

A transzgenikus Bt-kukoricamaradványok hatása egy gombatoxint termelő növényi kórokozóra, a *Fusarium graminearum*-ra és egy biokontroll-mikroorganizmusra, a *Trichoderma atroviride*-re

Andreas Nage^a, Thierry Ziegler^b és Geneviève Déjager^{a,c}

^a Plant Pathology, Institute of Integrative Biology, 1511 Zurich, 8092 Zurich, Svájc

^b N.Mari Nage SA, 2074 Marin-Épagnier, Svájc

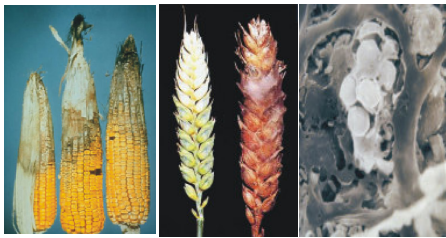
^c Levélzöld szerző: geneviève.dejager@agr.unizh.ch

Az eredeti dokumentum megtalálható:

<http://jeq.scjournals.org/cgi/content/abstract/35/4/1001>

A kukoricának a *Bacillus thuringiensis* (Bt) baktériumból származó, rovarölő hatású kristályos (crystal, Cry) fehérje génjével való transzformálása hatással lehet a kultúrnövények maradványain élő növényi kórokozók és azok antagonistáinak a túlélésére. Munkánkban a búzát és kukoricát károsító, dezoxinivalenol (DON) gombatoxint termelő *Fusarium graminearum* és a biokontroll-szervezetként használatos *Trichoderma atroviride* gombákat érintő lehetséges hatást vizsgáltuk. A tisztított Cry1Ab fehérje agarlemezeken nem gátolta e gombák növekedését. A Bt-kukorica szöveiben uralkodónál magasabb Cry1Ab-koncentrációk serkentették a *F. graminearum* növekedését. A gombák tenyésztését négy Bt-kukoricahibrid, valamint ezek nem transzgenikus izogénikus vonalainak γ -sugárzással sterilizált levélszövetén is elvégeztük (a növényi anyagot 2002-ben és 2003-ban szabadföldi kísérlet során gyűjtöttük a kukorica érése idején). Mindkét gomba lebontotta a Bt-kukoricában lévő Cry1Ab fehérjét. Mikroszatellit-alapú polimeráz-láncreakció

(PCR) segítségével végzett gombabiomassza-meghatározásokkal kimutattuk, hogy a gombák növekedése különféle kukoricafajták levélszövetén különböző, de nincs következetes különbség a megfelelő Bt- és nem Bt-hibridek között. A kukorica-szövetminták gyűjtési évének általában nagyobb hatása volt a biomassza-produkcióra, mint a kultúrváltozatnak vagy a Bt-transzformációnak. A kukorica-szövetmintákkal végzett kísérletekben megfigyelt DON gombatoxinszintek összhangban álltak a *F. graminearum* biomassza-produkcióban mutatkozó mintázatokkal, ami arra utal, hogy a Bt-transzformációnak nincs hatása a DON-termelésre. A biológiai vizsgálatok mellett a kukoricalevél-mintákat tömegspektrográfián alapuló ún. elektronikus orral is vizsgáltuk, amely „ujjlenyomatot” készít a mintákban található illékony szerves vegyületekről. A megfelelő Bt- és nem Bt-kukoricalevél-minták kémiai ujjlenyomata csak azoknál a hibridpároknál különbözött egymástól, amelyeknél a biológiai vizsgálatok eltérő gombabiomassza-produkciót mutattak. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a kukorica szövetmaradványokban található Cry1Ab fehérjének nincsen közvetlen hatása a *F. graminearum*-ra és a *T. atroviride*-re, azonban egyes Bt/nem Bt-kukorica hibridpárok összetétele a Cry1Ab fehérjetartalom mellett más tekintetben is különbözik egymástól, ami befolyásolhatja a gombák szaprofitikus növekedését a kultúrnövények maradványain.



Fusarium graminearum károsítása kukoricán

búzán

Trichoderma atroviride micélium



Ostrinia nubilalis Hübner

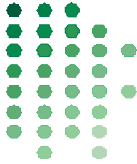
A transzgenikus növényekkel világszerte bevetett terület az elmúlt néhány évben gyorsan terjeszkedett (James, 2005). Az egyik fő transzgenikus termény a *Bacillus thuringiensis* Berlinerből (Bt) származó, rovarölő hatású kristályos (crystal, Cry) fehérjét kódoló génekkel transzformált kukorica (*Zea mays* L.), amelyet 2005-ben világszerte 11,3 millió hektáron termesztettek. A legtöbb Bt-kukoricafajtában a Cry1Ab fehérje termelődik, amely megövi a növényt a kártevő lepkéktől, különösen az európai kukoricacamoltyótól (*Ostrinia nubilalis* Hübner). A Cry1Ab fehérje a gyökérexudátummal (Saxena és mtsi., 1999, 2004) és a betakarításkor a szántóföldön maradt növényi maradványokkal (Zwahlen és mtsi., 2003) kerül a transzgenikus kukoricából a talaj ökoszisztémájába. A Cry1 Ab fehérje nagy része gyorsan lebomlik a talajban (Baumgarte és Tebbe, 2005; Sims és Holden, 1996; Zwahlen és mtsi., 2003), de egy része agyagásványokhoz és huminsavas frakciókhoz kötődve ellenállóvá válhat a mikrobiológiai lebontással szemben és megtarthatja rovarölő hatását (Koskella és Stotzky, 1997; Venkateswerlu és Stotzky, 1992). Újabb megjelent közlemények leírják a transzgenikus Bt-kukoricából (Flores és mtsi., 2005) és transzgenikus Bt-rizsből (Wu és mtsi., 2004) származó szövetek hatását a talajbiológiai aktivitására; egy másik közleményben a mikrobiális populációban bekövetkező változásokat a lebomló Bt-gyapotlevelekkel hozzák összefüggésbe (Donegan és mtsi., 1995). A megfigyelt hatásoka a Bt gén beépítése eredményeképp a levélszövet kémiai összetételében bekövetkező változás lehet. Saxena és Stotzky (2001) három különböző

transzformációs eseményből származó 10 Bt-kukoricahibridben magasabb lignintartalmat mért, mint a megfelelő izogénikus nem Bt-vonalakban. A megemelkedett lignintartalom csökkenti a növényi maradványok lebomlásának sebességét (Hopkins és mtsi., 2001; Parton és mtsi., 1996) és ezért hatással lehet a maradványokon élő mikrobiális populációkra.

A transzgenikus termények kockázatfelmérésében az egyik megfelelő megközelítés olyan mikrobiális indikátorfajokra gyakorolt hatás felmérése, amelyek különösen fontos szerepet játszanak az adott mezőgazdasági ökoszisztémában (Kowalchuk és mtsi., 2003). Ilyen mikroorganizmus a *Fusarium graminearum* Schwabe, egy növényi kórokozó, amelyet a Bt-kukorica termesztésével kapcsolatban még nem vizsgáltak. Ez a gomba nagy sebességgel benővi a termények, különösen a kukorica maradványait (Yi és mtsi., 2002), amelyek azután a fuzáriumos kukoricacső-rothadás, a búza fuzáriumos betegsége és egyéb hasonló fertőzések oltóanyagaként működnek (Sutton, 1982).

A fertőzött terményből készült élelmiszer és takarmány különféle gombatoxinokkal szennyeződik, amelyek veszélyeztetik az emberi és az állati egészséget (Bennett és Klich, 2003; Miller és Trenholm, 1994). A búza fuzáriumos betegsége növekvő gyakorisággal jelentkezett azokban a csökkentett művelési rendszerekben, ahol előveteményként kukoricát vetettek (Dill-Macky és Jones, 2000; Miller és mtsi., 1998), ami arra utal, hogy a földfelszínen maradó kukoricamaradványok különösen alkalmas tenyészhelyek a *F. graminearum* számára. Mivel a Bt-kukorica több éven keresztül





ugaron hagyás nélkül természetesen, és szemeskukorica termesztésekor minden évben hektáronként kb. 8 tonna növényi maradvány marad hátra, a silókukoricából pedig évenként, hektáronként 2 tonna (Zscheischler és mtsi., 1990), fontos megvizsgálni, hogy a Bt-transzformáció befolyásolja-e ennek a kártékony *Fusarium*-fajnak a szaprofitikus növekedését a kukoricamaradványokon.

A kukoricamaradványok összetételében bekövetkező változások a kártékony, valamint a jótékony hatású mikroorganizmusok (ilyenek például a növényi kártevők antagonistái) közötti egyensúlyt is befolyásolhatják. A *Trichoderma* fajok a kukorica és egyéb termények maradványait a lebomlás teljes folyamatán át nagy sebességgel betelepítő gombák (Broder és Wagner, 1988) és a *Fusarium* fajok antagonistájaként lépnek fel búza- és feketeszabszalmán (Fernandez, 1992). Még nem készült vizsgálat arról, milyen hatással vannak a Bt-transzformált termények maradványai ezekre a fontos antagonistákra, amelyek nem célpontjai a Bt-toxinnak.

Munkánkban transzgenikus Bt-hibridkukoricából származó tisztított Cry1Ab fehérjét és levélmaradványokat használtunk annak felmérésére, milyen (nem célzott) hatással van maga a Cry fehérje, valamint a kukorica Bt-vel való transzformációja néhány részletesen vizsgált modellgombára. A kukoricát és búzát megbetegítő *Fusarium graminearum* GZ3639 sz. törzsének növekedését és gombatoxin-termelését, valamint a *Trichoderma atroviride* Karsten antagonista gomba P1 törzsének növekedését vizsgáltuk. Két különböző transzformációs eseményből származó négy különböző Bt/nem Bt-hibridkukorica-pár levélszövetét tartalmazó üvegekben tenyésztett gomba növekedését vizsgáltuk kvantitatív mikroszatellit-alapú PCR-reakciókkal, amelyeket nem befolyásol a növényi szöve

tek lebomlása (Naef és mtsi., 2006). A változó környezeti körülmények miatti variációt olyan módon vettük figyelembe, hogy két különböző évben gyűjtött kukoricamaradványt használtunk. A kukorica-levélmарadványok illékony szerves összetevőiből elektronikus orral „ujjlenyomatot” készítettünk, hogy kimutassuk a kémiai összetételben lévő, a Cry fehérje jelenlétén vagy hiányán kívüli különbségeket. Ezenkívül vizsgáltuk azt is, hogy ezek a gombák képesek-e lebontani a kukoricalevél-maradványokban lévő Cry1Ab fehérjét.

Következtetések

Vizsgálatunk eredményei azt mutatják, hogy a *F. graminearum* GZ3639 és a *T. atroviride* P1 képes lebontani a Cry1Ab fehérjét, és hogy a Cry1AB fehérje a kukoricamaradványokban megtalálható koncentrációban nincs közvetlen hatással ezekre a gombákra. Egyes izogenikus kukoricavonalak összetétele azonban a Cry1Ab fehérjetartalomtól kívül még más összetevőkben is különbözik egymástól, ami befolyásolhatja a mezőgazdaságilag fontos gombák szaprofitikus növekedését. A megfigyelt különbségek belül ezek a hagyományos kultúrváltozatok közötti variabilitáson és kisebbek voltak a különböző környezeti feltételek okozta különbségeknél. Bár végkövetkeztetésünk az, hogy a transzgenikus Bt-kukorica maradványainak hatása a *F. graminearum* és *T. atroviride* gombatorzsekre korlátozott, javasoljuk, hogy a mezőgazdaságilag fontos gombákról készüljön felmérés a transzgenikus Bt-kukorica szántóföldi léptékű monitorozása keretében, mivel a maradványok összetételében fennálló kis különbségek a szántóföldön idővel felerősödhetnek. Eredményeink rávilágítanak arra, mennyire fontos a transzgenikus termények lehetséges nem célzott hatásainak értékelésénél a Bt/nem Bt-hibridpárok többszörös összehasonlítása, valamint a környezeti változékonyság figyelembevétele.





Hivatkozások

- Baumgarte, S., és C.C. Tebbe. **2005.** Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. *Mol. Ecol.* 14:2539-2551.
- Bennett, J.W., és M. Klich. **2003.** Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 497-511.
- Broder, M.W., és G.H. Wagner. **1988.** Microbial colonization and decomposition of corn, wheat, and soybean residue. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52: 112-117.
- Dill-Macky, R., és R.K. Jones. **2000.** The effect of previous crop residues and tillage on Fusarium head blight of wheat. *Plant Dis.* 84:71-76.
- Donegan, K.K., C.J. Palm, V.J. Fieland, L.A. Porteous, L.M. Ganio, D.L. Schaller, L.Q. Bucao, és R.J. Seidler. **1995.** Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil-microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. *Appl. Soil Ecol.* 2:111-124.
- Fernandez, M.R. **1992.** The effect of *Trichoderma harzianum* on fungal pathogens infesting wheat and black oat straw. *Soil Biol. Biochem.* 24:1031-1034.
- Flores, S., D. Saxena, és G. Stotzky. **2005.** Transgenic Bt plants decompose less in soil than non-Bt plants. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1073-1082.
- Hopkins, D.W., E.A. Webster, J.A. Chudek, és C. Halpin. **2001.** Decomposition in soil of tobacco plants with genetic modifications to lignin biosynthesis. *Soil Biol. Biochem.* 33:1455-1462.
- James, C. 2005. Global status of commercialized biotech/GM crops: **2005.** ISAAA Briefs no. 34. ISAAA, Ithaca, NY.
- Koskella, J., és G. Stotzky. **2002.** Larvicidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, *morrisoni* (strain *tenebrionis*), and *israelensis* have no microbicidal or microbiostatic activity against selected bacteria, fungi, and algae in vitro. *Can. J. Microbiol.* 48:262-267.
- Kowalchuk, G.A., M. Bruinsma, és J.A. van Veen. **2003.** Assessing responses of soil microorganisms to GM plants. *Trends Ecol. Evol.* 18: 403-410.
- Miller, J.D., és H.L. Trenholm (ed.) **1994.** Mycotoxins in grain; compounds other than aflatoxins. Eagan Press, St. Paul, MN.
- Naef, A., M. Senatore, és G. De'fago. **2006.** A microsatellite-based method for quantification of fungi in decomposing plant material elucidates the role of *Fusarium graminearum* DON production in the saprophytic interaction with *Trichoderma atroviride* in maize tissue microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55: 211-220.
- Miller, J.D., J. Culley, K. Fraser, S. Hubbard, F. Meloche, T. Ouellet, W.L. Seaman, K.A. Seifert, K. Turkington, és H. Voldeng. **1998.** Effect of tillage practice on Fusarium head blight of wheat. *Can. J. Plant Pathol.* 20: 95-103.
- Parton, W.J., D.S. Ojima, és D.S. Schimel. **1996.** Models to evaluate soil organic matter storage and dynamics. p. 421-448. In M.R. Carter and B.A. Stewart (ed.) *Structure and organic matter storage in agricultural soils.* CRC Press, Boca Raton, FL.
- Saxena, D., S. Flores, és G. Stotzky. **1999.** Transgenic plants Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature* 402:480.
- Saxena, D., C.N. Stewart, I. Altosaar, Q.Y. Shu, és G. Stotzky. **2004.** Larvicidal Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* are released in root exudates of transgenic *B. thuringiensis* corn, potato, and rice but not of *B. thuringiensis* canola, cotton, and tobacco. *Plant Physiol. Biochem.* 42:383-387.
- Saxena, D., és G. Stotzky. **2001.** Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn. *Am. J. Bot.* 88:1704-1706.
- Sims, S.R., és L.R. Holden. **1996.** Insect bioassay for determining soil degradation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIA(b) protein in corn tissue. *Environ. Entomol.* 25:659-664.
- Sutton, J.C. **1982.** Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can. J. Plant Pathol.* 4:195-209. Systat. 2000. Systat Version 10. Systat Software, Richmond, CA.
- Venkateswerlu, G., és G. Stotzky. **1992.** Binding of the protoxin and toxin proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on clay minerals. *Curr. Microbiol.* 25: 225-233.
- Wu, W.X., Q.F. Ye, H. Min, X.J. Duan, és W.M. Jin. **2004.** Bt transgenic rice straw affects the culturable microbiota and dehydrogenase and phosphatase activities in a flooded paddy soil. *Soil Biol. Biochem.* 36: 289-295.
- Yi, C.L., H.P. Kaul, E. Kubler, és W. Aufhammer. **2002.** Populations of *Fusarium graminearum* on crop residues as affected by incorporation depth, nitrogen and fungicide application. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 109:252-263.
- Zscheischler, J., M.C. Estler, W. Staudacher, F. Gross, G. Burgstaller, H. Strey, és T. Rechman. **1990.** *Handbuch Mais: Umweltgerechter Anbau, wirtschaftliche Verwertung.* 4th ed. Verlagsunion Agrar, Frankfurt am Main, Germany.
- Zwahlen, C., A. Hilbeck, P. Gugerli, és W. Nentwig. **2003.** Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Mol. Ecol.* 12:765-775.

