

Bislang keine Vorkommen von herbizid-tolerantem Raps in der Umgebung ehemaliger Freisetzungsfächen - Ergebnisse einer Pilotstudie zum GVO-Screening von Ruderalraps

Jürgen Franzaring, Ingo Holz & Andreas Fangmeier

Synopsis

Ruderal oilseed rape (OSR) plants were sampled in the vicinity of former release sites in Southern Germany, where transgenic herbicide resistant OSR had been planted in the late 1990s. Because OSR has the potential to survive for several years in the soil seed bank re-establishment and escape of transgenic cultivars as well as the outbreeding of these traits into ruderal populations of wild crucifers have been recognised as serious problems. In contaminated fields it may furthermore be difficult to return to non GM farming practices. While in other countries routine sampling has been established to identify transgenic events in ruderal OSR, there is a lack of data in Germany, although herbicide resistant OSR had been released in many regions and post-release monitoring programmes were compulsive thereafter. In a pilot study we collected 24 ruderal OSR plants and screened these plants with rapid lateral flow tests to see whether they contained the relevant traits, i.e. the proteins conferring resistance to the herbicides glyphosate and glufosinate. None of the tested individuals was transgenic suggesting that the escape of HR-OSR has not occurred to date. However, the number of tested plants was low and not representative for other regions. At the same time the investigation rested on only one season. Due to the long persistence of seeds it may well be that in the future transgenic plants may be found in ruderal populations of OSR. We plan to follow up these investigations and to include further release sites and susceptible areas, e.g. harbours, where imported transgenic OSR is being processed.

Keywords: transgenic oilseed rape, former release sites, rapid screening tests.

Schlüsselwörter: transgener Raps, Freisetzungsfächen, GVO-Schnelltests.

1. Hintergrund der Untersuchung

Studien aus Japan und Kanada haben gezeigt, dass sich gentechnisch veränderter herbizidresistenter Raps (GVO HR Raps) in jüngster Zeit immer stärker in Ruderalrapspopulationen in Hafen- und Straßennähe etabliert (AONO et al. 2006; YOSHIMURA et al. 2006; KAWATA et al. 2009; KNISPEL et al. 2008). Während dies in Kanada, einem Land, in dem mittlerweile über 80 % des angebauten Rapses transgen ist zu erwarten war, ist es in Japan überraschend, da dort insgesamt kaum Rapsanbau stattfindet, insgesamt wenig Rapssaat genutzt wird und transgene Sorten nicht importiert werden dürfen. Zudem wurde in Kanada erstmals unter Freilandbedingungen nachgewiesen, dass das Herbizidtoleranz-trait (Glyphosatresistenz) auf die verwandte Wildart *Brassica rapa* übertragen werden kann und die Nachkommen dieser Hybride über mehrere Jahre stabile Populationen bilden können (WARWICK et al. 2008).

In Deutschland haben bislang keine systematischen Untersuchungen stattgefunden, in denen die Ausbreitung von transgenem herbizidresistenten Ruderalraps überprüft wurde. Dabei ist davon auszugehen, dass auch hier ein gewisses Ausbreitungsrisiko für HR-Raps besteht. Zum einen steigen die

Rapsimporte aus Kanada in den letzten Jahren wieder an, nachdem sie bis zum Jahre 2000 (Moratorium der EU zum vorläufigen Genehmigungsstopp von GVP) fast zum Erliegen gekommen waren. Zum anderen kann es bei Importsaat, welche zur Herstellung von Ölen aber nicht zur Gewinnung von Nahrungsmitteln benutzt werden darf, zu Transportausfällen kommen, so dass sich transgene Saat z. B. in der Nähe von Ölmühlen ansamen kann. Die Verbreitung von Ruderalraps über Transportverluste entlang von Straßen wurde durch von der LIPPE & KOWARIK (2007) untersucht. Die Kontrolle der Ausbreitung von Ruderalraps entlang der Transportrouten wird nämlich als wichtige Containment-Strategie angesehen.

Neben möglicherweise GV-kontaminierter, nicht zum Anbau und Verzehr bestimmter Rapssaat, ist aber auch die Aussaat von GV-Raps haltigem Saatgut eine potentielle Route, auf der transgener Raps sich ausbreiten kann. In der Vergangenheit gelangte in Deutschland mehrfach Rapssaatgut in den Handel (z. B. die Sorte Taurus), welches mit transgenen HR-Rapssamen kontaminiert war. Wie viele solcher verunreinigter Chargen in den letzten Jahren tatsächlich zum Anbau gelangten, bleibt jedoch unklar, zumal Saatgut immer nur stichprobenhaft kontrolliert werden kann. Zudem wird gegenwärtig auf EU-Ebene noch über die erlaubten GV-Anteile im Saatgut beraten, wobei Schwellenwerte zwischen 0,3 und 0,7 Prozent diskutiert werden.

Schließlich müssen als potentielle Kontaminierungspfade aber auch die Freisetzungsstudien der 1990er Jahre genannt werden, in denen vor allem in Nord- und Ostdeutschland HR-Raps ausgesät und im Anbau erprobt wurde. Es ist dabei oft nicht genügend dokumentiert, welche langfristigen Maßnahmen auf den insgesamt über 180 Äckern getroffen wurden, um Ernteverluste und die nachfolgende Ausbreitung von HR-Raps zu verhindern bzw. zu überwachen (ARNDT & POHL 2005). Insgesamt wurde im Verlauf der 90er Jahre die Nachkontrolldauer bei Rapsfreisetzungen verkürzt und gegenwärtig ist nicht bekannt, wo und in welchem Ausmaß sich herbizidresistenter Raps in der Folge von Freisetzungsstudien halten konnte.

Während keine Ergebnisse langjähriger Beobachtungen zum möglichen Durchwuchs transgenen Rapses aus Deutschland vorliegen, zeigt eine aktuelle Studie aus Frankreich, dass auch noch Jahre nach entsprechenden Freisetzungen in den Nachfolgekulturen von konventionellem, nicht transgenem Raps hohe Anteile von HR-Rapssamen im Erntegut (maximal 18 %) auftreten können (MESSÉAN et al. 2007). Auch in Dänemark wurde die lange Überdauerung von Rapssamen nach Freisetzungen vor kurzem nachgewiesen (D'HERTEFELDT et al. 2008). Offensichtlich hatten die ausgefallenen Rapssamen der freigesetzten Sorten eine hohe Dormanz und Überlebensrate in der Samenbank. Die Ergebnisse der Studie belegen weiter, dass 6 von 18 getesteten konventionellen Rapsernten nach EU-Recht nicht in den Handel hätten gelangen dürfen, da sie mehr als 0,9 % GVO-Anteile enthielten. Die zitierte Studie weist zudem darauf hin, dass eine Rücküberführung nach dem Anbau von GV-Kulturen zu

konventionellen Sorten mitunter nur nach vielen Jahren möglich sein kann. Das Interesse der die Freisetzung genehmigenden Behörden an der möglicherweise erfolgten lokalen Überdauerung bzw. Etablierung von transgenem Raps ist gering, da unklar ist, ob und wie bei positiven Funden reagiert werden müsste. Allerdings gab es auch in Deutschland erste Hinweise darauf, dass die mehrjährige Überdauerung von transgenen Rapssamen in der Samenbank ehemaliger Freisetzungstandorte nicht zu vernachlässigen ist (ALBRECHT et al. 2005).

2. Zielsetzung

Im Jahre 2007 wurden im Rahmen eines durch die Landesanstalt für Umwelt Baden-Württemberg (LUBW) geförderten Pilotvorhabens verschiedene Ruderalrapspopulationen in Gewächshausversuchen auf das Vorliegen einer Herbizidtoleranz gescreent. Es wurden exemplarisch von 10 Ruderalrapspopulationen im Großraum Stuttgart Samen gesammelt, die danach in Gewächshausversuchen im Institut für Landschafts- und Pflanzenökologie der Universität Hohenheim angezogen und mit den Komplementärherbiziden Glufosinat (Basta® bzw. Liberty® von Bayer) und Glyphosat (Roundup® von Monsanto) behandelt wurden. Obwohl es große Unterschiede bei der Überlebensdauer der Pflanzen gab, starben alle angezogenen Keimlinge infolge der Herbizidapplikation (FRANZARING et al. 2007, 2008). Hieraus wurde geschlossen, dass keine der überprüften Ruderalrapspopulationen transgene, herbizidresistente Pflanzen enthielt. Diese Ergebnisse beruhen aber auf einer nur sehr kleinen, nicht raumrepräsentativen Stichprobe und bedeuten keinesfalls, dass HR-Raps im Südwesten Deutschlands bislang noch nicht Fuß fassen konnte.

Die Hypothese, dass sich in Deutschland bislang keine herbizidresistenten Rapspopulationen ausgebreitet haben, wurde daher in einer weiteren Untersuchung überprüft, in der Ruderalraps in der Umgebung ehemaliger Freisetzungsfelder beprobt wurde. Dabei wurde nicht das oben beschriebene Gewächshaus-Herbizidscreening mit am Ende der Vegetationsperiode gesammelten Samen eingesetzt, sondern es wurden GVO-Schnelltests an Blattproben von Ruderalraps angewandt. Die Überprüfung von Blatt- und Samenmaterial mittels GVO-Schnelltests sollte in der Praxis erprobt werden und es sollten Empfehlungen abgeleitet werden, wie ggf. der zukünftige Aufbau eines Routinemonitorings von möglicherweise transgenen Rapsvorkommen (Ruderal- und Durchwuchsraps) in der Landschaft zu konzipieren ist.

3. Material und Methoden

In der Umgebung ehemaliger HR-Raps-Freisetzungstandorte (Liberty Link Raps LL und Roundup Ready Raps, RuR) in NE-Baden-Württemberg und NW-Bayern wurden zur Rapsblüte am 1. Mai 2008 georeferenzierte Blattproben von Ruderal- und Durchwuchsraps gesammelt (Abb. 1), in beschriftete Plastiktüten überführt und auf Trockeneis gelagert ins Labor des Instituts für Landschafts- und Pflanzenökologie der Universität Hohenheim überführt. Bis zur Durchführung der Schnelltests wurden die Blattproben in einem Gefrierschrank bei -86 °C gelagert. Die Beprobung orientierte sich an den in LAG (2002, 2003) beschriebenen Methoden, während die eingesetzte GVO-Schnelltest-Methode auf der Untersuchung von YOSHIMURA et al. (2006) und den Angaben von SDI (2007) und GeneScan (2007) basierte. Die in den USA entwickelte Labormethode erbringt den Nachweis der durch die Herbizidresistenz vermittelnden Gene exprimierten Proteine (CP4 EPSPS bei Roundup Ready und PAT bei Liberty Link) mittels spezifischer Antikörper und einer Farbreaktion bei positiven Befunden (Abb. 2). Es ist nicht bekannt, ob es in Deutschland bereits Anwender dieser Teststreifenmethode gibt, jedoch wird sich der Unterausschuss Methodenentwicklung des Länderausschusses Gentechnik (LAG) in Zukunft mit solchen einfachen, nicht auf PCR basierenden Nachweismethoden beschäftigen.

4. Ergebnisse

Insgesamt wurde in der Nähe der untersuchten Flächen nur sehr wenig Durchwuchs- und Ruderalraps festgestellt. In den beiden Untersuchungsgebieten wird offensichtlich ein effektives Unkrautmanagement betrieben, das vermutlich die kurz- und langfristige Etablierung von Raps innerhalb und außerhalb der Ackerflächen vermindert. Dies bedeutet aber keinesfalls, dass sich nicht lokal doch noch (transgener) Ausfallraps in der Samenbank befindet und in Zukunft aufgehen wird.

Es konnten dennoch einige Getreideäcker identifiziert werden, auf denen Durchwuchsraps vor allem in Fahrrinnen und am Bestandesrand aufgelaufen war (s. Abb. 1). Von diesen wurden einige Proben entnommen. Zudem wurden mehrere Ruderalrapsproben in den beiden Untersuchungsgebieten gesammelt. Insgesamt wurden in dieser Pilotstudie Blattproben von 24 Rapspflanzen gezogen und mittels LL- (Liberty Link) und RuR (Roundup Ready) GVO-Schnelltests (Durchflussmethode) überprüft. In dem Verfahren wird eine kleine Menge eines zu untersuchenden Rapsblatts mit 0.5 mL Wasser in einem Probenröhrchen zerkleinert und ein Teststreifen in das Probengefäß zum Nachweis der HR-vermittelnden Proteine eingeführt. Der Test ist bereits nach 10 Minuten beendet, wobei das Auftreten von zwei roten Banden einen Positivfund darstellt.



Abbildung 1. Bilder von am 1. Mai 2008 in der Nähe ehemaliger HR-Raps Freisetzungstandorte aufgefundenem Durchwuchsraps (links, Mitte) und Ruderalraps am Wegesrand (rechts).

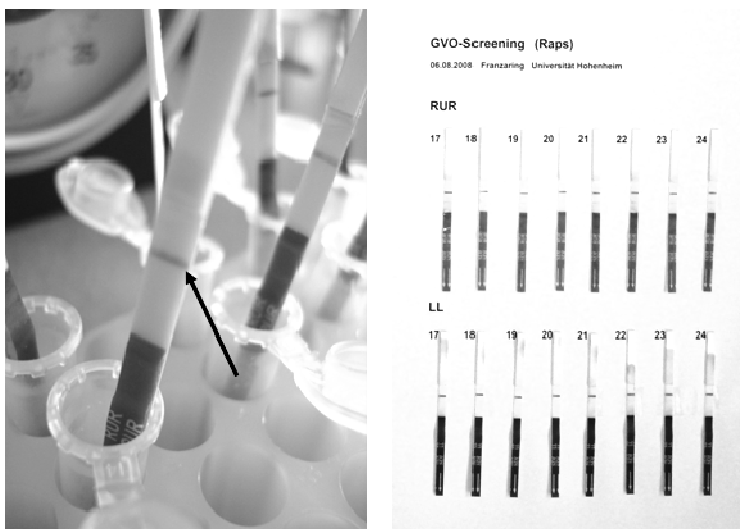


Abbildung 2. Übersicht auf das GVO-Schnelltestverfahren (links) und mehrere der im Versuch benutzten Teststreifen (rechts). Pfeil in Bild links deutet auf die rote Linie, die beim Ablauf des Durchflusstests (lateral flow test) entsteht. Eine zweite rote Linie am selben Teststreifen bedeutet, dass es sich bei der untersuchten Probe um ein herbizidresistentes Rapsindividuum handelt. Sämtliche getesteten Rapsproben erwiesen sich als negativ, d. h. die Herbizidresistenz vermittelnden Proteine konnten nicht nachgewiesen werden.

Fazit

Der eingesetzte Schnelltest erwies sich als gut praktikabel und es konnten mit relativ geringem Zeitaufwand größere Blattprobenmengen einem screening unterzogen werden. Bei allen Proben entstand im Test eine rote Kontrolllinie, die laut Herstellerangaben das ordnungsgemäße Funktionieren des Schnelltests anzeigt. Keine der in dieser Pilotstudie untersuchten Rapsproben erzeugte

jedoch im Durchflusstest eine proteinspezifische Farbreaktion, woraus zu schließen ist, dass keine der untersuchten Pflanzen eine gentechnisch erzeugte Basta®- oder Roundup®-Herbizidresistenz aufwies. Dies ist zunächst als Indiz dafür zu werten, dass sich herbizidresistenter Raps in der Umgebung der untersuchten ehemaligen Freisetzungsorte in Baden-Württemberg und NW-Bayern noch nicht dauerhaft etablieren konnte. Bei den exemplarisch untersuchten Standorten handelte es sich allerdings um relativ kleine Flächen, auf denen nur in einem Jahr transgener Raps freigesetzt wurde. Es gibt aber Regionen vor allem im Nordosten Deutschlands, in denen Freisetzungen auf mehreren Flächen und über mehrere Jahre erfolgten, wodurch das Risiko der Ausbreitung von HR-Raps deutlich höher als in Baden-Württemberg sein dürfte.

Es sollten daher in weiteren Untersuchungen zusätzliche ehemalige Freisetzungsorte beprobt werden, um zu überprüfen, ob sich auch in Gebieten, in denen in der Vergangenheit mehrere Freisetzungsversuche mit HR-Raps durchgeführt wurden, kein transgener Raps etabliert hat. Diese Information erscheint uns wichtig bei der Einschätzung möglicher Risiken, die aus Freisetzungs- oder Anbaugenehmigungen transgener Rapsarten entstehen können. Andererseits können solche wissenschaftlichen Untersuchungen auch bei der neu zu gestaltenden Zulassungspraxis herangezogen werden, da Entscheidungen über Zulassungen in der EU in Zukunft stärker auf wissenschaftlicher Basis anstatt auf politischer Ebene erfolgen sollten.

Literatur

- ALBRECHT, H., ROLLER, A., BEISMANN, H., PFADENHAUER, J. (2005): Persistenz von transgenen Rapsamen in Ackerböden. In: LfU Bayern (Hrsg.): Monitoring der Umweltwirkungen von gentechnisch veränderten Organismen: 20-26.
http://www.biosicherheit.de/pdf/projekte/bayern-projekte_seminar.pdf.
- AONO, M., WAKIYAMA, S., NAGATSU, M., NAKAJIMA, N., TAMAOKI, M., KUBO, A., SAJI, H. (2006): Detection of feral transgenic oilseed rape with multiple-herbicide resistance in Japan. *Environmental Biosafety Research* 5: 77-87.
- ARNDT, N., POHL, M. (2005): Analyse der bei Freisetzungen gentechnisch veränderter Pflanzen durchgeführten Sicherheitsmaßnahmen: Erhebungszeitraum 1998-2004. BfN Skripten 147, 134 S.
- D'HERTEFELDT, T., JØRGENSEN, R. B., PETERSSON, L. B. (2008): Long-term persistence of GM oilseed rape in the seedbank. *Biology Letters*. doi:10.1098/rsbl.2008.0123.
- FRANZARING, J., FANGMEIER, A. (2007): Pilotstudie zum Screening von Ruderalraps und verschiedenen mit Raps hybridisierbaren Brassicaceenarten auf Herbizidtoleranz. LUBW Werkvertrags Nr. 4500026132, Abschlussbericht, 18 S.
- FRANZARING, J., HOLZ, I., FANGMEIER, A., ZIPPERLE, J. (2008): Monitoring the absence of glyphosate and glufosinate resistance traits in feral oilseed rape

- and wild crucifer populations. In: Breckling, B., Reuter, H., Verhoeven, R. (eds.): Implications of GM crop cultivation at large spatial scales. Theorie in der Ökologie, Band 14 – Peter Lang, Internationaler Verlag der Wissenschaften, Frankfurt: 90-92.
- GENESCAN (2007): GVO Schnelltest für Raps. Für den schnellen und unkomplizierten GVO-Test für Raps - TraitChek™, 1 S.
- KAWATA, M., MURAKAMI, K., ISHIKAWA, T. (2009): Dispersal and persistence of genetically modified oilseed rape around Japanese harbors. *Environmental Science and Pollution Research* 16: 120-126.
- KNIPSEL, A. L., MCLACHLAN, S. M., VAN ACKER, R. C., FRIESEN, L. F. (2008): Gene flow and multiple herbicide resistance in escaped canola populations. *Weed Science* 56: 72-80.
- LAG (2002): Probennahme von Pflanzenmaterial. Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung des LAG, März 2002. Methodensammlung des Länderausschusses Gentechnik (LAG), 6 S.
- LAG (2003): Konzept zur Untersuchung von Saatgut auf Anteile gentechnisch veränderter Pflanzen. Unterausschuss "Methodenentwicklung" des Länderausschusses Gentechnik (LAG), 24 S., Stand: Oktober 2003.
- MESSÉAN, A., SAUSSE, C., GASQUEZ, J., DARMENCY, H. (2007): Occurrence of genetically modified oilseed rape seeds in the harvest of subsequent conventional oilseed rape over time. *European Journal of Agronomy* 27: 115-122.
- SDI (2007): Trait 4RUR Lateral Flow Test User Guide. Trait RUR Leaf and Seed Test Kit (100-Test), Part Number 7000017, Strategic Diagnostics Inc., 3 p.
- VON DER LIPPE, M., KOWARIK, I. (2007): Crop seed spillage along roads: a factor of uncertainty in the containment of GMO. *Ecography* 30: 483-490.
- WARWICK, S. I., LÉGÈRE, A., SIMARD, M.-J., JAMES, T. (2008): Do escaped transgenes persist in nature? The case of an herbicide resistance transgene in a weedy *Brassica rapa* population. *Molecular Ecology* 17: 1387-1395.
- YOSHIMURA, Y., BECKIE, H. J., MATSUO, K. (2006): Transgenic oilseed rape along transportation routes and port of Vancouver in western Canada. *Environmental Biosafety Research* 5: 67-75.

Adresse der Autoren:

Universität Hohenheim
Institut für Landschafts- und Pflanzenökologie -320 A-
Ökologiezentrum 2, August-von-Hartmann-Str. 3
70599 Stuttgart
Tel. +49 (0)711 459-22329, Fax +49 (0)711 459-23044
E-mail: franzari@uni-hohenheim.de