



Stefanie Reim

Institut für Züchtungsforschung an Gartenbaulichen Kulturen und Obst

Beiträge zur Bewertung der Umweltverträglichkeit gentechnisch veränderter Apfelgehölze



Kontakt:
Stefanie Reim
Julius Kühn-Institut (JKI)
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst (ZGO)
Pillnitzer Platz 3a
01326 Dresden

Die Schriftenreihe „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ veröffentlicht Doktorarbeiten, die in enger Zusammenarbeit mit Universitäten an Instituten des Julius Kühn-Instituts entstanden sind

Der Vertrieb dieser Monographien erfolgt über den Buchhandel (Nachweis im Verzeichnis lieferbarer Bücher - VLB) und OPEN ACCESS im Internetangebot www.jki.bund.de Bereich Veröffentlichungen.

Wir unterstützen den offenen Zugang zu wissenschaftlichem Wissen.
Die Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut erscheinen daher OPEN ACCESS.
Alle Ausgaben stehen kostenfrei im Internet zur Verfügung:
<http://www.jki.bund.de> Bereich Veröffentlichungen

We advocate open access to scientific knowledge. Dissertations from the Julius Kühn-Institut are therefore published open access. All issues are available free of charge under <http://www.jki.bund.de> (see Publications).

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation
In der Deutschen Nationalbibliografie: detaillierte bibliografische
Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

ISBN 978-3-930037-49-0

Herausgeber / Editor

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, Deutschland
Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany

© Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen sowie der genannten Universität, 2008.

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersendung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf fotomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten.

Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
der
Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg

Beiträge zur Bewertung der Umweltverträglichkeit gentechnisch veränderter Apfelgehölze

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor agriculturarum (Dr. agr.)

vorgelegt von
Diplomagraringenieurin Stefanie Reim
geb. 05.07.1974

Gutachter: Prof. Dr. habil. W. Eberhardt Weber
Dr. habil. Viola Hanke
Prof. Dr. habil. Andreas Graner

Verteidigung am: 20. Oktober 2008

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Stand des Wissens	4
2.1.	Herkunft und Bedeutung des Apfels	4
2.2.	Grundlagen der Apfelzüchtung	5
2.3.	Möglichkeiten der unkontrollierten Ausbreitung von Fremdgenen	8
2.4.	Bestimmung des vertikalen Gentransfers bei gentechnisch veränderten Pflanzen	9
2.4.1.	Befruchtungsbiologische Einflüsse	9
2.4.2.	Möglichkeit der Auskreuzung durch Hybridisierung	11
2.4.3.	Versuchsansätze zur Bestimmung von Auskreuzungsdistanzen	12
2.4.3.1.	Morphologische Marker bei <i>Malus</i>	13
2.4.3.2.	Mikrosatelliten-Marker bei <i>Malus</i>	15
2.4.4.	Möglichkeiten der Vermeidung von Auskreuzungen	15
2.4.4.1.	Verhinderung des Pollentransfers	15
2.4.4.2.	Verhinderung der Verbreitung von Samen	16
2.5.	Stabilität von Transgenen.....	18
2.5.1.	Transkriptionelles gene silencing (TGS).....	19
2.5.2.	Posttranskriptionelles gene silencing (PTGS).....	20
2.5.3.	Verlust des transgenen Merkmals durch Sequenzverlust oder – änderung.....	22
2.6.	Transport von Genprodukten.....	24
3.	Material und Methoden	27
3.1.	Pflanzenmaterial	27
3.1.1.	Versuchsfeld und Pollenfänger- und Pollenspenderpflanzen für die Bestimmung der Auskreuzungsrate von Apfelpollen	27
3.1.2.	Transgene In-vitro Pflanzen	29
3.2.	Verwendete Agrobakteriumstämme und Vektoren	34

3.3.	Methoden	35
3.3.1.	Vermehrung und Bewurzelung von In-vitro Pflanzen	35
3.3.2.	Stratifizierung von Apfelsamen und Anzucht von Apfelpflanzen im Gewächshaus	36
3.3.3.	Befruchtungsbiologische Untersuchungen	36
3.3.4.	Untersuchungen zum Windtransport von Apfelpollen	37
3.3.5.	Bonitur der Sämlinge aus den Kreuzungen und den freien Abblüten.....	37
3.3.6.	DNA Isolierung aus Blattmaterial.....	38
3.3.7.	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	38
3.3.8.	RNA Isolierung.....	39
3.3.9.	Restriktionsverdau von DNA	39
3.3.10.	PCR basierende Methoden	39
3.3.10.1.	Mikrosatelliten-Analyse	39
3.3.10.2.	Amplifikation von Gensequenzen	40
3.3.10.3.	Markierung der Sonden-DNA	40
3.3.10.4.	RT- PCR	40
3.3.11.	Elektrophorese.....	40
3.3.11.1.	Agarosegel-Elektrophorese	40
3.3.11.2.	Polyacrylamidgel-Elektrophorese	41
3.3.12.	Southern-Blot-Analysen	41
3.3.13.	Methylierungsuntersuchungen	42
3.3.14.	ELISA-Test.....	42
3.3.15.	GUS-Test.....	43
3.3.16.	Western-Blot-Analysen.....	44
4.	Ergebnisse.....	46
4.1.	Potentielles Auskreuzungsverhalten beim Apfel.....	46
4.1.1.	Untersuchungen zur Vitalität und Keimfähigkeit des Pollens von ,TNR 31-35'.....	46

4.1.2.	Untersuchung zur sexuellen Kompatibilität.....	47
4.1.3.	Untersuchung der Transportdistanzen von Apfelpollen durch Wind.....	50
4.1.4.	Bestimmung spezifischer SSR-Marker für die Identifizierung des Pollenspenders ‚TNR 31-35‘	51
4.1.5.	Phänotypische Evaluierung von Sämlingen aus künstlicher Bestäubung	53
4.1.6.	Genotypische Evaluierung grünlaubiger Sämlinge aus der Kreuzung von ‚TNR 31-35‘ mit verschiedenen Pollenfängersorten.....	55
4.1.7.	Phänotypische Bonitur von Sämlingen aus freier Abblüte	55
4.1.8.	Genotypische Evaluierung der Sämlinge aus freier Abblüte	59
4.2.	Stabilität der Integration und Expression der T-DNA	59
4.2.1.	Transgene Linien mit dem pLDB15-Konstrukt	60
4.2.2.	Transgene Linien mit dem p35SAMVT4-Konstrukt.....	61
4.2.3.	Transgene Linien mit dem pBinAtt35SAMVT4-Konstrukt	64
4.2.4.	Transgene Linien mit dem pBINAR19-Konstrukt	65
4.3.	Untersuchungen zum Transport von Transgenprodukten zwischen Veredelungspartnern beim Apfel	71
5.	Diskussion.....	75
5.1.	Vertikaler Gentransfer	75
5.1.1.	Versuchsanlage, befruchtungsbiologische Untersuchungen und Stichprobennahme	75
5.1.2.	Bestimmung des vertikalen Gentransfers mittels morphologischer und molekularer Marker	78
5.1.3.	Bestimmung der Auskreuzungsfrequenz.....	81
5.2.	Stabilität der Integration und Expression von Transgenen bei Apfel.....	84
5.2.1.	Stabilität der Integration der T-DNA.....	84
5.2.2.	Stabilität der Expression auf Transkriptions- und Translationsebene.....	89
5.2.3.	Transport von Transgenprodukten innerhalb veredelter Apfelgehölze	92

6.	Zusammenfassung.....	95
6.	Summary.....	98
7.	Literaturverzeichnis	101
8.	Anhang.....	120
8.1.	Abbildungsverzeichnis.....	120
8.2.	Tabellenverzeichnis	121
8.3.	Verzeichnis der Abbildung im Anhang.....	122
8.4.	Verzeichnis der Tabellen im Anhang	122
8.5.	Abbildungen im Anhang	123
8.6.	Tabellen im Anhang	127
8.7.	Verwendete Puffer und Chemikalien	149
8.8.	Abkürzungsverzeichnis	151

1. Einleitung

Der Apfel (*Maus x domestica* Borkh.) gehört neben verschiedenen Zitrusarten, Tafeltrauben und der Bananen zu den wichtigsten Obstarten weltweit und ist die wichtigste Obstart der gemäßigten Klimazone. Seine züchterische Bearbeitung reicht bis in das Mittelalter zurück. Bereits im 16. Jahrhundert waren Apfelsorten wie z.B. ‚Goldparmäne‘, ‚Weißer Winterkalvill‘, ‚Königlicher Krummstiel‘ und ‚Backapfel‘ bekannt (Höfer, 2006). Bis zum 18. Jahrhundert war die Apfelerzeugung durch bäuerlichen Obstbau geprägt und diente vorwiegend der Eigenversorgung. Durch den gesteigerten Obstbedarf erlebte die Apfelerzeugung mit Beginn des 19. Jahrhunderts einen starken Aufschwung. Dadurch sind zahlreiche Apfelsorten mit immer besseren Fruchtqualitätsmerkmalen entstanden (Höfer, 2006).

In der Apfelerzeugung spielen neben der Fruchtqualität Eigenschaften, wie Ertragshöhe und -sicherheit, Lagerfähigkeit und die Resistenz gegenüber Krankheitserregern eine wichtige Rolle. Für die Realisierung dieser Zuchtziele wird in der klassischen Züchtung die Kombinationszüchtung angewendet. Dabei werden ausgewählte Muttersorten mit dem Pollen ausgewählter Vatersorten bestäubt. Durch diese gezielten Kreuzungen sollen die gewünschten Eigenschaften der Elternsorten in einer Nachkommenschaft kombiniert werden. Da sich mit einer Kreuzung nicht alle Ziele gleichzeitig erreichen lassen, sind in der Regel zusätzliche Rückkreuzungen erforderlich. Die Vererbung der Eigenschaften erfolgt dabei zufällig auf die Nachkommen, so dass eine umfassende und stufenweise Auslese innerhalb der Nachkommenschaft notwendig ist. Aufgrund dieser langjährigen Selektion, der langen Generationszeiten des Apfels, der aufwändigen Rückkreuzungsprogramme und Anbauversuche kann die Entwicklung einer neuen Apfelsorte leicht 20 Jahre und mehr betragen.

Durch die Entwicklung der gentechnischen Methoden besteht die Möglichkeit die klassische Züchtung effektiver zu gestalten. Im Rahmen dieser Techniken wurde die markergestützte Selektion entwickelt. Diese erlaubt die frühzeitige Selektion geeigneter Nachkommen, da gewünschte genetische Eigenschaften schon bei Sämlingen identifiziert werden können. Damit kann der Züchtungsaufwand erheblich verkürzt werden. Weiterhin bieten gentechnische Methoden die Möglichkeit der gezielten Integration von einzelnen Genen in eine Sorte, so dass die sortentypischen Merkmale nicht verändert werden. Auf die wechselnde Anforderung des Obstbaus kann damit schneller reagiert werden, ohne einen langwierigen Züchtungsprozess zu durchlaufen. Bereits seit Ende der 1980er Jahre werden viele Anstrengungen unternommen Obstsorten gentechnisch zu verändern. Seit den frühen 1990er Jahren wurden weltweit

53 Freisetzungsversuche mit transgenen Apfelpflanzen durchgeführt¹. Bislang werden jedoch noch keine gentechnisch veränderten Obstsorten kommerziell genutzt (Petri und Burgos, 2005). Beim Apfel liegt das besondere Augenmerk der gentechnischen Veränderung auf einer Erhöhung der Resistenzeigenschaften gegenüber bakteriellen und pilzlichen Schaderregern, wie Feuerbrand, Mehltau und Schorf.

Neben der kommerziellen Nutzbarkeit von gentechnisch veränderten Pflanzen ist auch die Beurteilung der ökologischen Auswirkungen ein wichtiger Forschungsaspekt. Dabei wird unter anderem bei einer Freisetzung die Verbreitung von transgenem Erbgut durch Auskreuzung untersucht. Voraussetzung für eine Hybridisierung ist das Vorhandensein geeigneter Kreuzungspartner. Beim Apfel wird die Wahrscheinlichkeit einer Auskreuzung als hoch eingeschätzt, da mit anderen Kulturapfelsorten und verwandten Wildarten geeignete Kreuzungspartner zur Verfügung stehen. Weiterhin handelt es sich bei dem Apfel um einen Fremdbefruchter, wobei die Bestäubung durch Insekten erfolgt. Aus diesem Grund ist mit einer hohen Auskreuzungswahrscheinlichkeit zu rechnen. Für die Fortpflanzung des Apfels spielt der vertikale Gentransfer eine untergeordnete Rolle, da Apfelsorten nicht durch Kreuzung, sondern vegetativ durch die Veredelung von Reisern auf eine Unterlage vermehrt werden.

Eine wichtige Voraussetzung für die Nutzung von gentechnisch veränderten Pflanzen ist die Stabilität der Integration und Expression der transformierten Gene. Verschiedene Studien an transgenen Gehölzen berichten über eine Instabilität des transgenen Merkmals im Laufe der Pflanzenentwicklung (Hönicka und Fladung, 2006). Vor allem während der Gewächshaus- und Freilandkultivierung gibt es keinen Selektionsdruck für das Marker- oder Zielgen, so dass Instabilitäten unerkannt bleiben (Flachowsky et al., 2008). Im Rahmen von biologischen Sicherheitsmaßnahmen kann die Stabilität eines transgenen Merkmals jedoch von großer Bedeutung sein, wenn z.B. die Auskreuzung durch eine gentechnische Veränderung der betreffenden Pflanze verhindert wird. Dabei werden beispielsweise ‚Sterilitätsgene‘ in die Pflanze integriert, die zu einer männlicher Sterilität oder Parthenokarpie führen (Fladung, 2006). Durch diese gentechnische Veränderung soll eine Hybridisierung zwischen transgenen und nicht transgenen Pflanzen verhindert werden. Wird dieses Gen jedoch instabil und wird stillgelegt, kann es zu einer Auskreuzung kommen. Aufgrund der Langlebigkeit von Gehölzen ist die Wahrscheinlichkeit von Schwankungen in der Transgenexpression größer als bei einjährigen Kulturarten. Die Stabilität des transgenen Merkmals stellt deshalb einen wichtigen Schwerpunkt innerhalb der Sicherheitsforschung dar.

¹ <http://www.transgen.de/datenbank/pflanzen/18.apfel.html>; Stand: Februar 2008

Wie bereits erwähnt werden Apfelsorten nicht durch Hybridisierung zweier Elternsorten vermehrt, sondern vegetativ. Dabei werden von einer Muttersorte Reiser geschnitten, die auf Unterlagen veredelt werden. Es stellt sich die Frage, ob es zu einem Transport von Transgenprodukten über die Veredelungsstelle kommen kann. Für die Sicherheitsforschung ist diese Fragestellung von Bedeutung, da möglicherweise das Auskreuzungsrisiko durch die Kombination von transgenen und nicht transgenen Veredelungskomponenten verringert werden könnte. Im Falle eines Transports von Transgenprodukten über die Veredelungsstelle wäre es beispielsweise möglich die Resistenz eines Apfelbaumes durch den Einsatz einer Resistenz bringenden, gentechnisch veränderten Unterlage zu erhöhen. Das Transgenprodukt würde im nicht transgenen Edelreis wirken, da es aus der Unterlage transportiert würde. Da das Edelreis selbst nicht gentechnisch verändert ist, wäre das Risiko einer Auskreuzung nicht gegeben. Dagegen würden im Falle eines Verbleibs des Transgenprodukts in der gentechnisch veränderten Unterlage andere Bedenken entfallen. Beispielsweise wäre das Risiko, dass das Transgenprodukt in die Früchte gelangt, gering. Bedenken von Verbrauchern über den Konsum von transgenen Lebensmitteln würden sich damit erübrigen.

Zu diesem Zeitpunkt ist der Wissensstand über das Auskreuzungsverhalten und der Stabilität von Transgenen beim Apfel gering. Auch gibt es keine Kenntnisse über den Transport von Transgenen bzw. Transgenprodukten in Apfelgehölzen. Daher besteht in diesen Bereichen ein erhöhter Forschungsbedarf. Diese Arbeit wurde im Rahmen der biologischen Sicherheitsforschung durchgeführt und soll einen Beitrag zur Bewertung der Umweltverträglichkeit gentechnisch veränderter Apfelgehölze leisten. Mit den Untersuchungen sollte zum einen das potentielle Risiko der Übertragung von Genen durch transgenen Pollen auf nicht transgene Apfelgehölze bestimmt werden. Ziel war es die Auskreuzungsrate eines Apfelgenotyps auf umliegende Apfelsorten in Abhängigkeit von der räumlichen Entfernung abzuschätzen. Zum anderen sollten gentechnisch veränderte Apfelpflanzen nach der Phase der In-vitro-Kultur im Gewächshaus als unveredelte und veredelte Ex-vitro Pflanzen hinsichtlich der Stabilität der Integration und Expression der Zielgene geprüft werden. Weiterhin sollte ein möglicher Transport von Transgenprodukten innerhalb des veredelten Apfelgehölzes untersucht werden.

2. Stand des Wissens

2.1. Herkunft und Bedeutung des Apfels

Taxonomisch wird der europäische Kulturapfel (*Malus x domestica* Borkh.) in die Familie der *Rosaceae* eingeordnet. Die ersten Formen des Apfels entstanden vor ca. 70 bis 65 Millionen Jahren. Aus diesen Formen entwickelten sich dann vor etwa 2 Millionen Jahren die heutigen Apfelwildarten. Zu diesen gehören z. B. *Malus fusca* (Raf.) Schneid. oder *Malus coronaria* (L.) Mill., welche heute in Nordamerika beheimatet sind. Andere Wildarten wie *Malus sieboldii* Sieb., *Malus hupehensis* Pamp., *Malus sieversii* Ledeb. und *Malus baccata* (L.) Moench sind in Zentral- und Ostasien, insbesondere in China und im Himalaja verbreitet (Kutzelnigg und Silbereisen, 1994; Zhou, 1999). Dabei ist China eines der größten Ursprungszentren mit der höchsten genetischen Diversität der Gattung *Malus* (Jiang, 1986; Li, 1989; Zhou, 1999). In Europa sind die Wildarten *M. sylvestris* Mill., *M. x purpurea*, *M. baccata* (L.) und *M. floribunda* zu finden (Stace, 1991). Dabei ist vor allem die Wildapfelart *Malus sylvestris* Mill. mit seinen Subspezies verbreitet. Diese ist wahrscheinlich schon seit der mittleren Steinzeit (ca. 5000 v. Chr.) in Europa heimisch. *M. sylvestris* kommt mit Ausnahme der nördlichsten und südlichsten Regionen in ganz Europa vor. Als Halbschattenpflanze wächst *M. sylvestris* vorwiegend an Waldrändern oder lichten Mischwäldern und ist häufig in warmen Tieflagen anzutreffen. Die natürliche Hybridisierung zwischen *M. sylvestris* und den Sorten des domestizierten Apfels in den vergangenen 1000 Jahren macht die Identifizierung von *M. sylvestris* sehr schwierig (Coart et al., 2006; Wagner und Weeden, 2000).

Die Urformen der heutigen Kulturäpfel finden sich zwischen Kaukasus und Turkestan. In diesen Gebieten wurde von Vavilov (1930) eine große Variation an *Malus*-Arten entdeckt, die für die Menschen wertvolle Eigenschaften besitzen. Von dort aus wurden sie wahrscheinlich durch indogermanische und eurasische Völker verbreitet (Kutzelnigg und Silbereisen, 1994). Die heute in Europa, Asien und Nordamerika vorkommende Gattung *Malus* Mill. umfasst je nach Definition des Artbegriffs etwa 25 bis 52 heimische Arten (Kutzelnigg und Silbereisen, 1994).

Welche Wildart an der Entstehung des Kulturapfels (*Malus x domestica* Borkh.) hauptsächlich beteiligt war, ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. In den meisten Theorien wird *Malus sieversii* (Ledeb.) Roem. als hauptsächlicher Vater des heutigen Kulturapfels angesehen (Forte et al., 2002; Geibel et al., 2000; Harris et al., 2002; Robinson et al., 2001; Zhou und Li, 2000). Die in Europa einheimische Apfelwildart *Malus sylvestris* (L.) Mill. soll dagegen nichts oder wenig zur Domestizierung des

Apfels beigetragen haben (Ponomarenko, 1987; Robinson et al., 2001). Neue Untersuchungen zum Ursprung des Kulturapfels, die an Chloroplasten DNA durchgeführt wurden, zeigen jedoch, dass *M. sylvestris* (L.) Mill. sehr viel näher mit *M. domestica* Borkh. verwandt ist als bisher gedacht (Coart et al., 2006).

In den letzten Jahren hat sich der Apfel nach Zitrusfrüchten und Bananen zu einer der bedeutendsten Obstarten entwickelt. Weltweit beträgt die Apfelproduktion 63,8Mio.t, wobei 26Mio.t allein in China produziert werden². Damit ist China der größte Apfelproduzent. In der Europäischen Union (EU) lag die Produktion im Jahr 2006 bei rund 15Mio.t. Dabei hat Polen mit 2,3Mio.t, gefolgt von Italien (2,1Mio.t) und Frankreich (1,7Mio.t) den größten Anteil. Deutschland steht mit einer Produktionsmenge von 0,9Mio.t an vierter Stelle². Innerhalb Deutschlands gehört der Apfel zu den wichtigsten Früchten im Marktopstbau. Der jährliche Pro-Kopf-Verbrauch liegt hier bei etwa 20kg. Die Anbaufläche umfasst rund 70.000ha bei einem durchschnittlichen Ertrag von 227,4dt/ha².

Weltweit sind heute über 20.000 Apfelsorten bekannt. Davon sind rund 1.600 Sorten in Europa vertreten. Im Intensivobstbau haben zurzeit nur etwa 20 Apfelsorten eine wirtschaftliche Bedeutung. Die Direktvermarktung erhöht das Sortenspektrum etwas, wobei auch alte Sorten, wie z. B. ‚James Grieve‘ (1880) und ‚Gravensteiner‘ (1669) angebaut werden (Höfer, 2006).

2.2. Grundlagen der Apfelzüchtung

Die Anfänge der Apfelzüchtung reichen bis in das 3. Jahrhundert v. Chr. zurück. Durch die Selektion und Vermehrung von Apfelgenotypen mit besonderen Eigenschaften, wie Geschmack und Fruchtgröße, gab es bereits im antiken Griechenland und in Rom erste Apfelsorten. Mit der Ausbreitung des Christentums wurde der Obstbau besonders durch die Klöster gefördert. Im späten Mittelalter erzwangen die Adelshäuser per Gesetz den Anbau und die Pflege umfangreicher Obstpflanzungen. Durch die Verbreitung der ersten Schriften über obstbauliche Maßnahmen durch Christ und Diel (zitiert bei Friedrich, 1993) erlebte der Obstbau in Europa gegen Ende des 18. Jahrhunderts einen starken Aufschwung. Seit dem 19. Jahrhundert wurden gezielte Kreuzungen durchgeführt. Eine systematische Züchtung gibt es aber erst seit Beginn des 20. Jahrhunderts. Dabei wurden erstmals neben Geschmack und Größe der Früchte, auch Zuchtziele wie die Verbesserung der Wachstumseigenschaften und die Erhöhung von Krankheitsresistenzen verfolgt (Silbereisen et al., 1996). Bis heute hat

² Quelle: Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), Stand: 2006

sich das Spektrum der anzustrebenden Eigenschaften stark erweitert und beinhaltet eine an die Vermarktung angepasste Kombination aus Fruchtqualität, Ertrag und Resistenz (Fischer, 2002). Im Rahmen einer gezielten Resistenzzüchtung soll die Widerstandsfähigkeit des Apfels gegen pilzliche, bakterielle und tierische Schaderreger erhöht werden. Dabei zählen der Apfelmehltau (*Podosphaera leucotricha*) und der Apfelschorf (*Venturia inaequalis*) zu den bedeutendsten pilzlichen Erregern. Bei den bakteriellen Krankheiten gewinnt zunehmend der Feuerbrand (*Erwinia amylovora*) in Deutschland an Bedeutung. Bei den tierischen Schaderregern spielen vor allem die grüne Apfellaus (*Aphis pomi*), die Blutlaus (*Erisoma lanigerum*) und der Apfelwickler (*Carpocapsa pomonella*) eine Rolle. Die Züchtung von resistenten Sorten hat das Ziel zukünftig einen Anbau mit deutlich reduziertem Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln zu ermöglichen.

In der klassischen Apfelzüchtung wird vor allem die sogenannte Kombinationszüchtung angewendet. Dabei findet eine gezielte Bestäubung ausgewählter Muttersorten mit dem Pollen von Vatersorten statt. Auf diese Weise sollen die Eigenschaften beider Eltern kombiniert werden. Für die Erhöhung der Resistenzeigenschaften von Apfelsorten werden diese oftmals mit Wildarten gekreuzt. Durch die hohe Heterozygotie des Apfels gibt es innerhalb der Nachkommenschaft eine große genetische Variation. Innerhalb dieser Variation werden die Nachkommen selektiert die dem Zuchtziel entsprechen. Anschließend erfolgen mehrere Rückkreuzungen dieser Nachkommen mit qualitativ hochwertigen Sorten. Dabei sollen eingekreuzte negative Eigenschaften nach und nach wieder verdrängt werden. Durch das hohe Maß der Heterozygotie und die lange Generationszeit des Apfels dauert die Züchtung einer neuen Apfelsorte auf diesem Wege 20 Jahre und mehr (Fischer, 1995).

Demgegenüber bietet der Einsatz von gentechnischen Methoden eine Möglichkeit den Züchtungsprozess zu beschleunigen. Beim Apfel sind die konventionellen Züchtungsmethoden durch den langen Reproduktionszyklus und die lange juvenile Phase, die bis zu zehn Jahren dauern kann, sehr zeit- und arbeitsaufwändig. Durch die Entwicklung von molekularen Markern kann die Kreuzungsnachkommenschaft frühzeitig anhand von Markern, die mit den gewünschten genetischen Eigenschaften gekoppelt sind, selektiert werden. Die Anzahl der Nachkommen wird in einem frühen Entwicklungsstadium verringert, wodurch Kosten, Zeit- und Arbeitsaufwand im Züchtungsprozess wesentlich gesenkt werden können. Gentechnische Methoden bieten weiterhin die Möglichkeit gezielt einzelne oder wenige Gene in eine vorhandene Sorte zu integrieren. Dabei werden die sortentypischen Eigenschaften nicht verändert. Bei dieser Methodik können sowohl arteigene wie auch artfremde Gene in den

betreffenden Organismus eingefügt werden. Durch den Einsatz von gentechnischen Methoden erhofft man sich schneller auf die wechselnden Anforderungen des Obstbaus reagieren zu können ohne den langwierigen Zuchtprozess durchlaufen zu müssen.

Die ersten Experimente zu gentechnischen Veränderungen beim Apfel wurden von James et al. (1989) durchgeführt. Seitdem folgte eine Reihe von Arbeiten mit unterschiedlichen Zielstellungen. Die drei wesentlichen Ziele bei der Entwicklung von transgenen Apfelpflanzen sind dabei Veränderungen der Anbau- und Produkteigenschaften und der Pflanzenentwicklung. Die Verbesserung der Produkteigenschaften beschäftigt sich im Wesentlichen mit einem veränderten Gehalt an Fruchtzucker und –alkoholen. In einigen Ländern wird auch an einem transgenen Apfel geforscht, der für Allergiker verträglich ist³. Im Rahmen der Pflanzenentwicklung wird zum Beispiel an männlicher Sterilität und Parthenokarpie gearbeitet³. Mit diesen Sterilitätskonzepten soll eine Auskreuzung von gentechnisch verändertem Erbgut verhindert werden (vgl. Kapitel 2.4.4). Die meisten Experimente zur Verbesserung der Anbaueigenschaften beschäftigen sich mit der Erhöhung der Pilz-, Bakterien- und Insektenresistenz. Ein Beispiel für die Erhöhung der Resistenz gegenüber Pilz-erkrankungen ist die Übertragung von Genen aus *Trichoderma harzianum*. Diese Gene kodieren für Chitinasen, welche die Zellwände von pilzlichen Erregern abbauen. Weiterhin wird besonders intensiv an der Verbesserung der Resistenz gegenüber Feuerbrand (*Erwinia amylovora*) gearbeitet. Diese Krankheit hat sich in den letzten 30 Jahren in Europa stark verbreitet und ist hoch infektiös. Eine Bekämpfung mit Pflanzenschutzmitteln ist in Deutschland nur eingeschränkt möglich, da ihr Einsatz nur mit Auflagen erlaubt ist. In ersten gentechnischen Arbeiten zur Erhöhung der Resistenz gegenüber dem Feuerbrand wurden vor allem antibakteriell wirkende Gene der großen Seidenraupenmotte *Hyalophora cecropia* und des Bakteriophagen T4 übertragen (Ko et al., 1997). Darüber hinaus wurde ein Gen für Depolymerase aus dem Bakteriophagen Φ Ea 1h verwendet (Kim und Geider, 2000; Kim et al., 2004). Für die Erhöhung der Insektenresistenz wurde das Bt-Gen aus *Bacillus thuringiensis* in den Apfel übertragen.

Bisher wurden gentechnisch veränderte Apfelpflanzen in weltweit 53 Freisetzungsversuchen getestet. Allein 44 Freisetzungen fallen davon auf die USA. In Europa gab es bereits neun Freisetzungen von gentechnisch veränderten Apfelpflanzen, die alle

³ Quelle: <http://www.transgen.de/datenbank/pflanzen/18.apfel.html> Stand: März 2008

außerhalb von Deutschland durchgeführt wurden⁴. Keine der transgenen Apfelsorten hat es bislang bis zur Markteinführung geschafft. Mit der Zunahme von gentechnisch veränderten Apfelpflanzen und der damit verbundenen steigenden Anzahl von Freisetzungen ist es notwendig geworden, eine umfassende Begleitforschung durchzuführen.

2.3. Möglichkeiten der unkontrollierten Ausbreitung von Fremdgenen

Ein Schwerpunkt der Risikoforschung liegt in der Untersuchung einer möglichen Übertragung von gentechnisch verändertem Erbgut transgener Pflanzen auf nicht transgene Organismen. Bei der Übertragung wird zwischen horizontalen und vertikalen Gentransfer unterschieden. Erfolgt der Gentransfer auf asexuellem Wege spricht man von horizontalem Gentransfer. Ein Beispiel für einen horizontalen Gentransfer ist die Übertragung von Genen aus Pflanzen auf Bakterien bzw. Pilze (Schulte und Käppeli, 1996). Kommt es zu einer Übertragung von Transgenen auf Mikroorganismen besteht die Gefahr der unkontrollierten Ausbreitung. Dabei ist es unter Umständen möglich, dass Transgene von einem Mikroorganismus auf andere übertragen werden. Für eine Übertragung von Erbgut zwischen Mikroorganismen sind drei Mechanismen bekannt, die als Transduktion, Konjugation und Transformation bezeichnet werden. Die Transduktion beschreibt die Übertragung von DNA durch Bakteriophagen. Bei der Konjugation kommt es zu einer Genübertragung zwischen zwei Zellen infolge eines direkten Zellkontaktes. Die Transformation beschreibt die Aufnahme extrazellulärer DNA (Schütte et al., 2001). Dabei wird die Transferrate von günstigen Wachstumsbedingungen, einem hohen Anteil freier DNA im Boden, bzw. Wasser und einem hohen Anteil von Donor- und Rezeptorpflanzen begünstigt (Heidenreich, 1999). Bislang konnte die Aufnahme von Pflanzen-DNA durch Bakterien nur unter optimierten Laborbedingungen nachgewiesen werden (Gebhard und Smalla, 1998). Eine Integration von Pflanzen-DNA in das bakterielle Genom unter natürlichen Bedingungen konnte bislang noch nicht gezeigt werden. Ein Transfer ist jedoch nicht auszuschließen (Wackernagel und Lorenz, 1994).

⁴ Quelle: <http://www.transgen.de/datenbank/pflanzen/18.doku.html>; Stand: März 2008

2.4. Bestimmung des vertikalen Gentransfers bei gentechnisch veränderten Pflanzen

Als ‚vertikalen Gentransfer‘ oder ‚Auskreuzung‘ bezeichnet man die Übertragung eines Gens innerhalb der Art oder zwischen nah verwandten Arten über den natürlichen Mechanismus der sexuellen Reproduktion (Schütte et al., 2001). Dabei besteht die Befürchtung, dass sich nach Auskreuzung von transgenem Erbgut Hybride entwickeln, die sich dann unkontrolliert ausbreiten. Eine Ausbreitung ist durch Pollen oder Samen von Früchten transgener Pflanzen möglich. So ist es denkbar, dass während der Reife Äpfel zu Boden fallen und dort von Vögeln oder anderen Tieren verzehrt werden. Diese Tiere verbreiten dann die Kerne der Äpfel über ihren Kot. Diese Art der Ausbreitung kann jedoch regional in einem bewirtschafteten Obstbestand sehr gut kontrolliert werden. Schwieriger ist es die Ausbreitung von Fremdgenen durch Pollen zu kontrollieren.

2.4.1. Befruchtungsbiologische Einflüsse

Die Auskreuzungsdistanz ist unter anderem abhängig vom Befruchtungssystem. Bei den Befruchtungssystemen der Kulturpflanzen wird zwischen Selbst- und Fremdbefruchtung unterschieden. Als Selbstbefruchter werden Pflanzen mit einem Fremdbefruchtungsanteil unter 10% definiert. Beispiele für selbstbefruchtende Obstarten sind Pfirsich (*Prunus persica* (L.) Batsch), Quitte (*Cydonia oblonga* Mill.) und Aprikose (*Prunus armeniaca* L.). Bei selbstbefruchtenden Pflanzen sind Auskreuzungen zwar möglich, finden aber nur in einem geringen Maße statt (Schütte, 1998).

Fremdbefruchter sind auf die Befruchtung durch andere Genotypen angewiesen. Beispiele für fremdbefruchtende Obstarten sind Apfel (*Malus x domestica* Borkh.), Birne (*Pyrus communis* L.) und Süßkirsche (*Prunus avium* L.). Bei diesen Obstarten wird die Selbstbefruchtung aufgrund einer bestehenden Selbstinkompatibilität unterbunden. Dabei wird die Selbstbefruchtung durch sogenannte Selbstinkompatibilitätsgene verhindert. Bei allen heimischen Obstarten ist die Selbstinkompatibilität durch einen gametophytischen Mechanismus bedingt (Durka, 2002). Bei der gametophytischen Selbstinkompatibilität kommt es zunächst zu einem Eindringen des Pollenschlauchs in das Narben- und Griffelgewebe. Das weitere Wachstum des Pollenschlauchs in das Griffelgewebe wird jedoch durch die Aktivierung von RNAsen verhindert, wenn die S-Allele des Pollens und des Griffelgewebes

übereinstimmen. Beim Kulturapfel sind bisher 22-24 Selbstinkompatibilitäts-Allele (S-Allele) bekannt (Broothaerts, 2003).

Ein weiterer wichtiger Punkt zur Beurteilung des Auskreuzungsrisikos ist die Bestäubereignung des transgenen Genotyps. Diese kann beispielsweise durch eine bestehende Pollensterilität negativ beeinflusst sein. So gibt es verschiedene Apfelsorten, die einen schlecht keimfähigen und nicht befruchtungsfähigen Pollen entwickeln. Bei diesen Genotypen handelt es sich hauptsächlich um triploide Apfelsorten. Bei diesen Sorten kommt es während der meiotischen Zellteilung zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Chromosomen. Dies führt folglich zur Bildung von verkrüppelten Pollenkörner bzw. Antheren. Demgegenüber besitzen diploide Apfelsorten in der Regel die Fähigkeit zu einer guten Pollenbildung.

Neben dem Befruchtungstyp spielt auch die Art der Bestäubung eine wesentliche Rolle. Diese erfolgt durch Wind oder Insekten. Zu den windbestäubten Gehölzen zählen beispielweise Walnuss (*Juglans regia* L.), Haselnuss (*Corylus avellana* L.) und Birke (*Betula pendula* L.).

Beim Apfel erfolgt, wie bei den meisten Obstgehölzen, die Bestäubung durch Insekten. Aber auch ein Transport der Apfelpollen durch Wind ist möglich (Reim et al., 2006). Die Insektenbestäubung wird beim Apfel zu 90% durch Bienen realisiert. Sie kann aber auch durch Hummeln und Eulenfalter erfolgen. Über die Reichweite des Pollentransfers durch die Biene gibt es keine genauen Angaben (Zoglauer und Aurich, 2000). Es ist anzunehmen, dass dieser dem Flugradius bestäubender Bienen entspricht. Der Flugradius von Bienen beträgt maximal 10,9km (Seeley, 1995). Gewöhnlich ist der Futterflug der Biene auf ein Territorium mit einem Radius von 3-5m beschränkt. Die zurückgelegte Distanz kann aber in Abhängigkeit der Blütenmorphologie, Blütezeit, Blütendichte und der räumlichen Position der Blüten sowie der Anzahl der Bienen stark variieren (Dietzsch, 1982; Free, 1966; Mayer et al., 1989). Zur Pollenverbreitung in kommerziell genutzten Obstanlagen wurden viele Studien durchgeführt (Free, 1962; Free und Spencer-Booth, 1964; Kron et al., 2001a; Kron et al., 2001b; Wertheim, 1991). Anhand der Ergebnisse dieser Studien wurden die Menge und Verteilung der Pollenspenderpflanzen festgelegt, um optimale Bestäubungsergebnisse zu erzielen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Beurteilung des Auskreuzungsrisikos ist die Blütezeit. Eine Bestäubung zwischen zwei Genotypen ist nur bei einer annähernden Übereinstimmung der Blühzeiten möglich (Eastham und Sweet, 2002). Grundsätzlich lassen sich Apfelsorten nach ihrem Blühbeginn in vier Gruppen einteilen: früh blühend, mittelfrüh blühend, mittelspät blühend und spät blühend. Der Blühbeginn ist dabei sortentypisch fixiert. So gelten beispielsweise ‚Alkmene‘ und ‚Jonagold‘ als früh

blühend. Im Gegensatz dazu sind die Sorten ‚Rote Sternrenette‘ und ‚Morgenduff‘ als spät blühend einzuordnen (Fischer, 2001). Der Blühbeginn ist abhängig vom Witterungsverlauf, der Temperatur sowie der Sonneneinstrahlung. Er kann in unterschiedlichen Jahren für die einzelne Sorte bis zu 14 Tage schwanken. Je nach Blühbeginn und Witterungsverlauf beträgt die Blühdauer der Sorten zwischen 8 und 30 Tagen (Fischer, 2001). Dabei bleibt der Pollen bei Temperaturen über 10°C und bei einer Luftfeuchte unter 50% einige Tage bis Wochen lebensfähig.

2.4.2. Möglichkeit der Auskreuzung durch Hybridisierung

Unter einer Hybridisierung versteht man die Kreuzung zwischen zwei Genotypen innerhalb einer Art oder über Artgrenzen hinweg. Voraussetzung für eine Hybridisierung ist das Vorhandensein geeigneter Kreuzungspartner. Umfangreiche Untersuchungen zu potentiellen Kreuzungspartnern und eine Einschätzung des Risikos einer Hybridisierung mit Wildformen wurden an den meisten in Europa angebauten einjährigen Kulturpflanzenarten vorgenommen (Bartsch et al., 1993; Gerdemann-Knörk und Tegender, 1997; Neuroth, 1997). Für einen Teil der angebauten Kulturarten, wie beispielweise Mais (*Zea mays* L.), Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.), Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Gerste (*Hordeum vulgare* L.) wurde dabei das Auskreuzungsrisiko wegen fehlender verwandter Wildarten als Kreuzungspartner in Europa als gering eingestuft. Für die drei letztgenannten Kulturarten besteht auch ein geringes Auskreuzungsrisiko innerhalb der Kulturart. Bei anderen Kulturarten, wie beispielweise Raps (*Brassica napus* L.), Luzerne (*Medicago sativa* L.) oder Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.) ist dagegen sowohl innerhalb der Kulturart als auch auf verwandte Kulturarten mit einem mittleren bis hohem Auskreuzungsrisiko zu rechnen (Ammann et al., 1996; Bartsch et al., 2003; Eastham und Sweet, 2002; Mikkelsen et al., 1996).

Beim Apfel ist die Wahrscheinlichkeit zur Bildung von Hybriden als hoch einzustufen, da dieser als Fremdbefruchter nicht durch natürliche Kreuzungsbarrieren von anderen Kulturapfelarten getrennt ist (Ellstrand, 1992; Eastham und Sweet, 2002; Raybould und Gray, 1993). Es ist davon auszugehen, dass beim Apfel neben den Kulturapfelsorten auch Wildapfelarten als potentielle Kreuzungspartner in Frage kommen (Coart et al., 2003; Zhou und Li, 2000; Zohary und Hopf, 1994). Die Wildapfelart *M. sylvestris* ist in beinahe allen Teilen Deutschlands als potentieller Kreuzungspartner zu finden. Die Population ist jedoch oftmals klein und die Bäume verstreut (Coart et al., 2003, 2006). Gerade in diesen kleinen Populationen kann es durch das Fehlen eines kompatiblen Kreuzungspartners zu einer Unterdrückung der Hybridisierung innerhalb der Population

kommen, während die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzung mit dem Kulturapfel aus angrenzenden Habitaten steigt (Koopmann et al., 2007). Untersuchungen von Wild- und Kulturarten des Apfels mittels molekularer Marker weisen darauf hin, dass die interspezifische Hybridisierung mehr verbreitet ist, als bisher gedacht (Coart et al., 2006). Darüber hinaus ist die Bildung von Hybriden innerhalb eines Obstbaugebietes am wahrscheinlichsten, da sich dort die meisten potentiellen Kreuzungspartner befinden.

2.4.3. Versuchsansätze zur Bestimmung von Auskreuzungsdistanzen

Zur Bestimmung der Pollentransportdistanzen sind verschiedene experimentelle Ansätze möglich. Zum einen wäre ein rezeptorzentrierter Ansatz denkbar. Bei diesem Ansatz wird kein spezieller Pollendonor bestimmt. Die ausgewählten Rezeptorpflanzen besitzen ein homozygoten Markergen. Bei Nachkommen mit heterozygotem Markermerkmal wird von einer Bestäubung mit Pollen von Pflanzen ausgegangen, die sich außerhalb der Rezeptorpopulation befinden. Die Pollentransferdistanz ergibt sich aus dem Abstand zur nächstgelegenen Population (Schütte et al., 2001). Zum anderen ist ein donorzentrierter Ansatz möglich. Hier werden bestimmte Pflanzen als Pollenspender ausgewählt. Um die Spenderpflanzen werden in verschiedenen Abständen Fängerpflanzen bestimmt und deren Nachkommen untersucht. In diesem Ansatz besitzen die ausgewählten Donorpflanzen ein homozygoten Markergen, das nicht in den Fängerpflanzen vorhanden ist. Für die Bestimmung der Auskreuzungsdistanzen beim Apfel empfiehlt sich der Einsatz von ausgewählten Donorpflanzen. Beim rezeptorzentrierten Versuchsansatz könnte es problematisch sein eine geeignete Versuchsfläche zu finden. Da es sich beim Apfel um einen sehr heterozygoten Genotyp handelt, wäre die ausreichende Anzahl von Rezeptorpflanzen mit einem homozygoten Markergen ein begrenzender Faktor. Oftmals werden jedoch mit dem rezeptororientierten Ansatz höhere Pollentransportdistanzen ermittelt, als beim donorzentrierten Ansatz (Schütte, 1998).

Für einen Großteil der einjährigen Kulturpflanzen wurden die Auskreuzungsdistanzen bestimmt (Conner, 1994; Doney et al., 1990; Eastham und Sweet, 2002; Messeguer, 2001; Norris et al., 1999; Pellmann et al., 1998). Auch bei mehrjährigen Pflanzen, wie beispielsweise der Erdbeere (*Fragaria x ananassa*) und Himbeere (*Rubus idaeus* L.) wurden bereits erste Untersuchungen durchgeführt (Eastham und Sweet, 2002; Westmann et al., 2002). Für Gehölze erfolgten entsprechende Studien bisher vorwiegend an Waldbäumen, wie z.B. Kiefer (*Pinus elliotii* Engelm.), Fichte (*Picea*

glauca Moench) oder Pappel (*Populus* spp.) aber auch an Wein (*Vitis vinifera* L.) (Ellstrand und Hoffmann, 1990; Fuchs und Gonsalves, 2007; Hönicka und Fladung, 2006).

Die einfachste Methode zur Bestimmung der Auskreuzungsrate ist die Verwendung von Pflanzen mit einem Marker, der bei einer Weitergabe in die nächste Generation leicht nachverfolgbar ist (Eastham und Sweet, 2002). Geeignet dafür sind phänotypische, biochemische oder auch molekulare Marker. Als phänotypische Marker können beispielsweise Blattfarben oder Blattformen eingesetzt werden. So ist es möglich Tomatengenotypen mit gelben und grünen Blättern voneinander zu differenzieren (Hagemann, 1999). Die Unterscheidung von Genotypen bei Raps kann anhand der Form des Blattrandes erfolgen (Saure et al., 1999). Ein Beispiel für den Einsatz biochemischer Marker ist die Analyse der Hybridisierung zwischen dem Kulturmais (*Zea mays* L.) und der Wildart *Z. mays* ssp. *mexicana* L. mit Hilfe von Isoenzymmarkern (Blancas et al., 2002). Als molekulare Marker wurden vorwiegend Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLPs) und Simple Sequenz Repeats (SSRs) eingesetzt (Godoy und Jordano, 2001; Westmann et al., 2002). Auch ist der Einsatz von spezifischen Primern für unterschiedliche Allele bei der zu untersuchenden Art denkbar (Arriola und Ellstrand, 1996). Eine andere Möglichkeit für die Bestimmung des Auskreuzungsverhaltens ist der Einsatz von gentechnisch veränderten Pflanzen mit leicht nachweisbaren Reportergenen, wie z.B. β -Glucuronidase (GUS) oder das Gen für das Green Fluorescence Protein (GFP) (Hudson et al., 2001; Ottenschlager et al., 1999).

2.4.3.1. Morphologische Marker bei *Malus*

Unter dem Begriff ‚morphologische Marker‘ werden alle phänotypischen Eigenschaften zusammengefasst, mit denen sich Individuen einer Art voneinander unterscheiden lassen. Beim Apfel lassen sich nur wenige morphologische Eigenschaften als Marker einsetzen. Dazu gehört z.B. das Säulenwachstum. Dieses Merkmal wird durch ein dominantes Gen ‚Co‘ gesteuert und führt zu einer Verkürzung der Internodien (Lapins, 1976). Ein weiterer morphologischer Marker ist die Rotlaubigkeit. Dabei kommt es durch die Bildung von Anthocyanen zu einer roten bis blauen Färbung von Pflanzenteilen. Beispiele für rotlaubige Apfelwildarten sind *Malus x purpurea* (Barbier) Rehd., *M. cv. Baskatong* und *Malus sieversii* var. *sieversii* f. *niedzwetzkyana* Dieck.⁵ Die Wildart

⁵ Die Bezeichnung *Malus sieversii* var. *sieversii* f. *niedzwetzkyana* Dieck. ist seit 2006 gültig (Hanelt, 2006). Davor war die Bezeichnung *Malus pumila* var. *niedzwetzkyana* Dieck.

Malus sieversii var. *sieversii* f. *niedzwetzkyana* Dieck. hat ihren Ursprung in Kasachstan und zeichnet sich durch eine rosa-violette Färbung der Blätter, der Borke, des Holzes, der Blüten und der Früchte inklusive dem Fruchtfleisch aus (Dzhangaliev et al., 2001). Die Nachkommen von *Malus sieversii* var. *sieversii* f. *niedzwetzkyana* Dieck. zeigen schon als Sämlinge violette Keimblätter und bilden später rot-violette Blätter und Stängel aus.

Die Rotlaubigkeit wurde bereits mehrfach als morphologischer Marker zur Klärung unterschiedlicher Fragestellungen benutzt. So wurde bei der Erzeugung von apomiktischen Apfelpflanzen von UrRahman et al. (1997) die rotlaubige Apfelfildart *M. cv. Baskatong* als Selektionsmarker eingesetzt. Dabei wurde *M. cv. Baskatong* mit verschiedenen apomiktischen *Malus*-Spezies gekreuzt. Die grünlaubigen Nachkommen wurden herausselektiert, da unter ihnen apomiktische Apfelpflanzen vermutet wurden. Lespinasse und Godicheau (1980) benutzten bei der Erzeugung von haploiden Apfelpflanzen als Vater einen Hybriden der rotlaubigen Apfelfildart *Malus sieversii* var. *sieversii* f. *niedzwetzkyana* Dieck.. Nach Kreuzung mit einer grünlaubigen Apfelsorte wurden grünlaubige Nachkommen als potentiell haploide Apfelpflanzen herausselektiert.

Williams et al. (1979) setzten zur Untersuchung der Fertilität bei der künstlichen Bestäubung ebenfalls die rotlaubige Wildart *M. cv. Baskatong* ein. Nach künstlicher und natürlicher Bestäubung wurde die Fertilität anhand der Anzahl der rotlaubigen Nachkommen bestimmt. Zur Untersuchung der Pollenverbreitung innerhalb einer Obstanlage setzte Wertheim (1991) *M. cv. Baskatong* als Pollenspenderbaum ein. Nach freier Abblüte wurden Apfelkerne ausgewählter Pollenfängerpflanzen in unterschiedlichen Entfernungen zum Pollenspenderbaum geerntet und ausgesät. Anhand der Häufigkeit von rotlaubigen Sämlingen wurden der Abstand und die Verteilung von Pollenspenderbäumen zur Gewährleistung einer ausreichenden Bestäubung bestimmt.

Voraussetzung für die Verwendung von morphologischen Markern ist deren Vorhandensein in der Kulturart und ihre umweltunabhängige Ausprägung. Weiterhin muss die Vererbung des Merkmals bekannt sein. Sind diese Bedingungen erfüllt, sind morphologische Marker eine kosten- und arbeitssparende Alternative zu biochemischen oder molekularen Markersystemen.

2.4.3.2. Mikrosatelliten-Marker bei *Malus*

Neben den morphologischen Markern steht seit den letzten Jahren auch eine Vielzahl von molekularen Markern zur Verfügung. Dazu gehören unter anderem Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) und Simple Sequenz Repeat (SSR). SSR-Marker oder auch Mikrosatelliten genannt, sind DNA-Sequenzen, die aus einfachen Wiederholungen von 1-6bp großen Sequenzmotiven bestehen und über das gesamte Genom verteilt sein können (Weber und Wong, 1993). Sie zeichnen sich durch eine kodominante Vererbung und hohe Reproduzierbarkeit aus. Weiterhin besitzen sie einen hohen Polymorphiegrad und eignen sich deshalb auch im Obstbau besonders für die Identifizierung von Sorten (Hokanson et al., 1998; Hormaza, 2002; Yamamoto et al., 2007). Für den Apfel wurden die ersten SSR-Marker von Guilford et al. (1997) entwickelt. Diese wurden im Verlauf der nächsten Jahre mehrfach zur Untersuchung von Apfel, aber auch bei anderen Arten der Familie Maloideae, wie z.B. Birne (*Pyrus*) oder Eberesche (*Sorbus*) eingesetzt (Gianfranceschi et al., 1998; Goulao und Oliveira 2001; Liebhard et al., 2002; Pierantoni et al., 2004; Yamamoto et al., 2004). Mittlerweile gibt es weit über 100 publizierte SSR-Marker, die bereits im Apfelgenom kartiert sind (Liebhard et al., 2002; Silfverberg-Dilworth et al., 2006).

2.4.4. Möglichkeiten der Vermeidung von Ausbreitungen

Um die Ausbreitung von gentechnisch verändertem Erbgut bei Kulturarten zu verhindern, muss sowohl die Verbreitung von Pollen transgener Pflanzen als auch die Verschleppung von Samen dieser Pflanzen unterbunden werden. Zur Realisierung dieser Ziele sind verschiedene Ansätze denkbar, die in den nachfolgenden Kapiteln aufgeführt werden.

2.4.4.1. Verhinderung des Pollentransfers

Eine regionale Ausbreitung von Fremdgenen kann beispielsweise durch die Einhaltung von Isolierdistanzen zwischen einem Bestand mit gentechnisch veränderten Pflanzen und einem konventionellen Bestand eingegrenzt werden. Die notwendigen Sicherheitsabstände werden auf der Basis von Auskreuzungsanalysen festgelegt und variieren je nach Kulturart (Koechlin, 2003). So liegen beispielsweise für Mais die Empfehlungen zwischen 200m und 400m Isolierdistanz zu nicht-transgenen Beständen (Ingram, 2000; Tolstrup et al. 2003). Bei Raps reichen die Empfehlung von 100m bis mehrere

Kilometer je nach Sorte (Müller, 2002; Treu und Emberlin, 2000). Eine weitere Möglichkeit besteht im Anlegen einer Mantelpflanzung. Dabei werden in der Regel Pflanzen derselben Art direkt angrenzend um die transgenen Individuen angepflanzt. Diese sollen als ‚Pollenfalle‘ für den transgenen Pollen des gentechnisch veränderten Bestandes dienen. Eine Auskreuzung kann durch diese Maßnahme nur minimiert und nicht verhindert werden⁶. Diese Aussage gilt besonders für insektenbestäubten Arten, da bei ihnen mit größeren Auskreuzungsdistanzen zu rechnen ist, als bei windbestäubten Arten (Ramsey et al., 1999; Schütte, 1998).

Eine weitere Möglichkeit zur Verhinderung des Pollentransports ist der Anbau von männlich-sterilen Pflanzen. Diese bilden keinen Pollen aus. Bei manchen Arten, wie Mais, Sonnenblume und Raps werden männlich-sterile Sorten schon seit Jahrzehnten von Züchtern als Mutterpflanze für die Saatguterzeugung eingesetzt. Eine männliche Sterilität kann natürlich vorkommen aber auch künstlich erzeugt werden. So ist zum Beispiel eine Induktion männlicher Sterilität durch chemische Substanzen möglich (Chakraborty und Devakumar, 2005; Daniell, 2002; Kriete et al., 1996). Bei gentechnisch veränderten Pflanzen kann durch gentechnische Methoden eine männliche Sterilität erzeugt werden (Daniell, 2002). Dadurch werden beispielsweise zusätzlich Gene übertragen, deren toxische Produkte zum Tod der männlichen Blütenteile führen. Beim Apfel ist ein natürliches Vorkommen männlicher Sterilität nicht bekannt. Es werden jedoch erste Versuche zur Erzeugung von männlich sterilen Apfelpflanzen mit Hilfe von gentechnischen Methoden unternommen.

Eine weitere Strategie zur Minimierung der Auskreuzung besteht durch die Integration von Fremd-DNA in Plastiden (Maliga, 2004; Wang et al., 2004). Dabei wird das Fremdgen ausschließlich in Plastiden integriert. Plastiden besitzen eine vom Zellkern unabhängige DNA. Diese Plastiden-DNA kommt bei den meisten Blütenpflanzen nicht in den Pollenzellen vor. Damit enthält der Pollen transgener Pflanzen nur die nicht transgene Erbinformation des Zellkerns. Bisher wird die Transformation in Plastiden jedoch nur bei Tabak routinemäßig angewandt (Maliga, 2004).

2.4.4.2. Verhinderung der Verbreitung von Samen

Zur Verhinderung einer Ausbreitung von Transgenen über die Samen von gentechnisch veränderten Pflanzen sind ebenfalls verschiedenen Ansätze denkbar. Eine Möglichkeit besteht in der Anwendung des sogenannten ‚Terminator‘-Systems. Dieses System erlaubt eine Verbreitung von gentechnisch verändertem Pollen und

⁶ Quelle: <http://www.biosicherheit.de/de/raps/umwelt/252.doku.html>, Stand März 2008

kann auch andere Pflanzen in der Umgebung befruchten. Allerdings ist eine Keimung der Samen, die aus dieser Befruchtung resultieren nicht möglich (Daniell, 2002; Gressel und Al-Ahmad, 1999; Hills et al., 2007; Scherthner et al., 2003). Mit diesem System sollte ursprünglich verhindert werden, dass die Landwirte das gentechnisch veränderte Saatgut selbst vermehren können. In diesem Zusammenhang wird das ‚Terminator‘-System stark kritisiert. Eine Weiterentwicklung des ‚Terminator‘-Systems ist das sogenannte ‚Geneguard‘-System⁷. Dieses System ermöglicht ebenfalls die Verbreitung und Befruchtung mit gentechnisch veränderten Pollen. Im Unterschied zum ‚Terminator‘-System, kann jedoch eine Keimung von Samen stattfinden, wenn sie aus einer Befruchtung zweier transgener Kreuzungspartner entstanden sind. Damit ermöglicht das ‚Geneguard‘-System den Landwirten die Erzeugung von transgenen Saatgut für ihren eigenen Gebrauch. Das ‚Geneguard‘-System wurde bisher nur bei Tabak getestet und ist noch in der Entwicklungsphase. Bei beiden Systemen ist der Beitrag zur biologischen Sicherheit bislang umstritten, so dass sie keine regelmäßige Anwendung finden.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Induktion eines parthenokarpen Fruchtwachstums. Darunter versteht man die Bildung von Früchten ohne vorangegangene Befruchtung der weiblichen Eizelle. Die resultierenden Früchte besitzen keine Samen bzw. sind diese stark verkrüppelt und nicht keimfähig. Eine natürlich auftretende Parthenokarpie ist unter anderem bei Birnen (*Pyrus communis* L.), Wein (*Vitis vinifera* L.), Feige (*Ficus carica* L.) und verschiedenen Zitrusfrüchten bekannt. Auch beim Apfel ist das Vorkommen von parthenokarpen Früchten beschrieben. Diese treten jedoch sehr selten auf. Beim Apfel gibt es einige wenige Sorten wie ‚Rea Ime‘, ‚Spencer Seedless‘ und ‚Wellington Bloomless‘ deren Früchte vorwiegend parthenokarp sind (Yao et al., 2001). Verantwortlich für die Bildung von parthenokarpen Früchten ist in diesem Fall ein einzelnes, rezessives Gen. Die Parthenokarpie kann bei einigen Sorten, wie ‚McIntosh‘, ‚Bramley’s Seedling‘ und ‚Cox Orangen Pippin‘ auch künstlich durch die Behandlung von Blüten mit Phytohormonen wie Auxin oder Cytokinin herbeigeführt werden (Goldwin, 1978). Oftmals sind die parthenokarpen Früchte jedoch kleiner als normal oder länglich verformt. Deshalb spielen sie für den Anbau eine untergeordnete Rolle. Eine andere Möglichkeit ist die gentechnische Erzeugung der Parthenokarpie bei gentechnisch veränderten Pflanzen. Zur Erzeugung von sterilen, transgenen Bäumen mittels gentechnischen Methoden gibt es einige Arbeiten (Fladung und Hönicka, 2004; Hönicka und Fladung, 2003). Bisher konnten jedoch

⁷ Quelle: <http://www.biosicherheit.de/de/archiv/2003/100.doku.html>; Stand März 2008

keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden (Hönicka und Fladung, 2006). Weiterhin setzt die Anwendung von gentechnischen Methoden zur Verhinderung einer Auskreuzung die Stabilität des transformierten Gens voraus.

2.5. Stabilität von Transgenen

Für eine erfolgreiche Nutzung von gentechnisch veränderten Kulturpflanzen ist eine dauerhafte Stabilität des transformierten Gens Voraussetzung. Besonders bei langlebigen Gehölzen muss die Wirkung des transgenen Merkmals über die gesamte Nutzungsdauer erhalten bleiben. Bei Obstgehölzen kann diese bis zu 20 Jahre und länger betragen. Gentechnisch erzeugte Pflanzen zeigen jedoch zum Teil eine instabile Ausprägung des transgenen Merkmals (Feyissa et al., 2007; Maghuly et al., 2007; Marenkova und Deineko, 2006; Melander et al., 2006; Shiba und Takayama, 2007). Deshalb müssen Linien mit hoher und stabiler Expression aus einer Anzahl von Primärtransformanten herausselektiert werden. Auch nach Selektion ist bei diesen Linien eine dauerhafte Expression des transformierten Gens nicht zwangsläufig gewährleistet. Die Prozesse, die an physischen Instabilitäten oder einem Expressionsverlust beteiligt sein können, sind nicht in allen Fällen vollständig geklärt. Die meisten Arbeiten über die Stabilität gentechnisch veränderter Pflanzen beschreiben Merkmalsverluste bei unveränderter Basensequenz. Bei diesen Verlusten ist das Gen noch intakt, allerdings ist dessen Expression nicht mehr nachzuweisen. Diese Vorgänge werden den ‚epigenetischen Regulationsprozessen‘ zugeordnet (Henderson und Jacobsen, 2007). Im Vergleich dazu werden Merkmalsverluste, die auf Verluste oder Umstrukturierungen innerhalb der Basensequenz zurückzuführen sind, wesentlich seltener beschrieben (Flachowsky et al., 2008; Lechtenberg, 2003; Meza et al., 2002). Aufgetretene Sequenzänderungen wurden in den meisten Fällen auf meiotische Instabilitäten zurückgeführt und in der ersten Nachkommenschaft bzw. erst nach mehreren Generationen beobachtet (Spencer et al., 1992; Srivastava et al., 1996; Ulian et al., 1996). Über mitotische Instabilitäten, die während der In-vitro-Kultur, nach vegetativer Vermehrung transgener Linien bzw. Kallus-Kultur auftraten, wurde seltener berichtet (Flachowsky et al., 2008; Fladung, 1999; Peerbolte et al., 1987). Mitotische Instabilitäten sind oftmals durch Mutationen und/ oder somatische Rekombinationsvorgänge begründet. In vielen Fällen war der Verlust des transgenen Merkmals auch auf chimäres Gewebe zurückzuführen (Caboni et al., 2000; Dominguez et al., 2004). Ein Verlust der Expression eines Gens kann auf transkriptioneller oder posttranskriptioneller Ebene stattfinden. In der Literatur wird dieses Phänomen meist

als ‚gene silencing‘ bezeichnet. Beim transkriptionellen ‚gene silencing‘ (TGS) wird die Transkription eines Gens verhindert. Das heißt es wird keine intakte mRNA gebildet. Beim posttranskriptionellen ‚gene silencing‘ (PTGS) wird das Gen transkribiert, die mRNA wird jedoch vor der Translation degradiert. Für das Auftreten eines Expressionsverlustes werden vielfach Prozesse, wie die Methylierung der T-DNA oder Sense- bzw. Co-Suppression der T-DNA verantwortlich gemacht. Oftmals greifen diese Mechanismen der epigenetischen Genregulation ineinander.

2.5.1. Transkriptionelles gene silencing (TGS)

Der Hauptgrund für transkriptionelles gene silencing ist eine Methylierung von DNA-Abschnitten und der Umbau der Chromatinstruktur (Waterhouse et al., 2001). Beim TGS sind die kodierenden Bereiche des Transgens sowie die Promotorregion stark methyliert (Kooter et al., 1999). In vielen Fällen wurden Cytosin-Methylierungen für die Stilllegung des Transgens verantwortlich gemacht (De Souza et al., 2007; Ulian et al., 1996; Vaucheret und Fargard, 2001). Die DNA Methylierung an Cytosinen beeinflusst viele biologische Prozesse, wie beispielsweise Pathogenresistenz, die Erhaltung der Unversehrtheit des Genoms, Regulierung der Entwicklung und Genexpression (Shiba und Takayama, 2007). In Pflanzenzellen findet man Cytosin-Methylierungen hauptsächlich an Cytosin-Guanin- und CNG-(N=beliebiges Nucleotid) Sequenzen (Finnegan und Kovac, 2000). Die Häufigkeit der DNA-Methylierungen ist abhängig von dem jeweiligen Genom. So sind beispielsweise im Genom des Bakteriophagen T4 alle Cytosine methyliert. Im Säuger genom weisen jedoch nur etwa 3-10% der Cytosine eine Methylierung auf. In Pflanzen-DNA sind bis zu 50% der Cytosine methyliert (Lottspeich und Zorbas, 1998).

Die Mechanismen, die zu einer Methylierung im pflanzlichen Genom führen, sind bislang noch nicht vollständig geklärt (Shiba und Takayama, 2007). In der Literatur wird transkriptionelles ‚gene silencing‘ oftmals im Zusammenhang mit der Integration von multiplen Transgen-Kopien beschrieben, die zum Teil unvollständig bzw. invertiert vorliegen (Butaye et al., 2005; Nagaya et al., 2005; Park et al., 1996).

Wird der Zellzyklus während der Transformation mehrfach durchlaufen, erfolgt in der Regel eine Integration von mehreren T-DNA-Kopien. Diese multiplen Integrationen können sich am gleichen Locus oder in unterschiedlichen Loci innerhalb des Genoms befinden. Der Einbau der T-DNA erfolgt dabei in eine mehr oder weniger willkürliche Position des Genoms (Gheysen et al., 1991; Kim et al., 2007). Infolge einer Mehrfachintegration kann es zu einer Paarung benachbarter, aber auch weit entfernter,

homologer DNA-Sequenzen kommen (homology-depent gene silencing, HDGS). Dieser Prozess kann sowohl zu Reduzierung der transkriptionellen Genexpression als auch zu einer Reduzierung der Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene führen. Die Paarung von Sequenzen mit Homologien im Promotorbereich führen dabei zu einem TGS, während homologe Bereiche innerhalb codierender Bereiche ein PTGS bewirken (Fagard und Vaucheret, 2000; Kim und Geider, 2000). Darüber hinaus können miteinander agierende Homologiebereiche auch Erkennungssignale für Methylierungssysteme darstellen (Mette et al., 1999, 2000; Shiba und Takayama, 2007; De Souza et al., 2007; Yang et al., 2005).

Ein Großteil der Veränderungen der Chromatinstruktur, die zu einem TGS führen, beinhalten eine Methylierung und Acetylierung bzw. Deacetylierung von Histonen (Lippmann und Martienssen, 2004; Shiba und Takayama, 2007; De Souza et al., 2007). Diese Modifikationen innerhalb der Histone bewirken eine Veränderung der Packungsdichte der DNA, d.h. Euchromatin (aktive DNA) kann zu Heterochromatin (inaktive DNA) modifiziert werden (De Souza et al., 2007). In diesem Zusammenhang wird davon ausgegangen, dass bei der Integration von T-DNA in Heterochromatin die Wahrscheinlichkeit einer Methylierung zunimmt, da dieses stärker methyliert ist als das Euchromatin (Jackson et al., 2002; Lindroth et al., 2001; Pröls und Meyer, 1992). Es wird angenommen, dass sich die Methylierungsmuster der repetitiven Sequenzen des Heterochromatins auf die T-DNA-Bereiche ausbreiten können (Francis und Spiker, 2005; De Souza et al., 2007; Pröls und Meyer, 1992). Weiterhin können chemische Veränderungen innerhalb der Enden von Histonen als Signale für den Umbau des Chromatinkomplexes fungieren. Dieser ist verantwortlich für die Regulierung des Transkriptionsmechanismus der DNA (Alberts et al., 2002). Bei Pflanzen gibt es eine direkte Verbindung zwischen DNA Methylierung und der Methylierung von Histonen. Es ist dabei davon auszugehen, dass sowohl die Methylierung von DNA-Abschnitten als auch die Veränderung der Chromatinstruktur eine entscheidende Rolle beim TGS spielen (Depicker et al., 2005; Lippmann und Martienssen, 2004).

2.5.2. Posttranskriptionelles gene silencing (PTGS)

Im Gegensatz zum TGS wird beim PTGS das Gen transkribiert, die gebildete mRNA wird allerdings anschließend vor der Translation degradiert. Frühere Studien gingen davon aus, dass TGS und PTGS zwei voneinander unabhängige Vorgänge sind (De Souza et al., 2007). Heute ist klar, dass beide Vorgänge nebeneinander ablaufen können und der eine Prozess den anderen nicht ausschließt (Butaye et al., 2005;

Vaucheret und Fagard, 2001). Die meisten Genstilllegungen auf posttranskriptioneller Ebene werden durch die Aktivität von RNA Sequenzen gesteuert und deshalb oftmals unter dem Begriff ‚RNA-silencing‘ zusammengefasst (Galun, 2005). Genetische und biochemische Untersuchungen haben dabei gezeigt, dass die Mechanismen von ‚Co-suppression‘, ‚RNA interference‘ (RNAi) und Virus-induziertes ‚gene silencing‘ ähnlich sind.

Erste Beobachtungen zum PTGS wurden bei dem Versuch gemacht, transgene Petunien mit einer erhöhten Aktivität des Chalconsynthase-Gens herzustellen. Dabei führte die Übertragung Chalconsynthase-Gens unter der Kontrolle des 35S-Promotors unerwarteterweise zu einer Verringerung der Chalconsynthase-Expression (Napoli et al., 1990). Homologien zwischen Transgenen und endogenen Genen führen zu einer Inaktivierung des Transgens. Dieses Phänomen wird als ‚Co-suppression‘ bezeichnet (Gura, 2000; Kuhlmann und Nellen, 2004). Darüber hinaus kann PTGS auch durch das gleichzeitige Auftreten von ‚sense‘ und ‚antisense‘ RNAs ausgelöst werden (Hamilton und Baulcombe, 1999).

Der Signalweg für die ‚RNA interference‘ beginnt mit dem Vorhandensein von doppelsträngigen RNAs (dsRNA), die im Cytoplasma gebildet werden (Lodish et al., 2005; Meister und Tuschl, 2004). Sind diese RNA-Moleküle durch Co-suppression, Antisense oder Haarnadelstrukturen entstanden, wirken sie als Auslöser für den RNAi-Mechanismus (Kuhlmann und Nellen, 2004). Nach Erkennung durch eine RNA abhängige Polymerase (RNA-directed RNA-Polymerase; RdRP) wird die dsRNA synthetisiert und durch ein Enzym, das als DICER bezeichnet wird, fragmentiert. Es entstehen kleinere doppelsträngige RNAs, die sogenannten ‚small interfering‘- RNAs (siRNA) mit einer Länge von 21-28 Nucleotiden (Baulcombe, 2004). Diese fungieren wiederum als Primer für die RdRP, d.h. es erfolgt erneut eine RdRP-vermittelte Amplifikation mit einer mRNA. Der neu entstandene Doppelstrang wird anschließend wieder von DICER zerlegt. Durch immer wieder neu entstehenden siRNA wird die Stilllegung des betreffenden Gens aufrecht erhalten (Baulcombe, 2004; Kuhlmann und Nellen, 2004; Morel und Vaucheret, 2000). ‚RNA interferece‘ kann durch gentechnische Verfahren gezielt zur Stilllegung von ausgewählten Genen eingesetzt werden. Die siRNAs liegen dabei in antisense- Orientierung zum Zielgen vor und können so zur Bildung kürzerer dsRNAs führen, welche dann wie bereits beschrieben degradiert werden.

Für ein PTGS können neben siRNAs auch sogenannte Micro RNAs (miRNAs) verantwortlich sein. In der Pflanze sind miRNAs an der Blatt- und Blütenentwicklung beteiligt (Auckerman und Sakai, 2003; Chen, 2004) Die Gene für die miRNAs befinden

sich im Genom und sie werden von einer RNA-Polymerase II oder III transkribiert. Das entstandene Primärtranskript lagert sich zu einer Schleife zusammen. Dieses wird wiederum von einer RNase III gespalten und die entstandene pre-miRNA lagert sich zu einer Art Haarnadelstruktur zusammen. Nach dem Transport in das Cytoplasma wird dort schließlich die miRNA mit einer Länge von 17 bis 24 Nukleotiden von einer weiteren RNase III (Dicer) aus der pre-miRNA herausgeschnitten (Papp et al. 2003). Vollentwickelte miRNA führen entweder zu einer Fragmentierung der mRNA oder zu einer Unterdrückung der Translation (Meister und Tuschl, 2004). Der vollständige Wirkungsmechanismus der miRNA jedoch noch nicht geklärt (Kuhlmann und Nellen, 2004; De Souza et al., 2007).

Verschiedene Faktoren werden als Auslöser für eine Variation der Transgenexpression aufgeführt. Besonders von einem Zusammenhang zwischen der Anzahl der integrierten T-DNA-Kopien und Schwankungen der Genexpression wurde berichtet (Butaye et al., 2005). Eine verringerte Expression auf posttranskriptioneller Ebene durch eine hohe Anzahl von T-DNA-Kopien kann mit dem ‚threshold-Modell‘ erklärt werden (Butaye et al., 2005; Deroles und Gardner, 1988; Hobbs et al., 1990; Jorgensen et al., 1996). Dieses Modell geht davon aus, dass durch das Überschreiten eines kritischen Levels von gleichen Transkripten Mechanismen ausgelöst werden, die dazu führen, dass diese RNAs abgebaut und inaktiviert werden (Dougherty und Parks, 1995; Matzke et al., 2002; Waterhouse et al., 1999). Der gleiche Effekt kann auch durch die Verwendung eines starken Promotors auftreten. Auch hier kann die Überschreitung eines bestimmten Levels zu einer Akkumulation von transkribierten RNA-Molekülen führen (Que et al., 1997). Es gibt allerdings auch gegensätzliche Berichte, wobei keine Korrelation zwischen Anzahl der T-DNA-Kopien und der Genexpression festgestellt wurde (Hönicka und Fladung, 2006; Meza et al., 2002; Schubert et al., 2004).

2.5.3. Verlust des transgenen Merkmals durch Sequenzverlust oder –änderung

Schon in frühen Untersuchungen wurde von Deletionen bzw. Teil-Deletionen innerhalb vollständig integrierten T-DNAs berichtet (Fladung, 1999; Risseuw et al., 1997). Trotzdem gibt es unter den zahlreichen Studien zur Transgenstabilität nur wenige Untersuchungen, bei denen der Merkmalsverlust auf einen Verlust oder eine Änderung der T-DNA-Sequenz zurückzuführen ist. Diese ist oftmals verbunden mit dem Integrationsprozess, wobei es während der Integration der T-DNA in das pflanzliche Genom an den Bruchstellen zu einer Umstrukturierung der transgenen Sequenz

kommen kann (Papazova et al., 2007). In verschiedenen Studien wurde dabei von einer komplexen Umgestaltung der T-DNA berichtet, wie beispielsweise großflächige Duplikationen oder Deletionen oder dem Vorhandensein von ‚Filler‘-Sequenzen bzw. Organell-DNA innerhalb der T-DNA-Sequenz (Forsbach et al., 2003; Kim et al., 2003; Kumar und Fladung, 2002; Nacry et al., 1998; Szabados et al., 2002; Tax und Vernon, 2001; Windels et al., 2003). Bei Untersuchungen am Modellorganismus *Tetrahymena thermophila* wurde sogar eine vollständige Deletion des Transgens während der sexuellen Reproduktion beobachtet (Howard-Till und Yao, 2007; Liu et al., 2005). Diese und frühere Studien zeigen, dass es auch nach dem Transformationsprozess zu Veränderungen innerhalb der transgenen Sequenz kommen kann. Dabei treten entweder meiotische Instabilitäten auf, die sich in die nachfolgenden Generationen fortsetzen oder es kommt zu mitotischen Instabilitäten (Butaye et al., 2005; Flachowsky et al., 2008; Fladung, 1999; Hänisch ten Cate et al., 1991; Melander et al., 2006; Risseuw et al., 1997; Spencer et al., 1992; Srivastava et al., 1996).

Ein Verlust bzw. eine Änderung von T-DNA-Sequenzen kann durch komplexe T-DNA-Insertionen, die invertierte Sequenzwiederholungen enthalten, ausgelöst werden. Diese Wiederholungen bewirken durch homologe Rekombination eine Deletion der Sequenzen zwischen den invertierten Sequenzwiederholungen (Fladung, 1999; Nakano et al., 2005). Es kann aber auch zu Punktmutationen, wie beispielsweise kleine Deletionen oder den Austausch von Basenpaaren kommen. Diese stehen oftmals in einem engen Zusammenhang mit dem Integrationsort des Transgens (Papazova et al., 2007). Dabei führen Punktmutationen im Promotorbereich zu einer Änderung der Promotoraktivität, während Punktmutationen in der kodierenden Sequenz dagegen zur Inaktivierung der kodierenden Sequenz führen. Kommt es zu einer Substitution von Aminosäuren kann die Produktion der Transgenprodukte gehemmt bzw. inaktiviert werden (Ogasawara et al., 2005). Die Mutationsrate wird durch bestimmte Umweltbedingungen erhöht (Boyko et al., 2007). Besonders photo-oxidativer Stress durch starke UV-Einstrahlung bewirkt einen Anstieg der Mutationsfrequenz (Kovalchuk et al., 2000). Rekombinationen können in sämtlichen Entwicklungsstadien der Pflanze auftreten (Puchta et al., 1995). Daher sind Instabilitäten der Transgenexpression durch Mutations- und Rekombinationsereignisse sind besonders bei langlebigen Organismen wie Gehölzpflanzen zu berücksichtigen, da sich diese Sequenzveränderung über viele Jahre anreichern können.

2.6. Transport von Genprodukten

Neben den Untersuchungen zur Stabilität übertragener Gene werden zunehmend Studien zum Transport von Transgenprodukten durchgeführt. Besonders bei heimischen Obstgehölzen sind solche Fragestellungen von großem Interesse. Der Hauptgrund hierfür ist die Anbaupraxis. Üblicherweise werden Apfelsorten auf Unterlagen veredelt. Der Apfelbaum besteht damit aus zwei genetisch unterschiedlichen Komponenten, der Unterlage und dem Edelreis. Mitunter werden auch Stammbildner zwischen Edelreis und Unterlage veredelt. Ist einer der Veredelungspartner gentechnisch verändert, stellt sich die Frage welche Wechselwirkungen zwischen den Komponenten auftreten können und ob ein Transport von Transgenprodukten über die Veredelungsstelle hinweg stattfindet. Dieser wäre von Zelle zu Zelle oder über das Phloem denkbar.

Je nach Art der Phloembeladung kann das Phloem morphologisch in den offenen Typ und in den geschlossenen Typ eingeteilt werden. Beim offenen Typ sind die Mesophyll- bzw. Bündelscheidezellen und die Geleitzellen mit zahlreichen Plasmodesmen verbunden. Beim geschlossenen Typ sind dagegen die Mesophyll- bzw. Bündelscheidezellen symplastisch isoliert, d.h. es befinden sich zwischen den Zellen keine plasmodesmatischen Verbindungen. Es wird angenommen, dass der offene Phloemtyp mit der symplastischen und der geschlossene Phloemtyp mit der apoplastischen Phloembeladung korrelieren. Bei der symplastischen Verbreitung erfolgt der Transport von Zellprodukten über die Plasmodesmen in benachbarte Zellen bis hin zu den Geleitzellen, in denen die Produkte für die Phloembeladung gesammelt werden. Ausgehend von den Geleitzellen wird anschließend das Phloem beladen (Ghoshroy et al., 1997). Beim symplastischen Transport von Zelle zu Zelle handelt es sich um einen aktiven Vorgang. Aufgrund ihrer Struktur ist die Durchlässigkeit zwischen Plasmodesmen und Epidermiszelle bzw. Mesophyllzelle normalerweise auf etwa 1kDa begrenzt (Derrick et al., 1990; Wolf et al., 1989). Neben den Plasmodesmen gibt es noch spezialisierte untergeordnete Plasmodesmen, sogenannte Poren-Plasmodesmen-Einheiten (pore plasmodesmal units; PPU). Untersuchungen an PPU haben gezeigt, dass diese auch für größere Moleküle bis zu 100kDa durchlässig sind und damit auch den Durchgang von Makromolekülen, wie Proteinen oder kleinere RNAs erlauben (Stadler et al., 2005; Van Bel, 2003). Außerdem kann eine spezifische Interaktion zwischen dem Transportprodukt und den Plasmodesmen eine Erhöhung der Permeabilität der Plasmodesmen bewirken. Beispielsweise bewirkt das 30kD große Protein des Tabakmosaikvirus (P30) eine Erhöhung der Durchlässigkeit der Plasmodesmen von 0,75-1,0kDa auf bis zu 20kDa (Ghoshroy et al., 1997). Der

symplastische Transport findet vorwiegend in Form von Nucleinsäuren, Proteinen oder Nucleinsäure-Protein-Komplexen statt (zusammengefasst in Ghoshroy et al., 1997).

Bei der apoplastischen Phloembeladung müssen die zu transportierenden Substanzen zunächst aus der Mesophyllzelle in den Apoplasten transportiert werden. Dabei ist ungeklärt, ob der Export aus der Mesophyllzelle durch Diffusion oder einen spezifischen Transportmechanismus realisiert wird. Aus dem Apoplasten werden die Metabolite anschließend durch einen aktiven Transportprozess in die Geleitzellen aufgenommen. Ausgehend von den Geleitzellen erfolgt dann die Phloembeladung. Es ist bekannt, dass über 200 Proteine vom Zellinneren in den Apoplasten transportiert werden (Gau et al. 2004). Darunter befinden sich Proteine, die der Pflanzenabwehr gegenüber Krankheitserregern dienen (pathogenesis-related Proteins, PR-Proteins). Untersuchungen zur Zusammensetzung des Apoplastensaftes bei *Malus x domestica* vor und nach einer Schorfinfektion wurden von Gau et al. 2004 durchgeführt. Dabei wurde ein Anstieg der PR-Proteinen nach Infektion mit *V. inaequalis* im Apoplastensaft bei der schorfresistenten Apfelsorte ‚Remo‘ festgestellt. Unklar bleibt jedoch, ob PR-Proteine im Phloem über größere Distanzen befördert werden.

Das Phloem verbindet die meisten weit entfernten Regionen der Pflanze und ist daher der ideale Weg für einen schnellen und direkten systemischen Informationstransfer (Kehr und Buhtz, 2008). Lange Zeit wurde angenommen, dass nur kleine Moleküle wie Wasser, Ionen und Photoassimilate durch das Phloem transportiert werden. Im letzten Jahrzehnt wurde jedoch nachgewiesen, dass auch ein Transport von Makromolekülen, wie Proteinen oder Nucleinsäuren über lange Strecken im Phloem stattfindet (Golecki et al. 1998; Kim et al., 2001; Ruiz-Medrano et al., 1999). Für die Koordination der Pflanzenentwicklung, dem An- und Ausschalten von Abwehrmechanismen oder der Nährstoffverteilung haben die Pflanzen eine ganze Reihe an Signalmolekülen, die durch das Phloem transportiert werden. Es wird angenommen, dass es sich bei einem Großteil dieser Moleküle um Signalmoleküle zur Pathogenabwehr handelt (Van Bel und Gaupels, 2004). Weiterhin ist bekannt, dass mRNAs über größere Distanzen innerhalb der Pflanze transportiert werden, die als systemische Signale die Genexpression beeinflussen (Vionnet und Baulcombe, 1997). Eine Reihe weiterer Transkripte, die neben der Genexpression auch Einfluss auf die Pflanzenentwicklung und –morphologie haben, wurden ebenfalls im Phloemsaft nachgewiesen (Ueki und Citovsky, 2001).

Bei den Makromolekülen ist bisher nicht vollständig geklärt, ob diese innerhalb des Phloems kontrolliert oder passiv über größere Distanzen transportiert werden (Aoki et al., 2005). Untersuchungen zum Transport von Makromolekülen im Phloem erfolgten

vorwiegend an spezifischen Phloem-Proteinen, die in großer Anzahl im Phloemsaft vorhanden sind. So wurden beispielsweise im Reis über 100 verschiedene Phloem-Proteine bestimmt (Oparka und Santa Cruz, 2000). Das Vorhandensein einer großen Anzahl von biochemisch aktiven Proteinen im Phloemsaft, lässt annehmen, dass diese an der Koordination des Metabolismus, der Entwicklung und der Abwehrmechanismen beteiligt sind (Aoki et al., 2002; Walz et al., 2004; Yoo et al., 2002). Die Größe der transportierten Phloem-Proteine kann bis zu 70kDa betragen (Oparka und Santa Cruz, 2000). In früheren Studien wurde davon ausgegangen, dass Moleküle passiv transportiert werden (Imlau et al., 1999; Roberts et al., 1997). Neuere Untersuchungen haben dagegen gezeigt, dass der Transport von Makromolekülen nicht einfach dem Assimilatstrom folgt, sondern spezifisch ist und nicht alle Proteine transportiert werden (Aoki et al., 2005; Itaya et al., 2002; Oparka und Santa Cruz, 2000; Vionnet et al., 1998; Zhu et al., 2002).

Bei veredelten Pflanzen ist für einen Proteintransport über die Veredelungsstelle die Neubildung von Plasmodesmen bzw. der Siebröhren Voraussetzung. Beides wurde eindeutig von Kollmann und Glockmann (1991) nachgewiesen. Damit ist sowohl der Mechanismus für den Transport von Proteinen von Zelle zu Zelle, als auch der Transport von Makromolekülen im Phloem über die Veredelungsstelle hinweg gewährleistet. Erste Untersuchungen von Tiedemann (1989) an veredelten *Cucumis*-Pflanzen zeigten, dass ein Transport von Proteinen über die Veredelungsstelle auch wirklich stattfindet. Dabei wurden fünf Phloem-Proteine, die nur von der *Cucurbita*-Unterlage stammen konnten, in *Cucumis sativus* L. Edelreisern detektiert. Diese überstiegen einen Gehalt, der mit einer einfachen Diffusion zwischen den Zellen an der Veredelungsstelle zu erklären wäre. In weiteren Studien mit veredelten Pflanzen wurde ebenfalls gezeigt, dass Moleküle über die Veredelungsstelle transportiert werden (Banerjee et al., 2006; Haywood et al., 2005; Kim et al., 2001).

3. Material und Methoden

3.1. Pflanzenmaterial

3.1.1. Versuchsfeld und Pollenfänger- und Pollenspenderpflanzen für die Bestimmung der Auskreuzungsrate von Apfelpollen

Die Feldversuche für die Bestimmung der Auskreuzungsrate von Apfelpollen wurden innerhalb des Versuchsgeländes des Institutes für Obstzüchtung der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ) durchgeführt. Das Versuchsgelände besteht aus einer Vielzahl von Obstgehölzen, wie z.B. Apfel, Birne, Kirsche und Pflaume, welche für die Züchtung, als genetische Ressource oder als Veredelungssorte verwendet werden. Für die Untersuchungen zur Auskreuzungsdistanz wurde ein 0,26ha großes Apfelquartier innerhalb des Versuchsgeländes bestimmt. Dieses Quartier wurde zwischen 1994 und 1996 als genetische Ressource angelegt. In dem Quartier wurden 50 verschiedenen Apfelsorten mit insgesamt 300 Apfelbäumen gepflanzt, wobei auf die drei Reihen durchschnittlich 100 Bäume verteilt wurden (Abbildung 1). Dabei wurden die Edelreiser in Abhängigkeit von ihrer Wachstumsleistung auf verschiedene Unterlagen (M9, M26, MM106, A2) gepfropft, um eine Anlage mit gleich großen Bäumen zu erhalten. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung waren alle Bäume mit 2,5m mehr oder weniger gleich groß. Der Abstand zwischen den Bäumen innerhalb der Reihe betrug 2,5m und zwischen den Reihen 4,5m. In der Nähe des Versuchsquartiers waren Sauerkirschen gepflanzt.

Das hier beschriebene Apfelquartier wurde aus drei Gründen als Versuchsfeld für die Bestimmung der Auskreuzungsrate von Apfelpollen ausgewählt. Zum ersten besaß das Quartier durch die Vielzahl der vorhandenen Apfelsorten eine hohe genetische Variabilität, die für die Probenauswahl von Vorteil war. Weiterhin war der Apfelhybrid ‚TNR 31-35‘ gepflanzt, der aufgrund seines morphologischen Markers für Rotlaubigkeit als Pollenspendergenotyp sehr geeignet ist. Als dritter Grund wurde angenommen, dass in der Nähe der Versuchsfläche keine anderen Flächen mit einem Markergen für Rotlaubigkeit vorkommen.

Zur Blühdauer wurden zehn Bienenwagen immer an dieselbe Stelle in einem Abstand von 100m zur ersten Apfelreihe in das Kirschquartier platziert. Der Blühzeitpunkt der Kirschen war nahezu vorbei, als der Apfel zu blühen anfang.

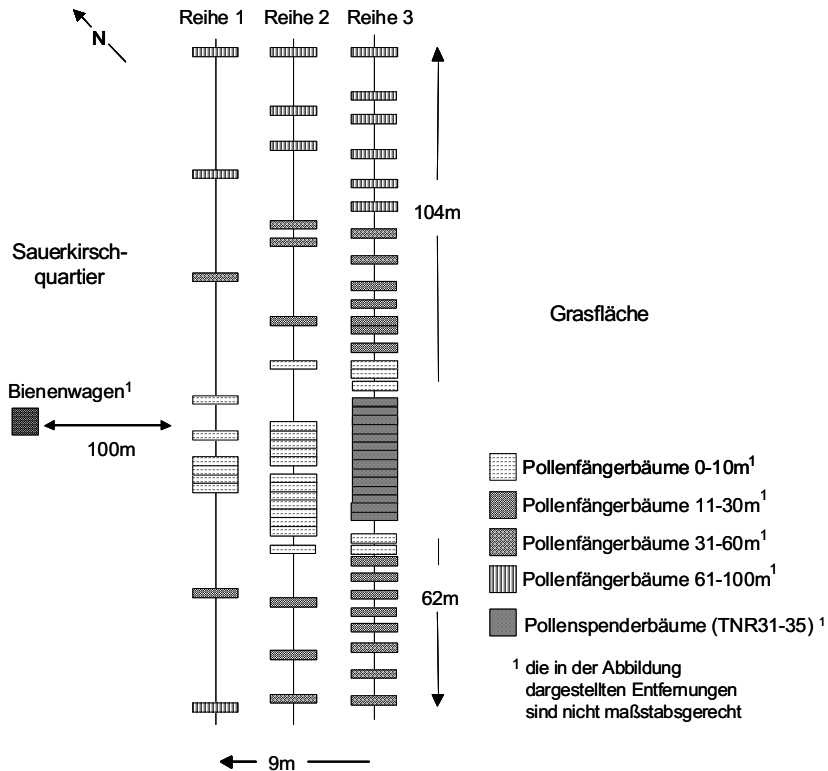


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsfeldes zur Bestimmung der Auskreuzungsdistanz durch Apfelpollen unter natürlichen Bedingungen.

Innerhalb dieser Fläche wurden 60 Bäume aus insgesamt 38 Kulturapfelsorten als Pollenfängerpflanzen ausgewählt. Diese befinden sich in einem Abstand von 4-104m zu ausgewählten Pollenspenderpflanzen. Die Auswahl der Pollenfängersorten ist in Abbildung 1 dargestellt. In der Nähe der Pollenspenderarten ist der Anteil der ausgewählten Pollenfängerbäume höher als in größeren Distanzen. Außerdem wurde in der Literatur angenommen, dass die Bienen auf ihrem Futterflug vorwiegend innerhalb der Reihen fliegen. Daher wurden 47% aller Bäume in der Reihe der Pollenspenderbäume beprobt. In der gegenüberliegenden Reihe des Pollenspendergenotyps befanden sich 38% der beprobten Pollenfängerbäume. Bei der Auswahl der Pollenfängersorten wurde darauf geachtet, dass die Blühzeitpunkte nicht mehr als zwei Boniturnoten (früh-/ mittel-blühend) von dem des Pollenspendergenotyps abweichen.

Für die Auswahl wurden die Boniturnoten der Blütezeiten des ‚Informationssystem für Evaluierungsdaten für pflanzengenetische Ressourcen‘ (EVA)⁸ genutzt. Bei einer Abweichung von zwei Boniturnoten liegt der Blühbeginn maximal 4 Tage auseinander. Die Entfernungen der ausgewählten Pollenfängerbäume in den benachbarten Reihen zu den Pollenspenderbäumen wurden mittels Satz des Pythagoras $c = \sqrt{a^2 + b^2}$ ermittelt. Dabei ist c die Distanz zwischen dem jeweiligen Pollenfängerbaum und den Pollenspenderbäumen, a ist der Abstand zwischen den Reihen und b ist die Entfernung zwischen dem Baum in der benachbarten Reihe und dem ausgewählten Pollenfängerbaum. Für die Berechnung wurde von den 15 Pollenspenderbäumen immer derjenige mit der kürzesten Entfernung zum jeweiligen Pollenfängerbaum ausgewählt.

Als Pollenspenderpflanzen wurden 15 Bäume des Hybrids ‚TNR 31-35‘ ausgewählt. Dieser stammt aus der Kreuzung der Wildart *Malus sieversii* var. *sieversii* f. *niedzwetzkyana* Dieck. und der Apfelsorte ‚Topred Delicious‘. *Malus sieversii* var. *sieversii* f. *niedzwetzkyana* Dieck. wurde in früheren Arbeiten als *Malus pumila* var. *niedzwetzkyana* bezeichnet und erst seit 2006 *Malus sieversii* zugeordnet (Hanelt, 2006). ‚TNR 31-35‘ ist homozygot für ein dominantes Markergen R, das eine Rottfärbung in Blättern, Trieben und Früchten hervorruft (Lespinasse und Godicheau, 1980; Lespinasse et al., 1983). Die genauen Angaben zu den Pollenfängerbäumen und den Pollenspenderbäumen sind in Abb. Anhang 1 aufgeführt.

3.1.2. Transgene In-vitro Pflanzen

Für diese Arbeit standen 9 transgene Linien der Apfelsorte ‚Pinova‘ und 8 transgene Linien des Apfelunterlagengenotyps ‚AU56-83‘ als Untersuchungsmaterial zur Verfügung. Diese waren im Vorfeld dieser Arbeit in den Jahren 1998 bis 2000 am Institut für Obstzüchtung der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen in Dresden-Pillnitz erstellt und *In-vitro* verklont worden (Hanke, 2004; Hanke et al., 2000). Dabei werden durch Transformation ausgewählte DNA-Abschnitte in eine Pflanzenzelle übertragen. Bei diesen Pflanzen waren Gene zur Erhöhung der Resistenz gegenüber dem Feuerbrand (*Erwinia amylovora*) integriert worden. Die Beschreibung der Herkunft der verwendeten Gene ist in Kapitel 3.2. zu finden. Nach erfolgreicher Transformation werden aus der Pflanzenzelle Pflanzensprosse auf Kanamycin im Nährmedium selektiert und regeneriert. Die regenerierten Pflanzensprosse sind genetisch identisch. Pro Transformationsprozess werden diese

⁸ www.genres.de/eva/apfel.htm

genetisch identischen Pflanzen einer transgenen Linie zugeordnet. Die In-vitro Pflanzen der 17 Linien wurden zwischen 1999 und 2003 bewurzelt und ins Gewächshaus überführt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Herstellungs-, Überführungs- und Veredelungsjahr der einzelnen transgenen Linien.

Linie	Herstellungsjahr der Linie	Überführungsjahr in das Gewächshaus	Veredelungsjahr
T86	1998	1999	2002
T95		2000	
T92			
T121	1999	2000	
T136			
T137			
T211	2000	2001	
T267			
T270	2000	2002	nicht veredelt
T362			
T363			
T350			
T351			
T352			
T320	2000	2003	2005
T349			
T355			

Von den 17 Linien wurden acht Linien (T86, T92, T121, T136, T137, T211, T267) im Jahr 2002 und drei weitere Linien (T320, T349, T355) im Jahr 2005 in verschiedenen Varianten veredelt. Sechs transgene Linien wurden als unveredelte Ex-vitro Pflanzen analysiert (T270, T350, T351, T352, T362, T363). Die Daten der transgene Linien, die für die Untersuchung der Stabilität der T-DNA eingesetzt wurden, sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Daten der transgene Linien, die für die Untersuchung des Transports von Transgenprodukten bei veredelten Apfelgehölzen verwendet wurden, sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Als transgenes Edelreis wurden die transgenen Linien der Sorte ‚Pinova‘ und als transgene Unterlage die transgenen Linien des Genotyps ‚AU56-83‘ und der Sorte ‚Pinova‘ verwendet. Als nicht transgener Veredelungspartner wurde die Sorten ‚Pinova‘ (Edelreis), ‚Hibernal‘ (Stammbildner) und ‚M9‘ (Unterlage) eingesetzt. Die verschiedenen Veredelungskombinationen sind in Abbildung 2 dargestellt. Alle Veredelungsvarianten mit Ausnahme der Linien T86, T320 und T349 wurden in zweifacher Wiederholung als Baum angezogen. Die unveredelten Ex-vitro Pflanzen

wurden mit einem Buchstaben, z.B. T267A, T267B, gekennzeichnet. Die veredelten Pflanzen einer Linie sind mit einem V und einer Nummer z.B. V1 für Veredelung 1 der Linie T267 gekennzeichnet.

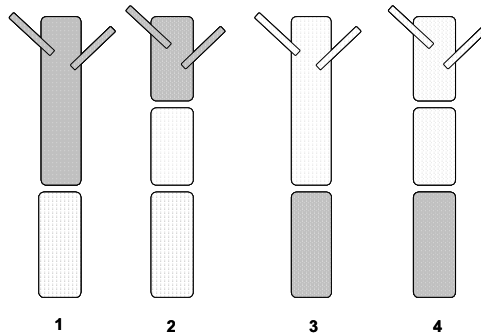


Abbildung 2:

Schematische Darstellung der verschiedenen Veredelungskombinationen.

Grau: transgene Veredelungskomponente; Weiß: nicht transgene Veredelungskomponente

1: Veredelung eines transgenen Edelreis der Sorte ‚Pinova‘ auf eine nicht transgene Unterlage (‚M9‘)

2: Veredelung eines transgenen Edelreis der Sorte ‚Pinova‘ (grau) auf einen nicht transgenen Stammbildner (‚Hibernal‘) und einer nicht transgenen Unterlage (‚M9‘).

3: Veredelungen einer transgenen Unterlage der Sorte ‚AU56-83‘ bzw. ‚Pinova‘ mit einem nicht transgenen Edelreis (‚Pinova‘).

4: Veredelung einer transgener Unterlage der Sorte ‚AU56-83‘ mit einem nicht transgenen Stammbildner (‚Hibernal‘) und nicht transgenen Edelreis (‚Pinova‘).

Tabelle 2: Transgene Linien und Art ihrer Verwendung für die Untersuchung der Stabilität der T-DNA bei gentechnisch veränderten Apfelpflanzen.

Konstrukt	Linie	Genotyp	Verwendung als Ex-vitro Pflanze	Pflanzen ⁵
pDI15 ¹	T86	AU 56-83	Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis	1
P35SAMVT4 ²	T121	Pinova	Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage	2
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage u. Stammbildner	2
	T352	AU 56-83	unveredelt	3
	T270	AU 56-83	unveredelt	3
	T362	AU 56-83	unveredelt	1
	T363	AU 56-83	unveredelt	3
pBinAtt35SAMVT4 ³	T92	Pinova	Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage	2
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage u. Stammbildner	2
			Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis	1
			Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis u. Stammbildner	1
	T95	Pinova	Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis	1
			Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis u. Stammbildner	1
	T350	AU 56-83	unveredelt	3
T351	AU 56-83	unveredelt	3	
PBINAR19 ⁴	T136	Pinova	unveredelt	3
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage	2
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage u. Stammbildner	2
	T137	Pinova	Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage	2
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage u. Stammbildner	2
	T211	Pinova	unveredelt	8
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage	2
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage u. Stammbildner	2
	T267	Pinova	unveredelt	4
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage	2
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage u. Stammbildner	2
Gesamt				60

¹ attE-Gen (Destefano-Beltran, 1991); ² T4L-Gen (Ko et al., 1997); ³ T4L- und attE-Gen (Ko et al., 1997); ⁴ Depolymerase-Gen (Kim und Geider, 2000); ⁵ Anzahl

Tabelle 3: Transgene Linien für die Untersuchung des Transport von Transgenprodukten bei veredelten Apfelgehölzen

Konstrukt	Linie	Genotyp	Verwendung als Ex-vitro Pflanze	Pflanzen ⁵
pID15 ¹	T320	Pinova	Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis u. Stammbildner	1
			Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis	1
	T355	Pinova	Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis	2
			Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis u. Stammbildner	2
P35SAMVT4 ²	T121	Pinova	Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage	2
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage u. Stammbildner	2
pBinAtt35SAMVT4 ³	T92	Pinova	Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage	2
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage u. Stammbildner	2
			Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis	1
			Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis u. Stammbildner	1
	T95	Pinova	Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis	1
			Unterlage, veredelt mit nicht transgenem Edelreis u. Stammbildner	1
PBINAR19 ⁴	T137	Pinova	Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage	2
			Edelreis, veredelt auf nicht transgener Unterlage u. Stammbildner	2
Gesamt				22

¹ *attE*-Gen (Destefano-Beltran, 1991); ² *T4L*-Gen (Ko et al., 1997); ³ *T4L*- und *attE*-Gen (Ko et al., 1997); ⁴ *Depolymerase*-Gen (Kim und Geider, 2000); ⁵ Anzahl

3.2. Verwendete Agrobakteriumstämme und Vektoren

Alle in dieser Arbeit verwendeten Apfelpflanzen wurden mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* nach einer Methode von Norelli et al. (1996) transformiert. Dafür wurden die Bakterienstämme EHA105, KYRT1 und LBA4404 verwendet (Hamilton, 1997; Hood et al., 1993; Ooms et al. 1982; Torisky et al. 1997). Bei den verwendeten Vektoren handelt es sich um die chimären Genkonstrukte pLDB15-, p35SAMVT4-, pPinAtt35SAMVT4- und pBINAR19Dpo (Abbildung 3) (Destefano-Beltran, 1991; Kim und Geider, 2000; Ko et al., 1997). Diese gehen alle auf den Basisvektor BIN19 (NCBI Accessionsnr.: U09365) zurück, der in der Literatur beschrieben ist (Bevan, 1984; Frisch et al., 1995). Die Vektoren enthalten eine entwaffnete T-DNA, die zwischen den Bändern (RB: rechte Border; LB: linke Border) keine natürlich vorkommende Gene mehr enthält. Außerhalb der T-DNA besitzt der Vektor ein Gen für eine bakterielle Kanamycinresistenz (*nptIII*) als Selektionsmarker und prokaryontische DNA-Elemente (Frisch et al., 1995). Innerhalb der T-DNA tragen die Vektoren das *nptII* Gen als Pflanzenselektionsmarker und jeweils ein oder zwei Zielgene, die im Folgenden aufgeführt sind:

- Das *gus*-Gen stammt aus *E. coli* und kodiert unter Kontrolle eines 35S-RNA-Promotors und Terminators aus dem Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) für eine β -Glucuronidase (Vancanneyt et al., 1990) (Abbildung 3, A).
- Das *attE*-Gen stammt aus dem Riesenseidenspinner (*Hyalophora cecropia*). Das Gen wurde zwischen den Promotor und Terminator des Proteinase-Inhibitor II-Gens der Kartoffel kloniert (Keil et al., 1989). Das Konstrukt pLDB15 enthält sowohl das *gus*-Gen als auch das *attE*-Gen (Abbildung 3, A).
- Das *T4L*-Gen stammt aus dem Bakteriophagen T4 und wurde zwischen die untranslatierte Leadersequenz der Alfalfamosaik-Virus-RNA und der Terminatorsequenz des Nopalinsynthase-Gens (T NOS) kloniert (Datla et al., 1993; Godefroy-Colburn et al., 1985; Porsch et al., 1998;). Das p35SAMT4-Konstrukt enthält das *T4L*-Gen (Abbildung 3, B). In dem Konstrukt pPinAtt35SAMVT4 sind das *attE*-Gen und das *T4L*-Gen kombiniert (Abbildung 3, C) (Ko et al., 1997).
- Das *Dpo*-Gen stammt aus dem Bakteriophagen Ea1h und kodiert für eine extrazelluläre Polysaccharid(EPS)-Depolymerase. Das Gen wurde zwischen 35S-RNA-Promotors aus dem Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) und dem Terminator des *Octopinsynthase*-Gens aus *A. tumefaciens* in den Vektor pBINAR19Dpo kloniert (Abbildung 3, D) (Kim und Geider, 2000).

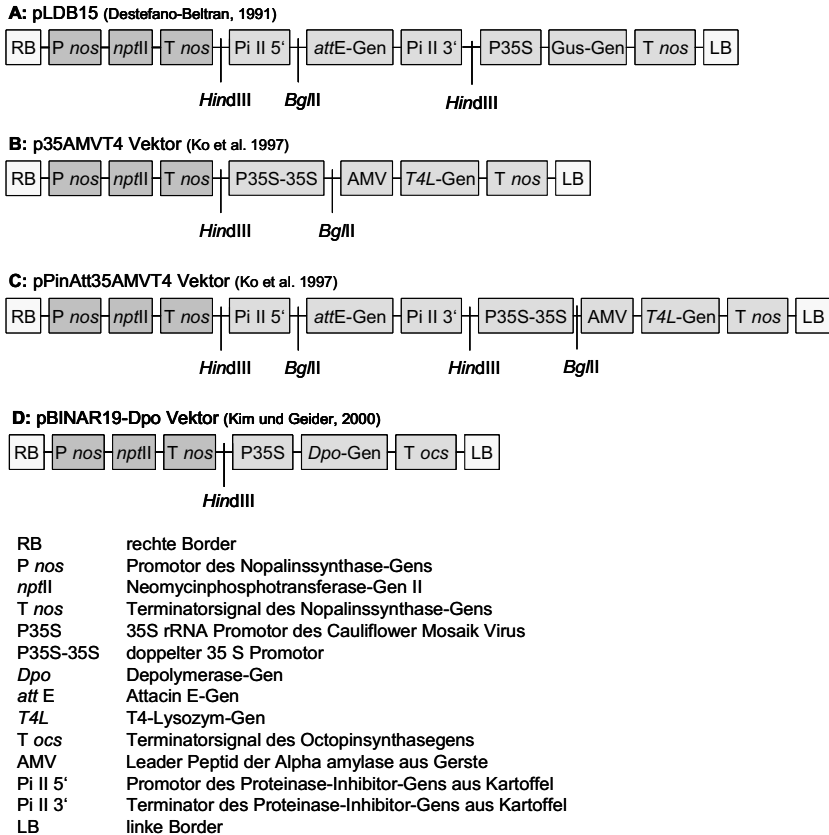


Abbildung 3: Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte.

3.3. Methoden

3.3.1. Vermehrung und Bewurzelung von In-vitro Pflanzen

Die Vermehrung von Apfelsprossspitzenkulturen erfolgte auf Fertignährboden nach Linsmaier und Skoog (Duchefa, Hamburg) nach bei 16h Licht und 8h Dunkelheit bei einer Temperatur von 22°C. Zur Bewurzelung wurden die In-vitro Pflanzen auf Fertignährboden nach Murashige und Skoog (Duchefa, Hamburg) umgesetzt und anschließend für eine Woche bei Dunkelheit kultiviert. Im Anschluss folgte die weitere

Bewurzelung für 3-4 Wochen auf ohne die Zugabe von Indol-3-buttersäure (IBA) bei 16h Licht und 8h Dunkelheit. Die Überführung der In-vitro Pflanzen in das Gewächshaus erfolgte ca. 14 Tage nach Abschluss der Wurzelbildung.

3.3.2. Stratifizierung von Apfelsamen und Anzucht von Apfelpflanzen im Gewächshaus

Die Samen geernteter Früchten wurden herauspräpariert, bei 4°C für 90 Tage in feuchtem Sand stratifiziert und anschließend ausgesät.

Die Anzucht der Pflanzen im Gewächshaus erfolgte unter Langtagbedingungen mit einer Beleuchtungsphase von 16h Licht bei 2000Lux und einer Temperatur von 23°C am Tag und 18°C in der Nacht bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60-70%.

3.3.3. Befruchtungsbioologische Untersuchungen

Die Untersuchung der Keimfähigkeit und Vitalität von Pollen erfolgte modifiziert nach Filiti und Montalti (1982). Dazu wurden zur Aufblüte die Antheren aus den Apfelblüten mit Hilfe einer Pinzette herauspräpariert. Diese wurden anschließend in Petrischalen bis zum Aufbrechen der Antheren und Heraustreten des Pollens zwischen einem und zwei Tagen bei Raumtemperatur (RT) getrocknet.

Für die Vitalitätsprüfung wurden die Pollenkörner mit 0,5%-iger Karminessigsäure angefärbt. Vitale Pollenkörner färben sich orange-rot, während tote Pollenkörner nicht angefärbt werden. Von insgesamt 1000 Pollenkörnern wurde die Anzahl der gefärbten und ungefärbten Pollenkörner anschließend unter dem Mikroskop ausgezählt.

Zur Bestimmung der Pollenkeimfähigkeit wurden Pollenkörner auf eine 15%ige Saccharoselösung gegeben und bei 25°C für 6-8h inkubiert. Anschließend wurden von 2000 Pollenkörnern die Anzahl der Pollen mit und ohne Keimschlauch unter dem Mikroskop bestimmt.

Für die Durchführung von gezielten Kreuzungen wurden Blüten der Pollenfängersorten ausgewählt und im Ballonstadium mit Tüten isoliert. Zur Vollblüte wurden die Isoliertüten geöffnet und der Pollen von ‚TNR 31-35‘ mit Hilfe eines Pinsels auf die Narben der isolierten Blüten der Pollenfängersorten aufgebracht. Anschließend wurden die Tüten wieder insektensicher verschlossen.

Die Auswertung der Befruchtungsversuche erfolgte nach dem Junifruchtfall. Dazu wurde der Fruchtansatz ausgezählt und prozentual auf die Anzahl bestäubter Blüten bezogen. Anhand des relativen Fruchtansatzes wurde die Kreuzungskombinationen in drei Gruppen eingeteilt (Fischer, 2001):

Fruchtansatz über 15% - Kombination hoch fertil

Fruchtansatz 8-15% - Kombination mittelmäßig fertil

Fruchtansatz unter 8% - Kombination wenig fertil bzw. steril

3.3.4. Untersuchungen zum Windtransport von Apfelpollen

Zur Untersuchung der Transportdistanzen von Apfelpollen durch Wind wurden Pollenfallen in zwei Untersuchungsjahren in unterschiedlichen Entfernungen und Himmelsrichtungen um einen Pollenspenderbaum der Apfelsorte ‚Regia‘ positioniert. Als Versuchsfläche wurde ein frisch gepflügter Acker gewählt, der sich weitab von Obstbauflächen befand. Der getopfte, 1,5m große Pollenspenderbaum befand sich zum Zeitpunkt der Untersuchung in voller Blüte. Als Pollenfallen wurden Objektträger verwendet, die mit einer 5cm² großen Schicht Glyceringelatine bestrichen waren. Die Objektträger wurden mit Gummibändern in einer Höhe von 1,5m an Stäben befestigt und alle 2m bis zu einer Entfernung von 20m, in nördlicher, westlicher, südlicher und östlicher Himmelsrichtung um den Pollenspenderbaum aufgestellt. Nach sechs Stunden wurden die Objektträger entfernt. Die Auswertung der Pollenfallen erfolgte visuell unter einem Lichtmikroskop ‚Axioskop‘ (Zeiss, Jena) bei 100facher Vergrößerung.

3.3.5. Bonitur der Sämlinge aus den Kreuzungen und den freien Ablüten

14 Tage nach Auflaufen der Sämlinge wurden diese anhand ihrer Blattfärbung bonitiert. Als ‚rot‘ wurden alle Apfelsämlinge mit roten Blättern oder roten Blattadern eingestuft (Abbildung 4, A). Sämlinge, die als ‚grün‘ eingestuft wurden, zeigten keine Anzeichen von roter Färbung (Abbildung 4, B). Die Bonitur wurde nach zwei Wochen wiederholt.

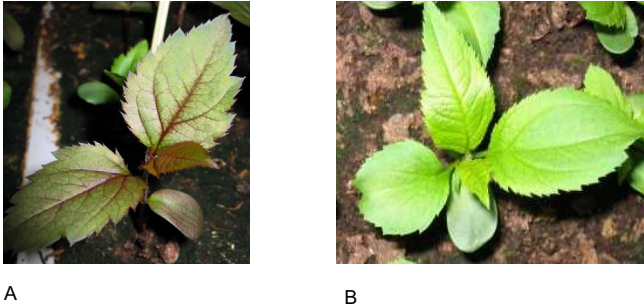


Abbildung 4: Sämlinge aus den Kreuzungen bzw. den freien Abblüten 14 Tage nach dem Auflaufen.
A: rotlaubiger Sämling und B: grünlaubiger Sämling

3.3.6. DNA Isolierung aus Blattmaterial

Die Isolierung von genomischer DNA aus Blattmaterial erfolgte, je nach benötigter DNA-Menge mit dem DNAeasy-Plant-Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend des Protokolls des bzw. modifiziert nach der CTAB-Methode von Saghai-Marooof (1984).

Für die Isolierung genomischer DNA nach der CTAB-Methode wurden 1g bei -80°C gelagertes Blattmaterial in flüssigem Stickstoff zermörsert, in 50ml Zentrifugenröhrchen (Sigma, Osterode) überführt und mit 5ml 2x CTAB-Puffer versetzt. Nach einer Inkubation bei 65°C unter leichtem Schütteln für 60 min wurden die Proben für 5min auf Eis abgekühlt, mit 1V Chloroform versetzt und für 30min geschüttelt. Nach 30min Zentrifugation bei 14.000rpm wurde die wässrige Phase abgenommen und in ein 10ml Reaktionsgefäß (Sigma, Osterode) überführt. Danach wurde die Probenlösung mit 4 μl 10%iger RNase A versetzt und für 30min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 0,6V eiskaltem Isopropanol wurde die DNA präzipitiert und anschließend 4min bei 8000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 1ml 76% Ethanol gewaschen. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen. Anschließend wurde die DNA 15min bei RT getrocknet und in 100 μl destilliertem Wasser über Nacht bei 4°C resuspensiert.

3.3.7. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung von PCR-Produkten wurde das entsprechende DNA-Fragment mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraktions- Kit (Qiagen, Hilden) eluiert.

3.3.8. RNA Isolierung

100mg bei -80°C gelagertes Blattmaterial wurden in flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Mörsers zerrieben und in 2ml Reaktionsgefäße überführt. Die Extraktion von Gesamt-RNA erfolgte mittels Invisorb® Spin Plant-RNA Mini Kit (Invitex, Berlin). Die RNA-Konzentration wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260nm und 280nm bestimmt.

Zur Überprüfung der RNA auf DNA-Kontaminationen wurde eine PCR unter Verwendung von spezifischen Primern für das Housekeeping-Gen EF-1 α durchgeführt. Bei Bedarf wurden DNA-Reste durch eine DNase Behandlung mit dem DNA-free-DNase-Treatment-Kit laut Protokoll entfernt (Amersham, Freiburg). Im Anschluss wurde die RNA nochmals auf Vorhandensein von DNA mittels PCR mit EF-1 α -Primern überprüft.

3.3.9. Restriktionsverdau von DNA

Zur Restriktion wurden 1-20 μg DNA mit Restriktionsenzymen in 1x Restriktionspuffer nach Angaben des Herstellers (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot) verdaut. Die enzymatische Reaktion erfolgte mit 1-10Units/ μg DNA bei 37°C über Nacht. Als Restriktionsenzyme wurden *HindIII* (5'-A[^]A G C T T-3'), *BglII* (5'-A[^]G A T C T-3') und *Cfr42I* (5'-C C G C[^]G G-3') eingesetzt.

3.3.10. PCR basierende Methoden

3.3.10.1. Mikrosatelliten-Analyse

Für die SSR-Analyse wurde das PCR-Protokoll der Fa. Licor (Bad Homburg, Deutschland) modifiziert. In einem Gesamtvolumen von 10 μl wurden 5ng genomische DNA mit 1 μM IRD700 bzw. -800 markiertem forward Primer und 2 μM reverse Primer in 1x Reaktionspuffer, 15mM MgCl₂, 2mM dNTPs mit 0,5Unit Taq Polymerase amplifiziert. Die DNA wurde zunächst für 5min bei 94°C denaturiert. Anschließend folgten 33 Zyklen mit: einem Denaturierungsschritt für 1min bei 94°C , einem Annealingschritt für 1min bei $56-60^{\circ}\text{C}$ und einer Elongation bei 72°C für 2min. Nach einer Abschluselongation bei 72°C für 5min wurde der Reaktionsansatz auf 4°C heruntergekühlt. Die verwendeten SSR-Primer sind in Tab. Anhang 1 aufgeführt.

3.3.10.2. Amplifikation von Gensequenzen

Für den Nachweis spezifischer Gensequenzen wurden 20-50ng DNA bzw. RNA in einem 25µl Reaktionsansatz mit 12,5pmol je Primer, 1x NH₄-Puffer, 12,5mM MgCl₂, 2,5mM dNTPs und 1x Farbpuffer unter Verwendung von 0,4Unit Taq Polymerase (Invitak, Berlin) amplifiziert.

Im ersten Schritt wurde die DNA für 2min bei 94°C denaturiert. Anschließend folgten 30 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt bei 94°C für 0,5min, einem Annealingsschritt für 1min bei 55-60°C und einer Elongation von 1,5min bei 72°C. Nach einer abschließenden Elongation für 10min bei 72°C wurde der Reaktionsansatz auf 4°C heruntergekühlt. Die verwendeten Primer mit der jeweiligen Annealingtemperatur sind in Tab. Anhang 2 aufgeführt.

3.3.10.3. Markierung der Sonden-DNA

Für die Herstellung der Sonden wurden die kodierenden Bereiche des *attE*-Gens, des *T4L*-Gens, des (*H*-)*Dpo*-Gens, des *nptII*-Gens bzw. des *nos*-Promotors markiert. Die Markierung der Sonden-DNA für die erfolgte mittels PCR DIG Probe Synthesis Kit nach dem Protokoll des Herstellers (Roche-Diagnostics, Mannheim). Die verwendeten Primer für die Amplifikation der jeweiligen Sequenzen sind in Tab Anhang 2 aufgeführt.

3.3.10.4. RT- PCR

Die Synthese der cDNA erfolgte aus 0,1-5µg Gesamt-RNA mit dem RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit entsprechend des Protokolls (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot). Der Erfolg der cDNA Synthese wurde mittels PCR (vgl. Kapitel 3.3.10.2.) unter Verwendung spezifischer Primer für den Elongationsfaktor EF-1α überprüft. Für weitere PCR Analysen wurden jeweils 1µl der synthetisierten cDNA eingesetzt.

3.3.11. Elektrophorese

3.3.11.1. Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in der Regel auf einem 0,8-1%igen Agarosegel mit 1x TAE-Puffer und einer Spannung von 50-120Volt bei maximaler Stromstärke mit einer Laufzeit von 1-6h. Die Anfärbung der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,0005% Ethidiumbromid in das Agarosegel. Die Auswertung der Agarosegele erfolgte mittels ‚Gel Doc XR‘ (Biorad, München). Als Größenstandard wurden 50bp-,

100bp- und 1kb-Leiter der Firma MBI-Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Für die Quantifizierung von DNA wurden λ -DNA-Mengenstandards in einer Verdünnungsreihe von 10ng, 50ng, 100ng und 200ng mitgeführt. Die Quantifizierung erfolgte durch Vergleich der DNA-Proben mit den λ -DNA Standards mittels des Softwareprogramms Quantity One 4.2.1 (Biorad, München).

3.3.11.2. Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur Auftrennung der SSR-Fragmente wurde der PCR-Ansatz mit 10-30 μ l Licor-Ladepuffer verdünnt. Nach Denaturierung der DNA für 3min bei 94°C wurden die Proben bei 4°C gekühlt und auf ein 6,5%-Polyacrylamidgel ‚KB-Plus‘ (Licor, Bad Homburg) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte mittels NEN Global IR² DNA Sequencer (Licor, Bad Homburg) für 90min bei 1400Volt in 1x TBE.

3.3.12. Southern-Blot-Analysen

Nach Auftrennung der DNA-Fragmente auf einem 0,8%-igen Agarosegel wurde das Gel für zweimal 15min in Denaturierungspuffer denaturiert und anschließend zweimal 15min in einer Neutralisierungslösung neutralisiert.

Der Transfer der DNA erfolgte auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Roche-Diagnostics, Mannheim) unter Anwendung von Standardmethoden nach Maniatis et al. (1982).

Zur Equilibrierung der Membran wurde diese zunächst bei 42°C in 10ml Hybridisierungslösung für 2h prähybridisiert. Anschließend wurde der Prähybridisierungspuffer verworfen. Für die Hybridisierung wurden ca. 250ng DIG-markierte Sonde (vgl. Kapitel 3.3.10.3.) für 10min bei 96°C denaturiert, in 5ml Hybridisierungslösung gelöst und der Membran zugesetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C über Nacht.

Nach jeweils zwei Waschschritten mit 2x SSC+ 0,1% SDS bei RT und 0,1% SSC + 0,1% SDS bei 68°C für jeweils 15min wurde die Membran kurz in Maleinsäurepuffer gespült und für 45min in Blockierungspuffer equilibriert. Zur Bindung des Anti-DIG-Konjugates an die Membran wurde das Konjugat in einem Verhältnis von 1: 20.000 in Blockierungslösung verdünnt und die Membran für 30min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für 20min in Waschpuffer und Equilibrierung der Membran in Blockierungspuffer für 10min erfolgte die Detektion mittels ECF-Lösung (Roche-Diagnostics, Mannheim). Die Auswertung wurde mit dem Laserscanner FX Pro Plus (Biorad, München) durchgeführt.

3.3.13. Methylierungsuntersuchungen

Die Untersuchung der Methylierung des *nos*-Promotors erfolgt mit geringen Modifikationen nach einem Protokoll von Ulian et al. (1996). Dazu wurden 100µg genomische DNA in einem Doppelverdau mit 100Units *HindIII* und 100Units *Cfr42I* (MBI Fermentas, St. Leon Roth) verdaut. *HindIII* ist nicht methylierungssensitiv⁹ (vgl. Kapitel 3.3.9.). Das Restriktionsenzym *Cfr42I* ist ein Isochizomer von *SacII* und *SstII* und schneidet in der Sequenz CCGCGG, wenn das innere C nicht methyliert ist. Methylierte DNA wird nur von *HindIII* geschnitten. Nach Hybridisierung (vgl. Kapitel 3.3.12.) mit einer *nos*-Promotor spezifischen Sonde (vgl. Kapitel 3.3.10.3.) ist ein Fragment mit einer Größe von über 2,5kb zu erwarten. Unmethylierte DNA wird von *HindIII* und *Cfr42I* geschnitten und nach Hybridisierung ist ein 2,3kb Fragment zu detektieren.

3.3.14. ELISA-Test

Eine 96er Mikrotiterplatte wurde mit 100µl Rabbit-Antikörper (5Prime→ 3Prime, Inc., Boulder, USA) je well in einer 1: 2000 Verdünnung beladen und bei 37°C inkubiert. Nach 2h wurde die Reaktion abgebrochen und die Platte dreimal für je 5min mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurde die Mikrotiterplatte mit 200µl Blockierungslösung je well für 30min bei RT und bei 300rpm auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. 20mg frisches Blattmaterial wurden mit ELISA-Extraktionspuffer (25µl/1mg Blattmaterial) versetzt, homogenisiert und für 5min bei 12.000rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Beladung der Mikrotiterplatte mit 100µl des Probenüberstandes je well in dreifacher Wiederholung. Als Standard wurden fünf NPTII-Konzentrationen (0pg, 100pg, 250pg, 500pg, 750pg bzw. 0pg, 100pg, 250pg, 650pg und 1500pg) in Extraktionspuffer gelöst und in dreifacher Wiederholung auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde eine positiv getestete, transgene Pflanzenprobe der Apfelsorte ‚Pinova‘ und als Negativkontrolle eine nicht transgene Pflanzenprobe der Apfelsorte ‚Pinova‘ mitgeführt. Die verschlossene Platte wurde anschließend bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligen Waschen in Waschpuffer wurden je 100µl des 1:2000 verdünnten, biotinylierten Antikörpers (5Prime→ 3Prime, Inc., Boulder, USA) zugegeben. Nach 1h Inkubation bei RT wurde die Platte fünfmal in Waschpuffer gewaschen. Darauf folgte die Zugabe von 100µl Streptavidin-Konjugat (5Prime→ 3Prime, Inc., Boulder, USA) pro

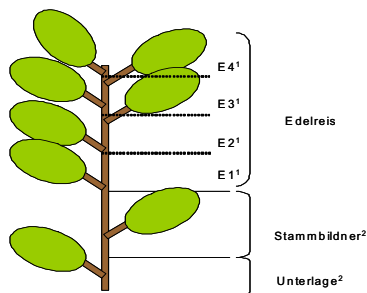
⁹ Quelle: www.fermentas.com

Ansatz und eine Inkubation für 30min bei RT. Nach fünf weiteren Waschschrritten in Waschpuffer wurden jeder Probe 100µl des alkalischen Phosphatase-Substrats (5Prime → 3Prime, Inc., Boulder, USA) hinzugefügt und diese für weitere 30min bei RT inkubiert.

Die Bestimmung der NPTII-Proteinkonzentration erfolgte im direkten Anschluss an die letzte Inkubationszeit, nach 10min und 20min mit dem ELISA plate reader (rosys anthos 2010, WinRead V.2.1, Anthos-Labtech, Wals, Salzburg, Österreich). Der NPTII-Proteingehalt wurde anhand der Punkt zu Punkt-Standardkurve in pg Protein/mg Pflanzenmaterial ermittelt. Das Ergebnis der ELISA Analyse wurde als positiv eingestuft, wenn die zweifache NPTII-Proteinmenge der Negativkontrolle überschritten wurde.

3.3.15. GUS-Test

Der histochemische GUS-Test erfolgte mit leichten Modifizierungen nach einem Protokoll von Flachowsky et al. (2008). Dabei wurden aus frischem Blattmaterial Blattstücke von 1cm Durchmesser mit einem Korkbohrer ausgestochen. Als Negativkontrolle wurden Blattstücke einer nicht transgenen Apfelpflanze der Sorte ‚Pinova‘ verwendet. Für die Untersuchungen der transgenen Unterlage und des Stammbildners wurden jeweils drei Blattstücke getestet. Von dem nicht transgenen Edelreis wurden vier verschiedene Blattetagen (E1 bis E4) beprobt (Abbildung 5). Von jeder Blattetage wurden ebenfalls drei Blattstücke getestet, so dass insgesamt 12 Blattstücke vom Edelreis getestet wurden.



¹E1 bis E4: Bezeichnung der Blattetagen eins bis vier, die innerhalb des Edelreis analysiert wurden. ²Bei dem Stammbildner und der Unterlage wurden die Blätter für die Untersuchungen zum Transport der Transgenprodukte nicht entfernt, wie das normalerweise bei veredelten Apfelpflanzen der Fall ist.

Abbildung 5: Schematische Darstellung der beprobten Veredelungskomponenten einer veredelten Apfelpflanze für die Untersuchung mittels GUS-Test.

Das Pflanzenmaterial wurde in 3ml GUS-Puffer zunächst für 30-60 min bei 1Pa vakuumfiltriert und anschließend bei 37°C über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Chlorophyll mit Ethanol-Essigsäure (3:1) entfernt und die Blattstücke in destilliertem Wasser gewaschen. Die Bestimmung der GUS Aktivität erfolgte anhand der Blaufärbung der untersuchten Blattstücke. Dazu wurden die Intensität der Blaufärbung in fünf Klassen eingeteilt: Klasse 1: Blattstück komplett dunkelblau; Klasse 2: der Großteil (70-80%) der Blattstücke ist blau, zum Teil treten vereinzelt weiße Punkte auf; Klasse 3: das Blattstück ist komplett hellblau gefärbt; Klasse 4: der Großteil (70-80%) des Blattstücks ist weiß, zum Teil treten vereinzelt blaue Punkte auf; Klasse 5: das Blattstück ist komplett weiß.

3.3.16. Western-Blot-Analysen

Für die Extraktion von Gesamtprotein wurden 50-100mg verholztes Pflanzenmaterial unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu Pulver zerrieben. Das Probenmaterial wurde mit 300µl Proteinextraktionspuffer versetzt und für 5min bei 100°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10min und 13.200rpm zentrifugiert (alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und mit 4V Aceton bei -20°C gefällt. Nach 10min wurden die Proben bei 13.200rpm für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet getrocknet. Anschließend wurden die Proteine in 50-100µl 1% Extraktionspuffer, 1x Blaupuffer und 1x Reducing Reagent (MBI-Fermentas, St Leon-Roth) gelöst. Zur Inaktivierung von Proteinasen wurde die Proteinlösung für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert oder bei -20°C eingefroren.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Spannung von 200Volt für 1h unter Verwendung einer vertikalen Gelkammer auf einem 4-20%igen Criterion XT precast-Fertigel (Biorad, München) in 1x SRB Laufpuffer. Dazu wurde das Gel mit 30µl der Proteinlösung beladen.

Der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran (Biorad, München) erfolgte mit Hilfe des Semi-dry-Blots. Das Acrylamidgel wurde für 5min in Anodenpuffer II equilibriert. Die PVDF-Membran wurde mit Methanol angefeuchtet, mit Wasser gespült und anschließend kurz in Anodenlösung II getaucht. Für den Aufbau des Transferpaketes wurden zunächst 6 Lagen Whatman-Papier mit Anodenlösung I und weitere 3 Lagen Whatman-Papier in Anodenlösung II getränkt und luftblasenfrei auf die Graphitplatte

der Semi-dry-Blot-Apparatur (Biorad, München) gestapelt. Dann folgten die PVDF-Membran und das Gel. Das Gel wurde mit 9 Lagen Whatman-Papier, die zuvor in Kathodenlösung getaucht wurden, abgedeckt. Der Transfer erfolgte bei 20Volt für 30min. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran mit Ponceau S angefärbt und anschließend mit Wasser bzw. 1x PBS wieder vollständig entfärbt.

Nach einstündiger Blockierung mit 3% BSA in 1x PBS wurde die Membran zweimal mit 1x PBS 10min gespült und danach für 1h mit dem Protein-spezifischen Antikörper¹⁰ (1:1000 in 1x PBS mit 10% BSA) inkubiert. Die Membran wurde dreimal jeweils 10min in Waschpuffer gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper¹¹ (1:1000 in 1x PBS mit 10% Magermilchpulver) für 1h inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Membran für 10min erfolgte die Detektion mittels ECL-Plus-Detektion-Kit (Amersham, Freiburg). Die Signale wurden mit Hilfe des Laserscanners FX Pro Plus (Biorad, München) visualisiert.

¹⁰ Anti-Neomycin Phosphotransferase II (rabbit polyclonal IgG) (Biomol, Hamburg) für den Nachweis des NPTII-Proteins.

¹¹ ECL Anti-rabbit IgG peroxidase-linked species-specific whole antibody (Amersham, Freiburg) zur Detektion der Anti-Neomycin Phosphotransferase II .

4. Ergebnisse

4.1. Potentielles Auskreuzungsverhalten beim Apfel

Für die Bestimmung des potentiellen Auskreuzungsverhaltens von transgenen Apfelbäumen wurde eine Versuchsfläche mit 50 Apfelgenotypen in Dresden-Pillnitz ausgewählt. Innerhalb dieser Sorten wurden 38 Sortengenotypen mit insgesamt 60 Apfelpflanzen als Pollenfängerbäume ausgesucht. Als Pollenspenderpflanze wurden 15 Bäume des Rotmarkergenotyps ‚TNR 31-35‘ bestimmt. Dieser Genotyp besitzt ein homozygot dominantes Gen, das verantwortlich für eine Rotfärbung der Laubblätter ist. In befruchtungsbiologischen Untersuchungen sollte zunächst geklärt werden, ob ‚TNR 31-35‘ ein geeigneter Pollenspender ist. Dazu wurden die Vitalität und die Keimfähigkeit des Pollens untersucht. Weiterhin wurde mit Hilfe von Kreuzungsversuchen die sexuelle Kompatibilität zwischen ‚TNR 31-35‘ und den Pollenfängersorten bestimmt. Zur Überprüfung des dominanten Erbganges des Rotmarkergens wurden die Früchte der Pollenfängersorten nach künstlicher Bestäubung geerntet und die Kerne ausgesät. Anschließend wurden die Sämlinge anhand ihrer Blattfärbung bonitiert.

Für die Bestimmung der Auskreuzungsdistanz wurden Früchte der ausgewählten Pollenfängerbäume nach freier Abblüte geerntet. Die Kerne wurden ausgesät und die Sämlinge anschließend phänotypisch anhand ihrer Blattfärbung bonitiert. Zusätzlich wurde ein Teil der Sämlinge mit spezifischen SSR-Markern überprüft.

4.1.1. Untersuchungen zur Vitalität und Keimfähigkeit des Pollens von ‚TNR 31-35‘

Zur Beurteilung der Befruchtungsfähigkeit von ‚TNR 31-35‘ wurde die Vitalität und die Keimfähigkeit des Pollens untersucht (Abbildung 6).

Für die Bestimmung der Vitalität wurden Pollenkörner mit Karminessigsäure angefärbt. 36 von insgesamt 1000 untersuchten Pollenkörnern blieben ungefärbt. Das heißt diese Körner waren nicht vital. 934 Pollenkörner waren gequollen und zeigten eine Rotfärbung. Diese Pollenkörner konnten damit als vital eingestuft werden. Damit betrug die Vitalität des Pollens 96,4%.

Für die Bestimmung der Keimfähigkeit wurden insgesamt 2000 Pollenkörner getestet. 188 Pollenkörner zeigten kein Wachstum eines Pollenschlauchs und waren damit nicht keimfähig. 1812 Pollenkörner bildeten einen Pollenschlauch aus und wurden als keimfähig eingestuft. Die Keimfähigkeit des Pollens von ‚TNR 31-35‘ betrug damit 90,6%.

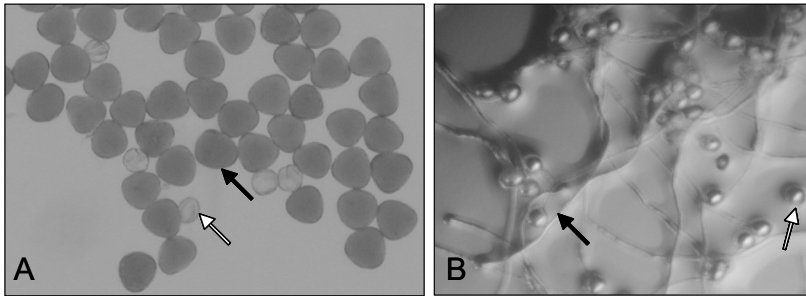


Abbildung 6: Vitalitäts- und Keimfähigkeitsprüfung der Pollenkörner von 'TNR 31-35'.

A: ➔ vitales Pollenkorn ⇨ nicht vitales Pollenkorn
 B: ➔ keimfähiges Pollenkorn ⇨ nicht-keimfähiges Pollenkorn

4.1.2. Untersuchung zur sexuellen Kompatibilität

Für die Untersuchung der sexuellen Kompatibilität zwischen dem Pollenspendergenotyp und den 38 ausgewählten Pollenfängersorten wurden im Jahr 2003 27 Pollenfängersorten und im Jahr 2004 28 Pollenfängersorten künstlich mit dem Pollen des Pollenspendergenotyps bestäubt. Die Klimadaten für den Zeitpunkt der künstlichen Bestäubung für die Jahre 2003 und 2004 sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Klimadaten für den Zeitraum der künstlichen Bestäubung in den Jahren 2003 und 2004.

Datum	Tages-Temperatur			relative Feuchte ¹	Nieder-schlag ²	Wind-geschw. ³
	min. °C	mittel °C	max. °C			
30.04.2003	9,5	17,3	23,3	64,0	0,0	15,5
01.05.2003	10,7	14,3	18,8	51,0	0,0	17,5
02.05.2003	8,5	16,1	21,5	46,0	0,0	12,0
03.05.2003	8,5	13,7	16,5	52,0	0,0	18,5
28.04.2004	7	13,6	18,7	53,0	0,0	9,6
29.04.2004	8,5	14,4	20,1	61,0	0,0	13,2
30.04.2004	9,3	16,2	22,7	64,0	0,0	14,5

Quelle: Deutscher Wetterdienst; ¹ mittel %; ² mm; ³ max. (m/ sec)

In beiden Jahren begann die Vollblüte von ‚TNR 31-35‘ zwei bzw. drei Tage früher als die Blüte der Pollenfängersorten. Im Jahr 2003 setzte die Vollblüte der Pollenfängersorten am 30. April mit der Sorte ‚Discovery‘ ein. Die meisten Pollenfängersorten folgten zwei Tage später. Abschließend (3. Mai 2003) begannen die Pollenfängersorten ‚Cox Orangen Renette‘, ‚Oldenburg‘, ‚Reka‘ und ‚Rewena‘ zu blühen.

Im Jahr 2004 begann die Vollblüte bei den Pollenfängersorten mit ‚Liberty‘ und ‚McIntosh‘ am 28. April. Der größte Teil der anderen Pollenfängersorten folgte am 29. und 30. April. Als letztes (1. Mai 2004) erreichten die zwei Pollenfängersorten ‚Reanda‘ und ‚Rewena‘ die Vollblüte.

Im Jahr 2003 waren 18 der getesteten Kreuzungskombination mit einem Fruchtansatz von über 15 % hoch fertil. Acht Kreuzungskombinationen waren mittelmäßig fertil (8-15% Fruchtansatz). Die Kombination ‚Idared‘ x ‚TNR 31-35‘ wurde als wenig fertil eingestuft. Diese Sorte hatte einen Fruchtansatz von 5%. Der durchschnittliche Fruchtansatz betrug 2003 20,1 % (Tabelle 5).

Im Jahr 2004 wurden die Kreuzungsversuche wiederholt. Für acht Pollenfängersorten war die Wiederholung der Kreuzungsversuche nicht möglich, da der Blütenansatz nicht ausreichend war. Neun Pollenfängersorten wurden im Jahr 2004 erstmalig gekreuzt. Zwei Pollenfängersorten wurden weder 2003 noch 2004 künstlich bestäubt, da in beiden Jahren nicht genügend Blüten für die Kreuzung zur Verfügung standen. Insgesamt war es möglich die geplanten Kreuzungsversuche an 36 der 38 ausgewählten Pollenfängersorten durchzuführen.

Im Jahr 2004 betrug der durchschnittliche Fruchtansatz 36,6% und war damit deutlich höher als im Vorjahr. 27 von insgesamt 28 Kreuzungskombinationen waren hoch fertil. Die Kombination ‚Greensleaves‘ x ‚TNR 31-35‘ war mittelmäßig fertil. Im Gegensatz zum Vorjahr war der Fruchtansatz bei den sechs Kreuzungskombination mit ‚Auralia‘, ‚Discovery‘, ‚Liberty‘, ‚Pi-As 21,73‘, ‚Pikant‘ bzw. ‚Rewena‘ im Jahr 2004 wesentlich höher (Tabelle 5).

Tabelle 5: Ergebnisse der künstlichen Bestäubung mit Pollen des Pollenspendergenotyps im Jahr 2003 und 2004 zur Bestimmung der sexuellen Kompatibilität von ‚TNR 31-35‘ mit den Pollenfängersorten.

Sorte	2003				2004			
	Datum ¹	Blüten ²	Junifall ³	Fertilität ⁴	Datum ¹	Blüten ²	Junifall ³	Fertilität ⁴
Auralia	2.5.03	86	8	xx	30.4.04	36	15	xxx
Carola	2.5.03	90	20	xxx	~	~	~	~
Clivia	1.5.03	136	22	xxx	29.4.04	42	25	xxx
Cox Orangen Renette	3.5.03	72	7	xx	~	~	~	~
Discovery	30.4.03	82	7	xx	~	~	~	~
Freedom	2.5.03	73	13	xxx	30.4.04	36	11	xxx
Gloster	~	~	~	~	29.4.04	98	21	xxx
Golden Delicious	2.5.03	102	36	xxx	29.4.04	41	9	xxx
Greensleves	~	~	~	~	30.4.04	16	2	xx
Idared	1.5.03	93	5	x	~	~	~	~
James Grieve	~	~	~	~	29.4.04	122	38	xxx
Jonadel	2.5.03	79	12	xxx	~	~	~	~
Jonagold	2.5.03	69	19	xxx	~	~	~	~
Jonathan	~	~	~	~	29.4.04	128	24	xxx
Liberty	1.5.03	85	10	xx	28.4.04	81	15	xxx
McIntosh	1.5.03	100	19	xxx	28.4.04	73	41	xxx
Oldenburg	3.5.03	72	23	xxx	29.4.04	102	34	xxx
PIAs 21,73	1.5.03	131	16	xx	29.4.04	37	23	xxx
Piglos	~	~	~	~	~	~	~	~
Pikant	2.5.03	81	12	xx	30.4.04	10	6	xxx
Pinova	2.5.03	100	17	xxx	29.4.04	100	16	xxx
Piros	2.5.03	94	14	xx	~	~	~	~
Priam	~	~	~	~	28.4.04	101	28	xxx
Prima	1.5.03	108	17	xxx	30.4.04	19	7	xxx
Realka	~	~	~	~	30.4.04	37	25	xxx
Reanda	2.5.03	73	25	xxx	1.5.04	72	23	xxx
Reglindis	2.5.03	76	12	xxx	29.4.04	74	19	xxx
Reka	3.5.03	94	20	xxx	30.4.04	44	16	xxx
Releika	~	~	~	~	29.4.04	55	18	xxx
Releta	2.5.03	53	32	xxx	1.5.04	33	22	xxx
Remo	~	~	~	~	30.4.04	103	28	xxx
Resi	2.5.03	59	18	xxx	30.4.04	37	20	xxx
Retina	~	~	~	~	30.4.04	30	6	xxx
Rewena	3.5.03	93	9	xx	1.5.04	45	24	xxx
Rome Beauty	2.5.03	58	45	xxx	30.4.04	66	29	xxx
Starkrimson	~	~	~	~	~	~	~	~
Spartan	1.5.03	92	15	xxx	29.4.04	21	12	xxx
Undine	2.5.03	90	18	xxx	~	~	~	~

¹Datum der Bestäubung; ² Anzahl bestäubte Blüten; ³ Anzahl Früchte nach Junifall; ⁴ Fertilität: x= gering fertil (Fruchtansatz <8%), xx= mittelmäßig fertil (Fruchtansatz 8-15%) xxx= hoch fertil (Fruchtansatz >15%); ~ nicht analysiert

4.1.3. Untersuchung der Transportdistanzen von Apfelpollen durch Wind

In beiden Untersuchungsjahren wurden auf den Pollenfallen Apfelpollen nachgewiesen, der Anteil war im Jahr 2006 jedoch höher als in 2005. Beide Versuchsergebnisse sind vergleichbar. Mindestens ein Apfelpollenkorn wurde innerhalb eines Radius von 6m zum Pollenspenderbaum gefunden. In Abhängigkeit von der Richtung waren bis zu einer Entfernung von 20m Apfelpollen auf den Pollenfallen nachweisbar. In beiden Jahren wurde der größte Anteil von Apfelpollen auf den Pollenfallen gefunden, die in nördlicher und westlicher Richtung aufgestellt waren. Hier war ein Pollentransport bis zu 20m nachweisbar (Abbildung 7). Besonders hoch war dabei die Anzahl der detektierten Pollenkörner in nördlicher Richtung. In östlicher und südlicher Richtung war der Anteil der detektierten Apfelpollenkörner geringer. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind schematisch in Abbildung 8 dargestellt.

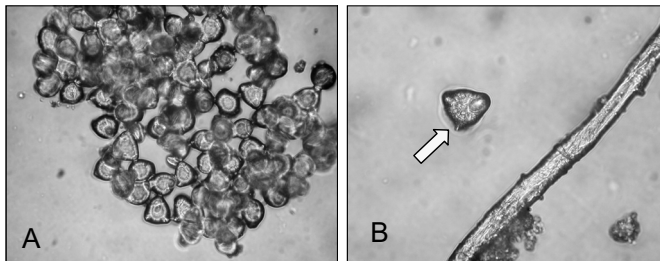


Abbildung 7: Nachweis von Apfelpollen auf den Pollenfallen mit Hilfe eines Lichtmikroskops bei 100facher Vergrößerung.
A: Apfelpollenkörner in einer Entfernung von 4m in nördlicher Richtung zum Pollenspenderbaum
B: einzelnes Apfelpollenkorn (weißer Pfeil) in einer Entfernung von 14m in westlicher Richtung zum Pollenspenderbaum.

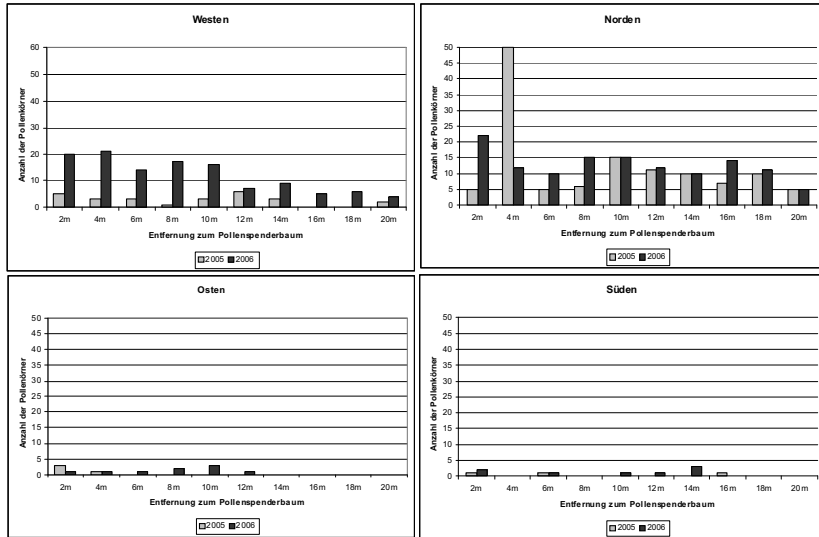


Abbildung 8: Transportdistanzen von Apfelpollen durch Wind in unterschiedlichen Himmelsrichtungen.

4.1.4. Bestimmung spezifischer SSR-Marker für die Identifizierung des Pollenspenders ‚TNR 31-35‘

Ziel dieser Untersuchung war es spezifische SSR-Marker für die Unterscheidung von ‚TNR 31-35‘ und den anderen Genotypen des Versuchsfeldes zu finden. Dazu wurden die 49 Apfelsorten des Versuchsfeldes sowie der ausgewählte Pollenspendergenotyp mit bekannten SSR-Primern untersucht. Insgesamt wurden 13 SSR-Primerkombinationen getestet. Von diesen Primerkombinationen zeigten zehn SSR-Primer ein auswertbares Bandenmuster mit bis zu 22 Allelen pro Locus. Die Ergebnisse sind in Tab. Anhang 3 dargestellt. Die SSR-Primer, bei denen die detektierten Allele der Apfelgenotypen um mindestens 2bp von den Allelen von ‚TNR 31-35‘ abwichen, wurden für die anschließenden Analysen ausgewählt (Tabelle 6).

Tabelle 6: SSR-Marker zur Selektion zwischen Apfelsorten und ‚TNR 31-35‘.

Apfelgenotyp	SSR Marker									
	CH05A05	CH04E03	CH05C07	CH03D11	CH04A12	CH04E02	CH04E05	CH02C02b	CH03B10	CH02F06
Alkmene	X		X	X						
Auralia	X		X							
Carola	X		X	X						
Clivia		X	X		X					
Cox Orangen Renette	X		X					X		
Discovery	X	X		X	X			X		
Elstar	X	X		X	X					
Empire	X			X		X			X	
Freedom		X		X						X
Gibbs Golden Gage	X			X						
Gloster	X	X				X				
Golden Delicious	X	X		X						
Greensleves	X	X		X						
Idared	X									
James Grieve	X	X		X				X		
Jonadel	X	X					X			
Jonafree	X		X							
Jonagold	X		X							X
Jonathan	X									
Juno	X	X		X	X		X			
Liberty	X	X		X	X					X
McIntosh	X					X				X
Oldenburg		X			X					
Pi-As 21,73	X	X	X		X		X			
Piglos	X	X				X				X
Pikant	X		X		X					X
Pilot		X								
Pinova		X	X		X		X			X
Piros		X	X	X		X				
Priam	X									X
Prima	X		X		X					
Priscilla	X	X	X		X				X	
Realka			X		X					
Reanda	X	X	X							
Redfree	X	X	X	X	X	X	X			
Reglindis	X	X	X	X						X
Reka	X	X	X	X						
Releika	X	X	X	X	X					
Releta			X		X					
Remo		X	X	X		X				
Rene		X		X						
Resi			X							
Retina	X		X							X
Rewena	X	X	X	X						
Rome Beauty				X						
Sire Prize	X	X			X					
Spartan	X	X				X				
Starkrimson	X					X				
Undine	X	X	X		X					
Anzahl detektierter Allele	17	22	17	9	21	9	12	13	10	12

Genotypen bei denen der SSR-Marker andere Allele zeigt, als der Pollenspendergenotyp sind mit einem X gekennzeichnet.

Mit dem SSR-Marker CH05A05 wurden für ‚TNR 31-35‘ zwei Allele von 203bp und 205bp Länge detektiert. Bei 37 Apfelsorten des Versuchsfeldes wurden Allele detektiert deren Fragmentlängen um mehr als 2bp von denen des Pollenspendergenotyps abwichen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei diesen Allelen um andere Allele, als bei ‚TNR 31-35‘ handelt. Damit ist es möglich mit diesem SSR-Marker 37 Apfelsorten vom Pollenspender zu unterscheiden. Der SSR-Marker CH04E03 zeigte ebenfalls ein sehr polymorphes Bandenmuster. Mit diesem SSR-Marker konnte ‚TNR 31-35‘ von 29 Pollenfängersorten differenziert werden. Der SSR-Marker CH05C07 erlaubte die Differenzierung von 25 Apfelsorten von ‚TNR 31-35‘. Mit den drei SSR-Markern CH05A05, CH04E03 und CH05C07 war es somit möglich, alle im Versuchsfeld vorhandenen Apfelgenotypen vom Pollenspendergenotyp zu unterscheiden. Drei weitere SSRs (CH03D11 CH04A12 und CH04E02) zeigten ebenfalls ein polymorphes Bandenmuster. Mit diesen Markern war die Differenzierung von 21, 17 bzw. 9 Pollenfängersorten vom Pollenspendergenotyp möglich. Vier weitere SSR-Primer waren weniger polymorph. Für diese SSR-Primer wurden maximal 12 verschiedene Allele pro Locus detektiert. Insgesamt konnten mit den SSRs CH04E05, CH02C02b, CH03B10 und CH02F06 25 Apfelsorten vom Pollenspendergenotyp unterschieden werden. Anhand dieser Ergebnisse konnte der Pollenspendergenotyp eindeutig von den anderen Kulturapfelsorten unterschieden werden.

4.1.5. Phänotypische Evaluierung von Sämlingen aus künstlicher Bestäubung

Von den Kreuzungen, die im Jahr 2003 durchgeführt wurden, wurden insgesamt 2504 Samen ausgesät. Die durchschnittliche Keimrate der Samen betrug 92,1 %. Damit konnten 2359 Sämlinge phänotypisch bonitiert werden (Tab. Anhang 4).

Von den Kreuzungen, die im Jahr 2004 durchgeführt wurden, wurden 2392 Samen ausgesät. Die durchschnittliche Keimrate lag hier bei 66,9%. Damit konnten 1649 Sämlinge analysiert werden (Tab. Anhang 4).

In 14 von 27 Kreuzungsnachkommenschaften des Jahres 2003 wurden nur rotblättrige Nachkommen gefunden. Die Nachkommen der restlichen 13 Kreuzungskombinationen wiesen auch grünlaubige Sämlinge auf. Der Anteil der grünlaubigen Sämlinge lag durchschnittlich bei 2,5%. Bei sieben Kreuzungskombinationen waren weniger als 1,5% der Sämlinge grünlaubig. Drei Sorten zeigten mit bis zu 5,8% einen höheren Anteil an grünlaubigen Sämlingen. Bei den Kreuzungsnachkommenschaften mit ‚Idared‘, ‚Freedom‘ und ‚Reglindis‘ waren sogar bis zu 26% der Sämlinge grünlaubig (Tabelle 7).

In 19 der 28 Kreuzungsnachkommenschaften des Jahres 2004 wurden nur rotlaubige Nachkommen bonitiert. Unter den Nachkommen der restlichen neun Kreuzungskombinationen waren auch grünlaubige Sämlinge. Der Anteil der grünlaubigen Sämlinge betrug im Durchschnitt 1,7%. Bei zwei Kreuzungsnachkommenschaften lag der Anteil grünlaubiger Nachkommen unter 1,6%. Die anderen Sorten zeigten einen höheren Anteil zwischen 2,5% und 8,3% (Tabelle 7).

Tabelle 7: Anzahl grünlaubiger Sämlinge nach Kreuzung von ‚TNR 31-35‘ mit verschiedenen Pollenfängersorten.

Sorte	Anzahl Sämlinge 2003				Anzahl Sämlinge 2004			
	Summe	rot	grün	grün (%)	Summe	rot	grün	grün (%)
Auralia	13	13	0	0,0	35	35	0	0,0
Carola	146	144	2	1,4	~	~	~	~
Clivia	155	155	0	0,0	81	79	2	2,5
Cox Orangen Renette	11	11	0	0,0	~	~	~	~
Discovery	7	7	0	0,0	~	~	~	~
Freedom	92	80	12	13,0	42	40	2	4,8
Gloster	~	~	~	~	35	35	0	0,0
Golden Delicious	262	260	2	0,8	131	129	2	1,5
Greensleaves	~	~	~	~	11	11	0	0,0
Idared	26	22	4	15,4	~	~	~	~
James Grieve	~	~	~	~	16	16	0	0,0
Jonadel	52	49	3	5,8	~	~	~	~
Jonagold	37	37	0	0,0	~	~	~	~
Jonathan	~	~	~	~	115	115	0	0,0
Liberty	44	44	0	0,0	26	26	0	0,0
McIntosh	95	95	0	0,0	36	36	0	0,0
Oldenburg	75	75	0	0,0	84	84	0	0,0
PiAs 21,73	83	82	1	1,2	102	102	0	0,0
Piglos	~	~	~	~	~	~	~	~
Pikant	60	60	0	0,0	7	7	0	0,0
Pinova	143	142	1	0,7	108	99	9	8,3
Piros	27	27	0	0,0	~	~	~	~
Priam	~	~	~	~	132	131	1	0,8
Prima	117	116	1	0,9	91	87	4	4,4
Realka	~	~	~	~	31	31	0	0,0
Reanda	114	111	3	2,6	7	7	0	0,0
Reglindis	103	77	26	25,2	98	98	0	0,0
Reka	113	112	1	0,9	19	19	0	0,0
Releika	~	~	~	~	46	46	0	0,0
Releta	129	128	1	0,8	40	40	0	0,0
Remo	~	~	~	~	59	59	0	0,0
Resi	104	102	2	1,9	76	73	3	3,9
Retina	~	~	~	~	36	35	1	2,8
Rewena	45	45	0	0,0	70	70	0	0,0
Rome Beauty	140	140	0	0,0	80	76	4	5,0
Starkrimson	~	~	~	~	~	~	~	~
Spartan	99	99	0	0,0	35	35	0	0,0
Undine	67	67	0	0,0	~	~	~	~

~ nicht analysiert

4.1.6. Genotypische Evaluierung grünlaubiger Sämlinge aus der Kreuzung von ‚TNR 31-35‘ mit verschiedenen Pollenfängersorten

Mit Hilfe einer SSR-Analyse sollte bestimmt werden, ob es sich bei den grünlaubigen Sämlingen um Kreuzungsnachkommen des Rotmarkers ‚TNR 31-35‘ handelt. Deshalb wurden 85 von insgesamt 87 grünlaubigen Sämlingen aus den Jahren 2003 und 2004 mit SSR-Markern analysiert. Zwei Sämlinge aus dem Jahr 2004 konnten nicht analysiert werden, da sie kurz nach der Bonitur eingegangen waren. Als Kontrolle wurden je fünf rotlaubige Nachkommen der Kreuzungskombination, die jeweilige Muttersorte sowie der Pollenspender ‚TNR 31-35‘ mit getestet. Jede Kreuzungskombination wurde mit zwei bis fünf SSR-Markern analysiert. Dabei wurden die SSR-Marker eingesetzt, die polymorphe Banden zwischen der Muttersorte und ‚TNR 31-35‘ gezeigt hatten (vgl. Tabelle 4, Kapitel 4.1.3.). Die Ergebnisse der SSR-Analyse der grünlaubigen Nachkommen aus den Kreuzungen für das Jahr 2003 sind in Tab. Anhang 6 und für das Jahr 2004 in Tab. Anhang 7 aufgeführt. Dabei war es für 84 grünlaubigen Sämlingen möglich ‚TNR 31-35‘ als Vaterpflanze auszuschließen. Ein grünlaubiger Sämling aus der Kreuzung ‚Idared‘ x ‚TNR 31-35‘ im Jahr 2003 zeigte bei SSR-Analyse mit drei SSR-Markern jeweils ein Allel der Mutterpflanze und ein Allel von ‚TNR 31-35‘. Bei diesem grünlaubigen Sämling konnte ‚TNR 31-35‘ nicht als Vater ausgeschlossen werden. Bei insgesamt sechs grünlaubigen Nachkommen aus den Kreuzungen der Pollenfängersorten ‚Reka‘, ‚Golden Delicious‘, ‚Reglindis‘, ‚Pinova‘ und ‚Resi‘ mit ‚TNR 31-35‘ wurden nach SSR-Untersuchungen nur die Allele der jeweiligen Pollenfängersorte detektiert. Bei diesen Nachkommen kann von einer Selbstung ausgegangen werden. Zwei weiteren Kreuzungsnachkommen der Kreuzung ‚Resi‘ x TNR 31-35‘ aus dem Jahr 2003 zeigten Allele, die sowohl der Muttersorte, als auch von ‚TNR 31-35‘ stammen können. Bei diesen Nachkommen wird ebenfalls von einer Selbstung der Mutterpflanze ausgegangen. Bei allen weiteren 76 grünlaubigen Nachkommen wurden nach SSR-Analyse ein Allel der jeweiligen Mutterpflanze und mindestens ein Allel, das nicht vom Pollenspender stammte, detektiert. Diese Pflanzen waren wahrscheinlich durch Kontamination mit Pollen anderer Apfelsorten entstanden. Bei den rotlaubigen Nachkommen aus den Kreuzungen wurden ausschließlich Allele der jeweiligen Pollenfängersorte und des Pollenspenders detektiert.

4.1.7. Phänotypische Bonitur von Sämlingen aus freier Abblüte

Im Jahr 2003 wurden von 60 ausgewählten Pollenfängerbäumen zwischen 9 und 30 Früchte je Baum nach freier Abblüte geerntet. Pro getesteten Baum wurden 21 bis 202

Kerne ausgesät. Im Jahr 2004 wurden von 54 Pollenfängerbäumen 3 bis 20 Früchte geerntet. Von diesen wurden jeweils 8 bis 191 Kerne je Pollenfängerbaum ausgesät. Alle Daten zur Anzahl und Keimrate der Samen sind in Tab. Anhang 5 aufgeführt. Insgesamt wurden 11058 Sämlinge phänotypisch überprüft.

Von den Sämlingen, die 2003 ausgesät worden waren, wurden insgesamt 6284 Sämlinge anhand ihrer Blattfärbung bonitiert (Tab. Anhang 8). Von diesen Pflanzen waren insgesamt 115 Sämlinge rotlaubig, was einem durchschnittlichen Anteil von 1,8% entspricht (Tabelle 8). Innerhalb der Sämlinge von 2004 wurden von 4774 Sämlingen 69 Sämlinge mit rotem Laub bonitiert (Tab. Anhang 8). Der durchschnittliche prozentuale Anteil rotlaubiger Nachkommen betrug hier 1,4%. Die rotlaubigen Nachkommen wurden den jeweiligen Pollenfängerbäumen zugeordnet. Anhand der Anzahl rotlaubiger Sämlinge pro Baum konnte die Auskreuzungsrate ermittelt werden (Abb. Anhang 2).

In beiden Untersuchungsjahren wurden 69% aller Nachkommen von ‚TNR 31-35‘ innerhalb eines Radius‘ von unter 10m zum nächstgelegenen Pollenspenderbaum detektiert. Das bedeutet, dass der Pollen von ‚TNR 31-35‘ durchschnittlich nicht weiter als fünf angrenzende Bäume in derselben Reihe bzw. zwei angrenzende Bäume quer zu den Reihen transportiert wurde. Nahezu 91% der rotlaubigen Sämlinge wurden in einer Distanz von unter 60m vom nächstgelegenen Pollenspenderbaum gefunden. Das entspricht einem Pollenflug von 30 angrenzenden Bäumen innerhalb der Reihe. In dieser Arbeit wurde ein Pollentransport bis zu einer Entfernung von 104m nachgewiesen.

Tabelle 8: Bestimmung des Pollentransports anhand des Anteils rotlaubiger Nachkommen von ‚TNR 31-35‘ nach freier Abblüte in den Jahren 2003 und 2004.

Abstand zum Pollenspender (m)	Anzahl untersuchter Nachkommen der Pollenfängerbäume		Anzahl rotlaubiger Sämlinge		Anteil rotlaubiger Sämlinge in %	
	2003	2004	2003	2004	2003	2004
0-10	1757	1440	88	39	5,0	2,7
11-30	1786	1287	15	26	0,8	2,0
31-60	1272	677	5	0	0,4	0,0
61-105	1469	1370	7	4	0,5	0,3
gesamt	6284	4774	115	69		

Pollentransport bis 10m Entfernung vom Pollenspender

In einer Entfernung bis zu 10m vom Pollenspendergenotyp wurden im Jahr 2003 insgesamt 1757 Nachkommen von 21 Pollenfängerbäumen beprobt. Davon waren 88 Sämlinge rotlaubig, was einem Anteil von 5,0% entspricht. Der maximale Anteil rotlaubiger Nachkommen pro Pollenfängerbaum lag bei 16,7%. Fünf der beprobten Pollenfängerbäume zeigten keine rotlaubigen Nachkommen. Im Jahr 2004 wurden von 20 Pollenfängerbäumen insgesamt 1440 Sämlinge analysiert. Durchschnittlich stammten 2,7% der Sämlinge von ‚TNR 31-35‘. Der höchste Anteil rotlaubiger Nachkommen pro Baum lag bei 28,6%. Bei zehn beprobten Pollenfängerbäumen wurden keine rotlaubigen Sämlinge festgestellt.

Pollentransport über 10 bis 30 m Entfernung vom Pollenspender

Im Jahr 2003 wurden in einer Entfernung von 10-30m insgesamt 1786 Nachkommen von 15 Pollenfängerbäumen beprobt. Der durchschnittliche Anteil rotlaubiger Sämlinge betrug in diesem Bereich 0,8%. Der maximale Wert, der an einem Pollenfängerbaum ermittelt wurde, lag bei 5,3%. 6 Pollenfängerbäume zeigten keine rotlaubigen Nachkommen. Im Jahr 2004 wurden 12 Pollenfängerbäume mit insgesamt 1287 Sämlingen in diesem Bereich analysiert. Dabei wurde ein durchschnittlicher Anteil rotlaubiger Nachkommen von 2,0% ermittelt. Bei 5 Pollenfängerbäumen konnten keine rotlaubigen Sämlinge nachgewiesen werden. Der maximale Anteil pro Pollenfängerbaum betrug 9,9% rotlaubige Nachkommen.

Pollentransport von 30 bis 60m Entfernung vom Pollenspender

Im Untersuchungsjahr 2003 wurden 1272 Nachkommen von insgesamt 11 Pollenfängerbäumen untersucht. Dabei waren 5 Nachkommen rotlaubig, was einem durchschnittlichen Anteil von 0,4% entspricht. Der maximale Anteil rotlaubiger Nachkommen pro Pollenfängerbaum lag bei 1,5%. Sechs der beprobten Pollenfängerbäume zeigten keine rotlaubigen Nachkommen. Im Jahr 2004 wurden 10 Pollenfängerbäume beprobt. Insgesamt wurden 677 Sämlinge untersucht. Für dieses Jahr konnte in diesem Bereich keine rotlaubigen Nachkommen nachgewiesen werden.

Pollentransport von 60 bis 105m Entfernung vom Pollenspender

In einer Entfernung ab 60m wurden in beiden Untersuchungsjahren jeweils 13 Pollenfängerbäume analysiert. Insgesamt wurden 2839 Sämlinge untersucht. Im Jahr 2003 und 2004 wurden 7 bzw. 4 rotlaubige Sämlinge detektiert, was einem Anteil von 0,5% bzw. 0,3% entspricht. Bei 8 der untersuchten Bäume konnte im Jahr 2003 keine rotlaubigen Nachkommen nachgewiesen werden. Im Jahr 2004 zeigten 9 der untersuchten Pollenfängerbäume keine Nachkommen von ‚TNR 31-35‘. Der höchste

Anteil rotlaubiger Nachkommen pro Baum lag bei 2,3% bzw. 0,8% (Abbildung 8). Unabhängig von der Entfernung zu den Pollenspenderbäumen wurde die höchste Auskreuzungsrate in Richtung des Bienenwagens sowie in nordöstlicher Richtung beobachtet. In südwestlicher Richtung wurden dagegen geringere Auskreuzungsraten festgestellt (Abbildung 9).

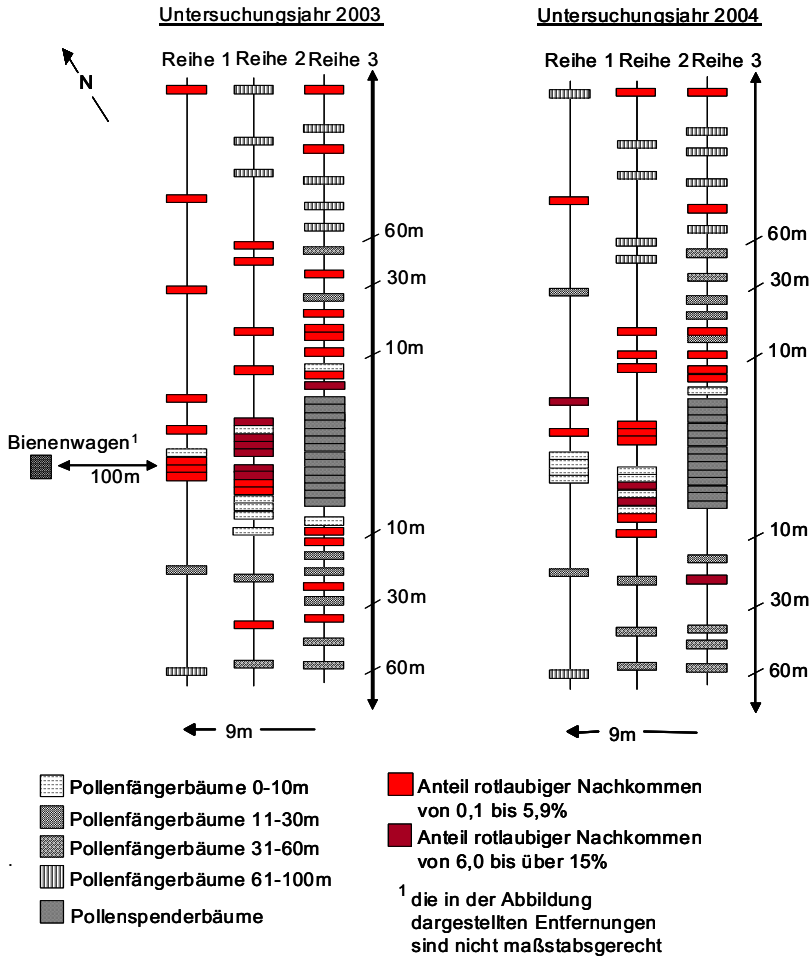


Abbildung 9: Anteil rotlaubiger Nachkommen nach freier Abblüte für die Jahre 2003 und 2004.

4.1.8. Genotypische Evaluierung der Sämlinge aus freier Abblüte

103 Sämlinge von insgesamt 115 rotlaubigen Sämlingen aus dem Jahr 2003 und 69 rotlaubige Sämlinge aus dem Jahr 2004 wurden mittels SSR-Analyse untersucht. Dabei war es das Ziel den Pollenspendergenotyp ‚TNR 31-35‘ als Vater zu bestätigen. Für die Analyse der rotlaubigen Nachkommen des Jahres 2003 wurden die SSR-Marker CH04A12, CH04E03, CH05C07, CH05A05 und CH04E02 verwendet. Jeder Sämling wurde mit mindestens einem SSR-Marker getestet. Die Ergebnisse der SSR-Analyse sind in Tab. Anhang 9 aufgeführt. Für die Analyse der rotlaubigen Nachkommen des Jahres 2004 wurden die SSR-Marker CH03D11, CH04E03, CH04A12, CH05A05 und CH05C07 eingesetzt. Hier wurde jeder Nachkomme mit mindestens zwei SSR-Markern getestet. Die Ergebnisse der SSR-Analyse für die rotlaubigen Nachkommen aus der freien Abblüte 2004 sind in Tab. Anhang 10 aufgeführt.

Alle untersuchten rotlaubigen Nachkommen, mit Ausnahme von vier Sämlingen, wiesen sowohl ein Allel der Muttersorte als auch ein Allel des Pollenspendergenotyps ‚TNR 31-35‘ auf. Zwei Sämlinge der Sorten ‚Greensleaves‘ und ‚Idared‘ aus der freien Abblüte 2003 und zwei Sämlinge von ‚Prima‘ und ‚Discovery‘ aus der freien Abblüte 2004 zeigten kein spezifisches Allel für ‚TNR 31-35‘. Für die restlichen rotlaubigen Sämlinge konnte eindeutig bestätigt werden, dass es sich um Nachkommen des Pollenspenders handelt.

4.2. Stabilität der Integration und Expression der T-DNA

Für die Untersuchungen zur Stabilität der Integration und Expression der T-DNA bei gentechnisch veränderten Apfelpflanzen wurden 60 Ex-vitro Pflanzen von insgesamt 14 transgenen Linien, die auf den Genotypen ‚Pinova‘ und ‚AU56-83‘ basieren, getestet.

Die transgenen Apfellinien sind aus Transformationen mit vier verschiedenen Zielgen-Konstrukten hervorgegangen (vgl. Kapitel 3.2., Abbildung 3).

Alle untersuchten Linien wurden im Vorfeld dieser Arbeit sofort nach der Selektion als In-vitro Pflanzen mittels PCR getestet. Dabei konnte bei allen Pflanzen die Integration von Ziel- und Markergen nachgewiesen werden. Die Transkription von Ziel- und Markergen mittels RT-PCR war ebenfalls für alle Pflanzen nachweisbar. Die Translation des Markergens *nptII* wurde mittels ELISA-Test nachgewiesen und zeigte für alle untersuchten Pflanzen ein positives Ergebnis (Hanke, mündliche Mitteilung).

Die 14 Linien wurden zwischen 1999 und 2002 ins Gewächshaus überführt (vgl. Kapitel 3.1.2., Tabelle 1). Ein Teil der Linien wurde im Jahr 2002 als transgenes Edelreis oder als transgene Unterlage in verschiedenen Kombinationen veredelt (vgl. Kapitel 3.1., Tabelle 2).

Insgesamt wurden 60 Ex-vitro Pflanzen im Jahr 2003 untersucht. Bei 31 Pflanzen handelte es sich um unveredelte Ex-vitro Pflanzen auf eigener Wurzel. 29 Pflanzen waren veredelte Ex-vitro Pflanzen (vgl. Kapitel 3.1., Tabelle 2). Von den Linien T136, T211 und T267 wurden sowohl veredelte Pflanzen als auch unveredelte Ex-vitro Pflanzen untersucht. Weiterhin wurden die In-vitro Pflanzen dieser drei Linien und der Linie T363 im Jahr 2003 zum wiederholten Male molekulargenetisch analysiert. Der Grund dafür war, dass bei diesen Linien im Jahr 2003 Instabilitäten detektiert wurden. Dadurch sollte der Zeitpunkt der Veränderung des Transgens eingegrenzt werden.

Der Nachweis von Ziel- und Markergen erfolgte unter Verwendung von genspezifischen Primern mittels PCR (Tab. Anhang 2). Die Ergebnisse dazu sind in Tab. Anhang 11 zusammengefasst. Die Anzahl der Integrationen von Ziel- und Markergen wurde mittels Southern-Blot-Analyse bestimmt. Dafür wurde die DNA der p35SAMVT4-, pPinAtt35SAMVT4- und pBINAR19-Linien mit dem Restriktionsenzym *HindIII* verdaut (vgl. Kapitel 3.2., Abbildung 3). Die DNA der pLDB15-Linie wurde mit dem Restriktionsenzym *BglII* restringiert (vgl. Kapitel 3.2., Abbildung 3). Diese Restriktionsenzyme schneiden innerhalb der T-DNA einmal und ein weiteres Mal an einem unbekanntem Ort im Pflanzengenom. Die Größe der Bande für das jeweilige Gen ist dabei abhängig vom Integrationsort der T-DNA im pflanzlichen Genom. Der Nachweis der T-DNA-Kopien erfolgte durch Hybridisierung mit genspezifischen Sonden (vgl. Kapitel 3.3.10.3.).

Bei allen Pflanzen mit stabiler Integration der T-DNA, wurde die Transkription des Ziel- bzw. *nptII*-Markergens mittels RT-PCR untersucht. Der Nachweis der *nptII*-Translation erfolgte mit Hilfe eines ELISA-Tests. Die Ergebnisse der Expressions-Analysen sind in Tab. Anhang 12 zusammengefasst.

Pflanzen mit geringer bzw. keiner Transkription des *nptII*-Markergens, wurden auf Methylierung der DNA-Sequenz innerhalb des *nos*-Promotors geprüft.

4.2.1. Transgene Linien mit dem pLDB15-Konstrukt

Die Linie T86 stammte aus Transformationen, die im Jahr 1998 mit dem Konstrukt pLDB15 durchgeführt wurden. Sie geht auf den Unterlagengenotyp ‚AU56-83‘ zurück. Eine Pflanze dieser Linie wurde im Jahr 1999 ins Gewächshaus überführt und im Jahr

2002 mit einem nicht transgenen Edelreis veredelt. Im Jahr 2003 wurde die Integration und Expression der T-DNA überprüft. Sowohl für das Zielgen *attE* als auch das *nptII*-Markergen konnten mittels PCR Fragmente in der korrekten Größe (*attE*: 672bp und *nptII*: 797bp)¹² nachgewiesen werden. Nach Southern-Blot-Analyse wurden zwei Kopien für das *attE*-Gen und zwei Kopien für das *nptII*-Markergen detektiert. Die Transkription des *attE*-Gens und des *nptII*-Gens war mittels RT-PCR ebenfalls nachweisbar. Der ELISA-Test zum Nachweis der Translation des *nptII*-Gens war positiv. Für diese Linie wurde ein NPTII-Proteingehalt von 16,1pg/mg Blattmaterial ermittelt.

4.2.2. Transgene Linien mit dem p35SAMVT4-Konstrukt

Aus Transformationsversuchen mit dem Konstrukt p35SAMVT4 standen die Linie T121 der Sorte ‚Pinova‘ und die vier Linien T270, T352, T362 und T363 des Genotyps ‚AU56-83‘ zur Verfügung (Tabelle 9).

Tabelle 9: Transgene Linien aus dem Konstrukt p35SAMVT.

Transgene Linie	Jahr der Transformation	Jahr der Überführung	Jahr der Veredelung	Art der Veredelung	Anzahl Pflanzen
T121	1999	2000	2002	transgenes Edelreis	4
T270	2000	2002	nicht veredelt		3
T352					3
T362					1
T363					3

Die 14 Pflanzen wurden im Jahr 2003 mittels Insert-PCR auf das Vorhandensein von Ziel- und Markergen überprüft. Das Ergebnis der PCR zeigte bei allen Pflanzen Fragmente für das Zielgen *T4L* und das *nptII*-Markergen. Mittels Southern-Blot-Analyse wurden für die einzelnen Linien zwischen einer und vier Integrationen der T-DNA detektiert. Die Linie T270 wies als einzige eine Einfachintegration der T-DNA auf. Zwei T-DNA Integrationen zeigten die Pflanzen der Linie T352. Die Linie T362 wies zwei Integrationen für das *T4L*-Gen auf, zeigte jedoch nur eine Integration für das *nptII*-

¹² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Markergen. Für die Linie T121 wurden drei Integrationen für das *T4L* und das *nptII*-Markergen detektiert.

Eine stabile Transkription des *T4L* und des *nptII*-Gens konnte für die Pflanzen der Linien T121, T270, T352 und T362 nachgewiesen werden. Die Translation des *nptII*-Markergens war ebenfalls bei diesen Linien nachweisbar. Für alle Pflanzen der Linie T121 wurde ein NPTII-Proteingehalt von über 18,8pg/mg Blattmaterial ermittelt (Tab. Anhang 12). Bei den Linien T270 und T352 schwankte der NPTII-Proteingehalt um 13,1 bzw. 5,1pg/mg Blattmaterial zwischen einzelnen Pflanzen einer Linie (Tab. Anhang 12).

Bei der Linie T363 wurden Instabilitäten festgestellt. Mittels Southern-Blot wurden von dieser Linie drei Ex-vitro Pflanzen und die In-vitro Pflanze untersucht. Dabei wurde nach Restriktionsverdau die DNA elektrophoretisch aufgetrennt und mit einer spezifischen Sonde für das *T4L*-Gen bzw. für das *nptII*-Markergen hybridisiert (vgl. Kapitel 3.3.9 und 3.3.12). Für das *T4L*-Gen und für das *nptII*-Markergen wurden jeweils vier Integrationen für das nachgewiesen. Jedoch waren die Fragmente für das *nptII*-Markergen der Ex-vitro Pflanze T363A und der In-vitro Pflanze von anderer Größe als bei den Ex-vitro Pflanzen T363B und T363C (Abbildung 9). Mittels RT-PCR konnte für alle Pflanzen der Linie T363 der Nachweis der Transkription des *T4L*-Gens erbracht werden. Für das *nptII*-Gen wurden jedoch nur sehr schwache Banden detektiert. Die Translation des *nptII*-Markergens war ebenfalls nur sehr schwach. Für die Pflanzen T363A und T363C wurden 3,7pg und 2,2pg NPTII-Protein pro mg Pflanzenmaterial nachgewiesen. Bei der Pflanze T363B betrug der NPTII-Proteingehalt 1,0pg/mg Blattmaterial. Damit war das Ergebnis des ELISA-Tests für diese Pflanze kaum noch als positiv einzustufen, da der Schwellenwert der Positivbeurteilung bei 0,9pg/mg Blattmaterial lag.

Nach Wiederholung des ELISA-Tests im Jahr 2004 war die NPTII-Proteinmenge bei den Pflanzen T363A und T363C sehr gering (1,6pg/ mg Blattmaterial). Dagegen wurde für die Pflanze T363C mit 9,4pg NPTII-Protein ein wesentlich höherer NPTII-Proteingehalt als in der vorherigen Analyse ermittelt. Der Expressionslevel zwischen den In-vitro Pflanzen schwankte zwischen 3,5pg im Jahr 2000 und 19,4pg NPTII/mg Blattmaterial im Jahr 2004.

Zur Klärung der Ursachen für die verminderte Transkription wurden die In-vitro Pflanze und die Ex-vitro Pflanzen der Linie T363 auf Methylierung der DNA-Sequenz innerhalb des *nos*-Promotors untersucht. Dazu wurde die genomische DNA mit *HindIII* und dem methylierungssensitiven Enzym *Cfr42I* (MBI-Fermentas, St Leon-Roth,) restringiert. Das Enzym *Cfr42I* schneidet nicht, wenn das dritte Cytosin in der Schnittsequenz 5'-

CCGCGG-3' methyliert ist. Die restringierte DNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt und nach Southern-Blot mit einer spezifischen Sonde für das *npfII*-Gen hybridisiert. Bei einer Methylierung sollte dasselbe Bandenmuster wie nach einer Southern-Blot-Analyse mit einfachem *HindIII*-Verdau zu detektieren sein. Ist die DNA im *nos*-Promotorbereich nicht methyliert, schneidet das methylierungssensitive Enzym *Cfr42I* und eine ca. 2,3kb große Bande sollte zu erkennen sein. Zur Kontrolle wurde von jeder Probe nur mit *HindIII* restringierte DNA mitgeführt.

Für die *HindIII* und die *HindIII* plus *Cfr42I* restringierten Proben wurden annähernd gleiche Banden detektiert. Die In-vitro Pflanze und die Ex-vitro Pflanze T363A zeigten vier Banden in einer Größe von 2,75kb, 3,7kb, 4,8kb und 7,4kb. Zusätzlich war bei den *HindIII* plus *Cfr42I* verdauten Proben eine schwache Bande mit einer Größe von 2,3kb zu erkennen (Abbildung 10).

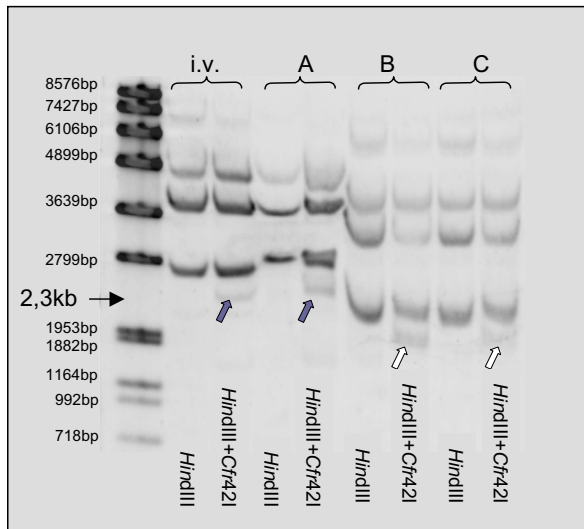


Abbildung 10:

Untersuchung zur Methylierung des *nos*-Promotors der Linie T363.

- ➡ 2,3kb großes Fragment nach Restriktion von unmethylierter DNA.
- ↪ zusätzliches Fragment nach Doppelrestriktion mit *HindIII* und *Cfr42I*.

Die Ex-vitro Pflanzen T363B und T363C zeigten nach dem Doppelverdau vier Fragmente. Diese waren identisch zu den detektierten Fragmenten der mit *HindIII*

verdauten Pflanzenproben. Jedoch wiesen die Pflanzen T363B und T363C nach dem Doppelverdau ebenfalls ein zusätzliches Fragment auf. Dieses lag in einem Größenbereich von 1,9kb.

Die Übereinstimmung des Hybridisierungsmusters nach Einzel- und Doppelverdau deutet auf eine Methylierung der *Cfr42I* Schnittstelle und damit des *nos*-Promotors hin.

4.2.3. Transgene Linien mit dem pBinAtt35SAMVT4-Konstrukt

Aus den Transformationen mit dem Konstrukt pPinAtt35SAMVT4 stammten die transgenen Linien T92 und T95 der Sorte ‚Pinova‘ sowie die Linien T350 und T351 des Genotyps ‚AU56-83‘ (Tabelle 10). Die 14 Ex-vitro Pflanzen wurden im Jahr 2003 hinsichtlich der Integration der Zielgene *T4L* und *AttE* sowie des *nptII*-Gens mittels PCR getestet. Bei allen Pflanzen dieser Linien waren die übertragenen Gene nachweisbar. Die Anzahl der *T4L*-Kopien und *nptII*-Kopien lag zwischen einer (T350), zwei (T92 und T95) und drei (T351) Integrationen. Für das *AttE*-Gen konnte nur eine Bande detektiert werden, da sich in dem Konstrukt zwei *BglII* Schnittstellen befinden (vgl. Kapitel 3.2. Abbildung 3). Die Ex-vitro Pflanzen zeigten eine stabile Expression des Zielgens. Ebenso wurde das *nptII*-Gen bei allen Pflanze transkribiert. Mittels ELISA-Tests wurde die Expression des NPTII-Markerproteins nachgewiesen. Allerdings wurden auch bei diesen Pflanzen Unterschiede im NPTII-Gehalt zwischen einzelnen Pflanzen einer Linie festgestellt. Den geringsten Unterschied (5,4pg/mg Blattmaterial) zeigten die Pflanzen der Linie T350. Größere Unterschiede wurden zwischen den Pflanzen innerhalb der Linien T351 (9,4pg/mg Blattmaterial) bzw. T92 (10,7pg/mg Blattmaterial) detektiert. Der größte Unterschied im NPTII-Proteingehalt wurde mit 11,0pg/mg Blattmaterial zwischen den beiden Veredelungen der Linie T95 festgestellt.

Tabelle 10: Transgene Linien aus dem Konstrukt pPinAtt35SAMVT4.

Transgene Linie	Jahr der Transformation	Jahr der Überführung	Jahr der Veredelung	Art der Veredelung	Anzahl Pflanzen
T92	1998	2000	2002	transgenes Edelreis	4
				transgene Unterlage	2
T95	1998	2000	2002	transgenes Edelreis	2
T350	2000	2002	nicht veredelt		3
T351					3

4.2.4. Transgene Linien mit dem pBINAR19-Konstrukt

Aus der Transformation mit dem Konstrukt pBINAR19 wurden die Linien T136, T137, T211 und T267 der Sorte ‚Pinova‘ regeneriert (Tabelle 11).

Von der Linie 136 wurden vier veredelte (T136V1-V4) und drei unveredelte Ex-vitro Pflanzen (T136A-C) untersucht. Mittels PCR war es möglich bei den veredelten Pflanzen der Linie T136 die Integration des *H-Dpo*-Gens und des *nptII*-Markergens nachzuweisen. Auch die unveredelten Pflanzen T136B und T136C zeigten jeweils eine Bande für beide Gene in der erwarteten Größe. Dagegen war bei der unveredelten Pflanze T136A lediglich der Nachweis des *nptII*-Gens möglich. Für das Zielgen *H-Dpo* konnte mittels PCR keine Bande detektiert werden. Der Nachweis des *H-Dpo*-Gens mit Hilfe der Southern-Blot-Analyse war für diese Pflanze jedoch möglich. Bei allen Pflanzen wurden zwei Fragmente für das Zielgen *H-Dpo* detektiert. Für das *nptII*-Markergen konnten sogar drei Fragmente detektiert werden. Dabei wichen die Fragmentgrößen für das *nptII*-Gen der veredelte Pflanze T136V1 von den detektierten Fragmenten der anderen Pflanzen dieser Linie ab. Die Ergebnisse der Insert-PCR und der Southern-Blot-Analyse sind in Tab. Anhang 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Transgene Linien aus dem Konstrukt pBINAR19

Transgene Linie	Jahr der Transformation	Jahr der Überführung	Jahr der Veredelung	Art der Veredelung	Anzahl Pflanzen
T136	1999	2000	2002	unveredelt	3
				transgenes Edelreis	4
T137	1999	2000	2002	transgenes Edelreis	4
T211	2000	2001	2002	unveredelt	8
				transgenes Edelreis	4
T267	2000	2001	2002	unveredelt	4
				transgenes Edelreis	4

Mittels RT-PCR war es möglich bei allen sieben Pflanzen der Linie T136 die Transkription des *nptII*-Markergens nachzuweisen. Die Transkription des *H-Dpo*-Gens war ebenfalls bei allen Pflanzen nachweisbar, mit Ausnahme der Pflanze T136A (Tabelle 12). Bei den veredelten Pflanzen der Linie T136 lag die NPTII-Proteinmenge

zwischen 1,4pg und 1,8pg/mg Blattmaterial. Der Schwellenwert für die Positivbewertung des ELISA-Tests lag bei 0,9pg/mg Pflanzenmaterial. Damit wurde das Ergebnis des ELISA-Tests für alle Pflanzen positiv bewertet. Für die drei unveredelten Pflanzen T136A, T136B und T136C wurden NPTII-Proteingehalte von 0,4pg bzw. 0,2pg/mg Blattmaterial gemessen. Der Schwellenwert für die Positivbewertung betrug hier nur 0,2pg/mg Blattmaterial. Damit konnte nur für die Ex-vitro Pflanze T136A der NPTII-Gehalt als positiv eingestuft werden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Ergebnisse der Expressionsanalysen von Ziel- und Markergenen bei den Pflanzen der Linie T136.

Pflanzennummer ¹		RT-PCR		ELISA ²	Schwellenwert ³	Bewertung
		<i>H-Dpo</i>	<i>nptII</i>			
T136A	unveredelte Pflanze	-	+	0,4	0,2	(+)
T136B		+	+	0,2	0,2	-
T136C		+	+	0,2	0,2	-
T136V1	transgenes Edelreis	+	+	1,8	0,9	+
T136V2		+	+	1,4	0,9	+
T136V3		+	+	1,2	0,9	+
T136V4		+	+	1,4	0,9	+
T136 ⁴	In-vitro	+	+	0,6	0,9	+

¹Genotyp: ‚Pinova‘; ²pg NPTII-Protein/mg Blattmaterial; ³Schwellenwert für die Positivbewertung des ELISA-Test; ⁴ Untersuchungsjahr: 2000; - negativ; + positiv; (+) schwach positiv

Von der Linie T137 wurden vier Veredelungen untersucht (T137V1-V4). Alle Pflanzen zeigten eine stabile Integration und Expression von Ziel- und Markergenen. Mittels Southern-Blot-Analysen konnten für beide Gene je vier Integrationen nachgewiesen werden. Die einzelnen Pflanzen dieser Linie zeigten nur geringe Unterschiede im NPTII-Gehalt.

Von der Linie T211 wurden acht unveredelte (T211A-H) und vier veredelte Ex-vitro Pflanzen untersucht (T211V1-V4). Weiterhin wurde In-vitro Pflanze im Jahr 2003 wiederholt analysiert. Alle Pflanzen zeigten nach Southern-Blot-Analyse zwei Kopien des *Dpo*-Gens und eine Kopie des *nptII*-Markergens. Die Ergebnisse der Insert-PCR

und der Southern-Blot-Analyse sind in Tab. Anhang 11 aufgeführt. Der Nachweis des *Dpo*-Gens mittels Insert-PCR war jedoch bei allen Pflanzen nicht möglich. Infolge dessen war die Expression des *Dpo*-Gens mittels RT-PCR bei allen Pflanzen ebenfalls nicht nachweisbar. Auch konnte für die In-vitro Pflanze nach Wiederholung der Analyse im Jahr 2003 keine stabile Integration und Expression des *Dpo*-Gens mehr nachgewiesen werden. Das *npfl*-Markergen war dagegen bei allen Pflanzen stabil integriert und wurde exprimiert. Jedoch zeigten sich nach ELISA-Test große Unterschiede im NPTII-Gehalt zwischen den einzelnen Pflanzen von T211. Beispielsweise wurden für die Pflanze T211A 0,8pg NPTII-Protein/mg Blattmaterial ermittelt, während die Pflanze T211E einen NPTII-Proteingehalt von 18,8pg/mg Blattmaterial aufwies (Tab. Anhang 12).

Aufgrund dieser großen Schwankungen des NPTII-Proteingehalts wurde der ELISA-Test wiederholt. Dabei wurden Unterschiede im NPTII-Gehalt für eine Pflanze zwischen dem ersten und dem zweiten ELISA-Test festgestellt. Beispielsweise konnte für die Pflanze T211A beim ersten ELISA-Test ein NPTII-Proteingehalt von 0,8pg/mg Blattmaterial nachgewiesen werden (Tab. Anhang 12). Bei der Wiederholung des ELISA-Tests betrug der NPTII-Gehalt für diese Pflanze dagegen 26,0pg/mg Blattmaterial (Tabelle 13).

Auch traten bei dem zweiten ELISA-Test große Variationen der NPTII-Gehalte zwischen den einzelnen Pflanzen auf. Der geringste NPTII-Proteingehalt betrug 11,9pg/mg Blattmaterial (T211E) und der höchste 26,0pg/mg Blattmaterial (T211A) bei den unveredelten Ex-vitro Pflanzen. Beim Vergleich der OD-Mittelwert mittels Duncan Multiple Range Test wurden für die unveredelten Ex-vitro Pflanzen signifikante Unterschiede ermittelt (Tabelle 13). Die In-vitro Pflanze zeigte mit >37,5pg/mg Pflanzenmaterial den höchsten NPTII-Gehalt. Zwischen den vier veredelten Pflanzen war der Unterschied der NPTII-Proteingehalte gering. Keine signifikanten Unterschiede wurden zwischen den einzelnen Proben der Negativkontrolle bzw. Positivkontrolle gefunden.

Für die Bestimmung der Variation der *npfl* Expression innerhalb einer Pflanze (T211V3) wurden 12 Blätter von fünf verschiedenen Blattetagen analysiert (Tabelle 14).

Tabelle 13: Analyse der *nptII* Translation bei Ex-vitro Pflanzen der Linie T211 mittels ELISA- Test

Probe	OD ¹	± std ^{2,3}	NPTII-Protein pg/mg Blattmaterial	
unveredelte Ex-vitro Pflanzen	T211A	1,314 ± 0,247	b	26,0 ± 2,74
	T211B	1,202 ± 0,189	bc	22,0 ± 1,25
	T211C	1,122 ± 0,171	bcd	19,0 ± 0,73
	T211D	0,992 ± 0,130	cd	15,2 ± 0,09
	T211E	0,826 ± 0,104	d	11,9 ± 0,48
	T211F	0,976 ± 0,117	cd	14,9 ± 0,51
	T211G	0,951 ± 0,129	cd	14,4 ± 0,07
	T211H	0,867 ± 0,126	d	12,7 ± 0,17
veredelte Ex-vitro Pflanzen	T211F1	0,985 ± 0,109	cd	15,1 ± 0,68
	T211F2	0,995 ± 0,123	cd	15,3 ± 0,71
	T211F3	0,986 ± 0,109	cd	15,1 ± 0,89
	T211F4	1,101 ± 0,147	bcd	18,3 ± 0,35
Negativ- kontrolle	Pinova_1	0,216 ± 0,028	e	2,5 ± 0,05
	Pinova_2	0,295 ± 0,041	e	3,4 ± 0,17
	Pinova_3	0,180 ± 0,019	e	2,2 ± 0,09
	Pinova_4	0,299 ± 0,045	e	3,4 ± 0,19
Positiv- Kontrolle ⁴	T288_1	1,618 ± 0,209	a	37,0 ± 0,75
	T288_2	1,664 ± 0,231	a	>37,5
	T288_3	1,586 ± 0,213	a	36,5 ± 0,94
	T288_4	1,723 ± 0,216	a	>37,5
T211 in vitro	1,781 ± 0,240	a	>37,5	

1OD (optical density) = OD405nm – OD620nm (Der OD-Wert der Blank-Probe wurde von dem OD-Wert der Probe subtrahiert) ²Standardabweichung, ³Werte mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant bei P=0,05 entsprechend des Duncan Tests, ⁴Die transgene Pflanze T288 (Konstrukt: pBI121cNag, Hanke et al., 2000) diente als Positivkontrolle, da sie im Vergleich zu anderen hier getesteten Pflanzen nach ELISA-Test einen sehr hohen NPTII-Proteingehalt aufwies (vgl.Tab. Anhang 12).

Für die Bestimmung der Variation der *nptII* Expression innerhalb einer Pflanze (T211V3) wurden 12 Blätter von fünf verschiedenen Blattetagen analysiert (Tabelle 14). Als Positiv- und Negativkontrollen wurden vier unabhängige Proben mitgeführt. Um die Proteinnachweisgrenze von 18,8pg auf 37,5pg NPTII-Protein/mg Pflanzenmaterial zu erhöhen, wurde die Standardkurve für diese Untersuchungen modifiziert (vgl. Kapitel 3.3.13.). Der Vergleich der OD-Mittelwerte erfolgte ebenfalls mittels Duncan-Test. Zwischen den einzelnen Pflanzen der Negativ- bzw. Positivkontrollen und den Wiederholungen der drei Blattproben (Blattnummer 1a; 2a; 4a) konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Im Gegensatz dazu wurden zwischen den Blättern der unterschiedlichen Blattetagen signifikante Unterschiede ermittelt. Der höchste NPTII-Gehalt wurde für die Blattetagen vier und

fünf gemessen. Die Blattetage eins wies den geringsten Gehalt an NPTII-Protein auf. Drei der vier untersuchten Blätter aus dieser Etage zeigten keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle.

Tabelle 14: Analyse der *nptII* Expression bei Blättern unterschiedlicher Blattetagen einer veredelten Pflanze von T211 mittels ELISA-Test.

Probe	Blatt- etage ¹	Blatt- nummer ²	OD ⁴	± std ^{5,6}	NPTII-Protein pg/mg Blattmaterial
T211 V3	1	1	0,383 ± 0,061	def	2,9 ± 0,14
		1a ³	0,396 ± 0,875	def	2,9 ± 0,13
		2	0,393 ± 0,063	def	2,9 ± 0,17
		3	0,250 ± 0,048	ef	1,9 ± 0,04
		4	0,869 ± 0,230	c	8,1 ± 1,34
	2	4a ³	0,833 ± 0,184	c	7,6 ± 0,48
		1	0,564 ± 0,117	cde	4,5 ± 0,11
		2	0,936 ± 0,167	c	9,3 ± 0,19
		2a ³	0,912 ± 0,182	c	8,9 ± 0,23
	3	3	0,849 ± 0,171	c	7,9 ± 0,24
		1	0,737 ± 0,143	cd	6,1 ± 0,15
		2	0,667 ± 0,136	cd	5,5 ± 0,10
	4	3	0,693 ± 0,134	cd	5,7 ± 0,08
		1	1,504 ± 0,292	b	20,6 ± 0,70
	5	1	1,411 ± 0,267	b	17,7 ± 0,66
Positiv-Kontrolle ⁷	Probe 1	2,285 ± 0,367	a	>37,5	
	Probe 2	2,022 ± 0,315	a	>37,5	
	Probe 3	2,060 ± 0,356	a	>37,5	
	Probe 4	2,203 ± 0,391	a	>37,5	
Negativ-Kontrolle ⁸	Probe 1	0,109 ± 0,017	f	1,1 ± 0,02	
	Probe 2	0,123 ± 0,017	f	1,1 ± 0,08	
	Probe 3	0,133 ± 0,028	f	1,2 ± 0,03	
	Probe 4	0,085 ± 0,018	f	0,9 ± 0,03	

¹die Kennzeichnung der Blattetagen beginnt mit der Blattspitze und endet in der Nähe der Veredelungsstelle; ²die Blattproben wurden zufällig ausgewählt; ³Proben die mit einem ‚a‘ gekennzeichnet sind, sind Wiederholungen von Blättern derselben Nummer; ⁴OD (optical density) = OD_{405nm} – OD_{620nm} (Der OD-Wert der Blank-Probe wurde von dem OD-Wert der Probe subtrahiert); ⁵Standardabweichung; ⁶Werte mit demselben Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant bei P=0,05 entsprechend des Duncan Tests, ⁷Die transgene Pflanze T288 (Konstrukt: pBI121cNag, Hanke et al., 2000) diente als Positivkontrolle, da sie im Vergleich zu anderen hier getesteten Pflanzen nach ELISA-Test einen sehr hohen NPTII-Proteingehalt aufwies (vgl.Tab. Anhang 12), ⁸als Negativkontrolle wurde eine nicht transgene Probe der Apfelsorte ‚Pinova‘ verwendet.

Von der Linie T267 wurden vier Veredelungen (T267V1-V4) aus der Ex-vitro Pflanze T267C hergestellt. Weiterhin standen vier unveredelte Ex-vitro Pflanzen für die Untersuchungen zur Verfügung (T267A-D). Die In-vitro Pflanze wurde im Jahr 2003 nochmals analysiert. Nach Insert-PCR war bei allen Veredelungen und der

unveredelten Ex-vitro Pflanze T267C der Nachweis von Ziel- und Markergen nicht möglich. Die unveredelten Ex-vitro Pflanzen T267A, T267B und T267D und die In-vitro Pflanze zeigten dagegen eine stabile Integration und Expression des *Dpo*-Gens und des *nptII*-Markergens (Tabelle 15). Mittels Southern-Blot-Analyse wurden vier Kopien für beide Gene bei den drei unveredelten Pflanzen detektiert (Abbildung 11).

Der Nachweis der Translation des *nptII*-Markergens erfolgte bei den drei unveredelten Ex-vitro Pflanzen. Das Ergebnis des ELISA-Tests konnte für die Pflanze T267A nicht mehr positiv eingestuft werden. Die NPTII-Proteinmenge betrug für diese Pflanze nur 0,5pg/mg Blattmaterial, während der NPTII-Wert der Negativkontrolle ebenfalls 0,5pg/mg Blattmaterial betrug. Bei den beiden anderen unveredelten Ex-vitro Pflanzen lag die NPTII-Proteinmenge zwischen 6,0 und 10,2pg/mg Blattmaterial (Tab. Anhang 12).

Tabelle 15: Ergebnisse der Untersuchung zur Integration und Expression von Ziel- und Markergen der Linie T267.

Pflanzennummer ¹		Insert-PCR		Southern-Blot ²		RT-PCR	
		<i>Dpo</i>	<i>nptII</i>	<i>Dpo</i>	<i>nptII</i>	<i>Dpo</i>	<i>nptII</i>
T267A	unveredelte Pflanze	+	+	4	4	+	+
T267B		+	+	4	4	+	+
T267C	transgenes	-	-	0	0	-	-
T267D		+	+	4	4	+	+
T267V1	Edelreis	-	-	0	0	-	-
T267V2		-	-	0	0	-	-
T136V3		-	-	0	0	-	-
T267V4		-	-	0	0	-	-
T267 ³	In-vitro	+	+	4	4	+	-

¹ Genotyp: ,Pinova'; ² Anzahl der Integrationen; ³ Untersuchungsjahr 2003; - negativ; + positiv; (+) schwach positiv

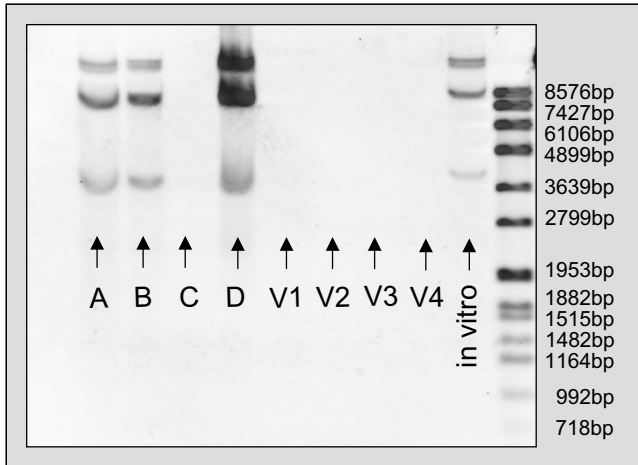


Abbildung 11: Ergebnisse der Southern-Blot Untersuchungen der Linie T267 zum Nachweis der Kopienanzahl des Zielgens *Dpo*.
A, B, C, D: unveredelte Ex-vitro Pflanzen
V1, V2, V3, V4: veredelte Pflanzen

4.3. Untersuchungen zum Transport von Transgenprodukten zwischen Veredelungspartnern beim Apfel

Für die Untersuchung des Transports von Transgenprodukten standen aus der Veredelung im Jahr 2002 16 Veredelungen aus den Linien T92, T95, T121 und T137 zur Verfügung. Im Jahr 2005 wurden sechs weitere Veredelungen aus den pLD15-Linien T320, T349 und T355 hergestellt, so dass insgesamt 22 Veredelungen für die Untersuchung zur Verfügung standen (

Tabelle 16 und Tabelle 17). Alle Linien hatten nach ihrer Regeneration eine stabile Integration und Expression der T-DNA gezeigt (vgl. Kapitel 3.1.2.). Von jeder veredelten Linie wurden die vorhandenen Veredelungskomponenten (Edelreis, Stammbildner und Unterlage) mittels Western-Blot-Analysen auf das Vorhandensein des NPTII-Proteins überprüft. Dazu wurden die aufgetrennten Proteine mit einem ersten Antikörper (Anti-Neomycin-Phosphotransferase II; Biomol, Hamburg, Deutschland) und anschließend für die Immunodetektion mit einem zweiten Antikörper (ECL-Anti-rabbit IgG; Amersham, Freiburg) inkubiert (vgl. Kapitel 3.3.15). Bei allen 22 Veredelungen war der Nachweis des NPTII-Proteins in der transgenen Komponente der Veredelung möglich (Tab. Anhang 13). In den nicht transgenen Komponenten der

Veredelung konnte dagegen das ca. 30kDa große NPTII-Protein nicht nachgewiesen werden (Abbildung 12). Die Zielgene *attE*, *T4L* und *H-Dpo* der anderen sechs Linien (T92, T95, T121, T137, T320, T349, T355) wurden mittels Western-Blot nicht analysiert.

Tabelle 16: Veredelte Apfelinien mit transgener Unterlage zur Untersuchung des Transports von Transgenprodukten zwischen Veredelungspartnern.

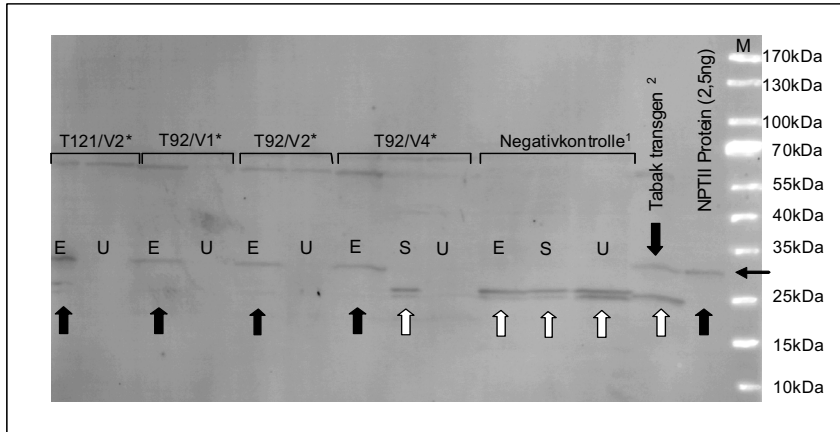
Linie	Bezeichnung	Veredelungskomponenten	Fremdgene	
T92	V5	Unterlage, Edelreis	<i>attE</i> , <i>T4L</i> , <i>nptII</i> ²	
	V6	Unterlage, Stammbildner, Edelreis		
T95	V1	Unterlage, Edelreis		
	V2	Unterlage, Stammbildner, Edelreis		
T320	V1	Unterlage, Edelreis		<i>attE</i> , <i>Gus</i> , <i>nptII</i> ¹
T349	V1	Unterlage, Edelreis		
T355	V1, V2	Unterlage, Edelreis		
	V3, V4	Unterlage, Stammbildner, Edelreis		

¹ pLD15-Konstrukt (Destefano-Beltran, 1991); ² pPinAtt35SAMVT4-Konstrukt (Ko et al., 1997)

Tabelle 17: Veredelte Apfelinien mit transgenem Edelreis zur Untersuchung des Transports von Transgenprodukten zwischen Veredelungspartnern.

Linie	Bezeichnung	Veredelungskomponenten	Fremdgene
T92	V1, V2	Edelreis, Unterlage	<i>attE</i> , <i>T4L</i> , <i>nptII</i> ¹
	V3, V4	Edelreis, Stammbildner, Unterlage	
T121	V1, V2	Edelreis, Unterlage	<i>T4L</i> , <i>nptII</i> ²
	V3, V4	Edelreis, Stammbildner, Unterlage	
T137	V1, V2	Edelreis, Unterlage	<i>H-Dpo</i> , <i>nptII</i> ³
	V3, V4	Edelreis, Stammbildner, Unterlage	

¹ pPinAtt35SAMVT4-Konstrukt (Ko et al., 1997); ² p35SAMVT4-Konstrukt (Ko et al., 1997); ³ pBINAR19 –Konstrukt (Kim und Geider, 2000).



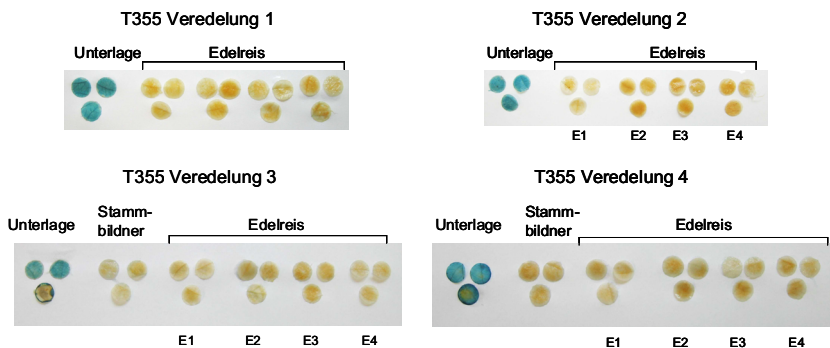
* Bezeichnung der Veredelungen; ¹ als Negativkontrolle wurde ein nicht transgener veredelter Apfelbaum der Sorte ‚Pinova‘ verwendet; ² Tabak; E: Edelreis; U: Unterlage; S: Stammbildner; schwarzer Pfeil ca. 30kDa großen NPTII-Proteinbanden; weißer Pfeil: unspezifische Proteinbanden (ca. 25kDa), M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (MBI-Fermentas, St. Leon-Roth)

Abbildung 12: Ergebnis der Western-Blot-Analysen am Beispiel von vier Veredelungen der Linie T121 und T92.

Die sechs Veredelungen der drei Linien T320, T349 und T355 aus dem pLD15-Konstrukt wurden zusätzlich auf eine Expression des *gus*-Gens überprüft. Die Aktivität der β -glucuronidase wurde dabei anhand der Intensität der Blaufärbung der untersuchten Blattstücken mittels histochemischen GUS-Test ermittelt (vgl. Kapitel 3.3.15.).

Von den drei pLD15-Linien wurden alle vorhandenen Veredelungskomponenten analysiert. Für die Untersuchungen der transgenen Unterlage und des Stammbildners wurden jeweils drei Blattstücke getestet. Von dem nicht transgenen Edelreis wurden vier verschiedene Blattetagen (E1 bis E4) beprobt. Von jeder Blattetage wurden ebenfalls drei Blattstücke getestet, so dass insgesamt 12 Blattstücke vom nicht transgenen Edelreis getestet wurden. Abbildung 13 zeigt die Blattfärbung der Blattstücke nach GUS-Test am Beispiel der vier Veredelungen der Linie T355. Bei allen Veredelungen der Linien T320, T349 und T355 zeigten die Blattstücke der transgenen Unterlage nach GUS-Test eine Blaufärbung. Die Intensität der Blaufärbung war bei allen drei Blattstücken der Unterlagen von Veredelung T355V1, T355V2 und

T349V1 der Klasse 1 (Blattstück komplett dunkelblau gefärbt) zu zuordnen. Jeweils ein Blattstück der Unterlage von T355V3 und T355V4 wurde der Klasse vier (Hauptteil des Blattes weiß mit einzelner Blaufärbung) bzw. Klasse 2 (Hauptteil des Blattes blau mit einzelner Weißfärbung) zugeordnet. Die restlichen Blätter waren dunkelblau gefärbt. Die drei Blattstücke der Unterlage von T320V1 zeigten eine Blaufärbung der Klasse 3 und 4 (Blattstück komplett hellblau gefärbt und Hauptteil des Blattes weiß mit einzelner Blaufärbung). Somit konnte bei allen untersuchten Veredelungen eine Expression des *gus*-Gens bei der transgenen Unterlage nachgewiesen werden (Tab. Anhang 13).



E1: Blattetage 1; E2: Blattetage 2; E3: Blattetage 3; E4: Blattetage 4; Unterlage: transgene ‚Pinova‘; Stammbildner: nicht transgene ‚Hibernal‘; Edelreis: nicht transgene ‚Pinova‘

Abbildung 13: Ergebnisse des GUS-Tests zur Bestimmung des Transports von Transgenprodukten am Beispiel der vier Veredelungen der Linie T355.

Beim nicht transgenen Stammbildner und Edelreis zeigte sich nach GUS-Test keine Blaufärbung der Blätter. Als Negativkontrolle wurden Blattstücke nicht transgener ‚Pinova‘ verwendet. Diese färbten sich ebenfalls nicht blau.

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen für das NPTII-Protein und der GUS-Tests weisen darauf hin, dass bei den untersuchten Pflanzen kein Transport von NPTII- und GUS-Protein zwischen transgener und nicht transgener Veredelungskomponente stattgefunden hat.

5. Diskussion

5.1. Vertikaler Gentransfer

Der Gentransfer von transgenen auf nicht transgene Organismen kann eine unerwünschte Begleiterscheinung beim Anbau gentechnisch veränderter Pflanzen sein. In den vergangenen Jahren wurden neben einjährigen Kulturarten, zunehmend Gehölze gentechnisch verändert und freigesetzt. Begleitende Untersuchungen über mögliche Auswirkungen auf die Umwelt erfolgten aber bisher vorwiegend an einjährigen Kulturarten, wie beispielsweise innerhalb der *Brassicaceae*, *Solanaceae*, *Poaceae* und *Leguminosae* (Gerdemann-Knörk und Tegender, 1997, Neuroth, 1997). Dagegen wurden bei Gehölzen nur in wenigen Fällen begleitende Analysen bei ihrer Freisetzung durchgeführt (Schütte et al., 2001). Die Einschätzung von möglichen Begleiterscheinungen, wie einer Auskreuzung von transgenem Erbgut ist aber eine wichtige Voraussetzung für die Beurteilung von Freisetzungsversuchen. Beim Apfel wird die Auskreuzungsrate als hoch eingeschätzt, weil dieser als Fremdbefruchter einen Kreuzungspartner benötigt und die Bestäubung durch Insekten erfolgt (Schütte et al., 2001).

In dieser Arbeit wurde die Übertragung von Apfelpollen eines Pollenspenders auf ausgewählte Apfelsorten untersucht. Die Häufigkeit der Auskreuzung wurde in Abhängigkeit von der Entfernung zum Pollenspender mit Hilfe eines phänotypischen sowie genotypischen Markern ermittelt. In den folgenden Kapiteln sollen die Versuchsanlage, Marker und Ergebnisse zur Auskreuzung diskutiert werden.

5.1.1. Versuchsanlage, befruchtungsbiologische Untersuchungen und Stichprobennahme

Für die Untersuchung des vertikalen Gentransfers wurde ein Quartier mit 50 verschiedenen Apfelsorten ausgewählt. Dieses Apfelquartier wurde nicht extra für den Versuch angelegt, sondern bestand bereits als ehemalige Versuchsfläche innerhalb des Institutes für Obstzüchtung der Bundesanstalt für Züchtungsforschung in Dresden-Pillnitz. Aus den 50 vorhandenen Apfelsorten wurden 38 Sorten als Pollenfängersorten ausgewählt. Insgesamt standen 60 Bäume als Pollenfänger zur Verfügung. Die Hybride ‚TNR 31-35‘ wurde aufgrund ihres Rotmarkergens als Pollenspender bestimmt.

Die Auswahl der Pollenfängerbäume erfolgte aufgrund ihrer Entfernung zum Pollenspendergenotyp und nach ihrem Blühzeitpunkt. Für optimale Bestäubungsverhältnisse soll der Blühbeginn der Bestäubersorte vor dem der Fängersorten liegen und möglichst

über das Blühende der Pollenfängersorten hinausreichen (Fischer, 2001). Der Pollenspender ‚TNR 31-35‘ gehört zu den früh blühenden Apfelgenotypen. Daher wurden vorrangig früh blühende Apfelsorten als Pollenfängersorten ausgewählt. Zusätzlich wurden in den beiden Untersuchungsjahren der Zeitpunkt der Vollblüte von ‚TNR 31-35‘ und den Pollenfängersorten bonitiert. Zwischen dem Beginn der Vollblüte der Pollenfängersorten und ‚TNR 31-35‘ lagen maximal sechs Tage. Da die Apfelblüte durchschnittlich 12 Tage dauert ist von einem ausreichenden Bestäubungszeitraum zwischen Pollenspender und Pollenfängersorten auszugehen.

Ein anderer wichtiger Punkt zur Beurteilung des Auskreuzungsrisikos ist die Befruchtungsfähigkeit des Spendergenotyps. Im Allgemeinen werden Wildarten wie *Malus sieversii* und ihre Hybride als gute Pollenspender und Befruchter eingestuft (Blasse, 1982). Die hier durchgeführten Untersuchungen zur Pollenvitalität und Pollenkeimfähigkeit bestätigten diese Annahme. 96,4% der untersuchten Pollenkörner von ‚TNR 31-35‘ waren vital. Die Keimfähigkeit des Pollens betrug 91,2%. Bei einem Anteil von über 60% gekeimter Pollenkörner wird die Keimrate als sehr gut eingestuft (Fischer, 2002).

Eine weitere Voraussetzung für die Bildung von Hybriden ist die sexuelle Kompatibilität zwischen ‚TNR 31-35‘ und den Pollenfängersorten. Für die Bestimmung der Kompatibilität wurden in den Jahren 2003 und 2004 insgesamt 36 der 38 Pollenfängersorten mit Pollen des Spendergenotyps künstlich bestäubt. Im Jahr 2003 waren zwei Drittel der bestäubten Pollenfängersorten in Kombination mit ‚TNR 31-35‘ hoch fertil. Im Jahr 2004 wurden 27 von 28 Kombinationen als hoch fertil eingestuft. Dabei waren die Pollenfängersorten, die im Jahr 2004 wiederholt bestäubt wurden, fertiler als im Vorjahr. Die höhere Fertilität zwischen Pollenspender und Fängersorten ist unter anderem auch auf die günstigeren klimatischen Bedingungen zurückzuführen. Eine hohe Befruchtungsrate ist bei wenig Niederschlag und Temperaturen zwischen 15°C und 20°C zu erwarten, da dann die Bedingungen für den Insektenflug, Pollenkeimung und Pollenschlauchwachstum optimal sind (Winter et al., 1992). Weiterhin wird die Keimrate des Pollens durch eine hohe relative Luftfeuchte gefördert (Huss-Marp, 2000). Temperatur und Niederschlagsmenge waren in beiden Untersuchungsjahren mit durchschnittlich 15°C und 0mm gleich, nur die durchschnittliche relative Luftfeuchte war im Jahr 2003 um 8% geringer als im Jahr 2004. Die besseren Befruchtungsergebnisse im Jahr 2004 könnten daher auf die höhere Luftfeuchte zurückgeführt werden.

Die Kompatibilität wird auch durch den Blütenansatz des Empfängerbaumes beeinflusst. Zur Bestimmung der Kompatibilität zweier Kreuzungspartner wird die

Anzahl der bestäubten Blüten ins Verhältnis zum Fruchtansatz nach dem Junifall gesetzt. Je mehr Früchte nach dem Junifall pro 100 bestäubte Blüten vorhanden sind, desto höher wird die Fertilität der Kombinationspartner bewertet. Mit steigender Blühstärke des Baumes nimmt jedoch auch die Stärke des Junifalls zu (Winter et al., 1992). Damit sinkt die Anzahl der Früchte pro 100 bestäubte Blüten. Als Folge ist der Fruchtansatz geringer und die Fertilität der Kombinationspartner wird niedriger eingeschätzt, als bei einer geringen Blühstärke. In dieser Arbeit wurden die Untersuchungen zur Fertilität nur zwei Jahre durchgeführt. Für eine genaue Beurteilung der Kompatibilität sollten die Versuche mindestens dreimal wiederholt werden, damit der Einfluss der Witterung auf Blühstärke, Blühverlauf und Keimfähigkeit des Pollens der Kreuzungssorten berücksichtigt werden kann (Fischer, 2002). Trotz der Unterschiede in der Kompatibilität zwischen einzelnen Fängersorte und ‚TNR 31-35‘ konnten jedoch ausreichend Früchte und damit Apfelsamen für die Bestimmung des vertikalen Gentransfers analysiert werden.

Bei der Versuchsplanung wurde davon ausgegangen, dass sich die Bienen hauptsächlich in einem Futterflugradius von 3-5m bewegen (zusammengefasst in Dietzsch, 1982). Im Bereich von 0-10m um den Pollenspender wurde ein hoher Stichprobenumfang gewählt. Damit sollte vor allem die Variation der Auskreuzungsrate in einer kurzen Distanz zum Pollenspender analysiert werden. Mit zunehmender Entfernung zu den Pollenspendern nahm dann die Anzahl der beprobten Pollenfängerbäume aus arbeitstechnischen Gründen ab. Ein Nachteil dieser Stichprobenverteilung ist, dass sich mit zunehmender Entfernung die Wahrscheinlichkeit ein Auskreuzungsereignis zu detektieren verringert. Beispielsweise wurde bei Analysen zur Auskreuzungsrate von Zuckerrüben errechnet, dass bei einem Umfang von 1500 Stichproben die Nachweiswahrscheinlichkeit in 90m Entfernung um 31% geringer ist, als in 1m Entfernung zum Pollenspender (Hoffmann und Köhler, 1999).

Die Anzahl der untersuchten Früchte und Apfelsamen pro Pollenfängerbaum war ebenfalls nicht konstant. Der Stichprobenumfang variierte zwischen 8 und 202 Samen pro Pollenfängerbaum. Die unterschiedliche Anzahl der geernteten Samen ergab sich durch die Anzahl gebildeter Samen pro Frucht. Aufgrund des unterschiedlichen Fruchtansatzes war es außerdem nicht möglich von allen Pollenfängerbäumen die vorgesehenen 20 Äpfel zu ernten.

Trotz des variablen Stichprobenumfangs war in dieser Arbeit die Probenanzahl mit insgesamt 11058 Samen ausreichend um die Auskreuzungsrate zu bestimmen. Um in zukünftigen Versuchen die Nachweiswahrscheinlichkeit einer Auskreuzung in größeren

Distanzen zu erhöhen, kann die Stichprobengröße der Entfernung angepasst werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit dienen dabei als Grundlage (vgl. Kapitel 5.1.3.).

5.1.2. Bestimmung des vertikalen Gentransfers mittels morphologischer und molekularer Marker

Die Rotlaubigkeit von Pflanzen wurde bereits mehrfach als phänotypischer Marker in der Pflanzenzüchtung eingesetzt. So verwendete Wertheim (1991) die rotlaubige Apfelsorte *Malus* cv. Baskatong als Pollenspender, um die Reichweite der Pollenübertragung und folglich die Anzahl benötigter Pollenspenderbäume in Apfelanlagen zu bestimmen. Im Vergleich zu molekularen Markern sind phänotypische Marker kostengünstiger und arbeitssparender und ermöglichen daher die Analyse einer großen Anzahl von Proben. Voraussetzung für ihre Verwendung ist eine dominante Vererbung und eine stabile Ausprägung des Merkmals.

Für die Untersuchung des vertikalen Gentransfers wurde ein Hybrid der Wildart *Malus sieversii* var. *sieversii* f. *niedzweckzyana* Dieck. als Pollenspender eingesetzt. Dieser Hybrid mit der Bezeichnung ‚TNR 31-35‘ ist homozygot für ein dominantes Gen, das für eine Rotfärbung in allen Organen verantwortlich ist (Lespinasse und Godicheau, 1980).

Für die Überprüfung der dominanten Vererbung der Rotlaubigkeit von ‚TNR 31-35‘ wurden die Pollenfängersorten mit dem Rotmarker gekreuzt. Aus den Kreuzungsversuchen resultierten aus beiden Jahren insgesamt 4008 Sämlinge. 87 Sämlinge zeigten jedoch nicht die erwartete Rotfärbung der Blätter, sondern hatten grünes Laub. Der durchschnittliche Anteil grünlaubiger Sämlinge betrug 2,5% im Jahr 2003 und 1,7% im Jahr 2004.

Für das Auftreten grünlaubiger Kreuzungsnachkommen gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Ein heterozygotes Vorliegen des Rotmarkergens von ‚TNR 31-35‘ kann aufgrund der geringen Anzahl grünlaubiger Sämlingen ausgeschlossen werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass durch eine Variation bzw. eine Unterdrückung der Anthocyanfärbung grünlaubige Nachkommen auftreten. Hanna und Burton (1992) berichten von Variationen der Rot- bzw. Violettfärbung bei Sämlingen der Perlhirse in Abhängigkeit vom Sämlingsalter. Lespinasse und Godicheau (1980) und Lespinasse et al. (1983) berichteten ebenfalls von einem Auftreten grünlaubiger Sämlingen nach Kreuzung einer grünlaubigen Apfelsorte mit ‚TNR 31-35‘. Der Hybrid wurde als Rotmarker bei der Erzeugung haploider Apfelpflanzen eingesetzt. Beim Auftreten von grünlaubigen Nachkommen wurde angenommen, dass es sich um haploide Nachkommen handelt, die aus einer Parthenogenese der Zellen des

Embryosackes entstanden sind. Von den 635 grünen Sämlingen war jedoch nur eine Pflanze haploid. Es wurde vermutet, dass die grünlaubigen, diploiden Nachkommen entweder durch eine diploiden Parthogenese, Selbstung oder eine fehlenden Funktion des Markergens entstanden sind. Es wurden jedoch keine molekularen Analysen durchgeführt, um einen dieser Erklärungsansätze zu bestätigen.

In einer anderen Arbeit nutzen UrRahman et al. (1997) *Malus* cv. Baskatong als Rotmarker bei der Herstellung von apomiktischen Apfelpflanzen. Auch hier erfolgte eine Selektion grünlaubiger Sämlinge, da angenommen wurde, dass es sich um apomiktischen Pflanzen handelt. Zusätzlich wurden die vermeintlich apomiktischen Sämlinge mit RAPD-Markern überprüft, um die Brauchbarkeit des Rotmarkergens von *Malus* cv. Baskatong zu bestätigen. Es zeigte sich, dass eine farbbaasierte Selektion bei Kreuzungsnachkommen *in vitro* von *M. toringoides* x *M. cv. Baskatong* möglich war, jedoch nicht für die In-vitro-Nachkommen aus der Kreuzung *M. hupehensis* x *M. cv. Baskatong*. Das Rotmarkergens von *M. cv. Baskatong* war daher nicht uneingeschränkt als Selektionsmarker zu verwenden. Der Einsatz von genetischen Markern ermöglicht die zusätzliche Analyse eines Merkmals auf molekularer Ebene. Dabei können Variationen eines phänotypischen Markers mittels genetischer Marker überprüft werden.

Als genetischer Marker für die Überprüfung der grünlaubigen Nachkommen aus der Kreuzung mit ‚TRN 31-35‘ wurden in dieser Arbeit SSR Marker ausgewählt. SSRs besitzen einen hohen Polymorphiegrad und stehen für die Analyse des Apfels in ausreichender Menge zur Verfügung (Gianfranceschi et al., 1998; Guilford et al., 1997; Liebhard et al., 2002). Eine weitere wichtige Voraussetzung für den Einsatz von SSRs zur Untersuchung des vertikalen Gentransfers ist ihre kodominante Vererbung. Diese erlaubt die Detektion verschiedener Allele innerhalb eines SSR-Locus und ermöglicht die genetische Identifizierung von Nachkommen und deren Zuordnung zu den Elternsorten (Hokanson et al., 1998).

Durch den Einsatz von SSR-Markern war es möglich ‚TNR 31-35‘ als Vater der 87 grünlaubigen Nachkommen aus den Kreuzungen 2003 und 2004 auszuschließen. Der Hauptanteil der grünlaubigen Nachkommen war wahrscheinlich durch Kontamination mit Pollen anderer Apfelgenotypen entstanden. Bei diesen Sämlingen wurde nur ein Allel der Muttersorte und ein weiteres Allel, dass weder von der Muttersorte noch von ‚TNR 31-35‘ stammte, detektiert.

Für eine Kontamination mit fremden Pollen sind verschiedene Ursachen denkbar. Eine Möglichkeit wäre die Verunreinigung durch einen kontaminierten Bestäubungspinsel. Der Pollen der bestäubten Pollenfängerpflanze könnte an dem Pinsel haften bleiben

und den nächsten Kreuzungspartner befruchten. Die Pinsel werden jedoch nach jeder Bestäubung in 70%igem Alkohol gereinigt. Der am Pinsel verbleibende Pollen zeigte nach dieser Behandlung keine Keimung mehr. Eine Befruchtung durch solchen Pollen ist daher unwahrscheinlich. Darüber hinaus müssten bei der Bestäubung mit einem verschmutzten Pinsel alle grünlaubigen Nachkommen einer Kreuzungskombination die gleichen SSR Muster besitzen, da sie von einem gemeinsamen Vater stammen. Die an den grünlaubigen Sämlingen detektierten Allele innerhalb einer Kreuzungskombination waren jedoch so unterschiedlich, dass ein gemeinsamer Vater auszuschließen ist.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Kontamination mit fremden Pollen durch Windbestäubung erfolgt ist. Bei einer künstlichen Bestäubung werden die Apfelblüten mit Kreuzungstüten isoliert, die eine Bestäubung der Blüte durch Insekten verhindern. Für den ca. 40µm großen Apfelpollen sind die feinmaschigen Tüten allerdings durchlässig. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung zum Windtransport von Apfelpollen zeigten, dass der Apfelpollen bis mindestens 20m transportiert werden kann (Reim et al., 2006). Besonders bei trockenem, warmem Wetter ist mit einem höheren Anteil an Windtransport, auch über größere Entfernungen, zu rechnen (Pickhardt und Fluri, 2000). Dieses Ergebnis widerspricht den Analysen von Janssen et al. (1995). Diese berichteten, dass der Apfelpollen zu schwer ist und nur maximal 6m durch Wind transportiert werden kann. Der Anteil der Windbestäubung wird daher beim Apfel als minimal angegeben (Janssen et al. 1995). Die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen lassen daher darauf schließen, dass eine Bestäubung der isolierten Blüte durch windtransportierten Pollen nicht auszuschließen ist.

Bei acht grünlaubigen Kreuzungsnachkommen wurden nach der SSR-Analyse nur Allele der Muttersorte detektiert. Diese Sämlinge sind daher durch eine Selbstung der Muttersorte entstanden. Normalerweise wird eine Selbstung beim Apfel durch Mechanismen der Selbstinkompatibilität verhindert (De Nettancourt, 2001). Verantwortlich für die Selbstinkompatibilität sind so genannte S-Allele. Diese kodieren für Ribonukleasen, die das Wachstum des Pollenschlauches hemmen (Broothaerts, 2003). Allerdings ist ein geringer Anteil von Selbstbefruchtung auch beim Apfel nicht ausgeschlossen. Durch höhere Temperaturen kann sich die Ausprägung der Selbstinkompatibilität verringern, wodurch es vermehrt zu einer Selbstbefruchtung kommt (Okazaki und Hinata, 1987).

Lediglich bei einem grünlaubigen Kreuzungsnachkommen wurden nach Analyse mit drei verschiedenen SSR-Markern ausschließlich Banden der Muttersorte und von ‚TNR 31-35‘ detektiert. Für diesen Sämling konnte ‚TNR 31-35‘ als Vater nicht ausgeschlossen werden. Wahrscheinlich ist dieser Sämling auch auf eine

Kontamination mit Apfelpollen einer anderen Apfelsorte zurückzuführen, die bei den drei getesteten SSRs dasselbe Allelmuster wie ‚TNR 31-35‘ besitzt. Mit weiteren SSR-Analysen wäre es eventuell möglich ‚TNR 31-35‘ als Vater auszuschließen.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe der SSR-Analyse das homozygote Vorliegen der Rotlaubigkeit bestätigt werden. Das Rotmarkergen von ‚TNR 31-35‘ kann somit als phänotypischer Marker für die Untersuchung des vertikalen Gentransfers eingesetzt werden.

5.1.3. Bestimmung der Auskreuzungsfrequenz

Durch den Einsatz des morphologischen Markers von ‚TNR 31-35‘ war es möglich insgesamt 11058 Nachkommen für die Bestimmung der Auskreuzungsfrequenz zu untersuchen. Der durchschnittliche Anteil rotlaubiger Sämlinge aus der freien Abblüte betrug in den Untersuchungsjahren 1,8% bzw. 1,4%. Dabei konnte ein Pollentransport bis mindestens 104m nachgewiesen werden.

In der Regel fliegen die Bienen während ihres Futterfluges nur wenige Bäume an und meist nur die benachbarte Bäume des zuerst besuchten Baumes (Free und Spencer-Booth, 1964). Große Distanzen werden normalerweise nur bei einer großen Bienenpopulation, geringem Blütenansatz oder Windabdrift angefliegen. Futtermangel kann aufgrund der verwendeten Versuchsfläche ausgeschlossen werden. Diese besteht aus 50 verschiedenen Apfelsorten mit mindestens zwei Bäumen pro Sorte. Ein hoher Blütenansatz ist daher gesichert, auch wenn eine alternierende Apfelsorte einen geringen Blütenansatz aufwies.

Die höchste Frequenz der Pollenübertragung war, wie zu erwarten in einer Entfernung bis 10m vom Pollenspender zu beobachten. In diesem Bereich wurden 69% aller rotlaubigen Nachkommen detektiert. In der Entfernung bis 60m vom Pollenspender konnten 94% der rotlaubigen Nachkommen ermittelt werden. Dieses Ergebnis entspricht den Untersuchungen von Wertheim (1991), der *Malus* cv. Baskatong als rotlaubigen Pollenspender für die Analyse der Pollenverteilung in Apfelanlagen einsetzte. Dabei wurden bis zu einer Distanz von 40m zum Pollenspender rotlaubige Nachkommen gefunden. Der Hauptanteil der roten Sämlinge stammte jedoch aus einem Radius von 5-15m. Mit zunehmender Entfernung zum Pollenspender wurde eine starke Abnahme der rotlaubigen Nachkommen festgestellt (Wertheim, 1991). Ähnliche Ergebnisse zeigten die Untersuchungen von Kron et al. (2001b), die in zwei unterschiedlichen Obstanlagen mit 15 Reihen (73,5m) bzw. 18 Reihen (86m) durchgeführt wurden. Dabei wurden 44-80% der transportierten Pollen innerhalb der

ersten drei Reihen, um den Pollenspender detektiert. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen nahm ebenfalls die Auskreuzungsrate mit zunehmender Entfernung ab. Trotzdem wurde an einzelnen Bäumen in über 100m noch ein Anteil von 0,8% rotlaubige Nachkommen detektiert. Einzelne Bäume in einem Bereich von 80m bis 90m wiesen dagegen nur 0,2% rotlaubige Sämlinge auf. Ähnliche Ergebnisse zeigten Untersuchungen zur Auskreuzungsrate bei Erdbeeren (Westmann et al., 2002). In diesen Untersuchungen wurden Wilderdbeerpopenationen in einer Entfernung von 15m bis 7km von Erdbeerfarmen mit 24 AFLP-Markern untersucht, die spezifisch für die Kulturerdbeere sind. Die Frequenz der AFLP-Marker war bei den Populationen in über 100m Entfernung von den Erdbeerfarmen am höchsten. Eine Korrelation zwischen der Häufigkeit der detektierten AFLP-Marker und der Entfernung zu Erdbeerfarmen war nicht zu erkennen.

Der Standort des Pollenspenders in der Obstanlage kann die Auskreuzung ebenfalls beeinflussen. Mayer et al. (1989) geben an, dass die Bienen bei ihrem Futterflug lieber entlang der Reihen fliegen, als quer zu den Reihen. Im Gegensatz dazu wurde von Kron et al. (2001a) eine größere Auskreuzungsdistanz zwischen den Reihen (62,4m), als entlang der Reihe (13,7m) beobachtet. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch in dieser Arbeit gemacht (Reim et al., 2006). Die meisten Auskreuzungsereignisse wurden quer zu den Reihen festgestellt. Weiterhin war die Auskreuzungsrate in nördlicher und nordöstlicher Richtung höher als in südlicher Richtung. Ähnliche Beobachtungen machte Wertheim (1991). Bei seiner Analyse zur Bestimmung der notwendigen Pollenspenderdichte mittels *Malus* cv. ‚Baskatong‘ wurden nach freier Abblüte in nordöstlicher und nordwestlicher Richtung mehr rotlaubige Nachkommen gefunden, als in südlicher Richtung. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die höchste Auskreuzungsrate jedoch im Bereich zwischen Pollenspender und Bienenwagen beobachtet. Das lässt darauf schließen, dass die Frequenz des Pollentransports stark durch den Standort des Bienenwagens beeinflusst wird.

Die insgesamt 184 rotlaubigen Nachkommen aus der freien Abblüte der Jahre 2003 und 2004 wurden mittels SSR-Analyse überprüft. Dabei wurden vier rotlaubige Sämlinge ohne ein spezifisches Allel für den Pollenspender ‚TNR 31-35‘ detektiert. Diese waren möglicherweise falsch bonitiert worden. Durch Stress (Lichtintensität, Temperatur) kann es zu einer Bildung von Anthocyanen in den Apfelblättern und Blattadern kommen. Beispielsweise wird bei hoher Lichtintensität durch die Aktivierung des Enzyms PAL (phenylalanine ammonia-lyase) der erste Schritt der Anthocyanbiosynthese angeregt (Lancaster, 1992). Als Folge davon können auch grünlaubige Pflanzen eine Rotfärbung des Laubes aufweisen. Bei den restlichen 180 rotlaubigen

Sämlingen aus freier Abblüte wurde jeweils ein pollenspenderspezifisches Allel detektiert.

Grundsätzlich ist bei insektenbestäubenden Pflanzen mit höheren Pollentransportraten in größeren Entfernungen zu rechnen, während sich die Pollenverbreitung bei windbestäubten Kulturpflanzen auf die nähere Umgebung der Pollenspender beschränkt (Driesel und Danneberg, 1996). Ein Beispiel für die geringen Pollentransferdistanzen bei Windbestäubern zeigten Untersuchungen bei Mais. Dabei wurde ermittelt, dass 98% des Pollens innerhalb von 20-25m zum Pollenspender verblieben (Pleasant et al, 2001; Sears und Stanley-Horn, 2000). Im Gegensatz dazu wurden bei insektenbestäubenden Pflanzen Auskreuzungsdistanzen bis 1300m (z.B. Kürbis) und mehr beobachtet (Kirkpatrick und Wilson, 1988).

Zusammenfassend haben die Untersuchungen zum vertikalen Gentransfer beim Apfel gezeigt, dass ein Großteil der Auskreuzungsereignisse (94%) innerhalb einer Entfernung von 60m zum Pollenspender stattfindet. Aus diesen Ergebnissen können wichtige Schlussfolgerungen für die Beurteilung des vertikalen Gentransfers von gentechnisch veränderten Apfelpflanzen bei einer Freisetzung gezogen werden. Trotz Insektenbestäubung weisen die Ergebnisse daraufhin, dass eine Auskreuzung vorwiegend in der Nähe des Pollenspenders stattfindet. In einer Entfernung von über 10m stammten weniger als 10% aller untersuchten Sämlinge von dem Pollenspender ab. In einer Entfernung von über 100m war der Anteil der Nachkommen des Pollenspendergenotyps unter 1%. Die Obstanlage, die für diese Untersuchungen verwendet wurde, weicht sehr von einer kommerziell genutzten Obstanlage ab. Diese sind normalerweise einheitliche mit einer Apfelsorte bepflanzt. Daher sind die hier erzielten Ergebnisse vor allem auf Anlagen übertragbar, die ebenfalls eine Anzahl verschiedener Apfelsorten enthalten, wie beispielsweise Apfelzuchtanlagen oder Genbanken.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zum vertikalen Gentransfer liefern neue Daten zur Auskreuzung von Apfel. Die Bewertung eines Umweltrisikos kann jedoch nicht nur auf Auskreuzungsdaten basieren. Neben der Bestimmung von Auskreuzungsraten sollte eine Bewertung des Umweltrisikos auch in Abhängigkeit einer Wahrscheinlichkeit der Hybridisierung und Introgression von transgenem Erbgut erfolgen. Nach der Definition von Slatkin (1987) ist unter vertikalem Gentransfer nicht nur das Auskreuzungsereignis, sondern auch die Aufnahme der Gene des Spenderorganismus in den Genpool der Empfängerpopulation zu verstehen. Voraussetzung dafür ist die Bildung einer Hybridpflanze. Nach Arriola und Ellstrand (1997) muss diese weiterhin genug Fitness besitzen, um in der Umwelt weiter zu bestehen und das betreffende

Fremdgen an andere Generationen weiterzugeben (Intogression). Der Kulturapfel wird normalerweise vegetativ vermehrt. Eine Verbreitung von Apfelsamen ist für das Fortbestehen des Apfels daher nicht notwendig. Die Produktion von Samen spielt nur für den Apfelzüchter eine Rolle. Deshalb kann die Verbreitung von Apfelsamen in Obstbaubetrieben relativ gut kontrolliert werden. Kommt es trotzdem zu einer unkontrollierten Verbreitung stellt sich die Frage, ob unter natürlichen Bedingungen der Apfelsamen keimt und es überhaupt zur Bildung einer Hybridapfelpflanze kommt. Für eine genauere Klärung dieser Frage sind weitere Forschungsarbeiten notwendig.

5.2. Stabilität der Integration und Expression von Transgenen bei Apfel

Die für diesen Teil der Arbeit verwendeten transgenen Linien sind bei Transformationsexperimenten in den Jahren 1998, 1999 und 2000, die mit vier verschiedenen Genkonstrukten durchgeführt worden, entstanden. Mittels Insert-PCR sind alle Linien nach ihrer Regeneration positiv auf die Integration von Fremd- und Markergen getestet worden. Die Ergebnisse der Expressionsanalysen waren ebenfalls positiv. Nach zwei bis vier Jahren Ex-vitro-Kultur wurde eine erneute Analyse dieser Pflanzen durchgeführt. Dabei wurde bei unveredelten und veredelten Pflanzen von fünf Linien ein Verlust der T-DNA Integration bzw. T-DNA Expression festgestellt. In den folgenden Kapiteln sollen die Ergebnisse dieser Arbeit zur Stabilität der Integration und Expression der T-DNA diskutiert werden.

5.2.1. Stabilität der Integration der T-DNA

In nur wenigen Arbeiten wird über einen physischen Verlust von T-DNA-Sequenzen berichtet (zusammengefasst in Pickhardt und De Kathen, 2002). Dieser resultiert oftmals aus intrachromosomalen Rekombinationsereignissen, wobei es entweder zu einer Sequenzumordnung oder –deletion kommt.

Die Untersuchungen zur Stabilität der T-DNA-Integration erfolgten mittels Insert-PCR und Southern-Blot-Analyse an insgesamt 60 transgenen Ex-vitro Pflanzen. Bei einzelnen Pflanzen der Linien T136, T211 und T267 konnte das Zielgen und bzw. oder das Markergen mittels Insert-PCR nicht mehr nachgewiesen werden. Bei den Linien T136 und T211 wurden Unterschiede in der Anzahl der Markergen- und Zielgenkopien mittels Southern-Blot-Analyse detektiert. Weiterhin wurden bei den Linien T362 und T363 Unterschiede in der Anzahl bzw. Größe der integrierten T-DNA-Kopien zwischen den einzelnen Pflanzen festgestellt.

Das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse für die Linie T136 und T211 weist auf eine unvollständige Integration einer T-DNA-Kopie während des Transformations-prozesses hin. Dabei ist es während der Integration zu T-DNA Brüchen gekommen, woraus die unterschiedliche Anzahl von Ziel- und Markergen bei T136 und T211 resultiert. Für die *Agrobacterium*-vermittelte Integration der T-DNA gibt es bislang drei Modelle: Das Doppelstrangbruch-, das Einzelstrangbruch- und das mikrohomologie-abhängige Integrationsmodell (Tzfira et al. 2004). Im letztgenannten Modell wird die T-DNA Integration durch Mikrohomologien zwischen der rechten Border des T-DNA Einzelstranges und der Zielsequenz initiiert. Beim Doppelstrangbruch- und Einzelstrangbruch-Modell wird angenommen, dass der Einbau der einzelsträngigen T-DNA durch einen Doppelstrangbruch in der Ziel-DNA bzw. durch einen Einzelstrangbruch der Ziel-DNA erfolgt. Auch hier wird die Integration der T-DNA durch kurze Homologien zwischen T-DNA und Ziel-DNA ausgelöst. Diese Homologien können sowohl von der rechten (RB) als auch von der linken Bordersequenz (LB) ausgehen (Tzfira et al., 2004). Bei der Linie T136 wäre es denkbar, dass der Integrationsprozess nach Einbau der rechten Border abgebrochen wurde und deshalb drei *nptII*-Markergen-Kopien, aber nur zwei Kopien des *H-Dpo*-Gens nachgewiesen werden konnten. Das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse für die Linie T211 ist mit dem Doppelstrangbruch-Modell und dem Einzelstrangbruch-Modell erklärbar, wobei die Integration der T-DNA von der linken Bordersequenz ausgegangen ist. Durch einen unvollständigen Einbau wurden zwei Zielgen-Kopien aber nur eine Markergen-Kopie integriert. Ähnliche Beobachtungen machten Thomas und Jones (2007) bei Untersuchungen zur T-DNA Integration an Tomate. Dabei wurde nur bei einer von insgesamt 42 eine vollständige Integration der LB-Sequenz nachgewiesen. Bei allen anderen Integrationen wurden Deletionen innerhalb der LB-Sequenz von bis zu 400 Basen detektiert. Deletionen an der RB-Sequenz waren dagegen weniger häufig.

Analog zur Linie T211 wurde bei der Linie T362 eine unterschiedliche Anzahl der *T4L*-Gen-Kopien und *nptII*-Gen-Kopien detektiert. Die In-vitro Pflanzen zeigten dagegen die gleiche Anzahl *T4L*- und *nptII*-Kopien. Ähnliche Ergebnisse wurden bei zwei Ex-vitro Pflanzen der Linie T363 beobachtet. Bei diesen Pflanzen wurde deutliche Änderung der Fragmentgröße zweier T-DNA Kopien im Vergleich zur In-vitro Pflanzen detektiert. Diese Ergebnisse auf eine unvollständige Integration der T-DNA-Kopien während des Integrationsprozesses zurückzuführen ist daher unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist, dass die Veränderungen der T-DNA-Abschnitte erst während der In-vitro-Kultur aufgetreten sind. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch in anderen Untersuchungen gemacht. Bereits 1991 berichten Hänisch ten Cate et al. von

transgenen Kartoffeln bei denen nach zweieinhalb Jahren In-vitro-Kultur der rechte T-DNA-Abschnitt (rechte Border und Gen für Opine-Synthese) nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Auch neuere Untersuchungen berichten von einem Verlust von T-DNA Abschnitten (Boyko et al., 2007; Flachowsky et al., 2008; Melander et al., 2006; Nakano et al., 2005; Yang et al., 2005). Dabei wird oftmals von einem Zusammenhang zwischen einer Sequenzveränderung der T-DNA und der Dauer der In-vitro-Kultur berichtet (Larkin und Scowcroft, 1981). So stellten Nehra et al. (1992) bei Erdbeeren nach der achten Woche *in-vitro* bei 5,6% der Erdbeerregenerate eine somaklonale Variation in Form von Blattveränderungen fest. Nach 24 Wochen In-vitro-Kultivierung stieg die Anzahl der Pflanzen mit Blattveränderungen über das Doppelte. Die Zusammensetzung des Kulturmediums beeinflusst die Stabilität der T-DNA Sequenz. Auch wurden Veränderungen innerhalb der T-DNA-Sequenz häufig in Verbindung mit der Induzierung von Kallusgewebe und der Regeneration von Sprossen während der In-vitro-Kultur gebracht (Papazova et al., 2006; Pickhardt und De Kathen, 2002). Andere Untersuchungen verweisen dagegen auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Punktmutationen und der Umweltbedingungen (Conner et al., 1998; Koorneef et al., 2004; Kovalchuk et al., 2000; McCallum et al., 2000; Ogasawara et al., 2005; Papazova et al., 2007). Dabei treten Punktmutationen oftmals in Form von kleinen Deletionen oder Basenpaarsubstitutionen auf, wobei sich die Mutationsfrequenz bei umweltbedingtem Stress erhöht. Unter natürlichen Bedingungen treten solche Rekombinationsvorgänge mit einer Frequenz von 10^{-4} bis 10^{-7} pro Zellteilung auf (Peterhans et al., 1990; Puchta et al., 1995). Der Verlust von T-DNA Abschnitten kann auch mit der Integration der T-DNA in Regionen mit hoher Transpositionsaktivität erklärt werden (Fladung, 1999; Francis und Spiker, 2005). Innerhalb dieser Integrationsorte sind vermehrt Mutationserscheinungen der so genannten ‚Insertional Mutagenesis‘ wahrscheinlich (Koncz et al., 1992; Zhang et al., 2003). Beim Vorhandensein mehrerer T-DNA Kopien muss der Verlust eines T-DNA-Abschnitts nicht zwangsläufig mit einem Verlust der Transgenexpression korrelieren (Hänisch ten Cate et al., 1991; Melander et al., 2006). Vergleichbare Ergebnisse wurden in dieser Arbeit für die Linie T362 beobachtet. Trotz des Verlustes einer Kopie des *nptII*-Markergens nach zwei Jahren In-vitro-Kultur war die Expression des *nptII*-Gens nachweisbar.

Bei den Pflanzen der Linien T136 und T211 konnte das (*H*)-*Dpo*-Gen mittels Insert-PCR nicht nachgewiesen werden. Allerdings war der Nachweis des (*H*)-*Dpo*-Gens mittels Southern-Blot-Analyse möglich. Das negative Ergebnis der Insert-PCR dieser Linien kann auf eine Sequenzveränderung des Zielgens wie oben beschrieben

zurückgeführt werden. Bei der Pflanze T136A ist es denkbar, dass diese Sequenzveränderung nicht in allen Zellen stattgefunden hat, sondern dass es sich um eine chimäre Pflanze handelt, die sowohl Zellen mit vollständiger und unvollständiger T-DNA besitzt. Für die PCR-Analyse wurde möglicherweise die DNA aus einem anderen Pflanzenbereich isoliert, als für die Southern-Blot-Analyse. Als Folge war der Nachweis des *H-Dpo*-Gens für T136A mittels Southern-Blot-Analyse möglich, aber nicht mittels Insert-PCR.

Bei der Linie T211 kann nicht von chimären Pflanzen ausgegangen werden. Von dieser Linie wurden insgesamt acht Pflanzen getestet. Dabei ist unwahrscheinlich, dass für die PCR bei allen acht Pflanzen DNA verwendet wurde, die aus chimären Pflanzenteilen isoliert wurde, während für Southern-Blot-Analysen T-DNA ohne Sequenzveränderung eingesetzt wurde. Durch die Veränderung in der *Dpo*-Sequenz konnten die spezifischen Primer bei der PCR nicht binden. Dagegen war das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse positiv, da zum Nachweis des *Dpo*-Gens eine komplementäre Sonde benutzt wird. Diese bindet auch bei geringen Abweichungen in der Zielgensequenz. Die Sequenzveränderung des *Dpo*-Gens bei der Linie T211 fand mit großer Wahrscheinlichkeit während der In-vitro-Kultur statt, da die Wiederholung der Insert-PCR im Jahr 2003 an In-vitro-Material dieser Linie ebenfalls negativ war. Aus der Vermehrung der In-vitro Pflanzen entstanden dann die acht untersuchten Ex-vitro Pflanzen.

Der Zeitpunkt der Sequenzveränderung ist bei T136A nicht eindeutig zu bestimmen. Die In-vitro Pflanze konnte im Jahr 2003 nicht erneut getestet werden, da sie eingegangen war. Die stabile Integration des *H-Dpo*-Gens bei den restlichen Ex-vitro Pflanzen von T136 deutet allerdings auf eine Umstrukturierung während der Ex-vitro-Kultur hin. Fladung (1999) berichtete ebenfalls über einen Verlust des transgenen Merkmals bei Aspen im ersten Jahr der Kultivierung im Gewächshaus. Einige der transgenen Aspenlinien, die mit dem *roC*-Gen transformiert wurden, zeigten eine Rückkehr zum untransformierten Phänotyp. Diese Linien besaßen Zweige mit transformierten und untransformierten Phänotyp. Mit molekularen Untersuchungen der Blätter mit untransformiertem Phänotyp wurden Sequenzveränderungen der T-DNA nachgewiesen, die durch Deletionen, invertierte T-DNA-Kopien bzw. Fillersequenzen entstanden waren.

Zur Klärung der Ergebnisse der Linien T136A, T211, T362 und T363 wären weitere Untersuchungen dieser Pflanzen mittels Inverser-PCR bzw. „genome walking“ und Sequenzierung sinnvoll. Mit diesen Methoden ist eine Analyse der T-DNA-Sequenz

und ihrer flankierenden Bereiche möglich, wodurch eventuelle Sequenzveränderungen detektiert werden können.

Bei der unveredelten Ex-vitro Pflanze T267C und den, aus dieser Pflanze resultierenden, vier Veredelungen (T267V1-V4) konnte weder mittels Insert-PCR noch Southern-Blot-Analyse eine Integration T-DNA nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf chimäre Pflanzen innerhalb der Linie T267 zurückzuführen. Es ist anzunehmen, dass die nach der Transformation entstandenen Sprossregenerate aus transgenen und nicht transgenen Zellen bestanden. Ein physischer Verlust der T-DNA durch eine Rekombination kann bei dieser Pflanze ausgeschlossen werden, da ein gleichzeitiger Verlust von vier T-DNA-Kopien unwahrscheinlich ist. Von dieser Pflanze haben sich während der In-vitro-Kultur neben den transgenen auch nicht transgene Sprosse entwickelt. Diese wurden zusammen mit den transgenen Pflanzen bewurzelt und in das Gewächshaus überführt. In der weiteren Bearbeitung wurden aus der nicht transgenen Pflanze T267C vier Veredelungen hergestellt (T267V1-V4). Die Regeneration von chimären Sprossen während des Transformationsprozesses ist eines der größten Probleme der bestehenden Transformationssysteme (Caboni et al., 2000; Dominguez et al., 2004). Diese Transformationssysteme basieren auf der Entwicklung von adventiven Sprossen direkt aus dem Blatt. Die dabei entstandenen Pflanzen stammen nicht unbedingt von einer einzelnen Zelle ab und besitzen folglich nicht denselben klonalen Ursprung (Schmülling und Schell, 1993). Eine Entwicklung von chimären Pflanzen auf dem Selektionsmedium kann durch eine vorübergehende Expression des Markergens durch die Anwesenheit von *Agrobacterium*-Zellen möglich sein. Auch können die untransformierten Zellen von den transformierten Zellen profitieren (Birch, 1997; Park et al., 1998). Daher ist die Anzahl der chimären Pflanzen oft höher als erwartet. So berichten Dominguez et al. (2004) von einer unerwartet hohen Anzahl von Chimären bei Citrus. Trotz In-vitro-Kultivierung auf Selektionsmedium betrug der Anteil von chimären Pflanzen 12%. Die Ineffizienz der Selektion wird hier mit dem Schutz der untransformierten Zellen durch benachbarte transformierte Zellen erklärt.

Besonders bei gentechnisch veränderten Gehölzen ist die Wahrscheinlichkeit, dass Instabilitäten der T-DNA auftreten groß, da sich Sequenzveränderung durch Mutations- und Rekombinationsereignisse über viele Jahre anreichern können. Diese Tatsache macht deutlich, dass vor allem bei langlebigen Pflanzen eine zweite molekulare Analyse der T-DNA während der Ex-vitro-Kultur notwendig ist.

5.2.2. Stabilität der Expression auf Transkriptions- und Translationsebene

In den meisten Untersuchungen zur Transgenstabilität wird von einer Inaktivierung der T-DNA ohne Veränderung der T-DNA Sequenz berichtet (zusammengefasst in Pickhardt und De Kathen, 2002). Die Inaktivierung der Expression kann dabei auf Transkriptions- oder Translationsebene erfolgen. In dieser Arbeit wurde bei einer Linie (T363) eine Inaktivierung der Transgenexpression auf Transkriptionsebene festgestellt. Einzelne Pflanzen von weiteren vier Linien (T136, T267 und T211 und T363) zeigten keine bzw. eine geringe Transgenexpression auf Translationsebene. Als Mechanismen einer instabilen Expression werden in den meisten Fällen Methylierungen der DNA oder als ‚RNA Interference‘ bezeichnete Vorgänge angegeben (De Souza et al., 2007; Shiba und Takayama, 2007; Sijen und Kooter, 2000). Dabei wird die Methylierung der T-DNA für ein ‚gene silencing‘ auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene verantwortlich gemacht, während die ‚RNA Interference‘ zu einer instabilen Expression auf posttranskriptioneller Ebene führt (De Souza et al., 2007; Nagaya et al., 2005; Shiba und Takayama, 2007; Sijen und Kooter, 2000).

Bei der Linie T363 wurde nach RT-PCR ein Verlust der Transkriptionsaktivität des *npII*-Markergens nachgewiesen. Weiterführende Methylierungsuntersuchungen zeigten für alle Pflanzen von T363 eine Methylierung der T-DNA im *nos*-Promotorbereich. Transkriptionsverluste korrelieren häufig mit einer Methylierung im Promotorbereich (Chan et al., 2007; Klose et al., 2007; Matzke et al., 1989; Ulian et al., 1996; Vaucheret und Fargard, 2001). Bei der In-vitro Pflanze und T363A wurde zusätzlich ein 2,3kb großes Fragment detektiert, was auf unmethylierte T-DNA schließen lässt. Bei diesen Pflanzen handelt es sich wahrscheinlich um Chimären, die Zellen mit methylierten als auch unmethylierten T-DNA-Kopien besitzen. Die Anwesenheit von unmethylierten Zellen innerhalb einer Pflanzeprobe würde auch erklären, warum noch eine geringe Expression des *npII*-Markergens nachgewiesen werden konnte.

Gefördert wird die Methylierung von T-DNA-Kopien durch die Integration in eine hypermethylierte Umgebung. Dabei wird angenommen, dass sich die Methylierungsmuster repetitiver, genomischer Sequenzen des Zielgenoms auf die T-DNA-Bereiche ausbreiten können (Francis und Spiker, 2005; Stam et al., 1998). Häufig wird ein Transkriptionsverlust auch mit invertierten oder tandemartigen T-DNA-Wiederholungen in Verbindung gebracht (Marenkova und Deineko, 2006; Meza et al., 2002; Stam et al., 1998; Yang et al., 2005). Durch invertierte Wiederholungen von zwei oder mehreren T-DNA-Kopien kann es zu einem Anstieg des DNA Methylierungslevels kommen. Dabei wird die Inaktivierung durch DNA/DNA bzw. DNA/RNA-Paarung

zwischen einem methylierten Locus und einem homologen T-DNA-Abschnitt induziert (Hönicka und Fladung, 2006; Mette et al., 1999; Muskens et al., 2000). Andere Untersuchungen zeigen, dass die Integration invertierter oder tandemartig angeordneter T-DNA-Kopien nicht zwangsläufig zu einer Transgenstilllegung führt (Lechtenberg et al., 2003; Meza et al., 2002).

Bei den Pflanzen T363B und T363C wurden bei der Analyse zur *nos*-Promotormethylierung eine 1,9kb große Bande detektiert, die bei der In-vitro Pflanze und der Gewächshauspflanze T363A fehlte. Möglicherweise handelt es sich dabei ebenfalls um eine unmethylierte T-DNA-Kopie, die von dem methylierungssensitiven Enzym *Cfr42I* geschnitten wurde. Die Größe des Fragments von 1,9kb statt, wie erwartet 2,3kb, könnte durch die Deletion von T-DNA-Abschnitten erklärt werden (vgl. Kapitel 5.2.1.). Für eine eindeutige Aussage wären jedoch weitere Analysen notwendig.

Bei den drei unveredelten Pflanzen T136B, T136C und T267A wurde eine Inaktivierung des *npftII*-Markergens auf Translationsebene festgestellt. Für einzelne Pflanzen der Linien T136, T211 und T363 konnten nur geringe NPTII-Proteingehalte ermittelt werden. Die Stilllegung eines Gens auf posttranskriptioneller Ebene kann durch Überschreitung eines bestimmten Expressionslevels ausgelöst werden (Matzke et al., 2002; Meins, 2000; Palauqui et al., 1998; Schubert et al., 2004). Die Inaktivierung wird dabei durch die Verwendung von starken Promotoren bzw. einer hohen Anzahl T-DNA Integrationen gefördert (De Bolle et al., 2003; Elmayan und Vaucheret, 1996; Hobbs et al., 1993; Que et al., 1997).

Der Zusammenhang zwischen der Anzahl integrierter T-DNA-Kopien und der Genexpression wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. In einigen Untersuchungen wurde ein Anstieg der Genexpression bei zwei oder mehreren T-DNA-Kopien festgestellt (Lechtenberg et al., 2003; Marenkova und Deineko, 2006; Schubert et al., 2004; Tang et al., 2003). Andere Autoren berichteten über eine Verringerung bzw. Stilllegung der Expression oder fanden keinen Zusammenhang zwischen der Anzahl der T-DNA-Kopien und der Genexpression (Flachowsky et al., 2008; Morel und Vaucheret, 2000; Schubert et al., 2004). In dieser Arbeit wurde bei zwei (T270 und T350) von 14 untersuchten Linien eine Einfachintegration der T-DNA detektiert. Die restlichen 12 Linien zeigten zwischen zwei und vier T-DNA-Kopien. Eine Korrelation zwischen Genexpression und Anzahl der integrierten Transgene konnte in dieser Arbeit nicht gefunden werden.

Die Reduzierung der Genexpression kann auch auf die Langzeit-In-vitro-Kultur zurückgeführt werden. Vergleichbare Beobachtungen wurden von Cao und Earle

(2003) bei transgenen Broccoli-Klonen gemacht. Nach Langzeit-In-vitro-Kultur war die T-DNA bei den Broccoli-Linien zwar stabil integriert, die Expression des Transgens war allerdings vermindert. Leljak-Levanic et al. (2004) berichteten über einen Einfluss der Zusammensetzung des Kulturmediums auf die DNA Methylierung. Bei somatischen Embryonen, die auf auxinfreiem Medium kultiviert wurden, stieg der Anteil der DNA Methylierung. Andere abiotische Faktoren können ebenfalls die Genexpression beeinflussen. Besonders Salz-, Kälte-, Hitze- oder Trockenstress kann zu einer Veränderung der Genexpression führen (El Ouakfaoui und Miki, 2005; Papazova et al., 2007). Die Überführung der Pflanzen aus der In-vitro-Kultur in die veränderten Gewächshausbedingungen sowie Veredelungsmaßnahmen sind als Einflussfaktoren auf die Stabilität der T-DNA Expression daher nicht auszuschließen. Zwischen den Linien wurden große Unterschiede der translatierten NPTII-Proteinmenge festgestellt. Unterschiedliche Expressionslevel bei verschiedenen Linien wurde in der Literatur häufig auf den so genannten ‚Positionseffekt‘ zurückgeführt (Allen et al., 2000; Fagard und Vaucheret, 2000; Maqbool und Christou, 1999; Matzke et al., 1989; Wakimoto, 1998; Wallrath, 1998). Dabei wird die Expression von der Chromatinstruktur des Integrationsortes positiv oder negativ beeinflusst. Andere Autoren gaben dagegen an, dass die genomische Position keinen signifikanten Einfluss auf die T-DNA Expression hat (Gendloff et al., 1990; Hobbs et al., 1990; Nagaya et al., 2005). Hobbs et al. (1990) untersuchten vier unabhängige transgene Tabaklinien mit einer Einfachintegration der T-DNA, die an unterschiedlichen Positionen auf dem Chromosom lokalisiert waren. Alle Linien zeigten die gleiche Transgenexpression. Die flankierenden genomischen Bereiche der T-DNA wurden in dieser Analyse jedoch nicht identifiziert, weshalb nicht klar ist, ob die T-DNA in euchromatische oder heterochromatische Regionen integriert wurde. Bei den Analysen von Nagaya et al. (2005) war bei keiner der untersuchten Linien die T-DNA in heterochromatische Bereiche, wie Telomere oder Centromere integriert. Die Schlussfolgerung, dass die genomische Position keinen Einfluss auf die Genexpression hat, gilt daher nicht generell.

Bei den Einzelpflanzen innerhalb der Linien wurden ebenfalls unterschiedliche NPTII-Proteingehalte detektiert. Diese können nicht mit einem Positionseffekt erklärt werden, da die Pflanzen einer Linie genetisch identisch sind. Bei einem Drittel der untersuchten Linien war die Variation der Genexpression der Einzelpflanzen besonders auffällig. Es wurden Unterschiede bis 18pg NPTII-Protein pro mg Blattmaterial detektiert. Weiterhin wurden bei den Linien T211 und T363 unterschiedliche Proteinnengen in den Analysen im Jahr 2003 und 2004 detektiert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden acht

Einzelpflanzen der Linie T211 für eine genauere Bestimmung der Variation der *nptII*-Expression nochmals mittels ELISA-Test analysiert. Die Variabilität der ermittelten OD-Werte und des Proteingehaltes wurde dabei mittels ‚Duncan's multiple range‘ Test bestimmt. Beim Vergleich Proteingehalte für die einzelnen Proben wurden jedoch mehr signifikante Unterschiede gefunden als beim Vergleich der OD-Werte. Dieses Ergebnis lässt sich mit der asymptotischen Korrelation zwischen OD-Wert und Proteingehalt erklären. Eine geringe Erhöhung des OD-Wertes führt zu einer drastischen Änderung der berechneten Proteinmenge. Aufgrund dieser Tatsache erfolgte die Auswertung des zweiten ELISA-Tests für T211 anhand der OD-Werte.

Signifikante Unterschiede der *nptII*-Expression wurden zwischen den unveredelten Pflanzen der Linie T211 und zwischen verschiedenen Blattetagen einer Pflanze gefunden. Eine Erklärungsmöglichkeit für die Variation der *nptII*-Expression wäre, dass es sich bei der Linie T211 um chimäre Pflanzen handelt. In den verschiedenen Pflanzenbereichen wurde dabei das *nptII*-Gen unterschiedlich stark exprimiert. Wahrscheinlich lassen sich die Variationen des NPTII-Gehaltes auch auf Unterschiede des Entwicklungsstandes der Pflanze bzw. des untersuchten Blattes zurückführen. Dabei ist je nach Alter des Blattes die NPTII-Expression unterschiedlich stark.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde für einen Großteil der analysierten Linien eine stabile Integration und Expression der T-DNA nachgewiesen. Bei einzelnen Pflanzen von fünf der insgesamt 14 untersuchten Linien wurden Unregelmäßigkeiten in Form von Sequenzverlusten oder Variationen der Expression der T-DNA festgestellt. Ein Zusammenhang zwischen der hier vorgenommenen Veredelungen und der Integration und/oder Expression der übertragenen Gene konnte nicht gefunden werden. Vielmehr hat die Dauer der Kultivierung einen Einfluss auf die Merkmalsstabilität der integrierten Gene, so dass Laufe der Kultivierung wiederholte Analysen zur T-DNA-Integration und Expression notwendig sind.

5.2.3. Transport von Transgenprodukten innerhalb veredelter Apfelgehölze

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Proteintransport bei 22 veredelten Apfelgehölzen untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war es festzustellen, ob ein Transgenprodukt eines transgenen Veredelungspartners über die Veredelungsstelle hinweg transportiert wird. Beim Einsatz gentechnisch veränderter Apfelpflanzen kann diese Fragestellung von großem Interesse sein. Beispielsweise könnte ein Transport über die Veredelungsstelle beim Einsatz einer transgenen Unterlage von Vorteil sein. Dabei würde das Transgenprodukt in das Edelreis transportiert werden und dort wirken ohne,

dass sich das transgene Erbgut im Edelreis befindet. Ein Auskreuzungsrisiko des transgenen Erbguts über das Edelreis würde damit nicht bestehen.

Eine Voraussetzung für den Transport von Proteinen zwischen zwei Veredelungspartnern ist die Neubildung der Siebröhren nach der Pfropfung. Die Existenz einer solchen Neubildung wurde bereits in mehreren Untersuchungen nachgewiesen (Kollmann und Glockmann, 1991; Kollmann und Schulz, 1993; Rachow-Brandt und Kollmann, 1992; Tiedemann, 1989). Durch die Siebröhren wird der Transport von Assimilaten und Proteinen über größere Distanzen realisiert. Ob ein Austausch von Proteinen zwischen Unterlage und Edelreis jedoch wirklich stattfindet, ist bislang kaum untersucht worden. Eine Analyse zum Proteintransport zwischen Veredelungen wurde mit *Cucurbita maxima* bzw. *C. ficifolia*-Pfropfungen durchgeführt. Dabei konnten *Cucurbita*-spezifische Phloem-Proteine im *Cucumis*-Edelreis nachgewiesen werden (Golecki et al., 1998; Tiedemann und Carstens-Behrens, 1994). In Untersuchungen an der parasitischen Blütenpflanze *Cuscuta reflexa* und *Nicotiana tabacum* wurde ebenfalls ein Transport von Makromolekülen über eine ‚natürliche‘ Veredelungsstelle beobachtet (Haupt et al., 2001). Aber auch nicht spezifische Phloem-Proteine werden innerhalb von Pfropfungen transportiert. Bei Veredelungen mit Tabak wurde das Reporterprotein GFP auch im Wildtyp von *Nicotiana tabacum* detektiert, der auf transgene *Nicotiana*-Pflanzen gepfropft worden war (Imlau et al., 1999). Mit einem Transport von Proteinen über die Veredelungsstelle hinweg ist also grundsätzlich zu rechnen. Dieser ist auch beim Apfel sehr wahrscheinlich.

In dieser Arbeit wurden die Proteine der Transgene *gus* und *nptII* analysiert. Die Detektion des *gus*- bzw. *nptII*-Genprodukts war bei der jeweiligen transgenen Veredelungskomponente möglich. Bei einzelnen Blattstücken der transgenen Veredelungskomponente der Pflanzen T320V1, T355V3 und T355V4 wurde eine verringerte *gus*-Expression detektiert. Dieses Ergebnis ist möglicherweise auf chimäre Pflanzenzellen zurückzuführen (vgl. Kapitel 5.2.1.). Trotz dieser geringeren Expression des *gus*-Gens ist ein Transport des Transgenprodukts denkbar. Allerdings wurde bei keiner der untersuchten Veredelungen das jeweilige Transgenprotein in der nicht transgenen Veredelungskomponente detektiert. Es ist daher davon auszugehen, dass ein Transport der Transgenproteine über die Veredelungsstelle nicht stattgefunden hat. Grundsätzlich ist ein Transport dieser Transgenprodukte innerhalb der veredelten Apfelpflanze möglich. Aufgrund seiner Größe würde das 30kDa große NPTII-Protein bzw. 70kDa große GUS-Protein mit großer Wahrscheinlichkeit durch das Phloem über die Veredelungsstelle transportiert werden.

Die Beladung des Phloems mit dem NPTII- bzw. GUS-Protein auf symplastischem Weg ist eher unwahrscheinlich. Eine symplastische Beladung erfolgt durch die Plasmodesmen und beschränkt sich normalerweise auf 0,75-1,0kDa große Proteine (Waigmann et al., 1997). Damit ist sowohl das NPTII-Protein mit 30kDa als auch das GUS-Protein mit 70kDa zu groß, um durch die Plasmodesmen transportiert zu werden. Neben den Plasmodesmen gibt es spezialisierte untergeordnete Plasmodesmen, sogenannte Poren-Plasmodesmen-Einheiten (pore plasmodesmal units; PPU), diese erlauben auch einen Transport von größeren Molekülen bis 100kDa (Stadler et al., 2005; Van Bel, 2003). Allerdings ist für den Transport des jeweiligen Moleküls ein Erkennungssignal notwendig (zusammengefasst in Ghoshroy et al., 1997). Da es sich beim NPTII bzw. GUS-Protein um kein pflanzeigenes Protein handelt, scheint es unwahrscheinlich, dass diese Proteine über einen selektiven Transportweg, wie z.B. Plasmodesmen oder PPU befördert werden (Imlau et al., 1999; Lough und Lucas, 2006).

Ein Transport des NPTII- bzw. GUS-Proteins über den Apoplasten scheint wahrscheinlicher. Dafür müssen die Proteine zunächst von der Zelle in den Apoplasten befördert werden. Von dort aus erfolgt die Beladung des Phloems (Ghoshroy et al., 1997). Voraussetzung für den Transport eines Transgenprodukts aus der Zelle in den Apoplasten ist das Vorhandensein eines Signal-Peptids (Ko et al., 2000). Dieses befindet sich in der Regel zwischen Promotor und Gen. Bei den hier untersuchten Apfelveredelungen wurde für die Regulation des *nptII*-Gens der Nopalin-Synthase (*nos*) Promotor aus *Agrobacterium tumefaciens* eingesetzt. Das *gus*-Gen wurde von dem 35S-Promotor des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) reguliert (vgl. Kapitel 3.2.). Bei beiden Konstrukten fehlt ein Signal-Peptid, das für den Transport des Proteins in den Apoplasten verantwortlich ist. Damit ist zu erklären, dass weder das NPTII-Protein noch das GUS-Protein über die Veredelungsstelle transportiert wurde.

Für die Klärung des Transports von Transgenprodukten bei veredelten Apfelgehölzen sind weitere Untersuchungen notwendig. Dabei könnten Apfelgehölze, die mit anderen Konstrukten transformiert wurden, verwendet werden. Ein Beispiel dafür wäre der Einsatz von Konstrukten mit einem Thioredoxin h-Promotor. Dieser Promotor ist spezifisch für die Geleitzellen der Siebröhren und wurde von Fukuda et al. (2005) zur Untersuchung der Verteilung der Transgenprodukte GUS und GFP im Phloem eingesetzt.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es die Umweltverträglichkeit von transgenen Apfelpflanzen für eine potentielle Freisetzung zu prüfen. Die dabei durchgeführten Untersuchungen befassen sich zum einen mit der Abschätzung der Häufigkeit eines vertikalen Gentransfers von genetisch veränderten auf nicht veränderte Apfelpflanzen. Zum anderen wurden Analysen zur Stabilität der Integration und Expression von Transgenen in vegetativ vermehrten Apfellinien nach der Phase der In-vitro-Kultur sowie in veredelten transgenen/ nicht transgenen Sorten-Unterlagen-Kombinationen durchgeführt. Weiterhin wurde der Transport von Transgenprodukten innerhalb veredelter Apfelgehölze untersucht.

Zur Abschätzung der Häufigkeit eines vertikalen Gentransfers sollte die Frequenz der Auskreuzung einer Apfelsorte auf umliegende Populationen in Abhängigkeit von der räumlichen Entfernung mit Hilfe von morphologischen und molekularen Markern geschätzt werden. Für diese Untersuchungen wurden aus 38 verschiedenen Sortengenotypen 60 Pollenfängerpflanzen in einer bestehenden Versuchsfeldfläche ausgewählt. Als Pollenspendergenotyp fungierten 15 Pflanzen eines Hybriden der Apfelmildart *Malus sieversii* var. *sieversii* f. *niedzwetzkyana* Dieck., mit der Bezeichnung ‚TNR 31-35‘. Dieser Hybrid besitzt ein dominantes Gen, das verantwortlich für eine Rotfärbung der Laubblätter und anderer Organe ist. Durch Kreuzungsversuche mit ‚TNR 31-35‘ als Pollenspendersorte und den ausgewählten Pollenfängersorten und anschließender phänotypischer und genotypischer Bonitur der Sämlinge mithilfe von SSR-Markern konnte die dominante Vererbung des Rotmarkergens bestätigt werden. Zur Abschätzung der Pollentransportrate wurden in den Jahren 2003 und 2004 insgesamt 11058 Sämlinge aus freier Abblüte gewonnen und phänotypisch überprüft. Anhand der Häufigkeit des Auftretens rotlaubiger Sämlinge wurde dann die Pollentransportrate in verschiedenen Distanzen zu den Pollenspenderbäumen bestimmt. Die höchste Frequenz der Pollenübertragung war dabei in einer Entfernung von 5-10m zu beobachten. Mit zunehmender Entfernung vom Pollenspender nahm die Anzahl der roten Nachkommen ab. Dabei war die Abnahme jedoch nicht proportional zur Entfernung. Weiterhin lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass der Bienenflug und damit der Pollentransport durch den Standort des Bienenwagens und die Himmelsrichtung beeinflusst werden.

Die Untersuchungen zur Stabilität von Transgenen erfolgten an 60 transgenen Apfelpflanzen aus 14 unabhängigen T-Linien. Diese T-Linien waren mit vier unterschiedlichen Genkonstrukten transformiert worden, um die Resistenz gegenüber

bakteriellen Krankheitserregern zu erhöhen. Alle Linien wurden nach ihrer Regeneration positiv auf die Integration und Expression der übertragenen Gene getestet und im Anschluss ins Gewächshaus überführt. Zwei bis vier Jahre später wurden ausgewählte Ex-vitro Pflanzen auf eine nicht transgene Unterlage veredelt oder die Veredelung erfolgte als transgene Unterlage mit einem nicht transgenen Edelreis. Anschließend wurde die Stabilität der T-DNA Integration mittels PCR und Southern-Blot-Analyse untersucht. Die Analyse der Expression der übertragenen Gene erfolgte mittels RT-PCR und ELISA-Test.

Elf der untersuchten Linien hatten das Ziel- und Markergen stabil integriert. Bei fünf Pflanzen der Linie T267 konnte die T-DNA nicht mehr nachgewiesen werden. Der Grund dafür könnte eine Vermehrung von chimärem Pflanzenmaterial während der In-vitro-Kultur sein. Bei den Pflanzen der Linie T211 und einer Pflanze der Linie T136 war die Amplifikation des Zielgens mittels PCR nicht mehr möglich. Da das Zielgen mittels Southern-Blot-Analyse jedoch detektiert werden konnte, deutet dieses Ergebnis auf eine Umstrukturierung innerhalb der Zielgensequenz hin. Wahrscheinlich ist diese Umstrukturierung auf die Primerbereiche der Zielgensequenz beschränkt.

Mit Hilfe der Southern-Blot-Analyse wurde bei zwei Linien eine Einfachintegration der T-DNA detektiert. Die restlichen zwölf Linien zeigten Mehrfachintegrationen mit bis zu vier T-DNA-Kopien. Bei drei Linien wurden Unterschiede in der Kopienanzahl von Ziel- und Markergen festgestellt. Zwei Linien zeigten bei einzelnen Pflanzen Unterschiede in der Größe der detektierten Fragmente. Die Variationen in der Kopienanzahl und der Größe der T-DNA können auf eine Umstrukturierung der T-DNA während der In-vitro- oder Ex-vitro-Kultur hinweisen. Möglicherweise sind diese Unterschiede auch auf eine Entmischung chimärer Gewebe zurückzuführen.

Bei sämtlichen Pflanzen mit stabiler Integration der T-DNA war die Transkription von Zielgen und Markergen dauerhaft nachweisbar. Eine Ausnahme ist die Linie T363. Bei den Pflanzen dieser Linie konnte zwar eine stabile Expression des Zielgens nachgewiesen werden, jedoch wurden für das *nptII*-Markergen mittels RT-PCR nur schwache Banden detektiert. Der Rückgang der *nptII*-Markergenexpression kann in diesem Fall mit einer Methylierung des *nos*-Promotors erklärt werden.

Bei allen Pflanzen mit stabiler Transkription des *nptII*-Markergens konnte auch das NPTII-Protein mittels ELISA-Test nachgewiesen werden. Dabei wurden zum Teil große Unterschiede in den NPTII-Gehalten innerhalb einzelner Linien festgestellt. Weiterführende Analysen an Pflanzen der Linie T211 zeigten, dass der NPTII-Gehalt innerhalb einer Pflanze in Abhängigkeit der beprobten Blättagen variiert. Die unterschiedliche Expression des *nptII*-Gens ist entweder auf chimäre Pflanzen von

T211 oder auf einen Zusammenhang zwischen physiologischem Blattalter und NPTII-Proteingehalt zurückzuführen.

Zusammenfassend konnte bei den hier durchgeführten Untersuchungen kein Zusammenhang zwischen einer Veredelung und der Integration und/oder Expression der übertragenen Gene gefunden werden. Die Ergebnisse zeigen, dass bei transgenen Pflanzen im Laufe der Kultivierung wiederholte Analysen zur T-DNA-Integration und Expression notwendig sind.

Die Analysen zum Transport von Transgenprodukten wurden an 22 veredelten Apfelgehölzen aus acht Linien durchgeführt. Diese Linien wurden sowohl als transgenes Edelreis als auch als transgene Unterlage veredelt. Anschließend wurden beide Veredelungskomponenten auf das Vorhandensein des Transgenprodukts (NPTII- bzw. GUS-Protein) untersucht. Die Transgenprodukte wurden dabei nur im transgenen Veredlungsteil detektiert. Das Ausbleiben eines Transportes der Transgenproteine ist vor allem in der cytosolischen Expression beider Gene zu sehen. Bei den verwendeten Konstrukten fehlt ein Signal-Peptid, welches den Transport des Genproduktes aus der Zelle hinaus steuert. Bei einer Expression von Transgenen unter dem *nos*- bzw. CaMV35S-Promotor ohne Signalpeptid konnte jedenfalls kein Transport des Transgenproduktes über die Veredelungsstelle nachgewiesen werden.

Die vorliegenden Untersuchungen zur Umweltverträglichkeit von gentechnisch veränderten Apfelpflanzen zeigen, dass bei einer Freisetzung von transgenem Apfel das Risiko einer Auskreuzung durch die Einhaltung von Sicherheitsabständen zu benachbarten Obstanlagen verringert werden kann. Eine Aussage, ab welcher Entfernung kein Auskreuzungsereignis mehr stattfindet, kann anhand der hier durchgeführten Untersuchungen jedoch nicht getroffen werden. Die Analysen zur Stabilität von Transgenen haben gezeigt, dass die T-DNA bei einem Großteil der untersuchten Apfelpflanzen über Jahre stabil integriert war und nach wie vor exprimiert wurde. Ein möglicher Verlust des transgenen Merkmals kann mit Hilfe der vorhandenen molekularen Techniken in den meisten Fällen nachgewiesen werden. Damit ist vor einer Freisetzung die Selektion instabiler Pflanzen möglich.

Eine Verbesserung der Umweltverträglichkeit hinsichtlich des Auskreuzungsrisikos durch die Kombination einer transgenen und nicht transgenen Veredelungskomponente konnte für die hier untersuchten Apfelpflanzen nicht nachgewiesen werden.

6. Summary

The aim of this work was the risk assessment of genetically engineered apple trees in the case of a potential release. One part of the investigations concerns the relative frequency of gene flow from transgenic to non-transgenic apple cultivars in the environment. Another objective deals with the stability of integration and long-term expression of transgenes in vegetatively propagated *in vitro* plants and after grafting of *ex vitro* plants in different scion/rootstock combinations. Furthermore the transport of transgene products in grafted *ex vitro* plants was analysed.

To determine the vertical gene transfer by pollen from one apple cultivar into surrounding populations the pollen transfer rate in dependence of the distance of a pollen dispenser plant was analysed by using molecular and morphological markers. Within an existing apple orchard, 60 apple trees were selected as pollen receptor plants, representing 38 apple cultivars. 15 plants of a hybride of *Malus sieversii* var. *sieversii* f. *niedzwetzkyana* Dieck. named ‚TNR 31-35‘ had been selected as pollen dispenser.

This species carries a dominant gene, which is responsible for red pigmentation of the leaves and other parts of the plant. Test-crosses between ‚TNR 31-35‘ and the pollen receptor cultivars with subsequent phenotypic and molecular rating of the seedlings by SSR-analyses confirmed the dominant inheritance of the red marker gene.

For the assessment of the pollen transport rate, in the years 2003 and 2004, a total of 11058 open pollinated seedlings were phenotypically scored for leaf pigmentation. On the basis of the number of red-coloured seedlings the gene flow frequency was determined for different distances to the dispenser plants. The highest frequency of red-coloured seedlings was present within a radius of 5 to 10m. With increasing distances to the pollen dispenser plants less pigmented seedlings were found. However, the diminishment was not proportional to the distance. Furthermore the results indicated that the pollen transport frequencies appear to be influenced by the bee flight, the position of the bee hive and the orientation.

The investigations on the stability of transgenes were performed on 60 transgenic apple plants, propagated from 14 independent *in vitro* lines. These had been genetically modified with four different gene constructs to increase bacterial resistance. All lines have been positively tested for their integration and expression of the T-DNA after regeneration and were transferred to the green house. Two to four years after regeneration, selected *ex vitro* plants were grafted onto a non-transgenic rootstock or were used as rootstocks for a grafted non-transgenic scion. Following on, the

greenhouse plants were analyzed for transgene integration by PCR and Southern blot analysis. The transgene expression was investigated by RT-PCR and ELISA assay.

Eleven of the investigated lines showed a stable integration of the T-DNA. In five plants of the line T267 the T-DNA was not longer detectable. The loss of the transgenic character of these plants could be caused by propagation of chimera during the in vitro culture. In all plants of line T211 and one plant of line T136 the gene of interest could not be detected by PCR. However the detection of the gene of interest by Southern-blot analysis was possible. This might be a result of rearrangements of the T-DNA.

After southern-blot analysis only two lines had a single copy integration of the T-DNA. For the remaining 12 lines multiple copy of the T-DNA with up to four integration sites were detected. In three lines the copy number between gene of interest and marker gene differed. Size differences of the T-DNA fragment were detected in plants of two lines. The variation in T-DNA size and number of integrations could also be founded in a rearrangement of the T-DNA during the in vitro or ex vitro culture. Possibly, these variations were caused by segregation of chimeric tissue.

For all plants with stable T-DNA integrations also a stable transcription of the transferred genes was observed, except for the plants of line T363. Plants of this line showed a normal transcription of the gene of interest, but for the *nptII* marker gene only weak bands were amplified during RT-PCR. The reduced expression of the *nptII* marker gene is probably a result of methylation of the *nos* promoter site.

For all plants with a stable transcription of the *nptII* marker gene, the NPTII protein was also detected by ELISA assay. But for several plants a great variation in the NPTII amount within one line was determined. Continulative analyses of plants of the line T211 showed that the NPTII amount varied within one plant depending on the investigated leaf stage. This result indicated either chimeric plants of T211 or a correlation between the physiological leaf age and the NPTII amount.

In conclusion in this work no correlation between grafting and the stability of transgenes was found within the investigated material. The results indicate that in the course of cultivation of transgene apple plants repeated investigations on the stability of T-DNA integration and expression are necessary.

The analysis on the transport of transgene products was performed for 22 grafted apple plants from eight different lines. These lines were both grafted as transgenic scions and as rootstock in combination with either non transgenic scions or rootstocks. Following on the presence of the transgene product (NPTII- and GUS-protein, respectively) was analysed for both transgenic and non-transgenic parts of the plants.

The presence of the transgene product was only observed in the transgenic part of the graftings. The absence of a transport of transgenic protein is mainly founded in the cytosolic expression of both genes. The used gene constructs had no signal peptide which accomplishes the transport of gene products out of the cell. In this case the transgene expression is controlled by *nos*- or CaMV35S-promoter without a signal peptide, and no transport of transgene products in grafted apple trees was detectable.

The present study on the environmental compatibility of genetically engineered apple plants shows, that the risk of a vertical gene transfer from transgenic apple trees could be decreased by the compliance of safety distances to neighbouring orchards. However, on the basis of this study it is not possible to make a statement in which distance no pollen transport takes place. The analyses on the stability of T-DNA showed that the main part of the investigated apple plants had stably integrated and expressed T-DNA over years. In most cases, a potential loss of the transgenic trait can be detected with the available molecular techniques. By this a selection of stable transgenic plants is possible before a release.

An improvement of the environmental compatibility of transgenic plants concerning the vertical gene transfer by the combination of transgenic and non transgenic grafting components was not verifiable for the analysed plants.

7. Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. (2002): Molecular biology of the cell. 4 Ed. New York: GARLAND SCIENCE: 1463 Seiten
- Allen, G.C., Spiker, S. und Thompson, W.F. (2000): Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. PLANT MOL BIOL. 43: 361-376
- Ammann, K., Jacot, Y. & Rufener Al Mazayad, P. (1996): Field release of transgenic crop in Switzerland, an ecological risk assessment. In: Schulte, E. und Käppeli, O. (Hrsg.), Gentechnisch veränderte krankheits- und schädlingsresistente Nutzpflanzen. SCHWERPUNKTPROGRAMM BIOTECHNOLOGIE DES SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS, BERN. 101 – 158
- Aoki, K., Kragler, F. Xoconostle-Cázares, B. und Lucas, W.J. (2002): A subclass of plant heat shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through plasmodesmata. PROC NATL ACAD SCI USA. 99: 16342-16347
- Aoki, K., Suzui, N., Fujimaki, S., Dohmae, N., Yonekura-Sakakibara, K., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yamaya, T. und Sakakibara, H. (2005): Destination-selective long-distance movement of phloem proteins. PLANT CELL. 17 (6): 1801-1814
- Arriola, P.E. und Ellstrand, N.C. (1996): Crop-to-weed gene flow in the genus *Sorghum* (*Poaceae*): Spontaneous interspecific hybridization between johnsongrass, *Sorghum halepense*, and crop *sorghum*, *S.-bicolor*. AM J BOT . 83: 1153-1159
- Arriola, P.E. und Ellstrand, N.C. (1997): Fitness of interspecific hybrids in the genus *Sorghum*: Persistence of crop genes in wild populations. ECOL APPL. 7: 512-518
- Auckerman, M.J. und Sakai, H. (2003): Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. PLANT CELL. 15: 2730-3741
- Banerjee, A.K., Chatterjee, M., Yu, Y., Suh, S.-G., Miller, W.A. und Hannapel, D.J. (2006): Dynamics of a mobile RNA of potato involved in a long-distance signalling pathway. PLANT CELL. 18: 3443–3457
- Bartsch, D., Cuguen, J., Biancardi, E. und Sweet, J. (2003): Environmental implications of gene flow from sugar beet to wild beet-current status and future research needs. ENVIRON BIOSAFETY RES. 2: 105-115
- Bartsch, D., Sühkopp, H. und Sühkopp, U. (1993): Introduction of plants with special regard to cultigens running wild. In: TRANSGENIC ORGANISMS: 135-151
- Baulcombe, D.C. (2004): RNA silencing in plants. NATURE. 431: 356-363
- Bevan, M. (1984): Binary *Agrobacterium* Vectors for plant transformation. NUCLEIC ACIDS RES. 12: 8711-8721
- Birch, R.G. (1997): Plant transformation: Problems and strategies for practical application. ANN REV PLANT PHYSIOL. 48: 297-326
- Blancas, L., Arias, D.M. und Ellstrand, N.C. (2002): Patterns of genetic diversity in sympatric and allopatric populations of maize and its wild relative teosinte in Mexico: Evidence for hybridization. GENE FLOW WORKSHOP. 31-38
- Blasse, W. (1982): Blüten und Früchten beim Obst. VEB DT LANDWIRTSCHAFTSVERLAG, BERLIN

- Boyko, A., Kathiria, P., Zemp, F.J., Yao, Y.L., Pogribny, I. und Kovalchuk, I., (2007): Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants (Virus-induced plant genome instability). NUCLEIC ACIDS RES. 35 (5): 1714-1725
- Broothaerts, W. (2003): New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles. THEOR APPL GENET. 106: 703-714
- Butaye, K.M.J., Cammue, B.P.A., Delaure, S.L. und De Bolle, M.F.C. (2005): Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. MOL BREEDING. 16 (1): 79-91
- Caboni, E., Lauri, P. und D'Angeli, S. (2000): In vitro plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. PLANT CELL REP. 19: 775-760
- Cao, J. und Earle, E.D. (2003): Transgene expression in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) clones propagated in vitro via leaf explants. PLANT CELL REP. 21: 789-796
- Chakraborty, K. und Devakumar, C. (2005): Quantitative structure-activity relationship analysis as a tool to evaluate the mode of action of chemical hybridizing agents for wheat (*Triticum aestivum* L.). J AGRIC FOOD CHEM. 53 (9): 3468-75
- Chan, S. W., Henderson, I. R. und Jacobsen, S. E. (2005): Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. NAT REV GENET. 6: 351-360
- Chen, X. (2004): A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development. SCIENCE. 303: 2022-2025
- Coart, E., Van Glabeke, S., De Loose, M., Larsen, A.S. und Roldan-Ruiz, I. (2006): Chloroplast diversity in the genus *Malus*: new insights into the relationship between the European wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) and the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.). MOL ECOL. 15 (8): 2171-2182
- Coart, E., Vekemans, X., Smulders, M.J.M., Wagner, I., Van Huylenbroeck, J., Van Bockstaele, E. und Roldan-Ruiz, I. (2003): Genetic variation in the endangered wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) in Belgium as revealed by amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. MOL ECOL. 12 (4): 845-857
- Conner, A.J. (1994): Analysis of containment and food safety issues associated with the release of transgenic potatoes. The molecular and cellular biology of the potato: 245-264. CAB. INTERNATIONAL, WALLINGFORD, UK.
- Conner, A.J., Mlynarova, L., Stiekema, W.J. und Nap, J.P. (1998): Meiotic stability of transgene expression is unaffected by flanking matrix-associated regions. MOL BREEDING. 4: 47-58
- Daniell, H. (2002): Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. NAT BIOTECHNOL. 20 (6): 581-586
- Datla, R.S.S., Faouzi Bakkaoui, Hammerlindl, J. K., Pilate, G., Dunstan, D. I. und Crosby, W. L. (1993): Improved high-level constitutive foreign gene expression in plants using an AMV RNA4 untranslated leader sequence. PLANT SCI. 94: 139-149

- De Bolle, M.F.C., Butaye, K.M.J., Coucke, W.J.W., Goderis, I.J.W.M., Wouters, P.F.J., van Boxel, N., Broekaert, W.F. und Cammue, B.P.A. (2003) Analysis of the influence of promoter elements and a matrix attachment region on the inter-individual variation of transgene expression in populations of *Arabidopsis thaliana*. PLANT SCI. 165 : 169-179
- De Nettancourt, D. (2001): Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. SPRINGER VERLAG, BERLIN, HEIDELBERG, NEW YORK.
- Depicker, A., Sanders, M. und Meyer, P.T. (2005): Transgene silencing. In "Plant Epigenetics" ed. Meyer, P. BLACKWELL, OXFORD: 1-32
- Derolles, S.C. und Gardner, R.C. (1988): Expression and inheritance of kanamycin resistance in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. PLANT MOL BIOL. 11: 355-364
- Derrick, P.M., Barker, H. und Oparka, K.J. (1990): Effect of virus infection on symplastic transport of fluorescent tracers in *Nicotiana clevelandii* leaf epidermis. PLANTA 181: 555-559
- Destefano-Beltran, L.J.C. (1991): The introduction into tobacco plants of genes which encodes some of the natural components of the humoral immune response of *Hyalophora cecropia*. PH.D. DISSERTATION. LOUISIANA STATE UNIVERSITY, BATON ROUGE, L.A.
- De Souza, A.J., Mendes, B.M.J. und Mourao, F.D.A (2007): Gene silencing: Concepts, applications, and perspectives in woody plants. SCIENTIA AGRICOLA. 64 (6): 645-656
- Dietzsch, A. (1982): Der Einfluss einiger Faktoren auf die Intensität des Bestäubungs- und Befruchtungsprozesses und ihre Wirkung auf die Fruchtbarkeit und äußere Merkmale in Apfelanlagen des Anbaugesbietes Halle. DISSERTATION, INSTITUT FÜR OBSTFORSCHUNG DRESDEN-PILLNITZ.
- Dominguez, A., Cervera, M., Perez, R.M., Romero, J., Fagoaga, C., Cubero, J., Lopez, M.M., Juarez, J.A., Navarro, L. und Pena L. (2004): Characterisation of regenerates obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. MOL BREED. 14: 171-183
- Doney, D.L., Whitney, E.D., Terry, J., Frese, L. und Fitzgerald, P. (1990): The distribution and dispersal of *Beta vulgaris* L. ssp. *maritima* germplasm in England, Wales and Ireland. SUGAR BEETS RESEARCH. 27: 29-37
- Dougherty, W.G. und Parks, T.D. (1995): Transgenes and gene suppression - Telling us something new. CURR OPIN CELL BIOL. 7: 399-405
- Driesel, A.J. und Danneberg, G. (1996): Stand der Sicherheitsforschung zur Freisetzung transgener Organismen- Auswertung internationaler und nationaler Erkenntnisse. FORSCHUNGSBERICHT IM AUFTRAG DES UMWELT-BUNDESAMTES, TEXTE 43/96, BERLIN.
- Durka, W. (2002): Schriftenreihe für Vegetationskunde. BUNDESAMT FÜR NATURSCHUTZ. 2002: 133-175
- Dzhangaliev, A.D., Salova, T.N. und Turekhanova, P.M. (2001): The wild fruit and nut plants of Kazakhstan. HORT REV. 29: 305-371
- Eastham, K. und Sweet, J. (2002): Genetically modified organisms (GMOs): the significance of gene flow through pollen transfer. ENVIRON ISSUE REP. 28: 75p

- El Ouakfaoui, S. und Miki, B. (2005): The stability of the *Arabidopsis* transcriptome in transgenic plants expressing the marker genes *npftII* and *uidA*. PLANT J. 41: 791-800
- Ellstrand, N.C. (1992): Gene flow by pollen - Implications for plant conservation genetics. OIKOS. 63: 77-86
- Ellstrand, N.C. und Hoffman, C.A. (1990): Hybridization as an avenue of escape for engineered genes - Strategies for risk reduction. BIOSCIENCE. 40: 438-442
- Elmayan, T. und Vaucheret, H. (1996): Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. PLANT J. 9: 787-797
- Fagard, M. und Vaucheret, H. (2000): (Trans)gene silencing in plants: How many mechanisms? ANNU REV PLANT PHYS. 51: 167-194
- Feyissa, T., Welander, M. und Negash, L. (2007): Genetic stability, ex vitro rooting and gene expression studies in *Hagenia abyssinica*. BIOLOGIA PLANTARUM. 51 (1): 15-21
- Filiti, N. und Montalti, P. (1982): In vitro germination and tube growth of apple pollen as affected by cold storage. RIV.ORTOFLOROFRUTT. IT. 66: 361-368
- Finnegan, E.J. und Kovac, K.A. (2000): Plant DNA methyltransferases. PLANT MOL BIOL. 43: 189-201
- Fischer, C. (2001): Befruchtungsverhältnisse der Pillnitzer Apfelsorten. OBSTBAU. 26: 181-183
- Fischer, C. (2002): Blüh- und Befruchtungsverhalten beim Apfel. ERWERBS-OBSTBAU. 44: 33-39
- Fischer, M. (1995): Farbatlas Obstsorten. EUGEN ULMER VERLAG, STUTTGART.
- Flachowsky, H., Riedel, M. Reim, S. und Hanke, M-V. (2008): Evaluation of the uniformity and stability of T-DNA integration and gene expression in transgenic apple plants. ELECTRON J BIOTECHNOL. 11 (1)
- Fladung, M. (1999): Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). I. Flanking DNA sequences and T-DNA structure. MOL GEN GENET. 260: 574-581
- Fladung, M. und Hönicka, H. (2004): Erzeugung transgener steriler Zitterpappeln zur Verhinderung eines vertikalen Gentransfers in forstliche Ökosysteme. GESUNDE PFLANZEN 56: 195-200
- Forsbach, A., Schubert, D., Lechtenberg, B., Gils, M. und Schmidt R (2003): A comprehensive characterization of single-copy T-DNA insertions in the *Arabidopsis thaliana* genome. PLANT MOL BIOL. 52: 161-176
- Forte, A. V. und Ignatov, A. N. (2002): Phylogeny of the Malus (apple tree) species, inferred from the morphological traits and molecular DNA analysis. RUSSIAN J GENET 38: 1150-1160.
- Francis, K.E. und Spiker, S. (2005): Identification of *Arabidopsis thaliana* transformants without selection reveals a high occurrence of silenced T-DNA integrations. PLANT J. 41: 464-477
- Free, J.B. (1962): The Behaviour of Honeybees Visiting Field Beans (*Vicia faba*) J ANIM ECOL. 31: 497-502
- Free, J.B. (1966): The Foraging Areas of Honeybees in an Orchard of Standard Apple Trees. J APPL ECOL. 3: 261-268

- Free, J.B. und Spencer-Booth, Y. (1964): The foraging behaviour of honeybees in an orchard of dwarf apple trees. *J HORTIC SCI.* 39: 54–60
- Friedrich, G. (1993): Handbuch des Obstbaus. VERLAG EUGEN ULMER, STUTTGART.
- Frisch, D.A., Harrishaller, L.W., Yokubaitis, N.T., Thomas, T.L., Hardin, S.H. und Hall, T.C. (1995): Complete sequence of the binary vector Bin-19. *PLANT MOL BIOL.* 27: 405-409
- Fuchs, M. und Gonsalves, D. (2007): Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: Lessons from realistic field risk assessment Studies. *ANNU REV PHYTOPATHOL.* 45: 173-202
- Fukuda, A., Fujimaki, S., Mori, T., Suzui, N., Ishiyama, K., Hayakawa, T., Yamaya, T., Fujiwara, T., Yoneyama, T. und Hayashi H. (2005): Differential distribution of proteins expressed in companion cells in the sieve element-companion cell complex of rice plants. *PLANT CELL PHYSIOL.* 46 (11): 1779-1786
- Galun, E. (2005): RNA silencing in plants. *IN VITRO CELL DEV-PL.* 41: 113-123
- Gau, A.E., Koutb, M., Piotrowski, M. und Kloppstech, K. (2004): Accumulation of pathogenesis-related proteins in the apoplast of susceptible cultivar of apple (*Malus domestica* cv. Elstar) after infection by *Venturia inaequalis* and constitutive expression of PR genes in the resistant cultivar Remo. *EUR J PLANT PATHOL.* 110: 703-711
- Gebhard, F. und Smalla, K. (1998): Transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 by transgenic sugar beet DNA. *ENVIRONM MICROBIOL.* 64: 1550-1554
- Gedloff, G.H., Bowen, B. und Buchholz, W.G. (1990): Quantitation of chloramphenicol acetyl transferase in transgenic tobacco plants by ELISA and correlation with gene copy number. *PLANT MOL BIOL.* 14: 575-583
- Geibel, M., Dehmer, K.J. und Forsline, P.L. (2000): Biological diversity in *Malus sieversii* population from central asia. *ACTA HORT.* 538: 43-49
- Gerdemann-Knörk, M. und Tegender, M. (1997): Kompendium der für Freisetzung relevanten Pflanzen; hier *Brassicaceae*, *Beta vulgaris*, *Linum usitatissimum*. *TEXTE DES UMWELTBUNDESAMTES.* 38: 1-221
- Gheysen, G., Villarroel, R. und van Montagu (1991): Illegitimate recombination in plants: A model for T-DNA integration. *GENES DEV.* 5: 287-297
- Ghoshroy, S., Lartey, R., Sheng, J. und Citovsky, V. (1997): Transport of proteins and nucleic acids through plasmodesmata. *ANN REV PLANT PHYS.* 48: 27-50
- Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M. und Gessler, C. (1998): Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *THEOR APPL GENET.* 96: 1069-1076
- Godefroy-Colburn, T., Ravelonandro, M. und Pinck, L. (1985): Cap accessibility correlates with the initiation efficiency of alfalfa mosaic virus RNAs. *EUR J BIOCHEM.* 147 (3): 549–552.
- Godoy, J.A. und Jordano, P. (2001): Seed dispersal by animals: Exact identification of source trees with endocarp DNA microsatellites. *MOL ECOL.* 10: 2275-2283
- Goldwin, G.K. (1978): Improved fruit setting with plant growth hormones. *ACTA HORT.* 80: 115-121

- Golecki, B., Schulz, A., Carstens-Behrens, U. und Kollmann, R. (1998): Evidence for graft transmission of structural phloem proteins or their precursors in heterografts of *Cucurbitacea*. *PLANTA*. 206: 630-640
- Goulao, L. und Oliveira, C.M. (2001): Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* BORKH.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *EUPHYTICA*. 122: 81-89
- Gressel, J. und Al-Ahmad, H. (1999): Tandem constructs: Preventing the rise of superweeds. *TRENDS BIOTECHNOL.* 17:361-366
- Guilford, P., Prakash, S., Zhu, J.M., Rikkerink, E., Gardiner, S., Bassett, H. und Forster, R. (1997): Microsatellites in *Malus x domestica* (apple): Abundance, polymorphism and cultivar identification. *THEOR APPL GEN.* 94: 249-254
- Gura, T. (2000): A silence that speaks volumes. *NATURE*. 404: 804-808
- Hagemann, R. (1999): Allgemeine Genetik. SPEKTRUM AKADEMISCHER VERLAG. HEIDELBERG, BERLIN.
- Hamilton, A.J. und Baulcombe, D.C. (1999): A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *SCIENCE*. 286: 950-952
- Hamilton, C.M. (1997): A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA. *GENE*. 200: 107-116
- Hanelt, P. (2006): Mansfeld's Encyclopaedia of agricultural and horticultural crops. [1]
- Hanke, V. (2004): The long and tortuous path from the leaf piece to the genetically engineered apple tree. *ACTA HORT.* 663: 511-513
- Hanke, V., Hiller, I., Klotzsche, G., Winkler, K., Egerer, J., Richter, K., Norelli, J.F. und Aldwinckle, H.S. (2000): Transformation in apple for increased disease resistance. *ACTA HORT.* 538: 611-616
- Hänisch ten Cate, C.H., Loonen, A.E.H.M., Ottavani, M.P., Ennik, L., Van Eldick, G. und Siekema, W.J. (1991): Frequent and spontaneous deletion of ri T-DNA in *Agrobacterium rhizogenes* transformed potato roots and regenerated plants. *MOL GEN GENET.* 264: 82-88
- Hanna, W.W. und Burton, G.W. (1992): Genetics of red and purple plant colour in pearl millet. *J HERED.* 83: 386-388
- Harris, S. A., Robinson, J. P. und Juniper, B. E. (2002): Genetic clues to the origin of the apple. *TRENDS GENET.* 18 (8): 426-430
- Haupt, S., Oparka, K.J., Sauer, N. und Neumann, S. (2001): Macromolecular trafficking between *Nicotiana tabacum* and the holoparasite *Cuscuta reflexa*. *J EXP BOT.* 52: 173-177
- Haywood, V., Yu, T.-S., Huang, N.-C. und Lucas, W.J. (2005): Phloem long-distance trafficking of GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE RNA regulates leaf development. *PLANT J.* 42: 49-68
- Heidenreich, B. (1999): Analyse und Bewertung der Risikoforschung zur Freisetzung gentechnisch veränderter Mikroorganismen. DISSERTATION FB BIOLOGIE, UNIVERSITÄT HAMBURG, 1999
- Henderson, I.R. und Jacobsen, S.E. (2007): Epigenetic inheritance in plants. *NATURE*. 447 (7143): 418-424
- Hills, M.J., Hall, L., Arnison, P.G. und Good, A.G. (2007): Genetic use restriction technologies (GURTs): strategies to impede transgene movement. *TRENDS PLANT SCI.* 12 (4): 177-183

- Hobbs., S., Kpodar, P. und DeLong, M.O. (1990): The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *PLANT MOL BIOL.* 15: 851-864
- Höfer, M.: Der Kulturapfel - Eine 12.000-jährige Geschichte [online] <http://www.obstbau.org/content/service/wissenswertes/kulturapfel.php>
- Hoffmann, M. und Köhler, W. (1999): Modellierung von Genfluss und Verwilderung bei transgenen Zuckerrüben (*Beta vulgaris* convar. *altissima* DÖLL). BMBF, STATUSSEMINAR, BRAUNSCHWEIG: 101-110
- Hokanson, S.C., Szewc-McFadden, A.K., Lamboy, W.F. und McFerson, J.R. (1998): Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus x domestica* Borkh. core subset collection. *THEOR APPL GEN.* 97: 671-683
- Hönicka, H. und Fladung, M. (2003): Evaluation of strategies for avoiding vertical gene transfer. Proceedings international congress 'BIOFOR 02'-Sustainable Forestry, Wood products and Biotechnology; Victoria-Gasteiz, Spanien, NEIKER (Instituto Vasco de Investigacion y Desarrollo Agrario): 221-226
- Hönicka, H. und Fladung, M. (2006): Biosafety in *Populus* spp. And other forest trees: From non-native species to taxa derived from traditional breeding and genetic engineering. *TREES STRUCT FUNCT.* 20 (5): 259-266
- Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. und Hoekema, A. (1993): New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *TRANSGENIC RES.* 2: 208-218
- Hormaza, J.I. (2002): Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. *THEOR APP GEN.* 104: 321-328
- Howard-Till, R.A. und Yao, M.C. (2007): Tudor nuclease genes and programmed DNA rearrangements in *Tetrahymena thermophila*. *EUKARYOT CELL.* 6 (10): 1795-804.
- Hudson, L.C., Chamberlain, D. und Stewart, C.N.J. (2001): GFP-tagged pollen to monitor gene flow of transgenic plants. *MOL ECOL NOTES.* 1: 321-324
- Huss-Marp, J. (2000): Untersuchung zur relativen Luftfeuchte für die Allergenfreisetzung aus Pollen. DISSERTATION, TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN.
- Imlau, A., Truernit, E. und Sauer, N. (1999). Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *PLANT CELL.* 11: 309–322
- Ingram, J. (2000) Report on the separation distances required to ensure cross-pollination is below specified limits in non-seed crops of sugar beet, maize and oilseed rape. National Institute of Agricultural Botany, Cambridge UK. published by MINISTRY OF AGRICULTURE FISHERIES AND FOOD - UK (MAFF).
- Itaya, A., Ma, F., Qi, Y., Matsuda, Y., Zhu, Y., Liang, G. und Ding, B. (2002): Plasmodesma-mediated selective protein traffic between "symplasmically isolated" cells probed by a viral movement protein. *PLANT CELL.* 14: 2071–2083
- Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X.F. und Jacobsen, S.E. (2002): Control of CpNpG DNA methylation by the kryptonite histone H3 methyltransferase. *NATURE.* 416: 556-560

- James, D.J., Passey, A.J., Barbara, D.J. und Bevan, M. (1989): Genetic-transformation of Apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. PLANT CELL REP 7(8): 658-661
- Janssen, I., Geissler, S. und Müller, W. (1995): Analyse ökologischer Auswirkungen von land- und forstwirtschaftlichen Nutzpflanzen und eingeführten standortfremden Pflanzen. Bericht des Österreichischen Ökologischen Instituts, Wien
- Jiang, N. G. (1986): An preliminary study on the center of origin of genus *Malus* Miller. J SOUTHWEST AGRIC UNIV. 1: 94-96
- Jorgensen, R.A., Cluster, P.D., English, J.J., Que, Q.D. und Napoli, C.A. (1996): Chalcone synthase co-suppression phenotypes in petunia flowers: Comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. PLANT MOL BIOL. 31: 957-973
- Kehr, J. und Buhtz, A. (2008): Long distance transport and movement of RNA through the phloem. J EXP BOT. 59 (1): 85-92
- Keil, M., Sánchez-Serano, J.J. und Willmitzer, L. (1989): Both wound-inducible and tuber-specific expression are mediated by the promoter of a single member of the potato proteinase inhibitor II gene family. EMBO J. 8: 1323-1330
- Kim, M., Canio, W., Kessler, S. und Sinha, N. (2001): Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. SCIENCE 293: 287-289
- Kim, S. I., Veena und Gelvin S.B. (2007): Genome-wide analysis of Agrobacterium T-DNA integration sites in the *Arabidopsis* genome generated under non-selective conditions. PLANT J. 51 (5): 779-791
- Kim, S.R., Lee, J., Jun und S.H. (2003): Transgene structures in T-DNA inserted rice plants. PLANT MOL BIOL. 52: 761-773
- Kim, W.S. und Geider, K. (2000): Characterization of a viral EPS-depolymerase, a potential tool for control of fire blight. PHYTOPATHOLOGY. 90: 1263-1268
- Kim, W.S., Salm, H. und Geider, K. (2004): Expression of bacteriophage phi Ea1h lysozyme in *Escherichia coli* and its activity in growth inhibition of *Erwinia amylovora*. MICROBIOLOGY-SGM. 150: 2707-2714
- Kirkpatrick, K. J. und Wilson, H. D. (1988): Interspecific gene flow in *Cucurbita*: *C. texana* vs. *C. pepo*. AMER J BOT. 75: 519-527
- Klose, R. J. und Bird, A. P. (2006): Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. TRENDS BIOCHEM SCI. 31: 89-97
- Ko, K., Brown, S.K., Norelli, J., Düring, K. und Aldwinckle, H.S. (1997): Construction of plasmid binary vectors for enhanced fire blight resistance in apple. PHYTOPATHOLOGIE. 87: 53-53
- Ko, K., Norelli, J.L., Reynoird, J.P., Borejsza-Wysocka, E., Brown, S.K. und Aldwinckle, H.S. (2000): Effect of untranslated leader sequence of AMV RNA 4 and signal peptide of pathogenesis-related protein 1b on Attacin gene expression, and resistance to fire blight in transgenic apple. BIOTECHNOL LETT. 22: 373-381
- Koehlin, F. (2003): Fact Sheet: Koexistenz II: Praktische Aspekte. aus: Florianne Koehlin, Moratorium für kommerzielle Freisetzen von gentechnisch veränderten Organismen. Unmögliche Koexistenz, WoZ. SCHWEIZERISCHE ARBEITSGRUPPE GENTECHNOLOGIE SAG.

- Kollmann, R. und Glockmann, C. (1991): Studies on graft unions. III. On the mechanism of secondary formation of plasmodesmata at the graft interface. *PROTOPLASMA*. 165: 71-85
- Kollmann, R. und Schulz, A. (1993): Phloem regeneration. *PROG BOT*. 54: 63-78
- Koncz, C., Nemeth, K., Redei, G.P. und Schell, J. (1992): T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. *PLANT MOL BIOL*. 20: 963-976
- Koopman, W.J., Li, Y., Coart, E., van de Weg, W.E., Vosman, B., Roldan-Ruiz, I. und Smulders, M.J. (2007): Linked vs unlinked markers: multilocus microsatellite haplotype-sharing as a tool to estimate gene flow and introgression. *MOL ECOL*. 16 (2): 243-256
- Koorneef, M., Alonso-Blanco, C. und Vreugdenhil, D. (2004): Naturally Occurring Genetic Variation in *Arabidopsis thaliana*. *ANNU REV PLANT BIOL* 55: 141–172
- Kooter, J.M., Matzke, M.A. und Meyer, P. (1999): Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *TRENDS PLANT SCI*. 4: 340-347
- Kooter, J.M., Matzke, M.A. und Meyer, P. (1999): Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *TRENDS PLANT SCI*. 4: 340-347
- Kovalchuk, I., Kovalchuk, O. und Hohn, B. (2000): Genome-wide variation of the somatic mutation frequency in transgenic plants. *EMBO J*. 17: 4431–4438
- Kriete, G., Niehaus, K., Perlick, A.M., Pühler, A. und Broer, I. (1996): Male sterility in transgenic tobacco plants induced by tapetum- specific deacetylation of the externally applied nontoxic compound N-acetyl-L-phosphinothricin. *PLANT J*. 9: 809-818
- Kron, P., Husband, B.C. und Kevan, P.G. (2001a): Across- and along-row pollen dispersal in high-density apple orchards: Insights from allozyme markers. *J HORT SCI BIOTECHNOL*. 76: 286-294
- Kron, P., Husband, B.C. und Kevan, P.G. und Belaoussoff, S. (2001b): Factors affecting pollen dispersal in high-density apple orchards. *HORT SCI*. 101: 133-135
- Kuhlmann, M. und Nellen, W. (2004): RNA interference. *IN VITRO CELL DEV-PL*. 3: 142-150
- Kumar, S. und Fladung, M. (2002): Transgene integration in aspen: Structures of integration sites and mechanism of T-DNA integration. *PLANT J*. 31: 543-551
- Kutzelnigg, H. und Silbereisen, R. (1994): Maloideae. in: Hegi, G.: *ILLUSTRIERTE FLORA VON MITTELEUROPA – Band IV*.
- Lancaster, J.E. (1992): Regulation of skin color in apples. *CRIT REV PLANT SCI*. 10: 487-502
- Lapins, K.O. (1976): Inheritance of compact growth type in apple. *J AM SOC HORTIC SCI*. 101: 133-135
- Larkin, P.J. und Scowcroft, W.R. (1981): Somaclonal Variation - A Novel Source of Variability from Cell-Cultures for Plant Improvement. *THEOR APPL GENET*. 60 (4): 197-214
- Lechtenberg, B., Schubert, D., Forsbach, A., Gils, M. und Schmidt, R. (2003): Neither inverted repeat T-DNA configuration nor arrangements of tandemly repeated transgenes are sufficient to trigger transgene silencing. *PLANT J*. 34: 507-517

- Lejcek-Levanic, D., Bauer, N., Mihaljevic, S. und Jelaska, S. (2004): Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Curcubita pepo* L.. PLANT CELL REP. 23: 120-127
- Lespinasse, Y. und Godicheau, M. (1980): Création et description d'une plante haploïde de Pommier (*Malus pumila* Mill.). ANN AMÉLIORE PLANTE. 30: 39-44
- Lespinasse, Y., Godicheau, M. und Duron, M. (1983): Potential value and method of Producing haploids in the apple tree, *Malus pumila* (Mill.). ACTA HORT. 131: 223-229
- Li, Y. N. (1989): An investigation of the genetic center of *Malus pumila* and *Malus* Miller in the world. ACTA HORT SINICA. 16: 101-108
- Liebhart, R., Gianfranceschi, L., Koller, B., Ryder, C.D., Tarchini, R., Van de Weg, E. und Gessler, C. (2002): Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). MOL BREEDING. 10: 217-241
- Lindroth, A.M., Cao, X.F., Jackson, J.P., Zilberman, D., McCallum, C.M., Henikoff, S. und Jacobsen, S.E. (2001): Requirement of chromoethylase 3 for maintenance of CpXpG methylation. SCIENCE. 292: 2077-2080
- Lippmann, Z. und Martienssen, R. (2004): The role of RNA interference in heterochromatic silencing. NATURE. 431: 364-370
- Liu, Y., Song, X. Gorovsky, M.A. und Karrer, K.M. (2005): Elimination of foreign DNA during somatic differentiation in *Tetrahymena thermophila* shows position effect and is dosage dependents. EUKARYONT CELL. 4: 421-431
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Kreiger, M., Scott, M.P. Baltimore, D. und Darnell, J. (2005): Biologia celular e molecular. 5 ed. Porto Alegre: ARTMED. 1054 Seiten
- Lottspeich, F. und Zorbas, H., Hrsg. (1998): Bioanalytik. SPEKTRUM AKADEMISCHER VERLAG, HEIDELBERG
- Lough, T.J. und Lucas, W.J. (2006): Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. ANN REV PLANT BIOL. 57: 203-232
- Maghuly, F., Machado, A.D., Leopold, S., Khan, M.A., Katinger, H. und Laimer, M. (2007): Long-term stability of marker gene expression in *Prunus subhirtella*: A model fruit tree species. J BIOTECHNOL. 127 (2): 310-321
- Maliga, P. (2004): Plastid transformation in higher plants. ANN REV PLANT BIOL. 55: 289-313.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982): Molecular cloning: A laboratory manual. COLD SPRING HARBOUR LABORATORY PRESS NEW YORK.
- Maqbool, S.B. und Christou, P. (1999): Multiple traits of agronomic importance in transgenic indica rice plants: Analysis of transgene interaction patterns, expression levels and stability. MOL BREED. 5: 471-480
- Marenkova, T.V. und Deinko, E.V. (2006): A change in the stability of marker *nptII* and *uidA* gene expression in transgenic tobacco plants. RUSSIAN J GENET. 42 (5): 518-525
- Matzke, M.A., Aufsatz, W., Kanno, T., Mette, M.F. und Matzke, A.J. (2002): Homology-dependent gene silencing and host defense in plants. ADV GENET. 46: 235-275

- Matzke, M.A., Primig, M., Trnovsky, J. und Matzke, A.J.M. (1989): Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *EMBO J.* 8: 643-649
- Mayer, D.F., Johansen, C.A. und Lunden, J.D. (1989): Honey bee foraging behaviour on ornamental crabapple pollinizers and commercial apple. *HORT SCI.* 24: 510-512
- McCallum, C., Comai, L., Greene, E.A. und Henikoff, S. (2000): Targeted screening for induced mutations. *NAT BIOTECHNOL* 18: 455-457
- Meins, F. (2000): RNA degradation and models for post-transcriptional gene silencing. *PLANT MOL BIOL.* 43: 261-273
- Meister, G. und Tuschl, T. (2004): Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *NATURE.* 431: 343-349
- Melander, M., Kamnert, I., Happstadius, I., Liljeroth, E. und Bryngelsson, T. (2006): Stability of transgene integration and expression in subsequent generations of doubled haploid oilseed rape transformed with chitinase and beta-1,3-glucanase genes in a double-gene. *PLANT CELL REP.* 25 (9): 942-952
- Messeguer, J. (2001): Gene flow assessment in transgenic plants. *PLANT CELL.* 73: 201-212
- Mette, M., van der Winden, J., Matzke, M.A. und Matzke, A.J.M. (1999): Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters in trans. *EMBO J.* 18: 241-248
- Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A. und Matzke, A.J.M. (2000): Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* 19: 5194-5201
- Meza, T.J., Stangeland, B., Mercy, I.S., Skarn, M., Nymoen, D.A., Berg, A., Butenko, M.A., Hakelin, A-M., Haslekas, C., Meza-Zepeda, L.A. und Aalen, R.B. (2002): Analysis of single-copy *Arabidopsis* T-DNA-transformed lines showed that the presence of vector backbone sequences, short inverted repeats and DNA methylation is not sufficient or necessary for the induction of transgenes silencing. *NUCLEIC ACIDS RES.* 30: 4556-4566
- Mikkelsen, T.R., Andersen, B. und Jörgensen, R.B. (1996): The risk of crop transgene spread. *NATURE.* 380: 31-31
- Morel, J.B. und Vaucheret, H. (2000): Post-transcriptional gene silencing mutants. *PLANT MOL BIOL.* 43: 275-284
- Müller, W. (2002) GVO-freie Bewirtschaftungsgebiete - Konzeption und Analyse von Umsetzungsschritten. BUNDESMINISTERIUMS FÜR SOZIALE SICHERHEIT UND GENERATIONEN, FORSCHUNGSBERICHTE 8/02.
- Murashige, T. und Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *PHYSIOL PLANTARUM.* 15: 473-497
- Muskens, M.W.M., Vissers, A.P.A., Mol, J.N.M. und Kooter, J. M. (2000): Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing. *PLANT MOL BIOL.* 43: 243-260
- Nacry, P., Camilleri, C., Courtial, B., Caboche, M. und Bouchez, D. (1998): Major chromosomal rearrangements induced by T-DNA transformation in *Arabidopsis*. *GENET* 149: 641-650

- Nagaya, S., Kato, K., Ninomiya, Y., Horie, R., Sekine, M., Yoshida, K. und Shinmyo, A. (2005): Expression of randomly integrated single complete copy transgenes does not vary in *Arabidopsis thaliana*. PLANT CELL PHYSIOL. 46: 438-444
- Nakano, A., Suzuki, G., Yamamoto, M., Turnbull, K., Rahman, S. und Mukai, Y. (2005): Rearrangements of large-insert T-DNAs in transgenic rice. MOL GENET GENOMICS. 273 (2): 123-129
- Napoli, C., Lemieux, C. und Jorgensen, R. (1990): Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. PLANT CELL. 2: 279-289
- Nehra, N.S., Kartha, K.K., Stushnoff, C. und Giles, K.L. (1992): The influence of plant-growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus- culture regenerants of strawberry. PLANT CELL TISS ORG. 29: 257-268
- Neuroth, B. (1997): Kompendium der für die Freisetzung relevanten Pflanzen; hier *Solanaceae, Poaceae, Leguminosae*. TEXTE DES UMWELTBUNDESAMTES. 62: 1-341
- Norelli, J.L., Mills, J. und Aldwinckle, H.S. (1996): Leaf wounding increases efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. HORT SCI. 31: 1-2
- Norris, C.E., Simpson, E.C., Sweet, J.B. und Thomas, J.E. (1999): Monitoring weedness and persistence of genetically modified oilseed rape (*Brassica napus*) in the UK. BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL: 255-260
- Ogasawara, T., Chikagawa, Y., Arakawa, F., Nozaki, A., Itoh, Y., Sasaki, K., Umetsu, H., Watanabe, T., Akiyama, H., Maitani, T., Toyoda, M., Kamada, H., Goda, Y. und Ozeki, Y. (2005): Frequency of mutations of the transgene, which might result in the loss of the glyphosate-tolerant phenotype, was lowered in Roundup Ready R soybeans. J HEALTH SCI. 51 (2): 197-201
- Okazaki, K. und Hinata, K. (1987): Repressing the expression of self- incompatibility in crucifers by short-term high- temperature treatment. THEOR APPL GENET. 73: 496-500
- Ooms, G., Hooykaas, P.J.J., Van Veen, R.J.M., Van Beelen, P., Regensburgtuink, T.J.G. und Schilperoort, R.A. (1982): Octopine Ti- plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T- region. PLASMID. 7: 15-29
- Oparka, K.J.; Cruz, S.S. (2000): The great escape: Phloem transport and unloading of macromolecules. ANNU REV PLANT PHYS. 51: 323-347
- Ottenschlager, I., Barinova, I., Voronin, V., Dahl, M., Heberle-Bors, E. und Touraev, A. (1999): Green fluorescent protein (GFP) as a marker during pollen development. TRANSGENIC RES. 8: 279-294
- Palauqui, J.C. und Vaucheret, H. (1998) Transgenes are dispensable for the RNA degradation step of co-suppression. PROC NATL ACAD SCI. USA. 95: 9675-9680
- Papazova, N., Windels, P., Depicker, A., Taverniers, I., Roldan-ruiz, I., Milcamps, A., Van Bockstaele, E., Van Den Eede, G. und De Loose, M. (2006): Sequence stability of the T-DNA-plant junctions in tissue culture in *Arabidopsis* transgenic lines. PLANT CELL REP. 25 (12): 1362–1368

- Papazova, N., Ghedira, R., Van Glabeke, S., Bartegi, A., Windels, P., Taverniers, I., Roldan-Ruiz, I., Van Bockstaele, E., Milcamps, A., Van Den Eede, G., Depicker, A. und De Loose, M. (2007): Stability of the T-DNA flanking regions in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants under influence of abiotic stress and cultivation practices. PLANT CELL REP. 0721-7714 (Print) 1432-203X (Online)
- Papp, I., Mette, M.F., Aufsatz, W., Daxinger, L., Schauer, S.E., Ray, A., van der Winden, J., Matzke, M. und Matzke, A.J.M. (2003): Evidence for nuclear processing of plant micro RNA and short interfering RNA precursors. PLANT PHYSIOL. 132: 1382-1390
- Park, S.H., Rose, S.C., Zapata, C., Srivantanakul, M. und Smith, R.H. (1998): Cross-protection and selectable marker genes in plant transformation. In Vitro Cell Dev Biol Plant. 34: 117-121
- Park, Y.D., Papp, I., Moscone, E.A., Iglesias, V.A., Vaucheret, H., Matzke, A.J.M. und Matzke, M. (1996): Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. PLANT J. 9: 183-194
- Peerbolte, R., Ruigrok, P., Wullems, G. und Schilperoort, R. (1987): T-DNA rearrangements due to tissue-culture - Somaclonal variation in crown gall tissues. PLANT MOL BIOL. 9: 51-57
- Pellmann, H., Reißer, W., Theophilou, S. und Schlegel, M. (1998): Begleitforschung zu Freisetzungen gentechnisch veränderter Pflanzen in Sachsen. BUNDESGESUNDHEITSBLATT. 12: 552-559
- Peterhans, A., Schlupmann, H., Basse, C. und Paszkowski, J. (1990): Intrachromosomal recombination in plants. EMBO J. 9: 3437-3445
- Petri, C. und Burgos, L. (2005): Transformation of fruit trees. Useful breeding tool or continued future prospect? TRANSGENIC RES. 14: 15-26
- Pickhardt, A. und Fluri, P. (2000): Die Bestäubung der Blütenpflanzen durch Bienen. Biologie, Ökologie, Ökonomie. SCHWEIZERISCHES ZENTRUM FÜR BIENENFORSCHUNG, MITTEILUNG Nr. 38
- Pickhardt, T. und De Kathen, A. (2002): Stabilität transgen-vermittelter Merkmale in gentechnisch veränderten Pflanzen mit dem Schwerpunkt transgene Gehölzarten und Stabilitätsgene. FORSCHUNGSBERICHT DES UMWELTBUNDESAMTES BERLIN, ISSN 0722-186X
- Pierantoni, L., Cho, K.-H., Shin, I.-S., Chiodini, R., Tartarini, S., Dondini, L., Kang, S.-J. und Sansavini, S. (2004): Characterisation and transferability of apple SSRs to two European pear F₁ populations. THEOR APPL GENET. 109 (7): 1519-1524
- Pleasants, J.M., Hellmich, R.L., Dively, G.P., Sears, M.K., Stanley-Horn, D., Mattila, H.R., Foster, J.E., Clark, T.L. und Jones, G.D. (2001): Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. PROC NATL ACAD SCI. USA. 98: 11919-11924
- Ponomarenko, V. V. (1987): History of *Malus domestica* Borkh. Origin and evolution. BOT. ZH. 176: 10-18
- Porsch, P., Jahnke, A. und Düring, K. (1998): A plant transformation vector with a minimal T-DNA II. Irregular integration patterns of the T-DNA in the plant genome. PLANT MOL BIOL. 37 (3):5 81-585

- Pröls, F. und Meyer, P. (1992): The methylation patterns of chromosomal integration regions influence gene activity of transferred DNA in *Petunia hybrida*. PLANT J. 2: 465-475
- Puchta, H., Swoboda, P. und Hohn, B. (1995): Induction of Intrachromosomal homologous recombination in whole plants. PLANT J. 7: 203-210
- Que, Q.D., Wang, H.Y., English, J.J. und Jorgensen, R.A. (1997): The frequency and degree of co-suppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in the transgene coding sequence. PLANT CELL. 9: 1357-1368
- Rachow-Brandt, G. und Kollmann, R. (1992): Studies on graft unions. IV. Assimilate transport and sieve element restitution on homo- and heterografts. J PLANT PHYSIOL. 139: 579-583
- Ramsey, G., Thompson, C.E., Neilson, S. und Mackay, G.R. (1999): Honey bees as vector of GM oilseed rape pollen. BCPC SYMPOSIUM PROC. 72: 203-208
- Raybould, A.F. und Gray, A.J. (1993): Genetically- modified crops and hybridization with wild relatives - A U.K. perspective. J APPL ECOL. 30: 199-219
- Reim, S., Flachowsky, H., Michael, M. und Hanke, M.-V. (2006): Assessing gene flow in apple using a descendant of *Malus sieversii* var. *sieversii* f. *niedzwetzkyana* as an identifier for pollen dispersal. ENVIRON BIOSAFETY RES. 5: 89-104
- Renckens, S., De Greve, H., Van Montagu, M. und Hernalsteens, J.P. (1992): Petunia plants escape from negative selection against a transgene by silencing the foreign DNA via methylation. MOL GEN GENET. 233: 53-64
- Risseeuw, E., Franke Van Dijk, M.E.I. und Hooykaas, P.J.J. (1997): Gene targeting and instability of *Agrobacterium* T-DNA loci in the plant genome. PLANT J. 11: 717-728
- Roberts, A.G., Cruz, S.S., Roberts, I.M., Prior, D., Turgeon, R., und Oparka, K.J. (1997): Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: Comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. PLANT CELL. 9: 1381-1396
- Robinson, J.P., Harris, A.P. und Juniper, B.E. (2001): Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (*Rosaceae*) with emphasis on the cultivated apple, *Malus x domestica* Borkh. PLANT SYST EVOL. 226: 35-58
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B. und Lucas, W.J. (1990): Phloem long-distance transport of *CmNACP* mRNA: implications for supracellular regulation in plants. DEVELOPMENT 126: 4405-4419
- Saghai-Marooof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. und Allard, R.W. (1984): Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 81:8014 - 8019.
- Saure, C., Kühne, S. und Hommel, B. (1999): Untersuchungen zum Pollentransfer von transgenen Raps auf verwandte Kreuzblütler durch Wind und Insekten. BMBF, STATUSSEMINAR, BRAUNSCHWEIG.
- Schernthaner, J. P., Fabijanski, S.F., Arnison, P. G., Racicot, M. und Robert, L.S. (2003): Control of seed germination in transgenic plants based on the segregation of a two-component genetic system. PROC NATL ACAD SCI U S A. 100 (11): 6855-6859

- Schmülling, T. und Schell, J. (1993): Transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks can be periclinal chimeras. *PLANT MOL BIOL.* 21: 705- 708
- Schubert, D., Lechtenberg, B., Forsbach, A., Gils, M., Bahadur, S. und Schmidt, R. (2004): Silencing in *Arabidopsis* T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. *PLANT CELL.* 16: 2561-2572
- Schulte, E. und Käppeli, O. (Hrsg) (1996): Gentechnisch veränderte krankheits- und schädlingsresistente Nutzpflanzen- Eine Option für die Landwirtschaft? FACHSTELLE FÜR BIOSICHERHEITSFORSCHUNG UND ABSCHÄTZUNG VON TECHNIKFOLGEN DES SCHWERPUNKTPROGRAMMES BIOTECHNOLOGIE (BATS), BASEL.
- Schütte, G. (1998): Vertikaler Gentransfer. In: Nutzung der Gentechnik im Agrarsektor der USA- Die Diskussion von Versuchsergebnissen und Szenarien zur Biosicherheit. *UBA-TEXTE.* 47/98: 239-270
- Schütte, G., Stirn, S. und Beusmann, V. (2001): Transgene Nutzpflanzen. BIRKHÄUSER VERLAG, BASEL, BOSTON, BERLIN.
- Sears, M.K. und Stanley-Horn, D. (2000): Proceedings of the 6th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms. In: Fairbairn, C., Scoles, G. und McHughen, A. (eds): Proceedings of the 6th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms. UNIVERSITY EXTENSION PRESS. CANADA
- Seeley, T.D. (1995): The wisdom of the hive. HARVARD UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE MASS.
- Sefc, K.M., Steinkellner, H., Wagner, H.W., Glossl, J. und Regner, F. (1997): Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevine. *VITIS.* 36: 179-183
- Shiba, H. und Takayania, S. (2007): RNA silencing systems and their relevance to allele-specific DNA methylation in plants. *BIOSCI BIOTECH BIOCH.* 71 (11): 2632-2646
- Sijen, T. und Kooter, J.M. (2000): Post-transcriptional gene-silencing: RNAs on the attack or on the defense? *BIOESSAYS.* 22: 520-531
- Silbereisen, R., Götz, G. und Hartmann, W. (1996): Obstsorten Atlas. EUGEN ULMER VERLAG, STUTTGART, 2. Auflage
- Silfverberg-Dilworth, E., Matasci, C.L., Van de Weg, W.E., Van Kaauwen, M.P.W., Walser, M., Kodde, L.P., Soglio, V., Gianfranceschi, L., Durel, C.-E., Costa, F., Yamamoto, T., Koller, B., Gessler, C. und Patocchi, A. (2006): Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. *TREE GENET GENOMES.* 2 (4): 202-224
- Slatkin, M. (1987): Gene flow and the geographic structure of natural- populations. *SCIENCE.* 236: 787-792
- Spencer, T.M., O'Brien, J.V., Start, W.G., Adams, T.R., Gordonkamm, W.J. und Lemaux, P.G. (1992): Segregation of transgenes in maize. *PLANT MOL BIOL.* 18: 201-210
- Srivastava, V., Vasil, V. und Vasil, I.K. (1996): Molecular characterization of the fate of transgenes in transformed wheat (*Triticum aestivum* L). *THEOR APPL GEN.* 92: 1031-1037
- Stace, C. (1991): New flora of the British isles. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS.

- Stadler, R., Wright, K.M., Lauterbach, C., Amon, G., Gahrtz, M., Feuerstein, A., Oparka, K.J. und Sauer, N. (2005): Expression of GFP-fusions in *Arabidopsis* companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *PLANT J.* 41 (2): 319-331.
- Stam, M., Viterbo, A., Mol, J.N.M. und Kooter, J.M. (1998): Position-dependent methylation and transcriptional silencing of transgenes in inverted T-DNA repeats: Implications for posttranscriptional silencing of homologous host genes in plants. *MOL CELL BIOL.* 6165-6177
- Szabados, L., Kovács, I., Oberschall, A., Ábrahám, E., Kerekes, I., Zsigmond, L., Nagy, R., Alvarado, M., Krasovskaja, I., Gál, M., Berente, A., Rédei, G.P., Ben-Haim, A. und Koncz, C. (2002): Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the *Arabidopsis* genome. *PLANT J.* 32: 233-242
- Tang, J., Scarth, R. und Fristensky, B. (2003): Effects of genomic position and copy number of Acyl-ACP thioesterase transgenes on the level of the target fatty acids in *Brassica napus* L.. *MOL BREEDING.* 12: 71-81
- Tax, F.E. und Vernon, D.M. (2001): T-DNA-associated duplication/translocations in *Arabidopsis*. Implications for mutant analysis and functional genomics. *PLANT PHYSIOL.* 126: 1527-1538
- Thomas, C.M. und Jones, J.D. (2007): Molecular analysis of *Agrobacterium* T-DNA integration in tomato reveals a role for left border sequence homology in most integration events. *MOL GENET GENOMICS.* 278 (4): 411-420
- Tiedemann, R. (1989): Graft union development and symplastic phloem contact in the heterograft *cucumis sativus* on *Cucurbita ficifolia*. *J PLANT PHYSIOL.* 134: 427-440
- Tiedemann, R. und Carsten-Behrens, U. (1994): Influence of grafting on the phloem protein patterns in *Cucurbitaceae*. I. Additional phloem exudate proteins in *Cucumis sativus* grafted on two *Cucurbita* species. *J PLANT PHYSIOL.* 143: 189-194
- Tolstrup, K., Andersen, S., Boelt, B., Buus, M., Gylling, M., Holm, P., Kjellsson, G., Pedersen, S., Ostergard, H. und Mikkelsen, S. (2003): Report from the Working Group on: The co-existence of genetically modified crops with conventional and organic crops. Conclusion and Summary. MINISTRY OF FOOD, AGRICULTURE AND FISHERIES.
- Torisky, R.S., Oh, M.H., Xu, W., Braam, J. und Clouse, S.D. (1997): Search for a brassinosteroid-response element in the TCH4 promoter of *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOL.* 114: 812-812
- Treu, R., Emberlin, J. (2000): Pollen dispersal in the crops Maize (*Zea mays*), Oil seed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*), Potatoes (*Solanum tuberosum*), Sugar beet (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris*) and Wheat (*Triticum aestivum*). A report for the SOIL ASSOCIATION FROM THE NATIONAL POLLEN RESEARCH UNIT.
- Tzfira, T., Li, J.X., Lacroix, B. und Citovsky, V. (2004): *Agrobacterium* T-DNA integration: Molecules and models. *TRENDS GENET.* 20: 375-383
- Ueki, S. und Citovsky, V. (2001): RNA commutes to work: regulation of plant gene expression by systemically transported RNA molecules. *BIO ESSAYS.* 23: 1087-1090
- Ulian, E.C., Magill, J.M., Magill, C.W. und Smith, R.H. (1996): DNA methylation and expression of NPTII in transgenic petunias and progeny. *THEOR APPL GEN.* 92: 976-981

- UrRahman, H., James, D.J., Hadonou, A.M. und Caligari, P.D.S. (1997): The use of RAPD for verifying the apomictic status of seedlings of *Malus* species. THEOR APPL GEN. 95: 1080-1083
- Van Bel, A. J. E.: The phloem, a miracle of ingenuity (2003): PLANT CELL ENVIRON. 26: 125–149
- Van Bel, A.J.E. und Gaupels, F. (2004): Pathogen-induced resistance and alarm signals in the phloem. MOL PLANT PATHOL. 5: 495–504
- Vancanneyt, G., Schmidt R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L. und Rocha-Sosa, M. (1990): Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. MOL GEN GENET. 220: 245-250
- Vaucheret, H. und Fagard, M. (2001): Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. TRENDS GENET. 17: 29-35
- Vavilov, N.I. (1930): Wild progenitors of the fruit trees of Turkestan and the Caucasus and the problem of the origin of fruit trees. PROC 9TH INT HORT CONGR:271-286
- Voinnet, O. und Baulcombe, D.C. (1997): Systemic signalling in gene silencing. NATURE 389: 553
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S. und Baulcombe, D.C. (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. CELL. 95: 177–187
- Wackernagel, W. und Lorenz, M.G. (1994): DNA-Entlassung aus Bakterien, DNA Überdauerung und genetische Transformation im natürlichen Lebensraum. In: BMFT (Ed.) BIOLOGISCHE SICHERHEIT, BONN. 3: 9-33
- Wagner, I. und Weeden, N.F. (2000): Isozymes in *Malus sylvestris*, *Malus domestica* and in related *Malus* species. ACTA HORT. 538: 51-56.
- Waigmann, E., Cohen, Y., McLean, G. und Zambryski, P. (1997). Plasmodemesmata: gateways for information transfer. SOCIETY OF EXPERIMENTAL BIOLOGY, Symposium Series 51 (1029): 43-49
- Wakimoto, B. (1998): Beyond the nucleosome: Epigenetic aspects of position-effect variegation. DROSOPHILA CELL. 93: 321-324
- Wallrath, L.L. (1998): Unfolding the mysteries of heterochromatin. CURR OPIN GENET DEV. 8: 147-153
- Walz, C., Giavalisco, P., Schad, M., Juenger, M., Klose, J. und Kehr, J. (2004): Proteomics of cucurbit phloem exudate reveals a network of defence proteins. PHYTOCHEMISTRY 65: 1795-1804
- Wang, T., Li, Y., Shi, Y., Reboud, X., Darmency, H. und Gressel, J. (2004): Low frequency transmission of a plastid-encoded trait in *Setaria italica*. THEOR APPL GEN. 108 (2): 315-320.
- Waterhouse, P.M., Smith, N.A. und Wang, M.B. (1999): Virus resistance and gene silencing: Killing the messenger. TRENDS PLANT SCI. 4: 452-457
- Waterhouse, P.M., Wang, M.B. und Lough, T. (2001): Gene silencing as an adaptive defense against viruses. NATURE. 411: 834-842
- Weber, J.L. und Wong, C. (1993): Mutation of human short tandem repeats. HUM. MOL GENET. 2: 1123-1128

- Wertheim, S.J. (1991): *Malus* cv. Baskatong as an indicator of pollen spread in intensive apple orchards. J HORTIC SCI. 66: 635-642
- Westmann, A.L., Spira, T.P., Miller, M.B., Rajapakse, S., Tonkyn, D.W. und Abbott, A.G. (2002): Assessing gene escape from cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa*) to native wild strawberry (*F. virginiana*). I. Molecular variation in *Fragaria* and identification of markers for detecting crop-wild gene flow. GENE FLOW WORKSHOP.
- Williams, R.R., Church, R.M., Wood, D.E.S. und Flook, V.A. (1979): Use of an anthocyanin progeny marker to determine the value of hive pollen dispensers in apple orchards. J HORTIC SCI. 54: 75-78
- Windels, P., De Buck, S., Van Bockstaele, E., De Loose, M. und Depicker, A. (2003): T-DNA integration in *Arabidopsis* chromosomes. Presence and origin of filler DNA sequences. PLANT PHYSIOL. 133: 2061-2068
- Winter, F., Janssen, H., Kennel, W., Link, H., Scheer, F. und Silbereisen, R. (1992): Lucas' Anleitung zum Obstbau. VERLAG EUGEN ULMER, STUTTGART.
- Wolf, S., Deom, C.M., Beachy, R.N. und Lucas, W.J. (1989): Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. SCIENCE 246: 377-379
- Yamamoto, T., Kimura, T., Saito, T., Kotobuki, K., Matsuta, N. und Liebhardt, R., Gessler, C., van de Weg, W.E. und Hayashi, T. (2004): Genetic linkage maps of Japanese and European pears aligned to the apple consensus map. ACTA HORT. 663: 51-56
- Yamamoto, T., Kimura, T., Terakami, S., Nishitani, C., Sawamura, Y., Saito, T., Kotobuki, K. und Hayashi, T. (2007): Integrated Reference Genetic Linkage Maps of Pear Based on SSR and AFLP Markers. BREED SCI. 57 (4): 321-329
- Yang, G.J., Lee, Y.H., Jiang, Y.M., Kumpatla, S.P., Hall, T.C. (2005): Organization, not duplication, triggers silencing in a complex transgene locus in rice. PLANT MOL BIOL. 58 (3): 351-366
- Yao, J. L., Dong, Y.H. und Morris, A.M. (2001): Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutation in a MADS-box transcription factor. PNAS. 98 (3):1306-1311
- Yoo, B.C., Lee, J.Y. und Lucas, W. J. (2002): Analysis of the complexity of protein kinase within the phloem sieve tube system: Characterization of *Curcubita maxima* calmodulin-like domain protein kinase 1. J BIOL CHEM. 277: 15325-15332
- Zhang, S., Raina, S., Li, H., Li, J., Dec, E., Ma, H. Huang, H. und Fedoroff, N.V. (2003): Resources for targeted insertional and deletional mutagenesis in *Arabidopsis*. PLANT MOL BIOL. 53: 133-150
- Zhou, Z.Q. und Li, Y.N. (2000): The RAPD evidence for the phylogenetic relationship of the closely related species of cultivated apple. GENET RESOUR CROP EVOL. 47 (4): 353-357
- Zhou, Z. (1999): The apple genetic resources in China: The wild species and their distributions, informative characteristics and utilization. GENET RESOUR CROP EVOL. 46: 599-609
- Zhu, Y., Qi, Y., Xun, Y., Owens, R. und Ding, B. (2002): Movement of potato spindle tuber viroid reveals regulatory points of phloem-mediated RNA traffic. PLANT PHYSIOL. 130: 138-146

-
- Zoglauer, K. und Aurich, C. (2000): Freisetzung Transgener Gehölze und Grundlagen für Confinements. FORSCHUNGSBERICHT IM AUFTRAG DES UMWELTBUNDESAMTES.
- Zohary, D. und Hopf, M. (1994): Domestication of plants on the old world. CLAREDON PRESS, OXFORD
- Zwintzschner, M. (1974): *Malus pumila* var. *niedzwetzkyana* als Partner in der Apfelzüchtung. Z. PFLANZENZÜCHTUNG. 74: 303-310

8. Anhang

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des Versuchsfeldes zur Bestimmung der Auskreuzungsdistanz durch Apfelpollen unter natürlichen Bedingungen.	28
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der verschiedenen Veredelungskombinationen.	31
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte.	35
Abbildung 4:	Sämlinge aus den Kreuzungen bzw. den freien Abblüten 14 Tage nach dem Auflaufen.	38
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der beprobten Veredelungskomponenten einer veredelten Apfelpflanze für die Untersuchung mittels GUS-Test.	43
Abbildung 6:	Vitalitäts- und Keimfähigkeitsprüfung der Pollenkörner von ‚TNR 31-35‘.	47
Abbildung 7:	Nachweis von Apfelpollen auf den Pollenfallen mit Hilfe eines Lichtmikroskops bei 100facher Vergrößerung.	50
Abbildung 8:	Transportdistanzen von Apfelpollen durch Wind in unterschiedlichen Himmelsrichtungen.	51
Abbildung 9:	Anteil rotlaubiger Nachkommen nach freier Abblüte für die Jahre 2003 und 2004.	58
Abbildung 10:	Untersuchung zur Methylierung des <i>nos</i> -Promotors der Linie T363.	63
Abbildung 11:	Ergebnisse der Southern-Blot Untersuchungen der Linie T267 zum Nachweis der Kopienanzahl des Zielgens <i>Dpo</i>	71
Abbildung 12:	Ergebnis der Western-Blot-Analysen am Beispiel von vier Veredelungen der Linie T121 und T92.	73
Abbildung 13:	Ergebnisse des GUS-Tests zur Bestimmung des Transports von Transgenprodukten am Beispiel der vier Veredelungen der Linie T355.	74

8.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Herstellungs-, Überführungs- und Veredelungsjahr der einzelnen transgenen Linien.....	30
Tabelle 2:	Transgene Linien und Art ihrer Verwendung für die Untersuchung der Stabilität der T-DNA bei gentechnisch veränderten Apfelpflanzen.....	32
Tabelle 3:	Transgene Linien für die Untersuchung des Transport von Transgenprodukten bei veredelten Apfelgehölzen.....	33
Tabelle 4:	Klimadaten für den Zeitraum der künstlichen Bestäubung in den Jahren 2003 und 2004.....	47
Tabelle 5:	Ergebnisse der künstlichen Bestäubung mit Pollen des Pollenspendergenotyps im Jahr 2003 und 2004 zur Bestimmung der sexuellen Kompatibilität von ‚TNR 31-35‘ mit den Pollenfängersorten.....	49
Tabelle 6:	SSR-Marker zur Selektion zwischen Apfelsorten und ‚TNR 31-35‘.....	52
Tabelle 7:	Anzahl grünlaubiger Sämlinge nach Kreuzung von ‚TNR 31-35‘ mit verschiedenen Pollenfängersorten.....	54
Tabelle 8:	Bestimmung des Pollentransports anhand des Anteils rotlaubiger Nachkommen von ‚TNR 31-35‘ nach freier Abblüte in den Jahren 2003 und 2004.....	56
Tabelle 9:	Transgene Linien aus dem Konstrukt p35SAMVT.....	61
Tabelle 10:	Transgene Linien aus dem Konstrukt pPinAtt35SAMVT4.....	64
Tabelle 11:	Transgene Linien aus dem Konstrukt pBINAR19.....	65
Tabelle 12:	Ergebnisse der Expressionsanalysen von Ziel- und Markergenen bei den Pflanzen der Linie T136.....	66
Tabelle 13:	Analyse der <i>npftII</i> Translation bei Ex-vitro Pflanzen der Linie T211 mittels ELISA- Test.....	68
Tabelle 14:	Analyse der <i>npftII</i> Expression bei Blättern unterschiedlicher Blattetagen einer veredelten Pflanze von T211 mittels ELISA-Test.....	69
Tabelle 15:	Ergebnisse der Untersuchung zur Integration und Expression von Ziel- und Markergenen der Linie T267.....	70
Tabelle 16:	Veredelte Apfelinien mit transgener Unterlage zur Untersuchung des Transports von Transgenprodukten zwischen Veredelungspartnern.....	72
Tabelle 17:	Veredelte Apfelinien mit transgenem Edelreis zur Untersuchung des Transports von Transgenprodukten zwischen Veredelungspartnern.....	72

8.3. Verzeichnis der Abbildung im Anhang

Abb. Anhang 1:	Schema des Versuchsfeldes zur Bestimmung des vertikalen Gentransfers bei <i>M. x domestica</i> Borkh.	123
Abb. Anhang 2:	Prozentualer Anteil rotlaubiger Nachkommen je Pollenfängerbaum nach freier Abblüte im Jahr 2003 und 2004 (schematische Darstellung).	125

8.4. Verzeichnis der Tabellen im Anhang

Tab. Anhang 1:	Getestete SSR-Primer für die Bestimmung eines pollenspenderspezifischen SSR-Markers.	127
Tab. Anhang 2:	Verwendete Primer zur Untersuchung transgener Pflanzen zur Amplifikation spezifischer Gensequenzen.	128
Tab. Anhang 3:	Ergebnisse der SSR-Analyse aller Apfelsorten innerhalb des Versuchsquartiers für die Untersuchungen zum vertikalen Gentransfer.	129
Tab. Anhang 4:	Anzahl und Keimfähigkeit der ausgesäten Samen aus der künstlichen Bestäubung der Pollenfängersorten 2003 und 2004.	131
Tab. Anhang 5:	Anzahl und Keimfähigkeit der Samen der Pollenfängersorten aus freier Abblüte 2003 und 2004.	132
Tab. Anhang 6:	Ergebnisse der SSR-Analyse der grünlaubigen Nachkommen aus der Kreuzung der Pollenfängersorten x ‚TNR 31-35‘ im Jahr 2003.	133
Tab. Anhang 7:	Ergebnisse der SSR-Analyse der grünlaubigen Nachkommen aus der Kreuzung der Pollenfängersorten x ‚TNR 31-35‘ im Jahr 2004.	136
Tab. Anhang 8:	Anzahl der rotlaubigen und grünlaubigen Sämlinge nach freier Abblüte im Jahr 2003 und 2004.	138
Tab. Anhang 9:	Ergebnisse der SSR-Analyse der rotlaubigen Nachkommen aus freier Abblüte im Jahr 2003.	139
Tab. Anhang 10:	Ergebnisse der SSR-Analyse der rotlaubigen Nachkommen aus freier Abblüte im Jahr 2004.	142
Tab. Anhang 11:	Ergebnisse zur Untersuchung der Stabilität der Integration der T-DNA mittels Insert-PCR und Southern-Blot-Analyse.	144
Tab. Anhang 12:	Ergebnisse zur Untersuchung zur Stabilität der Expression der T-DNA mittels RT-PCR und ELISA.	146
Tab. Anhang 13:	Ergebnisse zur Untersuchung des Transports von Transgenprodukten mittels Western-Blot-Analyse und GUS-Test.	148

8.5. Abbildungen im Anhang

Abb. Anhang 1: Schema des Versuchsfeldes zur Bestimmung des vertikalen Gentransfers bei *M. x domestica* Borkh.

Reihe	1		2		3			
	Baumnr.	Apfelsorte	bb	m*	bb	m*	bb	m*
1	Jonathan	108	Sire Prize	108	Realka	108		
2	Jonathan	106	Sire Prize	106	Realka	106		
3	Golden Delicious	4	Discovery	3	Realka	4		
4	Golden Delicious	102	Discovery	102	Realka	102		
5	Pinova	100	Prima	100	Reglindis	100		
6	Pinova	98	Prima	98	Reglindis	98		
7	Starkrimson	96	Priscilla	96	Rene	96		
8	Starkrimson	94	Priscilla	94	Rene	94		
9	Empire	92	Rewena	92	Rene	92		
10	Empire	90	Rewena	90	Spartan	4		
11	Liberty	88	Reka	4	Gloster	88		
12	Liberty	86	Reka	86	Gloster	5		
13	Sire Prize	84	Realka	84	McIntosh	84		
14	Sire Prize	82	Realka	82	McIntosh	82		
15	Discovery	81	Reglindis	3	Rome Beauty	80		
16	Discovery	79	Reglindis	78	Rome Beauty	5		
17	Prima	3	Rene	77	Jonafree	76		
18	Prima	75	Rene	74	Jonafree	74		
19	Priscilla	73	Spartan	72	Priam	72		
20	Priscilla	71	Spartan	70	Priam	3		
21	Rewena	69	Gloster	68	Greensleaves	68		
22	Rewena	67	Gloster	66	Greensleaves	66		
23	Reka	65	McIntosh	64	Clivia	3		
24	Reka	63	McIntosh	62	Clivia	62		
25	Realka	61	Rome Beauty	5	Redfree	60		
26	Realka	59	Rome Beauty	58	Redfree	58		
27	Reglindis	57	Jonafree	56	Piglos	56		
28	Reglindis	55	Jonafree	54	Piglos	54		
29	Rene	53	Freedom	52	Piglos	52		
30	Rene	51	Freedom	3	Piglos	50		
31	Spartan	49	Priam	48	Piglos	48		
32	Spartan	47	Priam	46	Alkmene	46		
33	Gloster	45	Alkmene	44	Alkmene	44		
34	Gloster	43	Alkmene	42	Pinova	42		
35	McIntosh	41	Alkmene	40	Pinova	40		
36	McIntosh	39	Alkmene	38	Freedom	3		
37	McIntosh	37	Alkmene	36	Freedom	36		
38	McIntosh	3	Greensleaves	34	Oldenburg	34		
39	Jonafree	33	Greensleaves	32	Oldenburg	32		
40	Jonafree	31	Clivia	30	Oldenburg	3		
41	Freedom	29	Clivia	28	Oldenburg	28		
42	Freedom	28	Pi-As 21,73	26	Oldenburg	3		
43	Priam	26	Pi-As 21,73	24	Reanda	24		
44	Priam	24	Pi-As 21,73	~	Reanda	3		
45	Alkmene	22	Pi-As 21,73	21	Releta	3		
46	Alkmene	20	Pi-As 21,73	19	Releta	18		
47	Alkmene	18	Pi-As 21,73	17	Releika	16		
48	Alkmene	17	Pi-As 21,73	15	Releika	3		
49	Alkmene	15	Pi-As 21,73	12	Resi	12		
50	Alkmene	13	Pi-As 21,73	~	Resi	5		
51	Alkmene	12	Pi-As 21,73	8	Retina	3		
52	Remo	11	Piglos	8	Retina	3		
53	Remo	10	Piglos	6	Gibs Golden Gage	4		
54	Remo	9	Piglos	5	Gibs Golden Gage	2		

Fortsetzung Abb. Anhang 1

Reihe	1		2		3				
Baumnr.	Apfelsorte	bb	m*	Apfelsorte	bb	m*	Apfelsorte	bb	m*
55	Remo		9	Piglos	5		TNR 31-35	3	
56	Remo	3	9	Piglos	5		TNR 31-35	3	
57	Remo		9	Redfree	5		TNR 31-35	3	
58	Remo		9	Redfree	5		TNR 31-35	3	
59	Remo		9	Idared	5		TNR 31-35	3	
60	Remo		9	Idared	3		TNR 31-35	3	
61	Remo	3	9	Jonathan	4		TNR 31-35	3	
62	Piglos		9	Jonathan	4		TNR 31-35	3	
63	Piglos		9	Golden Delicious	4		TNR 31-35	3	
64	Piglos	n.a.	9	Golden Delicious	4		TNR 31-35	3	
65	Piglos	n.a.	9	Pinova	5		TNR 31-35	3	
66	Piglos	n.a.	9	Pinova	4		TNR 31-35	3	
67	Greensleaves	3	9	James Grieve	3		TNR 31-35	3	
68	Greensleaves		9	James Grieve	3		TNR 31-35	3	
69	Greensleaves		9	Starkrimson	~		TNR 31-35	3	
70	Greensleaves		9	Starkrimson	~		Golden Delicious		2
71	Redfree		10	Remo	3		Golden Delicious		4
72	Redfree		11	Remo	3		Golden Delicious		6
73	Idared		12	Remo	9		McIntosh	3	8
74	Idared		13	Remo	3		McIntosh	3	10
75	Jonagold		15	Remo	11		McIntosh		12
76	Jonagold		17	Remo	15		Carola	3	14
77	Jonagold		18	Remo	17		Carola		16
78	Jonagold		20	Remo	19		Undine	3	18
79	Jonagold		22	Empire	21		Undine		20
80	Pinova	4	24	Empire	22		Pikant	4	22
81	Pinova		26	Liberty	3		Pikant		24
82	James Grieve		28	Liberty	26		Jonadel	4	26
83	James Grieve		29	Sire Prize	28		Jonadel		28
84	Remo		31	Sire Prize	30		Cox orangen Renette	4	30
85	Remo		33	Discovery	32		Cox orangen Renette		32
86	Remo		35	Discovery	34		Juno		34
87	Remo		37	Prima	3		Juno		36
88	Remo		39	Prima	38		Piros	4	38
89	Remo		41	Priscilla	40		Piros		40
90	Remo		43	Priscilla	42		Elstar		42
91	Remo		45	Alkmene	44		Elstar		44
92	Empire		47	Alkmene	46		Auralia		46
93	Empire		49	Alkmene	48		Auralia	4	48
94	Liberty		51	Alkmene	50		Pilot		50
95	Liberty		53	Alkmene	52		Pilot		52
96	Oldenburg		55	Rewena	5		Jonagold	3	54
97	Oldenburg		57	Rewena	56		Jonagold		56
98	Oldenburg		59	Rewena	58		Jonagold		58
99	Oldenburg		61	Rewena	60		Retina		60
100	Oldenburg	3	63	Rewena	62		Retina		62

* Boniturnote: Blüte

3	früh
4	früh-mittel
5	mittel
7	spät

~ nicht analysiert; bb: Blütenboniturnote (Quelle: <http://www.genres.de/eva/apfel.htm>);
m*: Abstand in meter vom äußersten Pollenspenderbaum; die Pollenfängerbäume sind grün unterlegt.

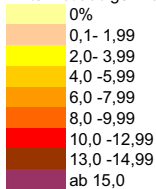
Abb. Anhang 2: Prozentualer Anteil rotlaubiger Nachkommen je Pollenfängerbaum nach freier Abblüte im Jahr 2003 und 2004 (schematische Darstellung).

Reihe:	1			2			3					
Baumnr.	Apfelsorte	2003 %	2004 %	Abstand* (m)	Apfelsorte	2003 %	2004 %	Abstand* (m)	Apfelsorte	2003 %	2004 %	Abstand* (m)
1	Jonathan			108.4	Sire Prize			108.1	Realka			108
2	Jonathan			106.4	Sire Prize			106.1	Realka			106
3	Golden Delicious	0.5		104.4	Discovery	0.0	1.8	104.1	Realka	2.3	1.6	104
4	Golden Delicious		0.0	102.4	Discovery			102.1	Realka			102
5	Pinova			100.4	Prima			100.1	Reglindis			100
6	Pinova			98.4	Prima			98.1	Reglindis			98
7	Starkrimson			96.4	Priscilla			96.1	Rene			96
8	Starkrimson			94.4	Priscilla			94.1	Rena			94
9	Empire			92.4	Rewena			92.1	Spartan	0.0	0.0	92
10	Empire			90.4	Rewena			90.1	Spartan			90
11	Liberty			88.5	Reka	0.0	-	88.1	Gloster			88
12	Liberty			86.5	Reka		0.0	86.1	Gloster	1.1	0.0	86
13	Sire Prize			84.5	Realka			84.1	McIntosh			84
14	Sire Prize			82.5	Realka			82.1	McIntosh			82
15	Discovery			80.5	Reglindis	0.0	0.0	80.1	Rome Beauty		0.0	80
16	Discovery			78.5	Reglindis			78.1	Rome Beauty	0.0		78
17	Prima	1.8	0.7	76.5	Rene			76.1	Jonafree			76
18	Prima			74.5	Rene			74.1	Jonafree			74
19	Priscilla			72.6	Spartan			72.1	Priam			72
20	Priscilla			70.6	Spartan			70.1	Priam	0.0	0.8	70
21	Rewena			68.6	Gloster			68.1	Greensleaves			68
22	Rewena			66.6	Gloster			66.2	Greensleaves			66
23	Reka			64.6	McIntosh			64.2	Clivia	0.0	0.0	64
24	Reka			62.6	McIntosh			62.2	Clivia			62
25	Realka			60.7	Rome Beauty	0.9	0.0	60.2	Redfree			60
26	Realka			58.7	Rome Beauty			58.2	Redfree			58
27	Reglindis			56.7	Jonafree			56.2	Piglos	0.0		56
28	Reglindis			54.7	Jonafree			54.2	Piglos		0.0	54
29	Rene			52.8	Freedom		0.0	52.2	Piglos			52
30	Rene			50.8	Freedom	1.0		50.2	Piglos			50
31	Spartan			48.8	Priam			48.2	Piglos			48
32	Spartan			46.9	Priam			46.2	Alkmene			46
33	Gloster			44.9	Alkmene			44.2	Alkmene			44
34	Gloster			43.0	Alkmene			42.2	Pinova			42
35	McIntosh			41.0	Alkmene			40.3	Pinova			40
36	McIntosh			39.1	Alkmene			38.3	Freedom	0.6	0.0	38
37	McIntosh			37.1	Alkmene			36.3	Freedom			36
38	McIntosh	0.7	0.0	35.2	Greensleaves			34.3	Oldenburg			34
39	Jonafree			33.2	Greensleaves			32.3	Oldenburg			32
40	Jonafree			31.3	Clivia			30.3	Oldenburg	0.0	0.0	30
41	Freedom			29.4	Clivia			28.4	Oldenburg			28
42	Freedom			27.5	Pi-As 21,73			26.4	Oldenburg	1.0	0.0	26
43	Priam			25.6	Pi-As 21,73			24.4	Reanda			24
44	Priam			23.8	Pi-As 21,73	0.7		22.5	Reanda	5.3	0.9	22
45	Alkmene			21.9	Pi-As 21,73		0.6	20.5	Releta	1.0		20
46	Alkmene			20.1	Pi-As 21,73			18.6	Releta		0.0	18
47	Alkmene			18.4	Pi-As 21,73			16.6	Releika			16
48	Alkmene			16.6	Pi-As 21,73			14.7	Releika	0.8	7.4	14
49	Alkmene			15.0	Pi-As 21,73			12.0	Resi			12
50	Alkmene			13.5	Pi-As 21,73	1.0	2.7	10.0	Resi	0.0	2.5	10
51	Alkmene			12.0	Pi-As 21,73			8.0	Retina	3.8	3.4	8
52	Remo			10.8	Piglos		1.4	7.5	Retina	6.0	0.0	6
53	Remo			9.8	Piglos			6.0	Gibs Golden Gage			4
54	Remo			9.2	Piglos			4.9	Gibs Golden Gage			2

Fortsetzung von Abb. Anhang 2

Reihe	1			2			3						
	Baumnr.	Apfelsorte	2003 %	2004 %	Abstand* (m)	Apfelsorte	2003 %	2004 %	Abstand* (m)	Apfelsorte	2003 %	2004 %	Abstand* (m)
55	Remo				9.0	Piglos			4.5	TNR 31-35			
56	Remo		5.5	0.0	9.0	Piglos			4.5	TNR 31-35			
57	Remo				9.0	Redfree			4.5	TNR 31-35			
58	Remo				9.0	Redfree			4.5	TNR 31-35			
59	Remo				9.0	Idared			4.5	TNR 31-35			
60	Remo				9.0	Idared	9.5	0.0	4.5	TNR 31-35			
61	Piglos		3.5	6.3	9.0	Jonathan	0.0	3.9	4.5	TNR 31-35			
62	Piglos				9.0	Jonathan	7.0	3.8	4.5	TNR 31-35			
63	Piglos				9.0	G. Delicious	16.7	4.5	4.5	TNR 31-35			
64	Piglos		0.0	1.3	9.0	G. Delicious	6.5		4.5	TNR 31-35			
65	Piglos		2.1	0.0	9.0	Pinova			4.5	TNR 31-35			
66	Piglos		4.3	0.0	9.0	Pinova	12.5	0.0	4.5	TNR 31-35			
67	Greensleves		1.4	0.0	9.0	James Grieve	8.7	0.0	4.5	TNR 31-35			
68	Greensleves			0.0	9.0	James Grieve	3.4	28.5	4.5	TNR 31-35			
69	Greensleves				9.0	Starkrimson	3.1	0.0	4.5	TNR 31-35			
70	Greensleves				9.2	Starkrimson	0.9	14.8	4.9	Golden Delicious			2
71	Redfree				9.8	Remo	0.0	0.0	6.0	Golden Delicious			4
72	Redfree				10.8	Remo	0.0	5.4	7.5	Golden Delicious			6
73	Idared				12.0	Remo			9.2	McIntosh	0.0		8
74	Idared				13.5	Remo	0.0	0.9	11.0	McIntosh	1.9		10
75	Jonagold				15.0	Remo			12.8	McIntosh			12
76	Jonagold				16.6	Remo			14.7	Carola	0.8		14
77	Jonagold				18.4	Remo			16.6	Carola			16
78	Jonagold				20.1	Remo			18.6	Undine	0.0	0.0	18
79	Jonagold				21.9	Empire			20.5	Undine			20
80	Pinova		0.0	0.0	23.8	Empire			22.5	Pikant			22
81	Pinova				25.6	Liberty	0.0	0.0	24.4	Pikant	0.0	9.9	24
82	James Grieve				27.5	Liberty			26.4	Jonadel	1.7		26
83	James Grieve				29.4	Sire Prize			28.4	Jonadel			28
84	Remo				31.3	Sire Prize			30.3	Cox O.Renette	0.0	0.0	30
85	Remo				33.2	Discovery			32.3	Cox Orangen Renette			32
86	Remo				35.2	Discovery			34.3	Juno			34
87	Remo				37.1	Prima	0.5	0.0	36.3	Juno			36
88	Remo				39.1	Prima			38.3	Piros	1.5		38
89	Remo				41.0	Priscilla			40.3	Piros			40
90	Remo				43.0	Priscilla			42.2	Elstar			42
91	Remo				44.9	Alkmene			44.2	Elstar			44
92	Empire				46.9	Alkmene			46.2	Auralia			46
93	Empire				48.8	Alkmene			48.2	Auralia	0.0	0.0	48
94	Liberty				50.8	Alkmene			50.2	Pilot			50
95	Liberty				52.8	Alkmene			52.2	Pilot			52
96	Oldenburg				54.7	Rewena	0.0		54.2	Jonagold	0.0	0.0	54
97	Oldenburg				56.7	Rewena			56.2	Jonagold			56
98	Oldenburg				58.7	Rewena		0.0	58.2	Jonagold			58
99	Oldenburg				60.7	Rewena			60.2	Retina			60
100	Oldenburg		0.0	0.0	62.6	Rewena			62.2	Retina			62

Anteil rotlaubiger Nachkommen



8.6. Tabellen im Anhang

Tab. Anhang 1: Getestete SSR-Primer für die Bestimmung eines pollenspenderspezifischen SSR-Markers.

SSR- Primer	Sequenz 5'-3'
CH05A05-F-IRD800 CH05A05-R	TGT ATC AGT GGT TTG CAT GAA C GCA ACT CCC AACTCT TCT TTC T
CH04E03-F-IRD800 CH04E03-R	TTG AAG ATG TTT GGC TGT GC TGC ATG TCT GTC TCC TCC AT
CH05C07-F-IRD800 CH05C07-R	TGA TGC ATT AGG GCTTGT ACT T GGG ATG CAT TGC TAA ATA GGA T
CH03D11-F-IRD700 CH03D11-R	ACC CCA CAG AAA CCT TCT CC CAA CTG CAA GAA TCG CAG AG
CH04A12-F-IRD800 CH04A12-R	CAG CCT GCA ACT GCA CTT AT ATC CAT GGT CCC ATA AAC CA
CH04E02-F-IRD700 CH04E02-R	GGC GAT GAC TAC CAG GAA AA ATG TAG CCA AGC CAG CGT AT
CH04E05-F-IRD800 CH04E05-R	AGG CTA ACA GAA ATG TGG TTT G ATG GCT CCT ATT GCC ATC AT
CH02C02b-for-IRD700 CH02C02b-R	CCTTCAAGTTCAGCATCAAGACAA TGG AAA AAG TCA CAC TGC TCC
CH02F06-F-IRD800 CH02F06-R	CCC TCT TCA GAC CTG CAT ATG ACT GTT TCC AAG CGA TCA GG
CH05B06-F-IRD800 CH05B06-R	ACA AGC AAA CCT AAT ACC ACC G GAG ACT GGA AGA GTT GCA GAG G
CH03B10-F-IRD700 CH03B10-R	CCC TCC AAA ATA TCT CCT CCT C CGT TGT CCT GCT CAT CAT ACT C
CH03G12-F-IRD800 CH03G12-R	GCG CTG AAA AAG GTC AGT TT CAA GGA TGC GCA TGT ATT TG
CH02B03b-F-IRD800 CH02B03b-R	ATA AGG ATA CAA AAA CCC TAC ACA G GAC ATG TTT GGT TGA AAA CTT G

Tab. Anhang 2: Verwendete Primer zur Untersuchung transgener Pflanzen zur Amplifikation spezifischer Gensequenzen.

Primer	Primersequenz 5'- 3'	Annealing-Temperatur
<i>Dpo</i> forward	5'- GGA CAT ACC GTG GAA GTG- 3'	60 °C
<i>Dpo</i> reverse	5'- ATT GAG CCG GAG TTG ATG- 3'	
<i>H-Dpo</i> forward	5'- CAC CAT CAC CAT CAC CAT AC- 3'	60 °C
<i>H-Dpo</i> reverse	5'- ATT GAG CCG GAG TTG ATG- 3'	
<i>attE</i> forward	5'- AGA TTG GTG CAT CTG CGA G- 3'	60 °C
<i>attE</i> reverse	5'- CCG AAG TTA GGC TCC CAA GA- 3'	
<i>T4L</i> forward	5'- ATT GGC ATC GGT CAT TTG CTT ACA- 3'	60 °C
<i>T4L</i> reverse	5'-TAT ACG CGT CCC AAG TGC CAG TT- 3'	
<i>nptII</i> forward	5'- ACA AGA TGG ATT GCA CGC AGG- 3'	56°C
<i>nptII</i> reverse	5'- AAC TCG TCA AGA AGG CGA TAG- 3'	
<i>nos</i> forward	5'- CAC TGA TAG TTT AAA CTG AAG GCG G- 3'	55°C
<i>nos</i> reverse	5'- ACT ATT CGG CTA TGA CTG GGA ACA A- 3'	
<i>EF-α</i> forward	5'- ATT GTG GTC ATT GG(CT) CA(CT) GT- 3'	56°C
<i>EF-α</i> reverse	5'- CCA ATC TTG TA(AGC) ACA TCC TG- 3'	

Tab. Anhang 3: Ergebnisse der SSR-Analyse aller Apfelsorten innerhalb des Versuchsquartiers für die Untersuchungen zum vertikalen Gentransfer.

Sorte	SSR-Marker		CH05A05		CH04E03		CH05C07		CH03D11		CH04A12	
	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2
Alkmene	0	0	197	207	124	142	120	120	143	175		
Auralia	221	233	191	197	122	122	122	126	145	175		
Carola	199	223	197	197	124	134	116	120	159	179		
Clivia	203	233	187	199	112	124	120	124	159	165		
Cox Orangen Renette	0	0	191	197	122	124	120	124	163	193		
Discovery	217	233	209	226	112	136	120	120	163	195		
Elstar	219	219	191	199	124	138	120	120	0	0		
Empire	219	227	187	199	138	148	120	126	177	177		
Freedom	203	223	199	199	136	138	120	120	~	~		
Gibbs Golden Gage	219	219	187	199	110	148	120	128	191	191		
Gloster	219	221	198	198	144	148	120	124	167	175		
Golden delicious	217	221	198	198	138	148	120	120	173	179		
Greensleeves	217	217	191	198	124	138	120	120	177	183		
Idared	197	229	187	199	138	140	120	124	179	179		
James grieves	215	219	191	229	124	138	120	120	181	191		
Jonadel	197	213	198	198	138	138	120	124	177	177		
Jonafree	221	221	~	~	134	134	120	124	~	~		
Jonagold	219	221	~	~	142	152	120	124	~	~		
Jonathan	197	221	185	195	138	138	124	124	177	191		
Juno	217	221	198	198	138	140	120	120	161	181		
Liberty	219	221	179	198	112	138	120	120	169	173		
Mcintosh	219	225	183	198	138	140	126	126	173	177		
Oldenburg	203	233	200	213	112	138	120	124	168	179		
Pi-As 21,73	219	229	192	198	110	122	120	124	161	181		
Piglos	219	221	198	198	146	148	120	124	167	177		
Pikant	0	0	195	195	124	148	116	124	162	196		
Pilot	203	219	198	198	128	138	124	119	163	193		
Pinova	203	221	191	198	124	148	122	122	167	181		
Piros	207	231	0	0	112	128	120	120	177	177		
Priam	199	221	195	203	146	148	124	120	181	191		
Prima	199	215	183	197	140	148	120	126	169	173		
Priscilla	217	217	0	0	112	140	114	122	173	173		
Realka	207	233	195	197	134	140	114	122	173	181		
Reanda	207	231	197	205	112	150	122	122	167	175		
Redfree	0	0	193	198	114	114	120	120	0	0		
Reglindis	219	231	198	198	112	112	120	120	169	177		
Reka	219	219	189	198	124	126	116	119	175	193		
Releika	221	231	197	197	112	124	120	120	161	181		
Releta	203	213	185	189	114	142	124	119	161	191		
Remo	207	219	179	191	112	124	120	120	175	181		
Rene	203	219	205	205	124	148	114	116	169	193		
Resi	203	203	177	195	124	148	120	124	169	177		
Retina	219	231	197	203	112	114	118	124	179	183		
Rewena	0	0	179	207	112	114	119	119	167	175		
Rome beauty	203	221	187	203	112	138	122	128	169	175		
Sire prize	217	221	198	198	110	138	122	128	169	181		
Spartan	221	225	198	198	112	138	118	124	175	175		
Starkrimson	219	221	197	201	112	146	120	124	175	175		
Undine	199	221	198	198	114	114	120	124	181	193		
TNR 31-35	203	205	185	195	138	146	124	124	177	191		
Anzahl detektierte Allele	17		22		17		9		21			

die detektierten Allele sind in bp angegeben; 0: Nullallel; ~ nicht analysiert; Sorten mit polymorphen Banden sind fett gedruckt (Allelgrößenabweichung über 2bp)

Fortsetzung von Tab. Anhang 3

Sorte	SSR-Maker		CH04E02		CH04E05		CH02C02b		CH03B10		CH02F06	
	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2
Alkmene	149	155	182	200	109	113	102	104	150	158		
Auralia	149	155	182	200	109	113	102	118	150	158		
Carola	151	159	174	198	113	113	118	118	150	152		
Clivia	151	159	174	200	105	109	102	104	150	158		
Cox Orangen Renette	151	151	174	200	105	117	104	120	150	154		
Discovery	157	165	174	174	115	123	102	108	144	158		
Elstar	159	159	174	198	109	113	102	104	144	158		
Empire	143	153	174	210	109	113	98	108	138	158		
Freedom	159	159	174	200	105	111	100	102	152	154		
Gibbs golden gage	159	159	172	172	105	111	104	118	138	158		
Gloster	143	153	174	202	105	111	102	106	146	150		
Golden delicious	157	159	174	174	113	121	104	118	144	158		
Greensleeves	151	157	174	202	111	119	104	108	150	158		
Idared	157	159	174	174	105	111	102	120	150	158		
James grieves	149	153	174	200	75	115	108	118	150	154		
Jonadel	153	159	174	204	109	113	98	118	138	158		
Jonafree	149	159	174	200	105	111	104	118	156	158		
Jonagold	149	159	194	206	105	111	104	118	0	0		
Jonathan	149	159	174	202	111	111	104	118	150	158		
Juno	149	159	198	210	109	115	98	118	150	158		
Liberty	153	159	198	202	109	111	102	114	0	0		
Mcintosh	143	165	202	210	109	115	106	114	0	0		
Oldenburg	153	159	174	222	103	111	100	104	152	158		
Pi-As 21,73	145	159	194	196	111	115	102	104	156	156		
Piglos	143	153	174	204	105	111	102	108	0	0		
Pikant	159	159	204	204	109	111	108	120	0	0		
Pilot	159	159	174	202	109	111	104	108	156	158		
Pinova	159	159	0	0	111	111	102	102	0	0		
Piros	151	151	174	204	109	111	104	104	152	158		
Priam	151	159	204	222	111	117	104	120	0	0		
Prima	157	165	174	210	111	117	102	106	156	158		
Priscilla	151	159	204	204	111	117	98	108	146	150		
Realka	143	159	202	202	105	111	108	120	148	152		
Reanda	151	159	202	202	111	125	102	104	150	158		
Redfree	151	151	0	0	109	115	104	104	144	150		
Reglindis	155	159	174	202	113	113	100	104	0	0		
Reka	151	159	202	202	109	115	108	116	148	154		
Releika	159	159	174	202	111	115	104	104	156	160		
Releta	149	153	202	222	111	125	100	120	150	152		
Remo	143	153	202	202	109	115	104	120	150	154		
Rene	151	159	174	202	111	117	104	120	150	154		
Resi	151	159	200	200	109	115	104	104	152	156		
Retina	155	159	174	222	111	117	102	102	0	0		
Rewena	151	159	202	222	111	115	104	104	150	150		
Rome beauty	159	159	202	202	111	115	104	104	152	160		
Sire prize	159	159	174	202	111	115	104	104	144	150		
Spartan	143	153	174	174	111	115	104	104	140	148		
Starkrimson	153	155	174	202	111	119	98	102	140	150		
Undine	151	159	174	202	117	117	104	108	146	146		
TNR 31-35	149	159	172	200	109	111	104	118	148	158		
Anzahl detektierte Allele	9		12		13		10		12			

die detektierten Allele sind in bp angegeben; 0: Nullallel; ~ nicht analysiert; Sorten mit polymorphen Banden sind fett gedruckt (Allelgrößenabweichung über 2bp);

Tab. Anhang 4: Anzahl und Keimfähigkeit der ausgesäten Samen aus der künstlichen Bestäubung der Pollenfängersorten 2003 und 2004.

Pollenfängersorte	Kreuzung 2003			Kreuzung 2004		
	Samen ausgesät ¹	gekeimt ¹	Keimung %	Samen ausgesät ¹	gekeimt ¹	Keimung %
Auralia	16	13	81,3	56	35	62,5
Carola	151	146	96,7	~	~	~
Clivia	157	155	98,7	99	81	81,8
Cox Orangen R.	13	11	84,6	~	~	~
Discovery	9	7	77,8	~	~	~
Freedom	104	92	88,5	42	42	100,0
Gloster	~	~	~	63	35	55,6
Golden Delicious	266	262	98,5	134	131	97,8
Greensleaves	~	~	~	19	11	57,9
Idared	27	26	96,3	~	~	~
James Grieve	~	~	~	35	16	45,7
Jonadel	54	52	96,3	~	~	~
Jonagold	75	37	49,3	~	~	~
Jonathan	~	~	~	119	115	96,6
Liberty	46	44	95,7	34	26	77,8
McIntosh	96	95	99,0	53	36	67,9
Oldenburg	82	75	91,5	166	84	50,6
Pi-As 21,73	87	83	95,4	155	102	65,8
Piglos	~	~	~	~	~	~
Pikant	60	60	100,0	30	7	23,3
Pinova	144	143	99,3	111	108	97,3
Piros	29	27	93,1	~	~	~
Priam	~	~	~	188	132	70,2
Prima	117	117	100,0	98	91	92,9
Realka	~	~	~	84	31	36,9
Reanda	121	114	94,2	20	7	35,0
Reglindis	104	103	99,0	98	98	100,0
Reka	122	113	92,6	34	19	55,9
Releika	~	~	~	119	46	38,7
Releta	134	129	96,3	126	40	31,7
Remo	~	~	~	94	59	62,8
Resi	121	104	86,0	103	76	73,8
Retina	~	~	~	58	36	62,1
Rewena	52	45	86,5	119	70	58,8
Rome Beauty	145	140	96,6	96	80	83,3
Starkrimson	~	~	~	~	~	~
Spartan	102	99	97,1	39	35	89,7
Undine	70	67	95,7	~	~	~
Durchschnitt	2504	2359	92,1	2392		66,9

~ nicht analysiert; ¹ Anzahl

Tab. Anhang 5: Anzahl und Keimfähigkeit der Samen der Pollenfängersorten aus freier Abblüte 2003 und 2004.

Pollenfänger- sorte	2003				2004					
	Baum- nr.	Früchte ¹	Samen ¹	nicht gekeimt ¹ %	Keimrate %	Baum- nr.	Früchte ¹	Samen ¹	nicht gekeimt ¹ %	Keimrate %
Golden Delicious	1_03	30	212	19	91,0	1_04	20	162	13	92,0
Prima	1_17	30	125	16	87,2	1_17	20	186	34	81,7
Mc Intosh	1_38	20	149	11	92,8	1_38	8	114	11	90,4
Remo	1_56	20	200	0	100,0	1_56	20	151	0	100,0
Remo	1_61	20	133	20	85,0	1_61	20	143	15	89,5
Piglos	1_64	12	51	1	97,1	1_64	20	78	3	96,2
Piglos	1_65	9	50	3	94,4	1_65	15	8	0	100,0
Piglos	1_66	20	187	1	99,5	1_66	20	44	2	95,5
Greensleaves	1_67	18	75	6	92,0	1_67	6	79	0	100,0
Pinova	1_80	20	157	4	97,1	1_80	20	191	15	92,1
Oldenburg	1_100	30	116	5	95,8	1_100	20	100	13	87,0
Discovery	2_03	20	118	24	79,7	2_03	9	64	9	85,9
Reka	2_12	20	160	11	93,1	2_12	20	118	10	91,5
Reglindis	2_15	8	68	7	89,7	2_15	20	165	40	75,8
Rome Beauty	2_25	20	127	12	90,6	2_25	20	168	30	82,1
Freedom	2_29	12	101	5	94,8	2_29	20	157	28	82,2
Pi-As, 21,73	2_45	20	161	18	88,8	2_45	20	156	2	98,7
Pi-As, 21,73	2_50	20	111	14	87,4	2_50	20	162	16	90,1
Piglos	2_52	~	~	~	~	2_52	20	80	9	88,8
Idared	2_60	18	97	2	97,9	2_60	20	108	6	94,4
Jonathan	2_61	20	93	6	93,5	2_61	20	161	3	98,1
Jonathan	2_62	20	47	4	91,5	2_62	20	152	47	69,1
Golden Delicious	2_63	12	93	9	90,2	2_63	20	137	73	46,7
Golden Delicious	2_64	15	114	6	94,5	2_64	~	~	~	~
Pinova	2_66	16	139	3	98,1	2_66	20	101	42	58,4
James Grieve	2_67	5	23	0	100,0	2_67	15	21	0	100,0
James Grieve	2_68	15	59	0	100,0	2_68	15	14	0	100,0
Starkrimson	2_69	20	108	10	90,7	2_69	4	17	0	100,0
Starkrimson	2_70	20	118	10	91,5	2_70	4	29	2	93,1
Remo	2_71	20	138	84	39,2	2_71	20	111	0	100,0
Remo	2_72	9	21	0	100,0	2_72	20	106	13	87,7
Remo	2_74	20	122	3	97,5	2_74	20	110	0	100,0
Liberty	2_81	20	109	0	100,0	2_81	20	34	0	100,0
Prima	2_87	20	184	2	98,9	2_87	5	26	4	84,6
Rewena	2_98	20	198	23	88,4	2_98	15	81	0	100,0
Realka	3_03	20	109	22	79,8	3_03	15	62	0	100,0
Spartan	3_09	18	93	2	97,8	3_09	18	93	2	97,8
Gloster	3_12	16	89	2	97,8	3_12	18	118	10	91,5
Rome Beauty	3_16	20	151	10	93,4	3_16	15	102	3	97,1
Priam	3_20	20	132	22	83,3	3_20	18	125	0	100,0
Clivia	3_23	20	124	3	97,6	3_23	17	108	2	98,1
Piglos	3_27	20	134	0	100,0	3_27	20	110	0	100,0
Freedom	3_36	20	175	5	97,1	3_36	19	111	63	43,2
Oldenburg	3_40	20	191	9	95,3	3_40	19	98	47	52,0
Oldenburg	3_42	20	103	0	100,0	3_42	20	90	0	100,0
Reanda	3_44	20	122	27	77,9	3_44	20	121	13	89,3
Releta	3_45	20	102	1	99,0	3_46	20	108	5	95,4
Releika	3_48	18	135	9	93,3	3_48	15	122	0	100,0
Resi	3_50	10	172	6	96,5	3_50	20	132	10	92,4
Retina	3_51	10	64	11	82,8	3_51	15	91	4	95,6
Retina	3_52	10	50	0	100,0	3_52	3	28	0	100,0
Mc Intosh	3_73	10	75	2	97,3	3_73	~	~	~	~
Mc Intosh	3_74	20	107	2	98,1	3_74	~	~	~	~
Carola	3_76	18	139	7	95,0	3_76	~	~	~	~
Undine	3_78	20	135	13	90,4	3_78	9	57	6	89,5
Pikant	3_81	20	99	3	97,0	3_81	15	79	8	89,9
Jonadel	3_82	20	122	3	97,5	3_82	~	~	~	~
Cox Orangen Renk	3_84	20	104	87	16,3	3_84	9	40	11	72,5
Piros	3_88	13	69	1	98,6	3_88	~	~	~	~
Auralla	3_93	15	70	4	94,3	3_93	20	141	55	61,0
Jonagold	3_96	6	46	2	95,7	3_96	20	76	58	23,7
Gesamt		1063	6876	592	91,4		921	4933	679	86,6

~ nicht analysiert; ¹ Anzahl

Tab. Anhang 6: Ergebnisse der SSR-Analyse der grünlaubigen Nachkommen aus der Kreuzung der Pollenfängersorten x ‚TNR 31-35‘ im Jahr 2003.

SSR		CH02C02b		CH03B10		CH03D11		CH04E05		CH05A05		CH05C07	
		Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2
TNR 31-35		109	111	104	118	124	124	172	200	203	205	138	146
Muttersorte	Bezeichnung der Nachkommen												
Carola		113	113					174	198	199	223	124	134
	Grün C1	113	113					174	198	189	199	124	134
	Grün C2	113	113					174	200	199	205	112	134
	Rot C1	109	113					172	174	199	205	134	146
	Rot C2	109	113					172	174	205	223	124	146
	Rot C3	109	113					172	174	205	223	124	138
	Rot C4	109	113					174	200	199	205	134	146
	Rot C5	109	113					172	174	205	223	134	146
Freedom		113	121	100	102	120	120	174	198	203	223	136	138
	Grün F1			102	118	120	120			203	235	124	138
	Grün F2			100	104	120	120			223	235	112	138
	Grün F3			102	118	120	120			223	235	112	138
	Grün F4			102	104	120	120			~	~	124	138
	Grün F5			100	104	120	124			203	223	124	138
	Grün F6			100	104	120	124			223	223	124	138
	Grün F7			102	104	120	120			203	219	124	138
	Grün F8			102	118	120	120			223	235	112	138
	Grün F9			102	104	120	120			193	203	136	146
	Grün F10			100	104	120	120			193	203	136	146
	Grün F11			~	~	120	120			~	~	132	138
	Grün F12			100	104	120	120			203	219	136	138
	Rot F1			102	118	120	124			203	205	136	146
	Rot F2			102	118	120	124			205	223	136	146
	Rot F3			102	118	120	124			203	205	136	146
	Rot F4			102	118	120	124			205	223	138	146
	Rot F5			102	104	120	124			203	205	138	146
Golden Delicious		113	121			120	120			217	221		
	Grün GD1	113	121			120	120			217	221		
	Grün GD2	113	113			120	120			217	219		
	Rot GD1	109	113			120	124			205	221		
	Rot GD2	109	113			120	124			203	217		
	Rot GD3	109	121			120	124			203	221		
	Rot GD4	109	113			120	124			205	221		
	Rot GD5	109	113			120	124			205	217		
Idared				102	120					197	229	138	140
	Grün I1			102	102					205	229	122	140
	Grün I2			102	120					197	197	140	140
	Grün I3			102	120					197	229	140	140
	Grün I4			104	120					197	205	140	146
	Rot I1			102	118					197	205	140	146
	Rot I2			104	120					205	229	138	140
	Rot I3			102	118					197	205	138	140
	Rot I4			104	120					205	229	138	140
	Rot I5			102	118					205	229	138	140

~ kein Allel detektiert; grüne Schrift: Allele der Mutter; rote Schrift: Allele von ‚TNR 31-35‘; schwarze Schrift: Allele, die weder der Muttersorte noch ‚TNR 31-35‘ zu zuordnen sind; lila Schrift: Allele können der Muttersorte und ‚TNR 31-35‘ zugeordnet werden

Fortsetzung von Tab. Anhang 6

SSR	CH02C02b		CH03B10		CH03D11		CH04E05		CH05A05		CH05C07	
	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2
TNR 31-35	109	111	104	118	124	124	172	200	203	205	138	146
Muttersorte	Bezeichnung der Nachkommen											
Jonadel	109	113	98	118					197	213		
Grün Jn1	113	113	108	118					197	215		
Grün Jn2	113	113	98	120					197	215		
Grün Jn3	109	113	98	106					189	197		
RotJn1	109	113	104	118					205	213		
RotJn2	109	113	118	118					205	213		
RotJn3	109	113	104	118					205	213		
RotJn4	109	109	104	118					203	213		
RotJn5	109	113	104	102					203	213		
Pi-As 21,73			102	104					219	229	110	122
Grün PiAs1			102	104					205	219	122	122
Rot PiAs1			102	118					203	219	122	146
Rot PiAs2			102	104					205	229	110	146
Rot PiAs3			102	104					203	219	122	138
Rot PiAs4			104	118					205	219	122	138
Rot PiAs5			102	104					205	229	122	146
Pinova			102	102					203	221	122	146
Grün Pn1			102	102					203	203	122	146
Rot Pn1			102	104					205	203	122	146
Rot Pn2			102	104					205	221	138	146
Rot Pn3			102	104					203	205	146	146
Rot Pn4			102	118					205	221	122	146
Rot Pn5			102	104					205	221	122	138
Prima			106	102	120	126			199	215		
Grün Pr1			102	115	122	126			215	219		
Rot Pr1			104	102	120	124			205	215		
Rot Pr2			104	102	124	126			205	215		
Rot Pr3			106	118	120	124			205	215		
Rot Pr4			106	118	120	124			205	215		
Rot Pr5			106	118	124	126			205	215		
Reanda	111	125			122	122			207	231		
Grün Ra1	111	123			122	122			207	219		
Grün Ra2	115	125			122	122			207	231		
Grün Ra3	111	115			122	122			231	231		
Rot Ra1	111	125			122	124			205	207		
Rot Ra2	111	111			122	124			203	207		
Rot Ra3	111	125			122	124			205	207		
Rot Ra4	111	111			122	124			205	207		
Rot Ra5	111	125			122	124			205	207		

~ kein Allel detektiert; grüne Schrift: Allele der Mutter; rote Schrift: Allele von ‚TNR 31-35‘; schwarze Schrift: Allele, die weder der Muttersorte noch ‚TNR 31-35‘ zu zuordnen sind; lila Schrift: Allele können der Muttersorte und ‚TNR 31-35‘ zugeordnet werden.

Fortsetzung von Tab. Anhang 6

SSR		CH02C02b		CH03B10		CH03D11		CH04E05		CH05A05		CH05C07	
		Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2
TNR 31-35		109	111	104	118	124	124	172	200	203	205	138	146
Muttersorte Bezeichnung der Nachkommen													
Reglindis		113	113			120	120			219	231	112	112
	Grün R1	113	115			116	120			217	219	112	138
	Grün R2	113	113			116	120			215	219	112	132
	Grün R3	113	113			120	120			219	231	112	146
	Grün R4	113	113			120	120			219	231	112	112
	Grün R5	113	113			120	120			217	219	112	122
	Grün R6	73	113			120	120			~	~	112	138
	Grün R7	113	113			120	120			~	~	112	125
	Grün R8	113	113			120	120			~	~	112	112
	Grün R9	113	113			120	120			219	229	112	112
	Grün R10	113	113			120	120			217	231	112	112
	Grün R11	109	113			120	120			~	~	112	148
	Grün R12	113	129			120	124			217	219	112	124
	Grün R13	113	119			120	124			157	219	112	124
	Grün R14	113	113			116	120			229	231	110	112
	Grün R15	109	113			120	124			219	229	112	112
	Grün R16	113	113			120	120			215	231	112	140
	Grün R17	113	113			120	120			215	231	112	134
	Grün R18	113	113			120	120			219	219	~	~
	Grün R19	113	113			120	120			229	231	112	140
	Grün R20	113	113			116	120			219	231	112	134
	Grün R21	113	113			120	120			215	231	112	138
	Grün R22	113	113			120	120			~	~	112	134
	Grün R23	113	113			120	120			215	219	112	134
	Grün R24	113	113			116	120			~	~	112	112
	Grün R25	~	~			120	120			201	219	112	122
	Grün R26	113	113			120	120			219	219	112	138
	Rot R1	109	113			120	124			205	219	112	138
	Rot R2	109	113			120	124			205	219	112	138
	Rot R3	109	113			120	124			205	231	112	146
	Rot R4	109	113			120	124			205	231	112	146
	Rot R5	109	113			120	124			205	231	112	138
Reka				108	116	116	119			219	219		
	Grün Rk1			108	116	116	119			219	219		
	Rot Rk1			104	116	124	119			205	219		
	Rot Rk2			108	118	124	119			205	219		
	Rot Rk3			116	118	124	119			205	219		
	Rot Rk4			116	118	~	~			205	219		
	Rot Rk5			116	118	124	119			205	219		
Releta				100	120	124	119					114	142
	Grün Rl1			100	120	112	124					114	142
	Rot Rl1			104	120	119	124					142	146
	Rot Rl2			104	120	124	124					114	146
	Rot Rl3			104	120	119	124					114	138
	Rot Rl4			104	120	119	124					142	146
	Rot Rl5			104	120	119	124					138	142
Resi						120	124	200	200	203	203	124	148
	Grün Rs1					120	124	200	200	203	203	124	124
	Grün Rs2					120	120	200	200	203	203	124	148
	Rot Rs1					120	124	200	200	205	203	146	148
	Rot Rs2					120	124	172	200	205	203	124	138
	Rot Rs3					124	124	172	200	205	203	124	146
	Rot Rs4					124	124	200	200	205	203	124	146
	Rot Rs5					120	124	200	200	205	203	146	148

~ kein Allel detektiert; grüne Schrift: Allele der Mutter; rote Schrift: Allele von ‚TNR 31-35‘; schwarze Schrift: Allele, die weder der Muttersorte noch ‚TNR 31-35‘ zu zuordnen sind; lila Schrift: Allele können der Muttersorte und ‚TNR 31-35‘ zugeordnet werden.

Tab. Anhang 7: Ergebnisse der SSR-Analyse der grünlaubigen Nachkommen aus der Kreuzung der Pollenfängersorten x ‚TNR 31-35‘ im Jahr 2004.

	SSR	CH03D11		CH04A12		CH04E03		CH05A05		CH05C07	
		Allel1	Allel2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2
TNR 31-35		124	124	203	205	138	146	185	195	177	191
Bezeichnung der Muttersorte	Nachkommen										
Clivia						187	199			112	124
	Grün C1					185	199			112	112
	Grün C2					188	199			112	112
	Rot C1					185	199			112	146
	Rot C2					187	195			112	138
	Rot C3					187	195			124	138
	Rot C4					185	199			124	146
	Rot C5					187	195			112	146
Freedom		120	120			199	199				
	Grün F1	118	120			195	199				
	Grün F2	118	120			195	199				
	Rot F1	120	124			195	199				
	Rot F2	120	124			195	199				
	Rot F3	120	124			195	199				
	Rot F4	120	124			185	199				
	Rot F5	120	124			185	199				
Golden Delicious		120	120			199	205	217	221		
	Grün GD1	120	124			185	199	217	221		
	Grün GD2	~	~			~	~	~	~		
	Rot GD1	120	124			185	199	203	217		
	Rot GD2	120	124			185	199	205	217		
	Rot GD3	120	124			185	199	205	217		
	Rot GD4	120	124			185	199	205	217		
	Rot GD5	120	124			185	199	205	217		
Priam						195	203	199	221		
	Grün Pm1					197	203	199	199		
	Rot Pm1					185	195	199	205		
	Rot Pm2					195	195	199	205		
	Rot Pm3					185	203	205	221		
	Rot Pm4					185	195	199	205		
	Rot Pm5					195	195	205	221		
Prima								199	215	140	148
	Grün Pr1							199	209	136	140
	Grün Pr2							199	219	138	140
	Grün Pr3							201	215	136	148
	Grün Pr4							199	203	134	148
	Rot Pr1							199	205	146	148
	Rot Pr2							199	205	146	148
	Rot Pr3							199	205	146	148
	Rot Pr4							203	215	146	148
	Rot Pr5							203	215	146	148
Pinova						191	198			124	148
	Grün Pn1					197	198			138	148
	Grün Pn2					189	198			124	124
	Grün Pn3					~	~			~	~
	Grün Pn4					187	191			124	124
	Grün Pn5					191	191			124	138
	Grün Pn6					191	197			134	148
	Grün Pn7					191	191			124	148
	Grün Pn8					189	191			138	148
	Grün Pn9					189	191			138	148
	Rot Pn1					191	195			124	146
	Rot Pn2					195	198			138	148
	Rot Pn3					185	198			124	146
	Rot Pn4					185	198			124	138
	Rot Pn5					195	198			124	146

~ kein Allel detektiert; grüne Schrift: Allele der Mutter; rote Schrift: Allele von ‚TNR 31-35‘; schwarze Schrift: Allele, die weder der Muttersorte noch ‚TNR 31-35‘ zu zuordnen sind; lila Schrift: Allele können der Muttersorte und ‚TNR 31-35‘ zugeordnet werden.

Fortsetzung von Tab. Anhang 7

SSR		CH03D11		CH04A12		CH04E03		CH05A05		CH05C07	
		Allel1	Allel2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2
TNR 31-35		124	124	203	205	138	146	185	195	177	191
Bezeichnung der Muttersorte											
Nachkommen											
Rome Beauty		122	128	169	175	187	203				
	Grün RB1	122	126	169	175	203	200				
	Grün RB2	122	124	167	169	185	203				
	Grün RB3	124	128	167	175	179	187				
	Grün RB4	122	124	169	169	187	195				
	Rot RB1	124	128	169	177	187	195				
	Rot RB2	122	124	169	191	195	203				
	Rot RB3	122	124	175	191	195	203				
	Rot RB4	124	128	169	177	185	203				
	Rot RB5	124	128	169	191	185	203				
	Retina						197	203	219	231	112
	Grün Rt1					179	203	219	219	112	112
	Rot Rt1					195	203	203	219	112	138
	Rot Rt2					185	197	205	231	~	~
	Rot Rt3					185	197	203	219	~	~
	Rot Rt4					195	197	203	231	112	146
	Rot Rt5					185	203	203	231	112	138
Resi						177	195			124	148
	Grün Rs1					189	195			124	140
	Grün Rs2					171	177			124	140
	Grün Rs3					173	177			124	124
	Rot Rs1					185	195			124	146
	Rot Rs2					195	195			124	146
	Rot Rs3					185	195			134	146
	Rot Rs4					177	195			124	146
	Rot Rs5					195	195			124	146

~ kein Allel detektiert; grüne Schrift: Allele der Mutter; rote Schrift: Allele von ‚TNR 31-35‘; schwarze Schrift: Allele, die weder der Muttersorte noch ‚TNR 31-35‘ zu zuordnen sind; lila Schrift: Allele können der Muttersorte und ‚TNR 31-35‘ zugeordnet werden.

Tab. Anhang 8: Anzahl der rotlaubigen und grünlaubigen Sämlinge nach freier Abblüte im Jahr 2003 und 2004.

Pollenfänger- sorte	2003				Anteil roter Pflanzen %	2004				Anteil roter Pflanzen %
	Baumnr.	Sämlinge (Anz.)				Baumnr.	Sämlinge (Anz.)			
	gesamt	rot	grün		gesamt	rot	grün			
Golden Delicious	1 03	193	1	192	0,5	1 04	149	0	149	0,0
Prima	1 17	109	2	107	1,8	1 17	152	1	151	0,7
Mc Intosh	1 38	138	1	137	0,7	1 38	103	0	103	0,0
Remo	1 56	200	11	189	5,5	1 56	151	0	151	0,0
Remo	1 61	113	4	109	3,5	1 61	128	8	120	6,3
Piglos	1 64	50	0	50	0,0	1 64	75	1	74	1,3
Piglos	1 65	47	1	46	2,1	1 65	8	0	8	0,0
Piglos	1 66	186	8	178	4,3	1 66	42	0	42	0,0
Greensleaves	1 67	69	1	68	1,4	1 67	79	0	79	0,0
Pinova	1 80	153	0	153	0,0	1 80	176	0	176	0,0
Oldenburg	1 100	111	0	111	0,0	1 100	87	0	87	0,0
Discovery	2 03	94	0	94	0,0	2 03	55	1	54	1,8
Reka	2 12	149	0	149	0,0	2 12	108	0	108	0,0
Reglindis	2 15	61	0	61	0,0	2 15	125	0	125	0,0
Rome Beauty	2 25	115	1	114	0,9	2 25	138	0	138	0,0
Freedom	2 29	96	1	95	1,0	2 29	129	0	129	0,0
PI-As, 21,73	2 45	143	1	142	0,7	2 45	154	1	153	0,6
PI-As, 21,73	2 50	97	1	96	1,0	2 50	146	4	142	2,7
Piglos	2 52	~	~	~	~	2 52	71	1	70	1,4
Idared	2 60	95	9	86	9,5	2 60	102	0	102	0,0
Jonathan	2 61	87	0	87	0,0	2 61	158	6	152	3,9
Jonathan	2 62	43	3	40	7,0	2 62	105	4	101	3,8
Golden Delicious	2 63	84	14	70	16,7	2 63	64	3	61	4,5
Golden Delicious	2 64	108	7	101	6,5	2 64	~	~	~	~
Pinova	2 66	136	17	119	12,5	2 66	59	0	59	0,0
James Grieve	2 67	23	2	21	8,7	2 67	21	0	21	0,0
James Grieve	2 68	59	2	57	3,4	2 68	14	4	10	28,6
Starkrimson	2 69	98	3	95	3,1	2 69	17	0	17	0,0
Starkrimson	2 70	108	1	107	0,9	2 70	27	4	23	14,8
Remo	2 71	54	0	54	0,0	2 71	111	0	111	0,0
Remo	2 72	21	0	21	0,0	2 72	93	5	88	5,4
Remo	2 74	119	0	119	0,0	2 74	110	1	109	0,9
Liberty	2 81	109	0	109	0,0	2 81	34	0	34	0,0
Prima	2 87	182	1	181	0,5	2 87	22	0	22	0,0
Rewena	2 98	175	0	175	0,0	2 98	81	0	81	0,0
Realka	3 03	87	2	85	2,3	3 03	62	1	61	1,6
Spartan	3 09	91	0	91	0,0	3 09	56	0	56	0,0
Gloster	3 12	87	1	86	1,1	3 12	108	0	108	0,0
Rome Beauty	3 16	141	0	141	0,0	3 15	99	0	99	0,0
Priam	3 20	110	0	110	0,0	3 20	125	1	124	0,8
Clivia	3 23	121	0	121	0,0	3 23	106	0	106	0,0
Piglos	3 27	134	0	134	0,0	3 28	110	0	110	0,0
Freedom	3 36	170	1	169	0,6	3 36	48	0	48	0,0
Oldenburg	3 40	182	0	182	0,0	3 40	51	0	51	0,0
Oldenburg	3 42	103	1	102	1,0	3 42	90	0	90	0,0
Reanda	3 44	95	5	90	5,3	3 44	108	1	107	0,9
Releta	3 45	101	1	100	1,0	3 46	103	0	103	0,0
Releika	3 48	126	1	125	0,8	3 48	122	9	113	7,4
Resi	3 50	166	0	166	0,0	3 50	122	3	119	2,5
Retina	3 51	53	2	51	3,8	3 51	87	3	84	3,4
Retina	3 52	50	3	47	6,0	3 52	28	0	28	0,0
Mc Intosh	3 73	73	0	73	0,0	3 73	~	~	~	~
Mc Intosh	3 74	105	2	103	1,9	3 74	~	~	~	~
Carola	3 76	132	1	131	0,8	3 76	~	~	~	~
Undine	3 78	122	0	122	0,0	3 78	51	0	51	0,0
Pikant	3 81	96	0	96	0,0	3 81	71	7	64	9,9
Jonadel	3 82	119	2	117	1,7	3 82	~	~	~	~
Cox Orangen Renet	3 84	17	0	17	0,0	3 84	29	0	29	0,0
Piros	3 88	68	1	67	1,5	3 88	~	~	~	~
Auralia	3 93	66	0	66	0,0	3 93	86	0	86	0,0
Jonagold	3 96	44	0	44	0,0	3 96	18	0	18	0,0
Gesamt		6284	115	6169	1,8		4774	69	4705	1,4

~ nicht analysiert

Tab. Anhang 9: Ergebnisse der SSR-Analyse der rotlaubigen Nachkommen aus freier Abblüte im Jahr 2003.

	SSR	CH05A05		CH04E03		CH05C07		CH04A12		CH04E02	
		Allel 1	Allel 2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2
TNR 31-35		203	205	185	195	138	146	177	191	149	159
Bezeichnung des rotlaubigen Muttersorte Nachkommen											
Golden Delicious		217	221	198	198						
1_03a		203	221	185	198						
Prima				183	197			169	173	157	165
1_17a				183	195			173	191	159	165
1_17b				185	197			173	177	159	165
Rome Beauty								169	175		
1_38a								169	191		
Remo		207	219	179	191					143	153
1_56a		203	219	~	~					143	159
1_56b		203	219	185	191					143	159
1_56c		203	219	185	191					143	159
1_56d		203	219	195	191					143	149
1_56e		203	219	~	~					143	159
1_56f		203	219	185	191					149	153
1_56g		203	219	195	191					149	153
1_56h		203	219	185	191					143	149
1_56i		203	219	~	~					153	159
1_56j		203	219	~	~					153	159
1_56k		~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
Remo		207	219	179	191					143	153
1_61a		203	219	191	195					153	159
1_61b		203	219	191	195					149	153
1_61c		203	219	191	195					149	153
1_61d		203	219	191	195					149	153
Piglos											
1_65a		~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
Piglos		219	221	198	198					143	153
1_66a		203	219	185	198					153	159
1_66b		203	219	185	198					143	159
1_66c		203	219	185	198					149	153
1_66d		203	219	185	198					143	159
1_66e		203	219	185	198					153	159
1_66f		203	219	185	198					143	159
1_66g		203	219	185	198					153	159
1_66h		203	219	185	198					153	159
Greensleves		217	217	191	198						
1_67a		197	217	185	191						
Freedom											
2_29a		~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
Rome Beauty								169	175		
2_25a								175	191		
Pi- As 21,73		219	229	192	198	110	122	161	181		
2_45a		203	229	192	195	146	122	181	191		
Pi-As 21,73		219	229	192	198	110	122	161	181		
2_50a		203	229	185	198	110	138	177	161		

~ kein Allel detektiert; grüne Schrift: Allele der Mutter; rote Schrift: Allele von ‚TNR 31-35‘; schwarze Schrift: Allele, die weder der Muttersorte noch ‚TNR 31-35‘ zu zuordnen sind; ~ nicht analysiert

Fortsetzung Tab. Anhang 9

SSR		CH05A05		CH04E03		CH05C07		CH04A12		CH04E02	
		Allel 1	Allel 2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2
TNR 31-35		203	205	185	195	138	146	177	191	149	159
Muttersorte	Bezeichnung des rotlaubigen Nachkommen										
	Idared										
	2_60a	205	197								
	2_60b	211	229								
	2_60c	197	205								
	2_60d	205	229								
	2_60e	205	229								
	2_60f	205	229								
	2_60g	205	229								
	2_60h	205	229								
	2_60i	205	229								
	Jonathan	197	221								
	2_62a	197	205								
	2_62b	197	205								
	2_62c	~	~			~	~	~	~	~	~
	Golden Delicious	217	221	198	198						
	2_63a	203	217	195	198						
	2_63b	203	217	185	198						
	2_63c	203	221	185	198						
	2_63d	203	217	195	198						
	2_63e	203	221	185	198						
	2_63f	203	221	195	198						
	2_63g	203	221	185	198						
	2_63h	203	217	185	198						
	2_63i	203	221	185	198						
	2_63j	203	217	185	198						
	2_63k	203	217	185	198						
	2_63l	203	217	185	198						
	2_63m	203	217	195	198						
	2_63n	203	221	195	198						
	Golden Delicious	217	221	198	198						
	2_64a	203	217	198	185						
	2_64b	203	221	198	185						
	2_64c	203	221	198	195						
	2_64d	203	221	198	185						
	2_64e	203	217	198	185						
	2_64f	203	221	198	185						
	2_64g	205	221	198	185						
	Pinova			191	198	124	148	167	181		
	2_66a			195	198	138	148	167	177		
	2_66b			185	198	146	148	167	177		
	2_66c			-1	-1	138	148	-1	-1		
	2_66d			185	198	146	148	167	177		
	2_66e			185	198	138	148	167	177		
	2_66f			-1	-1	146	148	-1	-1		
	2_66g			195	198	146	148	177	181		
	2_66h			195	198	146	148	167	191		
	2_66i			~	~	~	~	~	~		
	2_66j			185	198	146	148	167	177		
	2_66k			~	~	~	~	~	~		
	2_66l			185	198	124	146	167	177		
	2_66m			185	198	146	148	177	181		
	2_66n			~	~	~	~	~	~		
	2_66o			185	198	138	148	181	191		
	2_66p			185	198	124	138	181	191		
	2_66q			195	198	138	148	181	191		

~ kein Allel detektiert; grüne Schrift: Allele der Mutter; rote Schrift: Allele von ‚TNR 31-35‘; schwarze Schrift: Allele, die weder der Muttersorte noch ‚TNR 31-35‘ zu zuordnen sind; ~ nicht analysiert

Fortsetzung Tab. Anhang 9

	SSR	CH05A05		CH04E03		CH05C07		CH04A12		CH04E02	
		Allel 1	Allel 2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2
TNR 31-35		203	205	185	195	138	146	177	191	149	159
Bezeichnung des rotlaubigen Muttersorte Nachkommen											
James Grieve		215	219								
2_67a		203	215								
2_67b		203	215								
James Grieve		215	219	191	229						
2_68a		203	215	185	191						
2_68b		203	215	185	191						
Starkrimson		219	221	197	201					153	155
2_69a		205	219	195	201					~	~
2_69b		205	221	~	~					149	153
2_69c		205	221	~	~					~	~
Starkrimson		219	221	197	201					153	155
2_70a		205	219	185	197					149	153
Prima		199	215	183	197	140	148	169	173	157	165
2_87a		199	205	183	185	138	148	169	179	149	157
Realka				195	197			173	181		
3_03a				185	197			177	173		
3_03b				185	197			173	191		
Gloster		219	221	198	198						
3_12a		203	221	195	198						
Freedom						136	138				
3_36a						136	146				
Oldenburg				200	213			168	179		
3_42a				185	200			179	191		
Reanda		207	231	197	205						
3_44a		205	207	185	205						
3_44b		205	207	185	205						
3_44c		205	207	185	197						
3_44d		205	231	195	197						
3_44e				195	197						
Releta						114	142	161	191	149	153
3_45a						142	146	177	191	149	153
Releika				197	197			161	181		
3_48a				185	197			177	181		
Retina											
3_51a		~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
3_51b		~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
Retina						112	114				
3_52a						114	148				
3_52b						114	148				
3_52c						114	148				
Mc Intosh						138	140			143	165
3_74a						140	146			143	149
3_74c						140	146				
Carola				197	197	124	134				
3_76a				195	197	138	124				

~ kein Allel detektiert; grüne Schrift: Allele der Mutter; rote Schrift: Allele von ‚TNR 31-35‘; schwarze Schrift: Allele, die weder der Muttersorte noch ‚TNR 31-35‘ zu zuordnen sind; ~ nicht analysiert

Tab. Anhang 10: Ergebnisse der SSR-Analyse der rotlaubigen Nachkommen aus freier Abblüte im Jahr 2004.

	SSR	CH05A05		CH04E03		CH05C07		CH03D11		CH04A12	
		Allel1	Allel2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2
TNR 31-35		203	205	185	195	138	146	124	124	177	191
Bezeichnung des rotlaubigen Muttersorte Nachkommen											
Prima						140	148			169	173
1_17a						134	140			173	173
Remo				179	191					177	181
1_61a				185	191					181	191
1_61b				179	195					177	191
1_61c				179	185					181	191
1_61d				191	195					~	~
1_61e				179	185					177	191
1_61f				179	185					177	191
1_61g				179	185					177	181
1_61h				179	185					181	191
Piglos				198	198					167	177
1_64a				195	198					177	191
Discovery		217	223	209	225			120	120	163	195
2_03a		217	225	185	225			120	124	157	163
Pi-As 21,73				191	198	110	122			161	181
2_45a				191	195	122	146			161	177
Pi-As 21,73				191	198	110	122			161	181
2_50a				191	195	110	146			161	191
2_50b											
2_50c				185	198	122	138			177	181
2_50d				191	195	122	146			177	181
Piglos				198	198					167	177
2_52a				195	198					167	177
Jonathan		197	221	185	195					177	191
2_61a		205	221	185	185					191	191
2_61b		197	205	185	195					177	191
2_61c		197	205	185	195					191	191
2_61d		205	221	185	185					177	191
2_61e		205	221	195	195					177	177
2_61f		197	205	185	195					191	191
Jonathan		197	221	185	195					177	191
2_62a		205	221	185	185					191	191
2_62b		205	221	185	185					177	177
2_62c		205	221	185	195					177	177
2_62d		205	221	185	195					177	191
Golden Delicious				195	195			120	120		
2_63a				195	195			120	124		
2_63b				195	195			120	124		
2_63c				195	195			120	124		

~ kein Allel detektiert; grüne Schrift: Allele der Mutter; rote Schrift: Allele von ‚TNR 31-35‘; schwarze Schrift: Allele, die weder der Muttersorte noch ‚TNR 31-35‘ zu zuordnen sind; ~ nicht analysiert

Fortsetzung Tab. Anhang 10

	SSR	CH05A05		CH04E03		CH05C07		CH03D11		CH04A12	
		Allel1	Allel2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2	Allel1	Allel2
TNR 31-35		203	205	185	195	138	146	124	124	177	191
Bezeichnung des rotlaubigen Muttersorte	Nachkommen										
James Grieve				191	229			120	120		
2_68a				195	229			120	124		
2_68b				195	229			120	124		
2_68c				191	195			120	124		
2_68d				191	195			120	124		
Starkrimson				197	201					175	175
2_70a				195	201					175	177
2_70b				195	201					175	191
2_70c				185	201					175	191
2_70d				195	201					175	177
Remo				179	191	112	124	120	120		
2_72a				179	185	124	138	120	124		
2_72b				179	185	124	146	120	124		
2_72c				179	185	112	138	120	124		
2_72d				185	191	124	146	120	124		
2_72e				179	195	112	138	120	124		
Remo				179	191	112	124	120	120		
2_74a				179	185	112	138	120	124		
Realka						134	140			173	181
3_03a						134	146			173	191
Priam				195	203	148	150				
3_20a				185	195	146	150				
Reanda				197	205	116	152				
3_44a				195	205	116	146				
Releika				197	197	112	124	120	120	161	181
3_48a				185	197	124	146	120	124	177	181
3_48b				185	197	112	146	120	124	161	177
3_48c				185	197	112	146	120	124	161	177
3_48d				185	197	112	146	120	124	161	191
3_48e				195	197	124	146	120	124	181	191
3_48f				195	197	124	146	120	124	181	191
3_48g				195	197	124	146	120	124	161	191
3_48h				195	197	124	146	120	124	177	181
3_48i				185	197	124	138	120	124	181	191
Resi				177	195	124	148			169	177
3_50a				177	185	138	148			177	191
3_50b				177	185	146	150			177	177
3_50c				177	195	124	146			177	177
Retina				197	203	112	114			179	183
3_51a				195	203	112	146			179	191
3_51b				185	197	112	146			179	191
3_51c				185	203	112	138			177	179
Pikant						124	148			161	195
3_81a						124	146			161	177
3_81b						124	146			161	177
3_81c						146	148			177	195
3_81d						124	138			191	195
3_81e						146	150			191	195
3_81f						146	148			161	177
3_81g						124	138			161	177

~ kein Allel detektiert; grüne Schrift: Allele der Mutter; rote Schrift: Allele von ‚TNR 31-35‘; schwarze Schrift: Allele, die weder der Muttersorte noch ‚TNR 31-35‘ zu zuordnen sind; ~ nicht analysiert

Tab. Anhang 11: Ergebnisse zur Untersuchung der Stabilität der Integration der T-DNA mittels Insert-PCR und Southern-Blot-Analyse.

pLBD15-Linie

Probennr.		Sorte	Insert-PCR		Southern-blot (Anz. Integrationen)	
			<i>Attacin E</i>	<i>npt II</i>	<i>Attacin E</i>	<i>npt II</i>
T086/V1	transgene Unterlage	AU 56-83	+	+	2	2

p35SAMVT4-Linien

Probennr.		Sorte	Insert-PCR		Southern-blot (Anz. Integrationen)	
			<i>T4-Lysozym</i>	<i>npt II</i>	<i>T4-Lysozym</i>	<i>npt II</i>
T121/V1	transgenes Edelreis	Pinova	+	+	4	4
T121/V2			+	+	4	4
T121/V3			+	+	4	4
T121/V4			+	+	4	4
T270A	unveredelte Pflanze	AU 56-83	+	+	1	1
T270B			+	+	1	1
T270C			+	+	1	1
T352A	unveredelte Pflanze	AU 56-83	+	+	2	2
T352B			+	+	2	2
T352C			+	+	2	2
T362A		AU 56-83	+	+	2	1
T363A	unveredelte Pflanze	AU 56-83	+	+	4	4
T363B			+	+	4	4
T363C			+	+	4	4
T363(2002)*	In-vitro		+	+	4	4

* Untersuchungsjahr

pPinAtt35SAMVT4-Linien

Probennr.		Sorte	Insert-PCR		Southern-Blot) (Anz. Integrationen)		
			Zielgene*	<i>npt II</i>	<i>T4-Lysozym</i>	<i>Attacin E</i>	<i>npt II</i>
T350A	unveredelte Pflanze	AU 56-83	+/+*	+	1	1**	1
T350B			+/+	+	1	1**	1
T350C			+/+	+	1	1**	1
T351A	unveredelte Pflanze	AU 56-83	+/+	+	3	1**	3
T351B			+/+	+	3	1**	3
T351C			+/+	+	3	1**	3
T092/V1	transgenes Edelreis	Pinova	+/+	+	2	1**	2
T092/V2			+/+	+	2	1**	2
T092/V3			+/+	+	2	1**	2
T092/V4			+/+	+	2	1**	2
T092/V5	transgene Unterlage	Pinova	+/+	+	2	1**	2
T092/V6			+/+	+	2	1**	2
T095/V1	transgene Unterlage	AU 56-83	+/+	+	2	1**	2
T095/V2			+/+	+	2	1**	2

* das erste Zeichen steht für das *Lysozym*-Gen und das zweite für das *Attacin E*-Gen

** es kann nur eine Kopie für das *AttE*-Gen detektiert werden, da es in dem Konstrukt zwei *BglII* Schnittstellen gibt.

- negativ; + positiv; (+) schwach positiv

Fortsetzung Tab. Anhang 11

pBINAR19-Linien

Probennr.		Sorte	Insert-PCR		Southern-blot (Anz. Integrationen)		
			<i>Dpo</i>	<i>nptII</i>	<i>Dpo</i>	<i>nptII</i>	
T136A	unveredelte Pflanze	Pinova	-	+	2	3	
T136B			+	+	2	3	
T136C			+	+	2	3	
T136V1			+	+	2	3	
T136V2	transgenes Edelreis		+	+	2	3	
T136V3			+	+	2	3	
T136V4			+	+	2	3	
T136 (2000)*			In-vitro	+	+	2	3
T137V1	transgenes Edelreis	Pinova	+	+	4	4	
T137V2			+	+	4	4	
T137V3			+	+	4	4	
T137V4			+	+	4	4	
T211A	unveredelte Pflanze	Pinova	-	+	2	1	
T211B			-	+	2	1	
T211C			-	+	2	1	
T211D			-	+	2	1	
T211E			-	+	2	1	
T211F			-	+	2	1	
T211G			-	+	2	1	
T211H			-	+	2	1	
T211V1			transgenes Edelreis	-	+	2	1
T211V2				-	+	2	1
T211V3	-	+		2	1		
T211V4	-	+		2	1		
T211 (2002)*	In-vitro	-	+	2	1		
T267A	unveredelte Pflanze	Pinova	+	+	4	4	
T267B			+	+	4	4	
T267C			-	-	0	0	
T267D			+	+	4	4	
T267V1/1	transgenes Edelreis		-	-	0	0	
T267V2/1			-	-	0	0	
T267V3/1			-	-	0	0	
T267V4/1			-	-	0	0	
T267 (2002)*	In-vitro		+	+	4	4	

* Untersuchungsjahr

- negativ; + positiv; (+) schwach positiv

Tab. Anhang 12: Ergebnisse zur Untersuchung zur Stabilität der Expression der T-DNA mittels RT-PCR und ELISA.

pLBD15-Linie

Probennr.		Sorte	RT-PCR		ELISA (pg/ mg)	Schwellenwert für die Positiv- bewertung (pg) ¹	Bewertung
			<i>Attacin E</i>	<i>npt II</i>			
T086/V1	transgene Unterlage	AU 56-83	+	+	16.1	0.8	+

p35SAMVT4-Linien

Probennr.		Sorte	RT-PCR		ELISA (pg/ mg)	Schwellenwert für die Positiv- bewertung (pg) ¹	Bewertung
			<i>T4-Lysozym</i>	<i>npt II</i>			
T121/V1	transgenes Edelreis	Pinova	+	+	>18,8	0.0	+
T121/V2			+	+	>18,8	0.9	+
T121/V3			+	+	>18,8	0.9	+
T121/V4			+	+	>18,8	0.0	+
T270A	unveredelte Pflanze	AU 56-83	+	+	>18,8	0.8	+
T270B			+	+	>18,8	0.8	+
T270C			+	+	5.7	0.8	+
T352A	unveredelte Pflanze	AU 56-83	+	+	18.8	0.0	+
T352B			+	+	13.7	0.0	+
T352C			+	+	14.1	0.0	+
T362A		AU 56-83	+	+	16.7	0.8	+
T363A	unveredelte Pflanze	AU 56-83	+	(+)	3,6*/ 1,6**	0,9*/ 1,2**	+
T363B			+	(+)	1,0*/ 9,4**	0,9*/ 1,2**	+
T363C			+	(+)	2,2*/ 1,6**	0,9*/ 1,2**	+
T363 (2002)*			In-vitro	+	+	3,4*/ 19,1**	0,6*/ 1,2**

* Untersuchungs-jahr 2002; ** Untersuchungs-jahr 2004

pPinAtt35SAMVT4-Linien

Probennr.		Sorte	RT-PCR		ELISA (pg/ mg)	Schwellenwert für die Positiv- bewertung (pg) ¹	Bewertung
			Zielgen [#]	<i>npt II</i>			
T350A	unveredelte Pflanze	AU 56-83	+/+	+	5.4	0.8	+
T350B			+/+	+	7.1	0.8	+
T350C			+/+	+	8.3	0.0	+
T351A	unveredelte Pflanze	AU 56-83	+/+	+	18.8	0.0	+
T351B			+/+	+	9.3	0.8	+
T351C			+/+	+	18.8	0.0	+
T092/V1	transgenes Edelreis	Pinova	+/+	+	18.2	0.0	+
T092/V2			+/+	+	12.9	0.0	+
T092/V3			+/+	+	12.6	0.9	+
T092/V4			+/+	+	18.7	0.0	+
T092/V5	transgene Unterlage	Pinova	+/+	+	9.0	0.8	+
T092/V6			+/+	+	7.9	0.8	+
T095/V1	transgene Unterlage	AU 56-83	+/+	+	2.0	0.8	+
T095/V2	transgene Unterlage	AU 56-83	+/+	+	13.0	0.8	+

[#] das erste Zeichen steht für das *Lysozym*-Gen und das zweite für das *Attacin E*-Gen

- negativ; + positiv; (+) schwach positiv

¹ Schwellenwert: Das Ergebnis der ELISA Analyse wurde als positiv eingestuft, wenn die zweifache NPTII-Proteinmenge der Negativkontrolle überschritten wurde.

Fortsetzung Tab. Anhang 12

pBINAR19-Linien

Probennr.		Sorte	RT-PCR		ELISA (pg/ mg)	Schwellenwert für die Positiv- bewertung (pg) ¹	Bewertung	
			<i>Dpo</i>	<i>npt II</i>				
T136A	unveredelte Pflanze	Pinova	-	+	0.4	0.2	(+)	
T136B			+	+	0.2	0.2	-	
T136C			+	+	0.2	0.2	-	
T136/V1	transgenes Edelreis		+	+	1.8	0.9	+	
T136/V2			+	+	1.4	0.9	+	
T136/V3			+	+	1.2	0.9	+	
T136/V4			+	+	1.4	0.9	+	
T136 (2000)*	In-vitro		+	+	6.0	0.9	+	
T137/V1	transgenes Edelreis		Pinova	+	+	15.1	0.9	+
T137/V2				+	+	18.8	0.9	+
T137/V3		+		+	18.8	0.9	+	
T137/V4		+		+	18.8	0.9	+	
T211A	unveredelte Pflanze	Pinova	-	+	0.8	0.5	+	
T211B			-	+	16.2	0.5	+	
T211C			-	+	1.6	0.5	+	
T211D			-	+	13.8	0.5	+	
T211E			-	+	18.8	0.5	+	
T211F			-	+	11.1	0.5	+	
T211G			-	+	9.8	0.5	+	
T211H			-	+	12.1	0.5	+	
T211/V1			transgenes Edelreis	-	+	2.9	0.9	+
T211/V2				-	+	11.1	0.9	+
T211/V3	-			(+)	4.0	0.9	+	
T211/V4	-			(+)	2.8	0.9	+	
T211 (2002)*	In-vitro		-	+	9.6	0.5	+	
T267A	unveredelte Pflanze		Pinova	+	+	0.5	0.5	-
T267B				+	+	6.0	0.5	+
T267C				-	-	0.1	0.5	-
T267D		+		+	10.2	0.5	+	
T267/V1/1	transgenes Edelreis	-		-	0.5	0.9	-	
T267/V2/1		-		-	0.6	0.9	-	
T267/V3/1		-		-	0.6	0.9	-	
T267/V4/1		-		-	0.1	0.9	-	
T267 (2002)*	In-vitro	+		+	5.9	0.9	-	

* Untersuchungsjahr

- negativ; + positiv; (+) schwach positiv

¹ Schwellenwert: Das Ergebnis der ELISA Analyse wurde als positiv eingestuft, wenn die zweifache NPTII-Proteinmenge der Negativkontrolle überschritten wurde

Tab. Anhang 13: Ergebnisse zur Untersuchung des Transports von Transgenprodukten mittels Western-Blot-Analyse und GUS-Test

Pflanzen- bezeichn.	Veredelungs- komponente			vorhandene Gene			Western-Blot Markergen			GUS-Test Reportergen		
	U	S	E	Zielgen	Marker- gen	Reporter- gen	U	S	E	U	S	E
T95/V1	T95	~	Pinova	<i>lys + attE</i>	<i>npt II</i>	~	+	~	-	~	~	~
T95/V2	T95	Hibernal	Pinova	<i>lys + attE</i>	<i>npt III</i>	~	+	-	-	~	~	~
T92/V5	T92	~	Pinova	<i>lys + attE</i>	<i>npt II</i>	~	+	~	-	~	~	~
T92/V6	T92	Hibernal	Pinova	<i>lys + attE</i>	<i>npt III</i>	~	+	-	-	~	~	~
T92/V1	M9	~	T92	<i>lys + attE</i>	<i>npt II</i>	~	-	~	+	~	~	~
T92/V2	M9	~	T92	<i>lys + attE</i>	<i>npt II</i>	~	-	~	+	~	~	~
T92/V3	M9	Hibernal	T92	<i>lys + attE</i>	<i>npt II</i>	~	-	-	+	~	~	~
T92/V4	M9	Hibernal	T92	<i>lys + attE</i>	<i>npt III</i>	~	-	-	+	~	~	~
T121/V1	M9	~	T121	<i>lys</i>	<i>npt II</i>	~	-	~	+	~	~	~
T121/V2	M9	~	T121	<i>lys</i>	<i>npt II</i>	~	-	~	+	~	~	~
T121/V3	M9	Hibernal	T121	<i>lys</i>	<i>npt II</i>	~	-	-	+	~	~	~
T121/V4	M9	Hibernal	T121	<i>lys</i>	<i>npt II</i>	~	-	-	+	~	~	~
T137/V1	M9	~	T137	<i>h-dpo</i>	<i>npt II</i>	~	-	~	+	~	~	~
T137/V2	M9	~	T137	<i>h-dpo</i>	<i>npt II</i>	~	-	~	+	~	~	~
T137/V3	M9	Hibernal	T137	<i>h-dpo</i>	<i>npt II</i>	~	-	-	+	~	~	~
T137/V4	M9	Hibernal	T137	<i>h-dpo</i>	<i>npt II</i>	~	-	-	+	~	~	~
T320/V1	T320	Hibernal	Pinova	<i>attE</i>	<i>npt II</i>	<i>gus</i>	+	-	-	+	-	-
T349/V1	T349	~	Pinova	<i>attE</i>	<i>npt II</i>	<i>gus</i>	+	-	-	+	-	-
T355/V1	T355	~	Pinova	<i>attE</i>	<i>npt II</i>	<i>gus</i>	+	~	-	+	~	-
T355/V2	T355	~	Pinova	<i>attE</i>	<i>npt II</i>	<i>gus</i>	+	~	-	+	~	-
T355/V3	T355	Hibernal	Pinova	<i>attE</i>	<i>npt II</i>	<i>gus</i>	+	-	-	+	-	-
T355/V4	T355	Hibernal	Pinova	<i>attE</i>	<i>npt II</i>	<i>gus</i>	+	-	-	+	-	-

+ Nachweis des Proteins möglich; - Nachweis des Proteins nicht möglich; n.a. nicht analysiert; ~ nicht vorhanden; U: Unterlage; S: Stammbildner; E: Edelreis

8.7. Verwendete Puffer und Chemikalien

Alkalines Phosphatase-Substrat (ELISA)

2 Tabletten PNPP, (5Prime → 3Prime, Inc., Boulder, USA)
10ml ELISA Substratpuffer

BAP-Stammlösung

0,2g/l BAP in 1N NaOH

Beschichtungspuffer (ELISA)

10mM Na₂CO₃
28mM NaHCO₃
33mM Na₃
pH 9,6

Bewurzelungs-Medium nach Murashige und Skoog

2,3g/l Fertignährmedium
,M 0222' (Duchefa, Hamburg)
20 g/l Saccharose
(15g/l IBA)*
8,0g/l Agar
* bei Wurzelinduktion

Blockierungsstammlösung (Southern-Blot)

10% (w/v) Blockingreagenz
in Maleinsäurepuffer

Blockierungspuffer (Southern-Blot)

1% (w/v) Blockingreagenz
in Maleinsäurepuffer

Vermehrungs-Medium nach Linsmaier und Skoog

4,4g/l Fertignährmedium
,L 0230' (Duchefa, Hamburg)
30g/l Saccharose
2,5g/l BAP
1,0g/l IBA
2,5g/l GA3
8,0g/l Agar

2x CTAB-Puffer

2,0% (w/v) CTAB
200mM Tris pH 8,0
20mM EDTA pH 8,0
1,4M NaCl
1,0% (w/v) PVP
0,28M β-Mercaptoethanol

Denaturierungspuffer (Southern-Blot)

0,5M NaOH
1,5M NaCl

Detektionspuffer (Southern-Blot)

0,1M Tris-HCl
0,1M NaCl
pH 9,5

DNA-Ladepuffer (6 x)

0,25% Bromphenolblau
40% Saccharose

DNA-Ladepuffer 2

0,25% (w/v) Xylene Cyanol FF
40 % (w/v) Saccharose

Farbpuffer (20x)

30% (w/v) Saccharose
6,0mM Tatrazingelb
3,5mM Kresolrot

GUS-Puffer

9,8ml 100mM Phosphatpuffer
100µl 5mM K-Ferricyanide
100µl 5mM K-Ferrocyanide
10mg X-Gluc

Hybridisierungspuffer

5x SSC
2% (w/v) Blockingreagenz
(Roche-Diagnostics,
Mannheim)
0,1% (w/v) N-Lauroylsarkosin
0,02% (w/v) SDS
50% (v/v) Formalin

IBA-Stammlösung

0,2g/l IBA in 1 N NaOH

Karminessigsäure

45% (v/v) Eisessig
0,5% (w/v) Karmin

Licor- Ladepuffer

95% Formamid deionisiert
1M EDTA
0,8% (w/v) Bromphenolblau

Maleinsäurepuffer

0,1M Maleinsäure
0,15M NaCl
pH 7,5

Medium für Pollenkeimung

10% (w/v) Saccharose
25ppm H₃BO₃
250ppm Ca(NO₃)₂
1% (w/v) Agar
pH 6,5

Neutralisierungspuffer (Southern-Blot)

1M Tris-HCl
1,5M NaCl
pH 7,5

PBS (1 x)

4,3mM Na₂HPO₄
137mM NaCl
2,7mM KCl
1,4mM KH₂PO₄

Phosphatpuffer 0,1 M

87ml 0,2M KH₂PO₄
122ml 0,2M K₂HPO₄
209ml H₂O

Polyacrylamid-Gel

20ml 6,5% Kb-Plus Gel Matrix
(Licor, Bad Homburg, Deutschland)
7,5% (v/v) APS
0,75% (v/v) TEMED

RNAse A

10mg/ ml RNAse A
10mM Tris pH 7,5
15mM NaCl

Streptavidin-Konjugat

0,002% (v/v) Streptavidin (PeqLab,
Erlangen) in 1x PBS/Tween

SSC (20x)

0,3M Na₃Citrat
3M NaCl
pH 7,0

Substratpuffer (ELISA)

10% (v/v) Diethanolamine
pH 9,8

TAE (50x)

40mM Tris Acetat
1mM EDTA
pH 8,0

TE-Puffer (1x)

10mM Tris pH 8,0
1mM EDTA pH 8,0

Waschpuffer (ELISA)

1 x PBS+ 0,05 % (v/v) Tween 20

Waschpuffer (Southern-Blot)

Maleinsäurepuffer
0,3% (v/v) Tween 20

Waschpuffer (Western-Blot)

1x PBS
2% (v/v) Triton X
0,5% (v/v) Tween 20

8.8. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
APS	Ammoniumperoxidsulfat
<i>attE</i>	<i>Attacin</i> E-Gen
BAP	6-Benzylaminopurin
BAZ	Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen
bp	Basenpaar
bidest.	doppelt destilliert
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderalbumin)
cDNA	complementary DNA
CTAB	Cetyltrimethylammonium Bromid
GUS	β -glucuronidase
GFP	Green Fluorescence Protein
h	Stunde
DEA	Diethanolamin
dest.	destilliert
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonucleinacid
DNase	DNA abbauendes Enzym
dNTPs	Desoxynukleotidphosphat
<i>Dpo</i>	Depolymerase-Gen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EF</i>	Elongationsfaktor 1- α -Gen
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<i>H-Dpo</i>	Depolymerase-Gen gekoppelt mit einem His-Taq
IBA	Indole-3-Butyric Acid (Indol-3-Buttersäure)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LB	Linke Border
M	Mol
mA	Milliampere
mM	Millimolar
min	Minute
mRNA	messenger RNA

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
<i>nos</i>	Nopaline Synthase -Gen
<i>npfII</i>	Neomycinphosphotransferase II - Gen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten Reaktion)
pH	pH-Wert
pmol	pikomol
ppm	parts per million (1×10^{-6})
PNPP	P-Nitrophenyl Phosphat
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RB	Rechte Border
RNA	Ribonucleicacid (Ribonukleinsäure)
RNase	RNA abbauendes Enzym
RdRP	RNA directed RNA polymerase
rpm	rotation per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SDS	Natrium Dodecylsulfat
sec	Sekunde
SSC	Sodium Chloride Sodium Acetat Sodium Citrate
ssp.	Subspecies
SSR	Simple Sequence Repeats
TCA	Trichloressigsäure
T-DNA	Transfer-DNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
Ti-Plasmid	tumorinduzierendes Plasmid
<i>T4L</i>	T4-Lysozym-Gen
μ	micro
U	Unit
UV	ultraviolettes Licht
V	Volumen
var.	Varietät
<i>virG</i>	Virulenzgen G – Gen

(v/v) Volumenprozent

(w/v) Gewichtsprozent

Eigenständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dresden, April 2008

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mit dieser wissenschaftlichen Arbeit noch keine vergeblichen Promotionsversuche unternommen wurden.

Des Weiteren erkläre ich, dass keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind.

Dresden, April 2008

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei jenen Personen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Viola Hanke vom Institut für Obstzüchtung der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen in Dresden-Pillnitz für die Bereitstellung des Themas. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Henryk Flachowsky für seine hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas bedanken. Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Andreas Peil, der mir als Ansprechpartner jederzeit zur Verfügung stand. Weiterhin gilt mein Dank ganz besonders Kerstin Neumann, die mich in allen praktischen Aufgaben sehr unterstützt hat. Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern des Institutes für Obstzüchtung für die gute Zusammenarbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W.E. Weber des Institutes für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz der Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und Herrn Prof. Dr. A. Graner vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) für die wertvollen Anregungen und die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Lebenslauf

Name: Stefanie Reim
Geboren: 05.07.1975 in Peine
Familienstand: ledig, einen Sohn

Ausbildung

07/ 1994 Abitur am Fachgymnasium für Textiltechnik, Braunschweig
09/1994 -03/ 2001 Studium der Agrarökologie an der Universität Rostock.
Diplomthema "Genetische Kartierung eines Braunrost-resistenzgens bei Roggen mit Hilfe molekularer Marker" an der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ), Groß Lüsewitz

Berufstätigkeit

08 /2001-12/ 2004 wissenschaftliche Angestellte an der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ), Institut für Obstzüchtung Dresden-Pillnitz
Projekt: „Untersuchung der Expressionsstabilität und des Auskreuzungsrisikos bei gentechnisch veränderten Apfelgehölzen“.

01/ 2005- 12/ 2006 wissenschaftliche Angestellte an der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ), Institut für Obstzüchtung Dresden-Pillnitz
Projekt: „Auskreuzungsverhalten von gentechnisch veränderten Apfelpflanzen“

04/ 2006- 04/ 2008 Mutterschutz/ Elternzeit

seit 04/ 2008 wissenschaftliche Angestellte am Julius Kühn Institut (JKI), Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Dresden-Pillnitz
Projekt: „Erhaltung von *Malus sylvestris* unter In-situ-Bedingungen im Osterzgebirge“