

Asystent

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin w Radzikowie, Laboratorium Kontroli GMO

Plant Breeding and Acclimatization Institute – National Research Institute

Department of Plant Biotechnology and Cytogenetics

Genetically Modified Organisms Controlling Laboratory

### Streszczenie rozprawy doktorskiej

pt.: „Analiza zawartości białka Cry1Ab w kukurydzy MON810 i jego rozpadu w środowisku, jako element badań nad bezpieczeństwem GMO”

dla uzyskania stopnia doktora nauk rolniczych; dziedzina: nauki rolnicze, dyscyplina: agronomia

*Promotor: prof. dr hab. Janusz Żimny. Promotor pomocniczy: dr Anna Linkiewicz*

Genetycznie zmodyfikowana kukurydza typu MON810, dopuszczona do uprawy w UE, zawiera gen *cry1Ab* z bakterii glebowej *Bacillus thuringensis*, odpowiedzialny za syntezę białka Cry1Ab. Białko to może być wprowadzane do gleby zarówno w wyniku uprawy kukurydzy MON810 (resztki poźniwne, pyłek i wydzielinę korzeniową) jak i ochrony kukurydzy poprzez zastosowanie bakteryjnego insektycydu zawierającego spory *Bacillus thuringensis* var. *kurstaki* (np. DiPel WG). Ponieważ białko Cry1Ab może potencjalnie, negatywnie wpływać na organizmy niedocelowe, istotne jest określenie jego stężenia, trwałości i ewentualnej akumulacji w glebie.

W pracy określono, z użyciem wystandaryzowanych i zwalidowanych metod ELISA (test immunoenzymatyczny), poziom transgenicznego białka w kukurydzy MON810 odmiany DKC 3421YG oraz w glebie po 3 i 4 latach uprawy. Zbadano także szybkość rozpadu Cry1Ab w glebie w warunkach kontrolowanych i określono wpływ wybranych czynników na ten proces.

W ramach standaryzacji testu ELISA, służącego do ilościowych analiz zawartości białka Cry1Ab, porównano działanie 2 zestawów do oznaczenia jakościowego białka (QualiPlate Cry1Ab/Cry1Ac, Envirologix i Agdia Bt- Cry1Ab/1Ac) z dwoma dostępnymi standardami białka Cry1Ab (Fitzgerald Industries International i Agdia, Inc.). Standard Agdia okazał się bardziej uniwersalny – zaobserwowano mniejsze różnice w wartości OD pomiędzy zastosowanymi testami w porównaniu do standardu Fitzgerald.

Stężenie białka Cry1Ab w kukurydzy MON810 określano w 3 stadiach rozwojowych roślin (fazy: BBCH 39 – wydłużania pędu, BBCH 65 – kwitnienia i BBCH 79 – dojrzałości młecznej), uprawianych w 3 lokalizacjach na terenie Polski, w latach 2009-2010. Najwyższe stężenie białka Cry1Ab odnotowano w liściach: górnym (13,23–29,43 µg/g) i dolnym (8,94–

35,90 µg/g). Istotnie mniej Cry1Ab oznaczono w: korzeniu (1,52–4,14 µg/g), łodydze (1,22–3,84 µg/g), pyłku (1,27–2,59 µg/g) i ziarnie (0,72–2,58 µg/g). Wykazano korelację dodatnią pomiędzy stężeniem azotu ogólnego, a zawartością białka Cry1Ab w liściach kukurydzy MON810.

W celu określenia stężenia białka w glebie, przeprowadzono walidację metody oznaczania Cry1Ab w glebie, według wytycznych Decyzji Komisji Europejskiej 2002/657/WE. Decyzyjna wartość graniczna (CC $\alpha$ ) została ustalona na poziomie 1–2 ng Cry1Ab/g gleby, a zdolność wykrywania (CC $\beta$ ) jako 1,88–5,23 ng Cry1Ab/g gleby, w zależności od źródła białka i rodzaju gleby.

W warunkach kontrolowanych zbadano wpływ działalności mikroorganizmów, temperatury i pH gleby na czas rozpadu Cry1Ab pochodzenia bakteryjnego (DiPel WG, Bayer Crop Science) i roślinnego (liście MON810), w 2 rodzajach gleby. Wykazano, że działanie mikroorganizmów glebowych, zakwaszenie gleby (pH 5) oraz podwyższenie temperatury inkubacji (15 °C) pozytywnie wpływają na czas rozpadu Cry1Ab w glebie.

Zastosowany do oceny dynamiki rozpadu Cry1Ab w glebie model typu shift-log pokazał, że rozpad białka ma charakter nieliniowy i jest dwufazowy. Roślinne białko Cry1Ab rozpada się w glebie gwałtownie przez pierwsze 10 dni, po czym degraduje wolniej i utrzymuje się na bardzo niskim poziomie do 28. dnia.

W pracy doktorskiej wykazano, że 3 i 4-letnia uprawa kukurydzy MON810, nie powoduje akumulacji białka Cry1Ab w glebie.

Doświadczenia opisane w pracy były elementem grantu (PBZ-MNiSW-06/1/2007), dotyczącego środowiskowych i ekonomicznych aspektów dopuszczenia uprawy roślin zmodyfikowanych genetycznie w Polsce.

#### **Abstract PhD thesis:**

#### **“Analysis of the Cry1Ab protein content in MON 810 maize and its decay in the environment, as a part of the risk research of GMOs”**

To obtain the degree of PhD in agricultural sciences, field of knowledge of Agricultural Science,  
discipline: agronomy

*Dissertation supervisor: Associate Professor Janusz Zimny,  
auxiliary supervisor: Anna Linkiewicz PhD*

Genetically modified (GM) MON810 maize, approved for cultivation in the European Union, expresses a *cry1Ab* gene, responsible for synthesis of Cry1Ab protein, which is derived from soil bacterium *Bacillus thuringiensis*. The Cry1Ab protein can be introduced into soil as a result of the MON810 cultivation, during the growing season (with root exudates and pollen deposits) and as post-harvest plant residues, as well as via application of Bt

biopesticides- (e.g. DiPel WG) containing spores of *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*. Cry1Ab protein can have adverse impact on non-target species, therefore it is very important to assess its concentration, persistence and possible accumulation in soil.

This work defined, using standardized and validated ELISA methods (immunoenzymatic test), the concentration of protein in the transgenic maize MON810 variety DKC 3421 YG and in the soil after 3 and 4 years of cultivation. The persistence of Cry1Ab in the soil was also examined under controlled conditions, and the influence of select factors on this process was determined.

Two protein quality assessment ELISA kits (QualiPlate Cry1Ab/Cry1Ac, Envirologix and Agdia Bt- Cry1Ab/1Ac) were compared with two available protein standards (Fitzgerald Industries International and Agdia, Inc.). The Agdia standard appeared to be more universal, consistently showing lower differences in the OD value between the tested kits than the standard from Fitzgerald Ind.

The Cry1Ab concentration in MON810 maize was determined at 3 different growth stages: BBCH 39 – stem elongation, BBCH 65 – flowering, and BBCH 79 – milk stage, from 3 field trials located in Poland in the years 2009 and 2010. The highest concentration of the transgenic protein was observed in the leaves: the upper leaf (13.23–29.43  $\mu\text{g/g}$ ) and the lower leaf (8.94–35.90  $\mu\text{g/g}$ ). Significantly less Cry1Ab was observed in roots (1.52 –4.14  $\mu\text{g/g}$ ), stem (1.22–3.84  $\mu\text{g/g}$ ), pollen (1.27–2.59  $\mu\text{g/g}$ ) and grain (0.72–2.58  $\mu\text{g/g}$ ). Positive correlation between the concentration of the total nitrogen and transgenic protein in the leaves was observed.

For detection and quantification of Cry1Ab in the soil matrix, the assay was validated according to the criteria set forth by the European Commission Decision 2002/657/EC. This method enabled the quantification of the Cry1Ab protein depending on the protein source and soil type and the decision limit ( $CC\alpha$ ) was set at 1–2 ng Cry1Ab/g of soil and the detection capability ( $CC\beta$ ) at 1.88–5.23 ng Cry1Ab/g of soil.

The impact of microorganisms' activity, temperature and the pH on the degradation of bacterial (DiPel WG, Bayer Crop Science) and the plant Cry1Ab (MON810 leaves) in two soil types was assessed under controlled conditions. A positive correlation was shown between soil microorganisms' activity, the increase of incubation temperature (15°C) and soil acidity (pH 5) on the degradation of Cry1Ab in the soil.

The Shift-log model used to assess the degradation dynamics of the Cry1Ab protein in the soil showed that protein degradation is non-linear, with a two-stage pattern: the rapid degradation of plant Cry1Ab protein in the first 10 days is followed by a slowdown. The protein remained in the soil at a very low level till the 28th day. The results have shown no

accumulation of the Cry1Ab protein in the soil after three and four year cultivation of MON810 maize.

The conducted research described herein was an element of a project (PBZ-MNiSW-06/1/2007) on the environmental and economic aspects of the approval of the genetically modified crops in Poland.

*mgr inż. Ewelina Żmijewska*