Parameter der MON810-Methode nach EN ISO 21570:2005

Ziel-sequenz	Sequenzbereich	Primer	Sonde	PCR-Produkt
Referenz	hmg-Proteingen	ZM1-F / ZM1-R	ZM1	79 bp
GVO	Integrationsbereich von Genom-DNA und 35S-Promotor aus gentechnischer Veränderung	Mail-F1 / Mail-R1	Mail-S2	92 bp

3. Ergebnisse und Diskussion

In den Abbildungen 3, 4 und 6 sind die GVO-Gehalte der Ernteproben dargestellt. Die angegebenen GVO-Gehalte beruhen auf der Annahme, dass das Referenzgen und das nachgewiesene Transgen im Verhältnis von 1:1 vorliegen.

An keinem Standort konnte in den Ernteproben ein GVO-Gehalt über dem Kennzeichnungsschwellenwert von 0,9 % festgestellt werden. In beiden untersuchten Richtungen am Standort Köllitsch wurden bei einem Abstand von 25 m Werte um 0,5 % gefunden. Die Werte der in Hauptwindrichtung gezogenen Proben, also in östlicher Richtung, lagen bis zu einer Entfernung von 150 m in einem Bereich von 0,1 %. Die Windrichtung und -stärke während der Blütezeit am Standort Köllitsch sind in der Abbildung 5 graphisch festgehalten. Hauptwindrichtungen waren West-Süd-West bzw. West-Nord-West. In der Probe vom Nachbarbetrieb, die in einem Abstand von ca. 180 m in östlicher Richtung entnommen wurde, konnte die MON 810 -DNA-Sequenz nicht mehr nachgewiesen werden (Nachweisgrenze 0,01 %). Dabei ist anzumerken, dass die Blütezeit des Maises auf dem Versuchsfeld gegenüber dem Maisfeld des Nachbarbetriebes ca. 2 Wochen später war. Die Werte der in westlicher Richtung und somit entgegen der Hauptwindrichtung gezogenen Proben lagen bereits bei 50 m nahe der Nachweisgrenze.

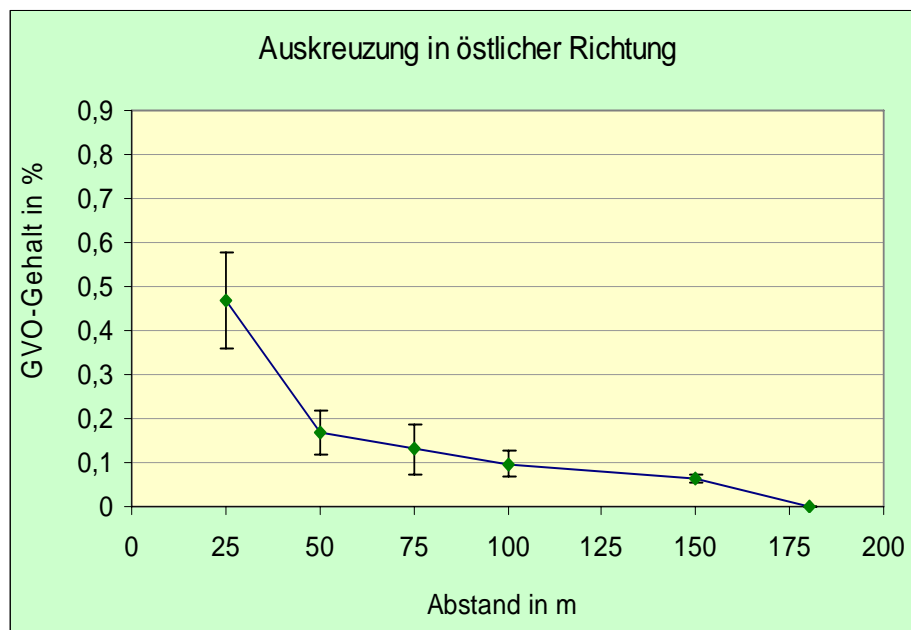


Abbildung 3: Auskreuzung in östlicher Richtung im Exaktversuch

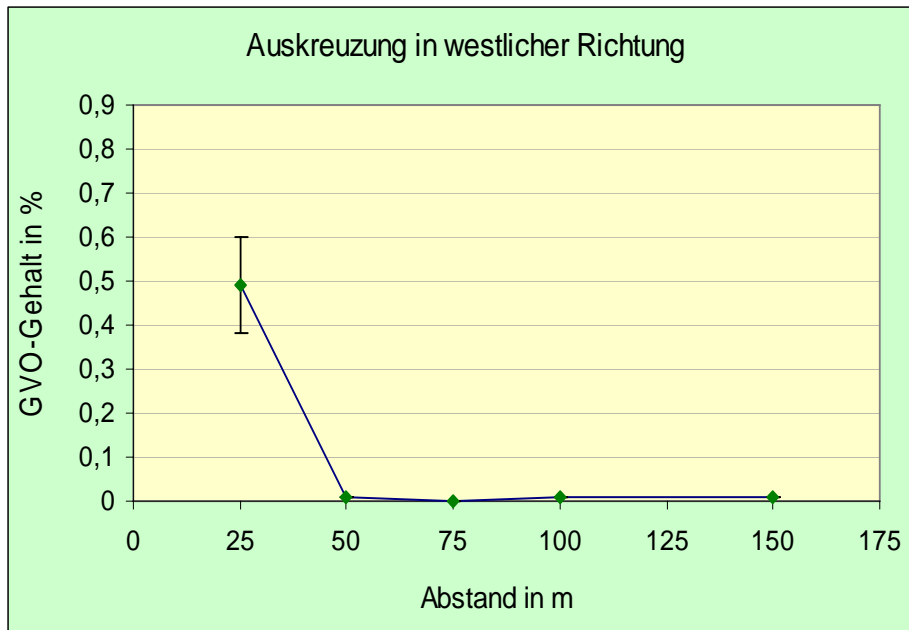


Abbildung 4: Auskreuzung in westlicher Richtung im Exaktversuch

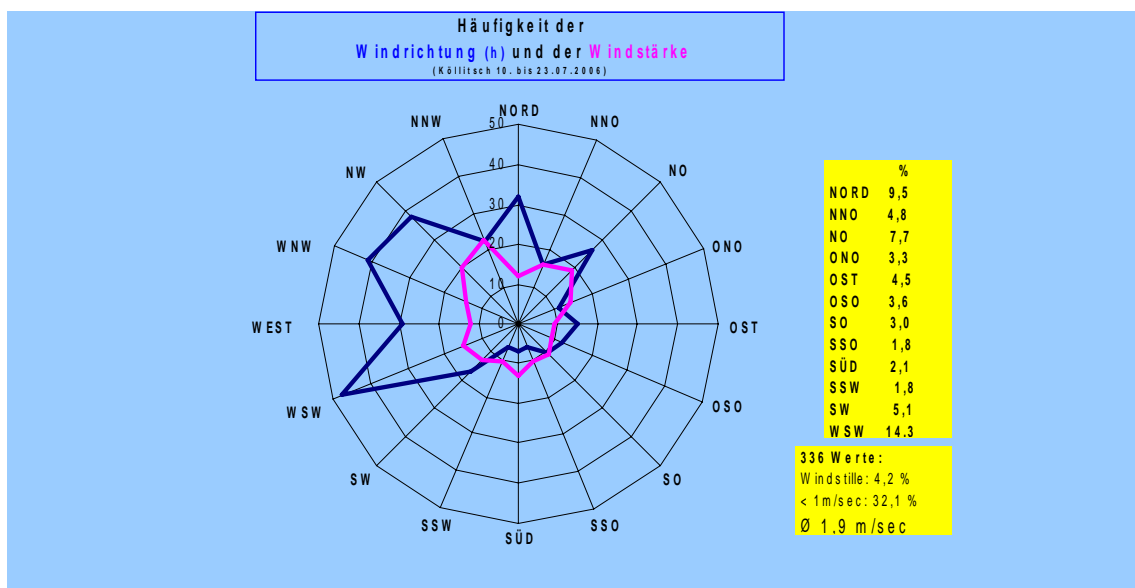


Abbildung 5: Graphische Darstellung der Windrichtung und Windstärke am Standort des Exaktversuches

Im Praxisschlag konnten nur in westlicher Richtung Proben gezogen werden. Der GVO-Gehalt lag bei 25 m um 0,3 %. Ab 75 m wurden nur sehr geringe Gehalte gefunden (< 0,1%). Von diesem Standort liegen keine Angaben zur Hauptwindrichtung vor. Es ist aber davon auszugehen, dass an diesem Standort, der ca. 20 km vom Exaktversuch entfernt ist, ebenfalls Westwinde zur Blütezeit vorherrschen. Somit wurden die Proben mit hoher Wahrscheinlichkeit entgegen der Hauptwindrichtung gezogen.

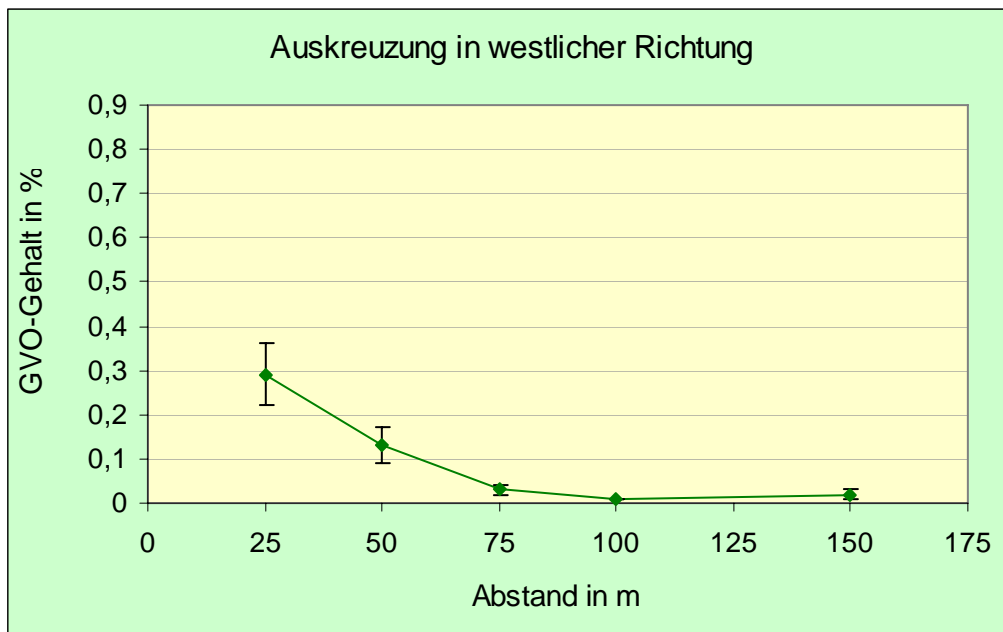


Abbildung 6: Auskreuzung in westlicher Richtung am Standort des Praxisschlages

In der Fachliteratur wird neben der Windrichtung auch dem Verhältnis der Größen von Donor- und Rezipientenfeld ein Einfluss auf den GVO-Eintrag zugeschrieben. Die vorliegenden Ergebnisse beider Standorte stimmen im Wesentlichen mit denen von WEBER und BRINGEZU (2004) überein, wonach die Größe der Bt-Maisflächen keinen signifikanten Einfluss auf den GVO-Eintrag haben.

In der Tabelle 5 sind die Ergebnisse von 8 Standorten des Erprobungsanbaus weiterer Bundesländer 2004 hinsichtlich der GVO-Einträge zusammengestellt. Die Ergebnisse beziehen sich auf die Untersuchung von Körnermais. Es wurden GVO-Einträge von 0,08 % bis 0,69 % in 20-30 m Entfernung zum Bt-Maisfeld gefunden. Die GVO-Einträge in 50-60 m Entfernung lagen zwischen 0,02 % und 0,36 %. Der Vergleich dieser Werte mit den vorliegenden Ergebnissen beider Standorte zeigt, dass die GVO-Einträge etwa in der gleichen Größenordnung liegen, jedoch stark schwanken.

Tabelle 5: Ergebnisse des Erprobungsanbaus Körnermais 2004 [8]

Standort	Bt-Fläche in ha	GVO-Einträge in %	
		20-30 m	50-60 m
1	1,8	0,69	0,36
2	2,9	0,26	0,18
3	18,3	0,32	0,07
4	8,5	0,32	0,11
5	8,5	0,58	---
6	5,0	0,09	0,02
7	5,0	0,28	0,05
8	5,0	0,08	0,05

Der Erprobungsanbau 2005 in Bayern (Bayrische Landesanstalt für Landwirtschaft) ergab im Vergleich zum Jahr 2004 wesentlich höhere Einkreuzungsraten, die durch einen größeren Einfluss der Hauptwindrichtung zu erklären sind. 2005 lagen zum Teil extreme Windverhältnisse vor. Diese Unterschiede belegen, dass es nicht ausreicht, die Ergebnisse eines Jahres bzw. nur weniger Orte als Maßstab für die Festlegung von Abstandsregelungen zu nehmen.

Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass bei Windbestäubung die meisten Pollen im Nahbereich bleiben. HOFMANN et al. (2005) konnten jedoch bis in 2.400 m Entfernung vom Donor in Hauptwindrichtung noch 247.000 Maispollen pro m² feststellen. Das sind ca. 25 Pollen pro cm². Die größte gemessene Distanz von 2.700 m erbrachte noch 3 Pollen pro cm². In der Literatur sind nur wenige Angaben zur Auskreuzung in praxisrelevanten Feldgrößen zu finden bzw. die Vorschläge zu Nutzpflanzenspezifischen Isolationsabständen liegen sehr hoch. Diese sind fast immer höher angegeben als die laut Saatgutverordnung (2006) vorgeschriebenen Isolationsabstände für konventionelle Vermehrungskulturen frei abblühender Mais- bzw. Hybridmaissorten von 200 m. Damit wurde bisher in der Praxis in der Regel eine ausreichende Sortenreinheit von 99,9 % gewährleistet. Unsere zunächst einjährigen Untersuchungen zeigen, dass bereits nach 150 m Distanz die Auskreuzungsrate bis zur Nachweisgrenze (0,01 %) absinkt.

Der im Entwurf einer Verordnung über die gute fachliche Praxis bei der Erzeugung gentechnisch veränderter Pflanzen (Gentechnik-Pflanzenerzeugungsverordnung – GenTPflEV) vorgeschlagene Mindestabstand zu Öko- bzw. zu Saatmais von 300 m ist daher eine weit über die nicht zuletzt durch unsere Versuchsergebnisse ermittelten notwendigen Sicherheitsabstände hinausgehende Regelung.

4. Zusammenfassung

2006 wurde in einem Exaktversuch mit dreifacher Wiederholung und in einem Praxisschlag die Auskreuzungsrate ermittelt und mit bisher in der Literatur angegebenen Ergebnissen verglichen. Die GVO-Einträge im konventionellen Mais lagen bereits bei einem Abstand von 25 m stets unter dem Kennzeichnungsschwellenwert von 0,9 %. Ab 150 m Abstand von Donor geht die Auskreuzungsrate gegen Null. Der Einfluss der Windrichtung auf die Auskreuzungsrate ist zu erkennen. Eine Korrelation zwischen der Donor- und Rezipientenflächengröße hinsichtlich der Auskreuzungsrate konnte nicht nachgewiesen werden. Die Versuche werden weitergeführt.

5. Literaturverzeichnis

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft:

Bericht zum Erprobungsanbau mit gentechnisch verändertem Mais in Bayern 2005

Schriftenreihe 18-2006, S. 16-33

BRINGEZU, TH. und WEBER, W.E.: Erprobungsanbau 2004-GVO Einträge von Bt-Mais in benachbarte Felder mit konventionellem Mais unter Praxisbedingungen. 2005 Vorträge für Pflanzenzüchtung, 67. 239-249

CTAB-Methode (in Anlehnung an die Europäische Norm prEN ISO/FDIS 21571:2004, Lebensmittel - Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten - Nukleinsäureextraktion)

DE VRIES, F. R., VAN DER MEIJDEN, R. und W. A. BRANDENBURG: Botanical files – A Study of the real chances for spontaneous gene flow from cultivated plants to the wild flora of the Netherlands. *Gorteria*, Suppl.: 1992, 1, 1-100

Eventspezifische Methode (Europäische Norm prEN ISO 21570:2005, Lebensmittel -Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten – Quantitative auf Nukleinsäure basierende Verfahren)

HAILS, R. S.: Genetically modified plants- The debate continues. *Trends in Ecology and Evolution*: 2000, 15, 14-18

HOFMANN, F.; SCHLECHTRIEMEN, U.; WOSNIOK, W. und M. FOTH: GVO-Pollenmonitoring – Technische und biologische Pollenakkumulatoren und PCR-Screening für ein Monitoring von gentechnisch veränderten Organismen.

BfN-Skripte.2005.139, <http://www-bundesamt.de/09/skript139.pdf>

MARQUARD, ELISABETH und W. DURKA: Auswirkungen des Anbaus gentechnisch veränderter Pflanzen auf Umwelt und Gesundheit: Potentielle Schäden und Monitoring. Bericht für das Sächsische Staatsministerium für Umwelt und Landwirtschaft. 2005, 187 S., unveröffentlicht

PASCHER, K. und G. GOLLMANN: Ecological risk assessment of transgenic plant releases: An Austrian perspective. *Biodiversity and Conservation*: 1999, 8, 1139-1158

RAYBOULD, A. F. und A. J. GRAY: Will hybrides of genetically modified crops invade natural communities? *Trends in Ecology and Evolution*. 1994, 9, 85-89

Saatgutverordnung: in *Sorten- und Saatgutrecht*, 11. Auflage.2006.Agrimedia, S. 126-217

SCHIEFER, C; SCHUBERT, R.; KÜHNE, ANGELA; WESTPHAL, K.; STEINHÖFEL, O. und ANETTE
SCHAERFF: Untersuchungen zu Konsequenzen des Anbaus von GVO in Sachsen. Zwischenbericht
2006, 55 S. unveröffentlicht