

ANNA LINKIEWICZ¹
MAGDALENA ŻURAWSKA-ZAJFERT¹
ZBIGNIEW TADEUSZ DĄBROWSKI²
SŁAWOMIR SOWA¹

¹Laboratorium Kontroli GMO, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie

²Katedra Entomologii Stosowanej, Wydział Ogrodniczy Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego

Ekspresja białka Cry1Ab w odmianach kukurydzy typu MON810 w Polsce — wpływ na organizmy niedocelowe: mszycę zbożową (*Sitobion avenae* F.) i mszycę czeremchowo-zbożową (*Rhopalosiphum padi* L.)*

Cry1Ab expression in MON810 maize varieties in Poland — impact on non-target organisms the grain aphid (*Sitobion avenae* F.) and the bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi* L.)

Kukurydza (*Zea mays* L.) MON810 Bt z białkiem Cry1Ab stanowi najbardziej efektywną ochronę przeciwko omacnicy prosowiance (*Ostrinia nubilalis* Hbn.). Jest ona uprawiana w Polsce od 2007 roku. Odmiany typu MON810 produkują 92 kDa N-terminalny fragment białka Cry1Ab z *Bacillus thuringiensis* (Bt) ssp. *kurstaki* szczep HD1, warunkujący odporność na owady z rzędu Motyle. Jednym z istotnych parametrów określających potencjał do rozwoju odporności populacji szkodników kukurydzy oraz wpływu upraw GM na owady niedocelowe jest poziom ekspresji białka w częściach roślin z którymi wchodzi w kontakt. W odmianach typu MON810 ekspresja białka Cry1Ab powinna mieć charakter konstytutywny ze względu na obecność promotora CaMV35S. Dane wskazują jednak, że zawartość białka w organach roślinnych jest różna. Ilościowy test immunoabsorpcji enzymatycznej (ELISA) został użyty do oznaczenia poziomu białka Cry1Ab w odmianach DKC60-16Bt i DKC3421YG uprawianych w warunkach zamkniętego użycia i w polu. Przedmiotem pracy było określenie poziomu białka Cry1Ab w dwu odmianach kukurydzy z cechą MON810 w Polsce i przeanalizowanie jego akumulacji w wybranych organizmach niedocelowych.

Słowa kluczowe: ekspresja Cry1Ab, MON810, mszyce, ocena ryzyka, organizmy niedocelowe

The transgenic MON810 maize (*Zea mays* L.), expressing Cry1Ab protein and known to have the most effective protection against European corn borer, has been cultivated in Poland since 2007. MON810 cultivars express 92 kDa N-terminal fragment of Cry1Ab protein from *Bacillus*

*Praca została wykonana przy udziale środków z grantu MNiSW Nr. 1511/P01/2006/31

thuringiensis (Bt) ssp. *kurstaki* strain HD1, assuring protection against *Lepidoptera* insects. Possible unintended effects of the widespread planting of Bt crops (insect resistance, impact on non-target organisms) are related to the expression level of Bt protein. Non-target herbivores and beneficial insects may be affected by direct feeding on the transgenic crop or by interactions in tri-trophic systems. In MON810 plants the Bt protein expression should have constitutive character due to the presence of 35S promoter. However, considerable variations in the expression level of Cry1Ab protein have been reported. A quantitative Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used to quantify the levels of Cry1Ab protein in DKC60-16Bt and DKC3421YG cultivars grown under greenhouse and field conditions. The tissue-specific expression and cultivation-dependent abundance of Cry1Ab protein were determined. The accumulation of Bt protein in selected non-target organisms is discussed.

Key words: aphids, Cry1Ab expression, MON810, non-target species, risk assessment

WSTĘP

Wraz ze zwiększającym się arealem roślin wykazujących w tkankach ekspresję białka Bt o działaniu insektycydu (grupa białek Cry), coraz częściej dyskutowany jest ich wpływ na ekosystemy, a szczególnie organizmy niedocelowe, które nie są obiektem zwalczania. (Dutton, 2004). Powierzchnia upraw kukurydzy w Polsce zmienia się rokrocznie i wynosiła w 2008 roku około 730000 ha przy czym około 3000 przeznaczonych było na kukurydzę z cechą MON810 (dane wg Polskiego Związku Producentów Kukurydzy). Równocześnie gwałtownie rosną straty powodowane przez szkodniki, w tym omacnicę prosowiankę, która uszkadza nawet do 40% roślin kukurydzy na polach Polski południowej (Lisowicz, 2003). Ze względu na coraz większy problem, jakim staje się żerowanie omacnicy na plantacjach kukurydzy w Polsce, jak też na fakt rozprzestrzeniania się w Polsce innego poważnego szkodnika kukurydzy — zachodniej stonki kukurydzianej (*Diabrotica virgifera* Le Conte) (Lipa, 2004) możemy spodziewać się zwiększonego zainteresowania wprowadzeniem cechy Bt do linii dobrze plonujących w warunkach naszego klimatu. Do tej pory ponad 55 odmian kukurydzy linii z cechą MON810 zostało wpisanych do Wspólnego Katalogu Odmian Gatunków Roślin Rolniczych i może być uprawiane na terenie Unii Europejskiej. Rysuje się coraz większa potrzeba stworzenia narzędzi umożliwiających właściwą ocenę ryzyka środowiskowego oraz metodyki, która pozwoli na właściwy monitoring środowiska przyrodniczego w Polsce (case specific monitoring) z uwzględnieniem zależności troficznych występujących w naszych ekosystemach. Jednocześnie prowadzone są prace nad ujednoczeniem metodyki badań nad niezamierzonym wpływem genetycznie zmodyfikowanych roślin z genem *cry1Ab* na agrocenozy. Wykorzystanie organizmów genetycznie zmodyfikowanych (GMO) w polskim rolnictwie, w szczególności roślin jest przedmiotem wielu dyskusji co powoduje, że zastosowanie na szeroką skalę GMO w Polsce w bliskiej przyszłości może być utrudnione.

W roku 1996 w USA zarejestrowano pierwsze odmiany zawierające modyfikacje MON810. Od tego czasu kukurydza MON810 uprawiana jest na całym świecie w tym w Unii Europejskiej, gdzie pierwsza rejestracja w celu uwolnienia do środowiska miała miejsce w 1998 roku. Uprawy kukurydzy MON810 na szeroką skalę wywołują pytania odnośnie możliwości pojawienia się odporności w populacjach szkodników (Alstad

i Andow, 1995; Gould, 1998). Również możliwy wpływ kukurydzy MON810 na organizmy niedocelowe takie jak pasożytniki, drapieżcy czy wpływ na ekosystemy glebowe stanowi temat wielu prowadzonych na świecie programów badawczych (Hellmich i in., 2001; Dutton i in., 2003; Romeis i in., 2004; Romeis i in., 2008; Sanvido i in., 2006).

Jednym z istotnych parametrów wymaganych do oceny możliwości rozwoju odporności w populacji owadów docelowych, takich jak omacnica prosowianka, jak też ewentualnego wpływu upraw kukurydzy MON810 na inne ogniwa łańcuchów troficznych związanych z tymi uprawami, jest poziom białka Cry1Ab w organach roślin uprawnych. W odmianach typu MON810 ekspresja białka Cry1Ab powinna mieć charakter konstytutywny, ze względu na obecność genu *cry1Ab* pod kontrolą promotora wirusa mozaiki kalafiora CaMV35S (Maessen, 1997), z enhancerem (E35S). Niewiele jest danych literaturowych mówiących o poziomach ekspresji Cry1Ab w kukurydzy MON810 w zależności od stadium rozwojowego rośliny, tkanki lub organu, warunków uprawy czy warunków klimatycznych (Clark i in., 2005; Nguyen i Jehle, 2008). Zebrane do tej pory dane wskazują, że zawartość białka Cry1Ab w organach kukurydzy może się istotnie różnić między doświadczeniami (laboratoryjnymi i polowymi), zależeć od wieku rośliny i etapu rozwoju rośliny, a aktywność względem owadów docelowych zależeć może od czynników środowiska jak warunki klimatyczne, glebowe (struktura gleby i jej pH), poziomu nawożenia, itp. (Fearing i in., 1997; Bruns i Abel, 2007; Hilbeck i Schmidt, 2006). Jednocześnie dane literaturowe wskazują na preferencyjną lokalizację białka Cry1Ab w kukurydzy MON810 w komórkach mezofilowych (Dutton, 2004 b). Celem pracy było określenie tkankowo-specyficznego poziomu ekspresji białka Cry1Ab w dwu odmianach genetycznie zmodyfikowanej kukurydzy z cechą MON810 w warunkach uprawy w Polsce, oraz przedstawienie tych danych w kontekście dotychczasowych informacji na temat ekspresji Cry1Ab w kukurydzy. Równocześnie praca miała na celu określenie ekspozycji na białko z kukurydzy MON810 wybranych organizmów niedocelowych znajdujących się na drugim poziomie łańcucha troficznego.

MATERIAŁY I METODY

Materiał roślinny

Materiał w doświadczeniu stanowiły transgeniczne odmiany kukurydzy DKC60 -16Bt i DKC3421YG pochodzące z linii MON810 firmy Monsanto, z ekspresją białka Cry1Ab o toksycznym działaniu w stosunku do owadów z rzędu motyle (*Lepidoptera*). Kontrolą były izogeniczne, nietransgeniczne linie wyjściowe dla tych odmian DKC60-15 i DKC3420. Rośliny uprawiane były w donicach w szklarni (szklarnie Wydziału Ogrodniczego SGGW, fitotrony IHAR Radzików) lub na polu, w latach 2007 i 2008, zgodnie ze standardowymi warunkami dla kukurydzy. Do oznaczeń białka w materiale roślinnym użyto fragmentów roślin pochodzących z czterech stadiów rozwojowych kukurydzy — stadium 3 liści, stadium 6 liści, stadium kwitnienia, stadium dojrzałej kolby oraz nasion. Do oznaczeń wykorzystano tkanki liści, łodygi, korzeni, kwiatostanów męskich i żeńskich, kolby, pyłku, nasiona oraz całe rośliny w fazie kwitnienia. Do celów

prezentowanej pracy dane pochodzące z jednego typu tkanki np. liście, korzenie zostały potraktowane łącznie. Próbkę po zbiorze były oczyszczane z ziemi, krojone a następnie liofilizowane i przetrzymywane do czasu oznaczenia w -20°C . Korzenie przed zamrożeniem były dodatkowo płukane pod bieżącą wodą, a następnie suszone na bibule.

Materiał zwierzęcy

- Owady niedocelowe w doświadczeniach stanowiły:
- mszyca zbożowa (*Sitobion avenae* F.),
- mszyca czeremchowo-zbożowa (*Rhopalosiphum padi* L.).

Kontrolą były owady tego samego gatunku hodowane na izogenicznych odmianach nietransgenicznej kukurydzy. Owady były zebrane z ich naturalnych stanowisk i namnożone w izolatorach w Katedrze Entomologii Stosowanej SGGW lub dostarczone przez firmę Koppert. Po minimum 7 dniach żerowania na kukurydzy owady były zebrane przy użyciu pędzelka do 2,0 ml probówek wirówkowych, zliofilizowane i zamrożone w -20°C do czasu oznaczenia białka.

Oznaczenie Cry1Ab metodą ELISA

Tkanka roślinna była rozcierana na proszek w moździerz, następnie 40 mg tkanki było zawieszane w 1 ml buforu ekstrakcyjnego EB (PBS/0,55% Tween 20) i inkubowane przez 1 h w temperaturze pokojowej. W przypadku tkanek owadzych nie zawsze możliwe było uzyskanie takiej masy próby, dlatego waga każdej próbki była odnotowywana i wykorzystana przy kalkulacji ilości białka. Po inkubacji roztwór był wirowany przez 2 minuty w celu uzyskania względnie klarownego supernatantu. Zawartość białka Cry1Ab oznaczano przy użyciu immunodetekcji testem ELISA QualiPlate Kit (Envirologix, Portland, USA), według załączonego protokołu, z modyfikacją do oznaczenia ilościowego. Próbkę stosowaną do pomiaru była rozcieńczana w buforze ekstrakcyjnym od 10 do 2000 razy w zależności od tkanki. Każdorazowo konieczne było wykonanie próbnych rozcieńczeń tkanki, tak by wartości odczytu mieściły się w obrębie krzywej standardowej. Ekstrakty pochodzące z nietransgenicznych odmian izogenicznych były używane jako kontrole. Jako standardy ilości białka wykorzystano 0,25 ppb, 0,4 ppb, 1 ppb, 4 ppb i 10 ppb białka Cry1Ab z Fitzgerald Industries USA. Dodatkowo stosowano kontrolę pozytywną z zestawu ELISA QualiPlate Kit oraz próbę ślepą, którą stanowił czysty bufor ekstrakcyjny. Absorbancję przy długości fali 450 nm mierzono na spektrofotometrycznym FLUOstar Optima (BMG Labtech) w teście płytkowym. Dane zostały przeanalizowane przy wykorzystaniu FLUOstar Optima Software (BMG Labtech). Wyniki są prezentowane jako ilość Cry1Ab wyrażona w mikrogramach Cry1Ab w przeliczeniu na gram suchej masy tkanki [ppm]. Limit detekcji zastosowanej metody (LOD) ELISA określono wykorzystując standardy Cry1Ab i wynosił on 0,20 ppb białka.

Oznaczenie białka ogólnego metodą Bradford

Analizowane tkanki sprawdzano jednocześnie pod kątem ogólnej zawartości białka. W tym celu tkanka w ilości 20 mg była homogenizowana w buforze 1x PBS (0,2M bufor fosforanowy, 1,5M NaCl, pH 7,4). Po 30 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej do supernatantu był dodawany odczynnik Roti®-Quant (Roth, Niemcy), zgodnie z zaleceniami producenta. Jako standard zastosowano rozcieńczenia albuminy bydlęcej (BSA, Fermentas) w stężeniu od 20 $\mu\text{g/ml}$ do 100

µg/ml. Białko ogólne oznaczano metodą Bradford na spektrofлуориметrze FLUOstar Optima przy długości fali 595 nm. Dane zostały zanalizowane przy wykorzystaniu FLUOstar Optima Software (BMG Labtech).

Analizy statystyczne

Każda próba w analizie Cry1Ab czy białka ogólnego oznaczana była w dwu powtórzeniach dla każdego rozcieńczenia. Dane zostały wstępnie przeanalizowane przy wykorzystaniu FLUOstar Optima Software (BMG Labtech), gdzie wynik był obliczany na podstawie krzywej standardowej. W przypadku oznaczeń białka Cry1Ab wpływ warunków uprawy czy rodzaju odmiany był analizowany osobno dla każdego typu tkanki. Analizy statystyczne przeprowadzono w układzie split-plot przy użyciu programu SAS wersja 8.2. stosując trójkierunkową analizę wariancji. Średnie różnice pomiędzy badanymi czynnikami określono na podstawie testu Tukey-Kramera.

Porównanie par odmian (transgeniczna-izogeniczna) w celu stwierdzenia różnic w ilości białka ogólnym między odmianami lub owadami żerującymi na tych odmianach przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta porównania średnich dla populacji o równych wariancjach lub, zależnie od potrzeby, z modyfikacją Satterthwaite'a dla populacji o istotnie różnych wariancjach. Wariancje porównywano testem F.

WYNIKI

Przeprowadzono 214 analiz próbek zawierających tkanki roślinne z odmian genetycznie zmodyfikowanych i 80 prób z odmian kontrolnych pod kątem zawartości białka Cry1Ab. Dodatkowo przeprowadzono oznaczenie Cry1Ab dla 18 prób zawierających mszyce żerujące na odmianach transgenicznych i 18 prób z mszyc odżywiających się na kukurydzy nietransgenicznej, odmianach izogenicznych. Ponieważ celem pracy było przedstawienie szerokiego spektrum akumulacji białka Cry1Ab, prezentowane są wyłącznie uśrednione dane z poszczególnych doświadczeń. Wyniki z kontrolnych, nietransgenicznych odmian izogenicznych służyły jako sprawdzenie poprawności analizy. Zawartość Cry1Ab w izogenicznych kontrolach kształtowały się na poziomie wartości dla próby ślepej, z wyjątkiem roślin, które na podstawie tego oznaczenia zostały określone jako zamieszany materiał i usunięte z dalszych doświadczeń.

Określenie poziomu ekspozycji wybranych gatunków organizmów niedocelowych na działanie toksyny Cry1Ab poprzez ocenę ekspresji białka Bt (Cry1Ab) w transgenicznej kukurydzy MON810

Zawartość białka Bt w kukurydzy odmiany DKC3421YG i DKC6016Bt z podziałem na analizowane tkanki, typy uprawy i lata doświadczeń została przedstawiona w tabeli 1.

Średnie zawartości białka Cry1Ab w kukurydzy
Mean content of Cry1Ab protein in maize plant

Zawartość białka Cry1Ab (µg/g·s.m.) w tkankach roślinnych Content of Cry1Ab protein in plant tissues (µg/g·d.m.)								
tkanka tissue	rok year	warunki conditions	odmiana cultivar	liczba obserwacji number of observations	średnia mean	współczynniki wariancji CV	odchylenie standardowe standard deviation	
Całe rośliny Entire plants	8	pole field	DKC3421YG	2	270,34	35,07	94,80	
			DKC6016Bt	3	361,35	85,52	309,04	
			DKC6016Bt	2*	539,75*	1,38*	7,42*	
Korzeń Root	7	szklarnia greenhouse	DKC6016BT	6	26,08	78,28	20,41	
			DKC6016BT	6	1,28	83,65	1,07	
	8	pole field	DKC3421YG	2	62,75	5,07	3,18	
			DKC6016BT	4	22,57	153,16	34,57	
Kwiat męski Male flower	7	szklarnia greenhouse	DKC6016BT	2	3,19	21,21	0,98	
			DKC6016BT	2	32,65	33,14	10,82	
	8	pole field	DKC3421YG	3	35,76	25,46	9,71	
Liście Leaves	7	szklarnia greenhouse	DKC6016BT	10	11,99	61,27	7,35	
			DKC3421YG	7	348,95	46,99	163,98	
	8	pole field	DKC6016BT	5	220,50	63,01	138,94	
			DKC6016BT	6	94,86	21,48	20,37	
Młoda kolba Young ear	8	pole field	DKC3421YG	2	128,13	10,35	13,26	
			DKC3421YG	3	26,81	3,21	0,86	
Okrywa kolby Husk	7	szklarnia greenhouse	DKC6016BT	3	0,18	51,23	0,09	
			DKC3421YG	5	0,43	34,75	0,15	
	8	pole field	DKC6016BT	3	0,34	0,51*	152,31	0,53
			DKC6016BT	2*	0,34	0,51*	120,76*	0,62*
Młode ziarniaki Young grains	8	pole field	DKC6016BT	3	0,18	51,23	0,09	
			DKC3421YG	3	110,67	22,88	25,32	
	7	szklarnia greenhouse	DKC6016Bt	9	14,70	102,04	15,00	
Nasiona Seeds	8	pole field	DKC3421YG	8	20,99	89,15	10,81	
			DKC6016Bt	3	2,19	31,59	0,69	
Łodyga Stem	8	szklarnia greenhouse	DKC6016Bt	5	3,23	25,89	1,77	
			DKC3421YG	10	6,35	14,58	10,87	

Czcionką pogrubioną zaznaczono współczynniki zmienności świadczące o bardzo dużej zmienności obserwacji.

Z gwiazdką (*) podano dane bez obserwacji skrajnie odstających

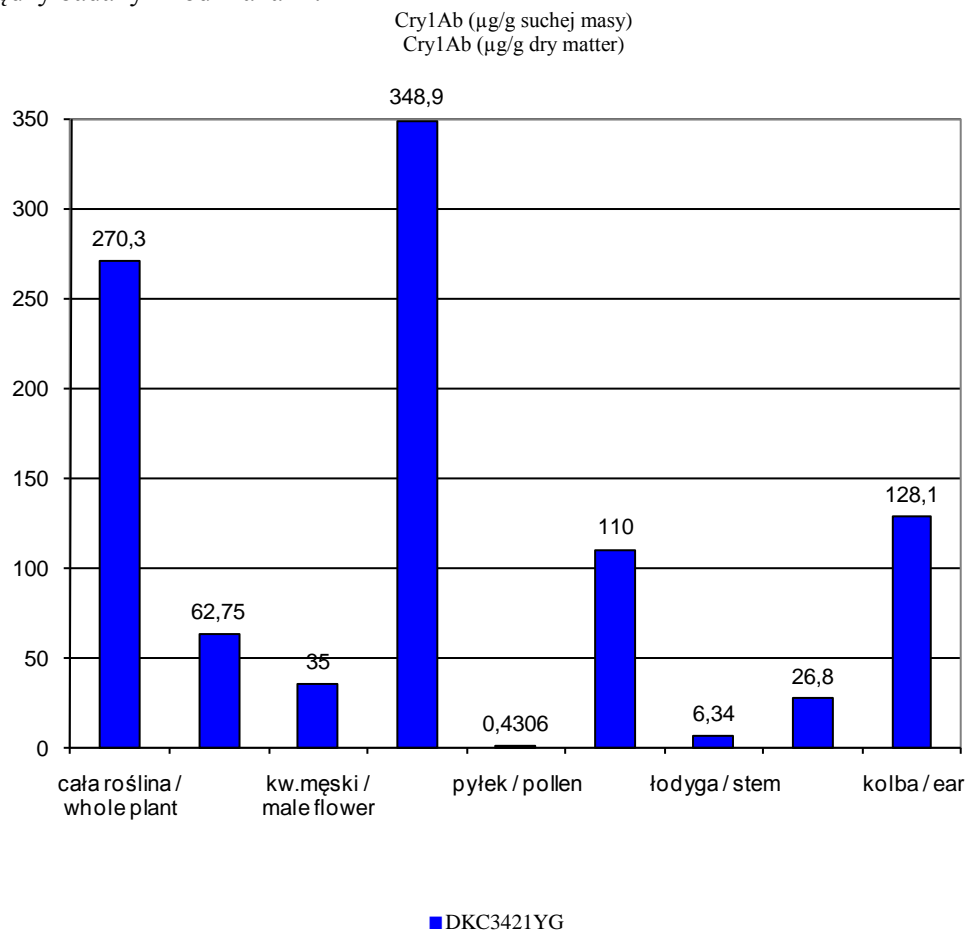
Coefficients of variation indicating the high level of variability among the observations are distinguished by bold characters. An asterisk(*) indicates the data without extreme observations

Porównanie zawartości białka Cry1Ab w odmianach DKC60-16Bt i DKC3421YG

Porównania poziomu białka Cry1Ab pomiędzy odmianami przeprowadzono na podstawie wyników pomiaru w liściach, korzeniach, pyłku oraz całych roślinach w fazie

kwitnienia. Test metodą analizy wariancji (ANOVA) nie wykazał statystycznie istotnych różnic w ekspresji białka Cry1Ab pomiędzy badanymi odmianami, zarówno w warunkach pola jak w warunkach szklarniowych. Obserwowano dużą zmienność w ilości białka Cry1Ab pomiędzy badanymi próbkami.

Analiza zawartości białka ogólnego nie wykazała statystycznie istotnych różnic między badanymi odmianami.



Rys. 1. Średnia zawartość białka Cry1Ab w $\mu\text{g/g}$ suchej masy tkanki w odmianie DKC3421YG w warunkach polowych

Fig. 1. Mean content of Cry1Ab protein in dry matter of plant tissue in the cultivar DKC3421YG under field conditions

Porównanie poziomu Cry1Ab pomiędzy testowanymi rodzajami organów roślinnych

Porównano poziom ekspresji Cry1Ab w tkankach roślinnych. Wykazano istotne statystycznie różnice w poziomie akumulacji białka Cry1Ab ($P = 0,01$) w odniesieniu do testowanych organów, co graficznie przedstawione jest na przykładzie odmiany

DKC3421YG (rys. 1). Najwyższa akumulacja białka dla odmiany DKC3421YG w warunkach polowych miała miejsce w liściach ($348,9 \pm 163,9 \mu\text{g/g s.m.}$), w młodej kolbie ($128,1 \pm 13,2 \mu\text{g/g s.m.}$), młodych ziarniakach ($110 \pm 25,3 \mu\text{g/g s.m.}$) i korzeniu ($62,75 \pm 3,18 \mu\text{g/g s.m.}$). Niższe zawartości Cry1Ab obserwowane były w kwiecie męskim ($35,0 \pm 3,18 \mu\text{g/g s.m.}$), okrywie kolby oraz pręcikowiu ($26,8 \pm 0,86 \mu\text{g/g s.m.}$), łodydze ($6,34 \pm 10,9 \mu\text{g/g s.m.}$), a najmniejsza była w pyłku ($0,43 \pm 0,15 \mu\text{g/g s.m.}$). Podobne zależności obserwowano w odmianie DKC6016Bt. Analiza zawartości białka ogólnego nie wykazała statystycznie istotnych różnic między analogicznymi organami w transgenicznym i izogenicznym odmianach konwencjonalnych.

Porównanie poziomu Cry1Ab w roślinach w zależności od warunków uprawy

Przeprowadzono porównanie ilości Cry1Ab w całych roślinach dla badanych odmian uprawianych w warunkach kontrolowanych (szklarnia i fitotron) oraz w warunkach polowych. Wykazano istotne statystycznie różnice w ilości białka Cry1Ab w kukurydzy MON810 pomiędzy dwoma typami upraw ($P = 0,01$). Dla odmiany DKC6016Bt średnie ilości Cry1Ab potraktowane sumarycznie dla wszystkich badanych tkanek z uprawy polowej były 4,3 razy wyższe niż te obserwowane w szklarni/fitotronie. Wyniki analizy wariancji w połączeniu z wynikiem porównań wielokrotnych Tukeya przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Średnia zawartość białka Cry1Ab w roślinach kukurydzy odmiany DKC6016Bt rosnących w polu i w szklarni
Mean content of Cry1Ab protein in the maize cultivar DKC6016Bt grown under field and greenhouse conditions

Grupowanie Tukey Tukey grouping	Średnia — Mean Cry1Ab [ppm]	Liczba obserwacji Number of observations	Uprawa Conditions
A	87,58	30	pole — field
B	20,48	32	szklarnia — greenhouse

Wykonano wg procedury porównań wielokrotnych Tukeya, $\text{NIR}_{0,05} = 23,978$

Comparison done according to Tukey's multiple comparisons test, $\text{LSD}_{0,05} = 23,978$

Ocena poziomu ekspozycji organizmów niedocelowych na toksyczne działanie białka Cry1Ab poprzez określenie akumulacji tego białka w ich diecie, czyli w organizmach stanowiących pośrednie ogniwo łańcucha pokarmowego (2 gatunki mszyc)

Oznaczenie białka Cry1Ab w mszycy zbożowej (*Sitobion avenae* F.) wykonane zostało wyłącznie z doświadczeń w fitotronach. Mszyca ta nie została odnotowana na polach w prowadzonych doświadczeniach, tak w 2007 jak i w 2008 roku. Kilukrotne próby przeniesienia dorosłych, uzyskanych komercyjnie osobników mszycy na kukurydzę uprawianą w warunkach polowych nie spowodowały założenia kolonii i mszyca ta opuszczała roślinę bądź osobniki ginęły (w przypadku zastosowania siatki ochronnej na liściu). Analiza białka Cry1Ab z owadów utrzymywanych na kukurydzy w warunkach fitotyonu wykazała w tkankach mszycy zbożowej śladowe ilości Cry1Ab — $15,60 \text{ ng/g}$ suchej masy dla DKC6016BT i $7,74 \text{ ng/g}$ suchej masy dla DKC3421YG

w warunkach kontrolowanych. Brak było istotnych statystycznie różnic w ogólnej ilości białka w mszycy na odmianach transgenicznej i konwencjonalnej.

Oznaczenie białka Cry1Ab w mszycy czeremchowo-zbożowej (*Rhopalosiphum padi* L.) wykonano, zarówno z doświadczeń prowadzonych w szklarni, jak i z kolonii mszyc pojawiających się na polu. Zawartość białka Cry1Ab w tkankach mszycy czeremchowo-zbożowej zebranej z kukurydzy rosnącej w szklarni była bliska limitu detekcji metody 0,2 ppb Cry1Ab. Dla *R. padi* zebranej z DKC6016Bt rosnącej w polu wyniosła 56,88 ng Cry1Ab/g suchej masy, a dla DKC3421YG 6,25 ng Cry1Ab/g suchej masy.

Poziom białka ogólnego w mszycach żerujących na odmianach Bt i konwencjonalnych nie różnił się istotnie.

DYSKUSJA

Białko Cry1Ab

Toksyna Cry1Ab jest białkiem o działaniu insektycydu produkowanym przez bakterię glebową *Bacillus thuringiensis* (Höfte i Whiteley, 1989; Schnepf i in., 1998). Skrócona forma genu kodującego białko Cry1Ab została wprowadzona metodą transgenezy do roślin kukurydzy w celu otrzymania odmian odpornych na owady z rzędu motyle. Odmiany linii MON810 w ciągu ostatnich 13 lat zostały skomercjalizowane i są uprawiane z podstawowym przeznaczeniem na paszę i produkcję skrobi w wielu krajach, także w Unii Europejskiej.

Określenie poziomu ekspozycji organizmów niedocelowych na działanie toksyny Cry1Ab poprzez ocenę ekspresji białka Bt (Cry1Ab) w transgenicznej kukurydzy MON810

Ocena wpływu odmiany GMO na środowisko powinna uwzględnić dane obejmujące zestawienie poziomu ekspresji produktu transgeny w różnych częściach i tkankach roślinnych. Do oceny wpływu roślin GM na gatunki niedocelowe stawonogów bezpośrednio żerujące na kukurydzy MON810 (rolnice, bielinki *Pieris* spp.) musi być określona ekspozycja danego organizmu na insektycyd zawarty w roślinie. Poziom ekspozycji jest zależny od zwyczajów żywieniowych (feeding behaviour) badanego organizmu oraz poziomu ekspresji białka w poszczególnych częściach rośliny.

Poziom ekspresji białka w roślinie

Podstawową drogą ekspozycji na białko Bt jest bezpośrednia konsumpcja części transgenicznej rośliny. Wartości poziomu ekspresji białka Cry1Ab podawane w literaturze różnią się. Dane na stronach US Environmental Protection Agency (EPA) mówią o średniej wartości 10,34 µg/g Cry1Ab w świeżej masie liści, 0,19–0,32 µg/g w nasionach, 0,05 µg/g w pyłku i 4,65 µg/g w przeliczeniu na całą roślinę. Niewiele jest badań dotyczących zmian w ekspresji białka podczas sezonu wegetacyjnego, w różnych warunkach uprawy i klimatu, na skutek stresu, czy w odniesieniu do danej tkanki roślinnej (Clark i in., 2005). W badaniach Dutton (2004) stwierdzono istotne różnice w ekspresji Cry1Ab roślin w młodym i dojrzałym stadium wzrostu. Młodsze rośliny zawierały dwukrotnie więcej Cry1Ab w tkankach (58 µg/g suchej masy). Ta prawidłowo-

wość była tłumaczona niższą ogólną zawartością białek w roślinach starszych. Wykazano też różnice w ilości białka w pomiędzy trzema typami upraw — polową ($58 \pm 2,8$ $\mu\text{g/g}$ suchej masy), otwartą szklarnią ($26 \pm 0,9$ $\mu\text{g/g}$ suchej masy) i zamkniętą szklarnią ($47 \pm 1,8$ $\mu\text{g/g}$ suchej masy). Wskazuje się na wpływ na akumulację białka Bt takich czynników jak poziom nawożenia azotowego (Coviella i in., 2000; Bruns i Abel, 2007), jakość gleby (Griffiths i in., 2006), użycie pestycydów oraz stadium rozwojowe rośliny (Griffiths i in., 2006; Nguyen i Jehle, 2007). Znane jest również zjawisko hamowania ekspresji transgenu na skutek wysokiej temperatury (Neumann i in., 1997), choć takie doświadczenia nie są znane w odniesieniu do cechy Bt (Duton, 2004a). Poziom białka Cry1Ab był również sprawdzany przez organizacje ekologiczne takie jak Greenpeace, gdzie określono dla liści kukurydzy MON810 wartości Cry1Ab od 5,21 $\mu\text{g/g}$ do 15,06 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy (Lorch i Then, 2007). Większość dostępnych danych dotyczy pomiarów Cry w przeliczeniu na świeżą masę tkanki. Uzyskane wyniki potwierdzają wpływ warunków uprawy na poziom ekspresji białka Bt. Podobnie jak w pracy Dutton (2004 a) wyższe ilości białka w poszczególnych typach tkanek były znajdowane w roślinach z upraw polowych. Jednak fakt tak znaczącego spadku ilości Cry1Ab w kukurydzy uprawianej w warunkach szklarni może być po części tłumaczony niezbalansowanym nawożeniem oraz silnym porażeniem roślin przez przędziorki. Bruns i Abel (2007) obserwowali podwyższenie syntezy Cry1Ab w wyniku zwiększenia nawożenia azotowego.

Najsilniejszą ekspresję białka Cry1Ab stwierdzono w liściach MON810 badanych odmian. Pozostaje to w zgodzie z danymi literaturowymi, chociaż wartości obserwowane w liściach z roślin w polu przewyższają od 3,8x do 6,0x wartości dotychczas odnotowywane dla pomiarów wykonanych dla suchej masy tkanki. Kolejną znaczną akumulację białka Bt stwierdzono w kolbach i młodych ziarniakach. W tych organach również ma miejsce żerowanie szkodników jak omacnica, dlatego istotne jest zapewnienie odpowiedniego poziomu ochrony. Niższa ekspresja Cry1Ab była odnotowana w korzeniu i w łodydze, co pokrywa się z doniesieniami Nguyen i Jehle (2007).

W pracy potwierdzono bardzo niski poziom białka Cry1Ab w pyłku kukurydzy MON810. Wydaje się, że niska ekspresja Cry1Ab w pyłku w porównaniu do liści (średnio 295 razy niższej w warunkach szklarni i 739 razy niższej w warunkach polowych) oznacza, że potencjalny wpływ na organizmy niedocelowe, których jedynym pokarmem z kukurydzy jest pyłek, jest nieistotny.

Obserwowane wyniki wskazują na fluktuacje w zawartości białka Cry1Ab pomiędzy badanymi próbkami w ramach analizowanych części roślin (rys.1). Niektóre dane literaturowe mówią o znacznych różnicach pomiędzy próbkami pochodzącymi z kolejnych roślin w tym samym stadium rozwojowym (Nguyen i Jehle, 2007), czy roślin z cechą MON rosnących w łanie. Wysoki współczynnik wariancji charakteryzujący zgromadzone w tej pracy dane potwierdza tę prawidłowość.

Ocena poziomu ekspozycji organizmów niedocelowych na toksyczne działanie białka Cry1Ab w kukurydzy MON810 poprzez określenie poziomu tego białka w ich diecie, czyli w organizmach stanowiących pośrednie ogniwo łańcucha pokarmowego (2 gatunki mszyc)

Wybrane do analiz gatunki owadów stanowią pośrednie ogniwo w łańcuchu pokarmowym pomiędzy rośliną a niedocelowymi gatunkami drapieżnymi (biedronką *Adalia bipunctata* i złotookiem *Chrysoperla carnea*). W doświadczeniach był określony poziom akumulacji białka Cry1Ab w organizmie dwu gatunków mszyc *Sitobion avenae* i *Rhopalosiphum padi* na skutek bezpośredniego żerowania na kukurydzy MON810 w warunkach fitotronu/szklarni (2 gatunki) i pola (1 gatunek). Wybrane gatunki mszyc najczęściej występują na kukurydzy w Polsce, przy czym pierwszy jest mszycą jednodomną, która zasiedla zboża zwykle w fazie kłoszenia w warunkach ciepłej i suchej pogody i nie tworzy licznych populacji. Mszyca zbożowa najczęściej przelatuje na kukurydzę w okresie dojrzałości mleczonej. Mszyca czeremchowo-zbożowa to gatunek dwudomny, migrujący z czeremchy na rośliny żywicielskie, między innymi na kukurydzę. Latem zakładają na łodygach i liściach liczne kolonie, w których okresowo powstają letnie formy uskrzydłone odbywające loty dyspersyjne w uprawach. W literaturze można spotkać informacje o preferencyjnym zasiedlaniu przez mszyce odmian kukurydzy Bt (Bt11 i MON810) (Faria i in., 2007; Pons i in., 2005), co nie jest jednoznacznie naukowo wytłumaczone.

W przeprowadzonych doświadczeniach na liniach MON810 stwierdzono śladową obecność białka Cry1Ab w mszycy zbożowej i mszycy czeremchowo-zbożowej, w ilościach poniżej 60 ppb białka, czyli około 6 tysięcy razy niższą niż w liściach kukurydzy. Jest to zgodne z danymi literaturowymi wskazującymi na brak pobierania, lub śladowe pobieranie przez mszyce toksycznego białka z rośliny. Wynika to ze sposobu żerowania mszyc, które pobierają sok floemowy nie zawierający białka Cry (Duton, 2004b; Raps i in., 2001). Nie ma tu miejsca akumulacja białka Cry, która mogłaby zagrażać owadom w dalszych etapach łańcucha troficznego. W równoległe przeprowadzonych w Katedrze Entomologii Stosowanej SGGW biotestach pokarmowych nie wykazano też istotnego wpływu linii MON810 na mszyce zbożowe i ich drapieżców — biedronkę *Adalia bipunctata* i złotooka *Chrysoperla carnea* (Lewandowski i Górecka, 2008).

LITERATURA

- Alstad, D. N., Andow D. A. 1995. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science* 268: 1894 — 6.
- Bruns, H. A., Abel C. A. 2007. Effects of nitrogen fertility on Bt endotoxin levels in corn. *Journal of Entomological Science*. 42 (1): 35 — 34.
- Carozzi N. B., Warren G. W., Desai N., Jayne S. M., Lotstein R., Rice D. A., Evola S., Koziel M. G. 1992. Expression of a chimeric CaMV35S *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* 20: 539 — 548.
- Coviella C. E., Morgan D. J. W., Trumble J. T. 2000. Interactions of elevated CO₂ and nitrogen fertilization: Effects on production of *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic plants. *Environ. Microbiol.* 29: 781 — 787.

- Dutton A., D'Alessandro M., Romeis J., Bigler F. 2004. Assessing expression of Bt-toxin (Cry1Ab) in transgenic maize under different environmental conditions. In: *GMOs in Integrated Production. Ecological Impact of Genetically Modified Organisms*. Editors Romeis J., Bigler F., IOBC/WPRS vol. 27 (3): 49 — 55.
- Dutton A., Obrist L. D., D'Alessandro M., Diener L., Romeis J., Bigler F. 2004. Tracking Bt-toxin in transgenic maize to assess the risk of non target arthropods. In: *GMOs in Integrated Production. Ecological Impact of Genetically Modified Organisms*. Editors Romeis J., Bigler F., IOBC/WPRS vol. 27 (3): 57 — 63.
- Faria C. A., Wäckers F. L., Pritchard J., Barrett D. A., Turlings, T. C. J. 2007. High susceptibility of Bt maize to aphids enhances the performance of parasitoids of lepidopteron pests. *PLoS ONE* 2: e600. doi:10.1371/journal.pone.0000600.
- Gould F. 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annual Review of Entomology* 43: 701 — 726.
- Griffiths B. S., Caul S., Thompson J., Birch A. N., Scrimgeour C., Cortet J., Foggo A., Hacket C. A., Krogh, P. H. 2006. Soil microbial and faunal community responses to Bt maize and insecticide in two soils. *J. Environ. Qual.* 35: 734 — 741.
- Hilbeck A. Schmidt J. E. U., 2006. Another view on Bt proteins — how specific are they and what else might they do? *Biopesticides International* 2: 1 — 50.
- Höfte H., Whiteley H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev.* 53 (2): 242 — 55.
- Lipa J. J. 2004. Zachodnia stonka kukurydziana (*Diabrotica virgifera* Le Conte) zagraża Polsce — konieczny monitoring i środki zapobiegawcze. Postępy w Ochronie Roślin 44 (1): 197 — 201.
- Lisowicz F. 2003. Narastająca szkodliwość omacnicy prosowianki (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) dla kukurydzy w południowo-wschodniej Polsce. *Prog. Pl. Protection/Post. Ochr. Roślin* 43 (1): 245 — 250.
- Maessen G. D. F. 1997. Genomic stability and stability of expression in genetically modified plants. *Acta. Bot. Neerl.* 46: 3 — 24.
- Neumann K., Droge-Laser W., Kohne S., Broer. I. 1997. Heat treatment results in a loss of transgene-encoded activities in several tobacco lines. *Plant Physiology*, Vol. 115, 3: 939 — 947.
- Nguyen, H. T., J. A. Jehle 2007. Quantitative analysis of the seasonal and tissue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize Mon810. *Journal of Plant Diseases and Protection* 114: 820 — 87.
- Pons X., Lumbierres B., Lopez C., Albajes R. 2005. Abundance of non-target pests in transgenic Bt-maize: A farm scale study *Eur. J. Entomol.* 2005, 102 (1): 73 — 79.
- Raps A., Kehr J., Gugerli P., Moar W. J., Bigler F., Hilbeck A. 2001. Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and of the nontarget herbivore *Rhopalosiphum padi* (*Homoptera* : *Aphididae*) for the presence of Cry1Ab, *Molecular Ecology* 10: 525 — 533.
- Romeis J., Bartsch D., Bigler F., Candolfi M. P., Gielkens M. M. C., Hartley S. E., Hellmich R. L., Huesing J. E., Jepson P. C., Layton R., Quemada H., Raybould A., Rose R. I., Schiemann J., Sears M. K., Shelton A. M., Sweet J., Vaituzis Z., Wolt J. D. 2008. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. *Nature Biotechnology* 26: 203 — 208
- Sanvido O., Stark M., Romeis J., Bigler F. 2006. Ecological impacts of genetically modified crops: experiences from ten years of experimental field research and commercial cultivation, *Agroscope Reckenholz Tänikon Research Station ART, Zurich, Switzerland*.
- Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D. R., Dean D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 62 (3): 775 — 806.
- Tiedje, J.M., Colwell R. K., Grossman Y. L., Hodson R. E., Lenski R. E., Mack R. N., Regal P. J. 1989. The planned introduction of genetically engineered organisms: Ecological considerations and recommendations. *Ecology* 70: 298 — 315.