

Trotz unterschiedlicher Herangehensweisen zeigte sich, dass resistente Populationen zumeist sicher erkannt wurden. Dies galt ganz besonders für Biotypen, die eine Wirkort-Resistenz (Target-Site-Resistenz) oder bei metabolisch begründeter Resistenz einen hohen Resistenzfaktor aufwiesen. Bei einigen Herbiziden – insbesondere bei niedrigen Resistenzfaktoren – gab es widersprüchliche Resultate. Gerade in diesen Fällen wurde deutlich, dass die Umweltbedingungen in den Testsystemen einen Einfluss auf die einzelne Herbizidwirkung besitzen. Insbesondere waren hier die Herbizide ARELON TOP® und LEXUS® betroffen. Vor allem die Faktoren Jahreszeit, Temperatur in Gewächshaus oder Klimakammer und Lichtbedingungen (Intensität der Zusatzbeleuchtung) hatten einen deutlichen Einfluss auf die Variabilität der Herbizidwirkung. Der Einfluss dieser Faktoren bedeutet, dass je nach Testbedingung (Jahreszeit bzw. technische Ausstattung) Interaktionen zwischen Resistenzgrad und Aufwandmenge der eingesetzten Herbizide bestehen. Je nach Testbedingung/Testsystem müssten die Prüfaufwandmengen testortspezifisch gewählt werden, um niedrige Resistenzfaktoren sicher diagnostizieren zu können. Der Parameter Sprossfrischmasse führte im Vergleich zur Bonitur zu keiner grundlegend anderen Bewertung der Herbizidresistenzsituation.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der Befund Resistenz gegenüber einem Herbizid in einer einzustufenden Herkunft vorhanden oder nicht, unabhängig von den beteiligten Institutionen, sicher eingestuft wurde. Wenn Abweichungen in der Bewertung vorlagen, bezog es sich auf den Resistenzgrad und hierbei vor allen auf die Herbizide ARELON TOP® und LEXUS®. Sehr niedrige Resistenzgrade wurden nicht immer sicher erkannt, obwohl auch diese Resistenzen durchaus eine praktische Relevanz besitzen können.

Sektion 40 – Gentechnik / Biologische Sicherheit

40-1 - Schiemann, J.
Julius Kühn-Institut

Risikoanalyse gentechnisch veränderter Pflanzen für Nicht-Nahrungsmittel/Futtermittel-Anwendungen

Risk assessment of genetically modified plants used for non-food or non-feed purposes

In seiner Stellungnahme zu "Guidance for the risk assessment of genetically modified plants used for non-food or non-feed purposes" diskutiert das GMO Panel der EFSA Aspekte der Sicherheitsbewertung gentechnisch veränderter Pflanzen für Nicht-Nahrungsmittel/Futtermittel-Anwendungen und definiert spezifische Anforderungen, die Antragsteller und Bewerter zu beachten haben. Hiermit wird das „EFSA Guidance Document for the risk assessment of GM plants and derived food and feed“, das für die Sicherheitsbewertung gentechnisch veränderter Pflanzen für Nahrungs- und Futtermittel-Anwendungen konzipiert wurde, ergänzt. Gentechnisch veränderte Pflanzen für Nicht-Nahrungsmittel/Futtermittel-Anwendungen können für vielfältige Zwecke benutzt werden, u. a. für die Herstellung von industriellen Enzymen, Ausgangsprodukten für industrielle Prozesse sowie von pharmazeutischen Produkten, als Energiepflanzen, urbanes Grün oder für Umweltsanierungen (phytoremediation). Der Vortrag beschreibt spezifische Nicht-Nahrungsmittel/Futtermittel-Anwendungen gentechnisch veränderter Pflanzen und sich daraus ergebende Aspekte der Sicherheitsbewertung. Darüber hinaus werden neue Techniken zur genetischen Veränderung von Pflanzen vorgestellt und im Vergleich zu transgenen Techniken kommentiert.

40-2 - Albers, M.-C.; Pagel-Wieder, S.; Niemeyer, J.; Gessler, F.
Georg-August-Universität Göttingen

Sorption multipler Cry-Proteine (Bt-Mais) in Böden einer Freisetzungsfläche

Adsorption of multiple cry proteins (Bt-corn) in soils of a release area

In Mais (*Zea mays*) können sowohl Gene für insektizide Proteine aus dem Bakterium *Bacillus thuringiensis* (Bt) (z. B. Cry1Ab, Cry2Ab2, Cry3Bb1) als auch Kombinationsgene (z. B. Cry1A.105) übertragen werden, so dass der gentechnisch veränderte Bt-Mais Toxine (Cry-Proteine) mit hoher Spezifität für bestimmte Zielorganismen (z. B. Maiszünsler, Maiswurzelbohrer) exprimieren kann. Diese Cry-Proteine können über Pollen, Ernterückstände und Wurzelexsudate in Böden gelangen und dort an Bodenpartikel sorbieren. Im Gegensatz zu den bisher untersuchten transgenen Maispflanzen, die jeweils ein Cry-Protein exprimierten, produziert die Bt-Maislinie MON89034 x MON88017 drei verschiedene Cry-Proteine (Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1), die simultan freigesetzt werden. Wir

nehmen daher an, dass diese gleichzeitige Freisetzung zu einer Konkurrenz um Bindungsplätze auf den Partikeln der Bodenfraktionen führt.

Vorausgehende Untersuchungen konnten zeigen, dass die Retardation und Mobilität eines Cry-Proteins (Cry1Ab) von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Böden sowie der Molekülstruktur (Aminosäuresequenz) und der chemischen Reaktivität des Cry-Proteins maßgeblich beeinflusst wird. So war eine deutliche Zunahme der Affinitäten gegenüber Cry1Ab mit zunehmender spezifischer Oberfläche und mit abnehmender spezifischer Oberflächenladung der Bodenpartikel zu beobachten. Daher wird in den aktuellen Untersuchungen das Sorptionsverhalten der Cry-Proteine in den Böden der Freisetzungsfäche, unter Berücksichtigung der Gehalte an organischer Substanz, der spezifischen negativen äußeren Oberflächenladung und der spezifischen äußeren Oberfläche der Fraktionen (< 2 mm, < 63 µm, < 2 µm), näher charakterisiert. Interessanterweise zeigen die bisher untersuchten Cry-Proteine (Cry1Ab, Cry3Bb1) ein unterschiedliches Sorptionsverhalten.

40-3 - Langhof, M.¹⁾; Hommel, B.¹⁾; Hüskens, A.¹⁾; Mastel, K.²⁾; Schiemann, J.¹⁾; Wehling, P.¹⁾; Rühl, G.¹⁾

¹⁾ Julius Kühn-Institut; ²⁾ Landwirtschaftliches Technologiezentrum Augustenberg

Pollenvermittelter Genfluss bei Mais: Reduzierung der Auskreuzung durch separate Randstreifen-ernte und Anlage einer Mantelsaat?

Pollen mediated gene flow in maize: Reduction in outcrossing through separate edge harvest and non-GM border rows?

Im Rahmen des vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) initiierten Forschungsprogramms zur Sicherung der Koexistenz werden verschiedene pflanzenbauliche Maßnahmen geprüft, die ein Nebeneinander („Koexistenz“) von konventioneller, ökologischer und gentechnisch veränderte (GV) Sorten nutzender Landwirtschaft gewährleisten können. In Kooperation mehrerer Institute des Julius Kühn-Instituts, sowie in Zusammenarbeit mit dem Landwirtschaftlichen Technologiezentrum Augustenberg (Karlsruhe) werden seit 2005 in praxisnahen Feldversuchsanlagen verschiedene koexistenzsichernde Maßnahmen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zur Reduktion der Auskreuzung von GV-Mais in benachbarte konventionelle (NGV) Maisbestände bewertet.

Untersuchungsschwerpunkte der ersten Versuchsjahre waren neben der Prüfung verschiedener Mindestabstände (24–150 m) auch die Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Pufferkulturen zwischen GV- und konventionellem Mais sowie der GV-Feldtiefe und der Ausrichtung von GV- und NGV-Schlag zueinander. Eine vielfach diskutierte Maßnahme zur Reduzierung des pollenvermittelten Genflusses ist die Anlage einer Mantelsaat aus konventionellem Mais an der Feldkante des GV-Maisfeldes, die dem konventionellen Schlag gegenüber liegt. Einer Mantelsaat werden zwei auskreuzungsreduzierende Funktionen zugeschrieben; erstens kann sie aufgrund ihrer räumlichen Ausdehnung als physikalische Barriere für den Pollenflug wirken und zweitens verdünnt sie durch Schüttung eigenen Pollens den Eintrag von GV-Pollen.

Im Jahr 2008 wurde die Wirkung einer Mantelsaat an insgesamt drei Versuchsstandorten, zwei in Nord- und einem in Süddeutschland, getestet. Untersucht wurde jeweils der Effekt einer 9 m und einer 18 m breiten Mantelsaat am GV-Feldrand auf die Auskreuzungshöhen im benachbarten NGV-Schlag im Vergleich zu einer Variante ohne Mantelsaat. GV- und NGV-Maisschlag wurden durch eine 51 m breite Abstandsfläche mit Klee gras getrennt. Es wurden GV-Gehalte von Körnerproben aus verschiedenen Feldtiefen des NGV-Schlages mittels quantitativer PCR bestimmt und auf deren Basis der GV-Gehalt der gesamten Ernte des Schlages berechnet. Die Ergebnisse zeigen, dass die Anlage von 9 m oder 18 m breiten NGV-Maismantelsaaten am GV-Feldrand bei einem Feldabstand von 51 m an keinem der Versuchsstandorte zu einer Reduktion der Auskreuzungsrate führte. Aus der Literatur ist bekannt, dass der GV-Anteil im konventionellen Maisschlag meist bereits ab ca. 20 m Feldtiefe unter dem EU-Kennzeichnungsschwellenwert von 0,9 % liegt, wenn GV- und NGV-Schlag direkt aneinander grenzen. Daher wird im Jahr 2010 geprüft, ob die beiden verglichenen Mantelsaatstärken bei deutlich geringeren Feldabständen (6 und 12 m) eine Wirkung zeigen.

Alle bisher im Rahmen des Forschungsprogramms durchgeführten Feldversuche haben gezeigt, dass die Auskreuzungsraten im dem Feldrandbereich des NGV-Schlages, der dem GV-Feld gegenüber liegt, am höchsten sind und mit zunehmender Feldtiefe abnehmen. Als eine effektive Maßnahme zur Reduktion des GV-Gehalts der Gesamternte eines konventionellen Nachbarschlages wird daher die separate Ernte dieses Feldrandstreifens diskutiert; die Vermarktung dieser Teilernte könnte zusammen mit der Ernte des GV-Schlages erfolgen. Auf der Basis der Daten der dreijährigen Versuchsanstellungen zum Einfluss unterschiedlicher Mindestabstände wurde daher die mit der separaten Ernte der ersten 3, 6 bzw. 12 m des konventionellen Maisschlages verbundene Reduktion des GV-Anteils der Gesamternte berechnet. Insgesamt war die separate Ernte der ersten 6 m des Feldrandes am effektivsten, während die Ernte eines 12 m breiten Streifens nur in wenigen Fällen zu einer weiteren,

dann allerdings marginalen Reduktion des GV-Gehaltes führte. Bei Feldern, bei denen eine Auskreuzung bis in größere Feldtiefen nachgewiesen werden konnte, war die Reduktion allerdings relativ gering.

Als Fazit der Versuche lässt sich festhalten, dass (i) die separate Randstreifenenernte im NGV-Maisschlag in Verbindung mit anderen pflanzenbaulichen Maßnahmen (z. B. Feldabstand) eine wirkungsvolle Koexistenzmaßnahme sein kann, während (ii) die Wirksamkeit einer Mantelsaat im GV-Maisschlag in Verbindung mit einem Feldabstand zum NGV-Schlag bisher nicht belegt werden konnte.

40-4 - Bückmann, H.; Kobbe, C.; Hüsken, A.
Julius Kühn-Institut

Eignung des Anbaus von cytoplasmatisch männlich sterilem (CMS) Mais als biologische Confinement-Methode zur Reduzierung der Pollenverbreitung

Suitability of cytoplasmatic male sterile (CMS) maize cultivation as a biological confinement-method to reduce pollen emission

Für die biologische Sicherheit nutzungsveränderter transgener Pflanzen, die z. B. pharmazeutische Wirkstoffe (PMPs), Industrierohstoffe (PMIs), funktionelle Inhaltsstoffe (Functional Food) oder Bioenergie produzieren, ist die Reduzierung einer möglichen unerwünschten Verbreitung (biologisches Confinement) von zentraler Bedeutung. Erforderlich für die Nutzung biologischer Confinement-Methoden sind eine hohe Merkmalstabilität der Gene und Kenntnisse über die Zuverlässigkeit dieser Methoden in verschiedenen Umwelten.

Cytoplasmatisch männlich steriler Mais (CMS) als biologische Confinement-Methode beruht auf der Tatsache, dass die männliche Blüte auf natürliche Weise keinen befruchtungsfähigen Pollen bildet. Diese Eigenschaft wird maternal vererbt, ist aber reversibel in Gegenwart eines oder mehrerer sogenannter Restorer-Gene (Rf-Gene). Diese Gene basieren auf dem Cytoplasma-Typ (CMS-T, CMS-S und CMS-C) und können die Fertilität ganz oder teilweise restaurieren. Die Pflanzen bilden dann fertile oder fluktuierende Rispen mit unterschiedlichen Mengen an befruchtungsfähigem Pollen aus. Desweiteren können auch Umwelteinflüsse wie Starkregen und extreme Hitze die Sterilität aufheben.

Ziel des hier vorgestellten Projektes ist die Prüfung der umweltabhängigen Zuverlässigkeit von CMS-Mais als biologische Confinement-Methode. Die Untersuchungen sollen dazu beitragen, Empfehlungen für den Anbau von nutzungsveränderten Pflanzen zu geben. Im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes „Optimierung der biologischen Sicherheit gentechnisch veränderter Pflanzen“ wurden im Jahr 2009 Feldversuche in drei Umwelten (Braunschweig, Freising, Groß Lüsewitz) unter praxisüblicher Bewirtschaftung durchgeführt und in Hauptwindrichtung angelegt. Aus einem Vorversuch in 2008 wurden drei geeignete CMS-Maishybriden (DSP2: CMS-T, 'Torres' und 'Zidane': CMS-S) ausgewählt und im Vergleich zur konventionellen Hybride 'Delitop' getestet. Alle Hybriden entwickeln gelbe Körner. Weißmais (DSP 17007) diente als Pollenempfänger. Zwischen CMS-Mais- und Weißmaisparzellen (je 48 x 69 m) lag ein Bearbeitungstreifen von 3,5 m. Als natürliche Pollenbarriere zwischen den Prüfeinheiten wurde Hanf angebaut. An definierten Bonitur- und Erntepunkten wurde folgendes untersucht: Blüte der CMS-Maishybriden (steril, fluktuierend, fertil), Pollenvitalität durch Selbstung und Mean Kernel Sets (MKS = Anteil Körner je Spindel), Auskreuzungspotential (Anzahl gelber Körner im Weißmais), Reduzierung der Auskreuzung.

Keine der geprüften CMS-Hybriden war im Versuchsjahr 2009 100 % steril. Die CMS-Hybride DSP2 reagierte stark standortabhängig. In Braunschweig bildete sie überwiegend sterile Rispen an den Boniturstellen aus. Im Gesamtbestand traten aber immer wieder fertile Rispen mit viel Pollen auf. In Groß Lüsewitz wurden überwiegend fluktuierende Rispen mit wenig Pollen bonitiert. Die höchste Vitalität der Pollen wurde in Freising (MKS 81 %) gemessen. In Groß Lüsewitz wurden 40 % MKS entwickelt und in Braunschweig < 1 %. 'Torres' bildete an allen Standorten fluktuierende Rispen mit wenig Pollen, deren Vitalität gering war (MKS < 1 %). Zidane entwickelte erwartungsgemäß fluktuierende bis fertile Rispen mit vitalem Pollen (MKS 20 bis 40 %). Die Zeiträume der männlichen CMS-Maisblüte und der weiblichen Weißmais-Blüte verliefen parallel. Blühsynchronität und Befruchtung waren demnach sichergestellt. An jedem Standort erfolgte die höchste Auskreuzung aller Prüfglieder in der ersten Reihe des Pollenempfängers, d. h. nach 3,5 m. Bereits nach 6,50 m trat eine starke Auskreuzungsreduktion auf, die sich mit zunehmender Entfernung zur CMS-Mais-Parzelle weiter verringerte. Nach 30 m waren alle Werte < 1 %. An den drei Standorten wurde im Mittel der ersten 30 m die Auskreuzung aller CMS-Maishybriden um 84 % bis 97 % im Vergleich zur 'Delitop' reduziert. 'Torres' wies eine Reduktion von mittleren 96,5 % auf. In Braunschweig wurden sogar 98 % erreicht. DSP2 bewirkte eine Auskreuzungsreduktion von ca. 84,2 %, wobei in Braunschweig 91,7 % berechnet wurden und in Freising nur 77 %. 'Zidane' bewirkte eine Auskreuzungsreduktion um mittlere 83,7 %, die höchste am Standort Groß Lüsewitz (89,5 %).

Die 2009 geprüften CMS-Maishybriden stellen (mit Einschränkungen) ein geeignetes Instrument zur Auskreuzungskontrolle dar. Für die Nutzung als Confinement-Methode, beim Anbau von PMPs und PMIs sollten sie mit anderen Confinement-Methoden wie z. B. geringe Isolationsabstände, Mantelsaaten aus Mais oder Hanf, kombiniert werden.

40-5 - Dowideit, K.; Hüsken, A.
Julius Kühn-Institut

Kleistogamer Raps als biologische Confinement-Strategie – Kann eine Auskreuzung über den Pollen unterbunden werden?

Cleistogamous oilseed rape as a biological confinement strategy – Is it possible to prevent out-crossing through pollen?

Beim Anbau von Raps (*Brassica napus* L.) können Rapspollen durch Wind und Insekten auch über weite Distanzen transportiert werden. Das daraus resultierende hohe Auskreuzungspotential könnte bei der Kultivierung von gentechnisch verändertem Raps zu einer Verbreitung von neu eingeführten Genen führen. Um den ungewollten Pollenfluss zu unterbinden und eine Auskreuzung während des Anbaus von transgenem Raps einzuschränken, soll die Eigenschaft der Kleistogamie (Selbstbestäubung in geschlossenen Blüten) als mögliche biologische Confinement-Strategie beim Raps untersucht werden. Kleistogamie kommt beim Raps natürlicherweise nicht vor. Im INRA (National Institute for Agronomic Research, Rennes) wurde jedoch durch chemisch induzierte Mutation ein kleistogamer Rapsgenotyp erzeugt und patentiert. Diese Rapslinie weist einen durchschnittlichen Anteil von 94 % geschlossenen Blüten auf (Leflon et al, 2010).

In Feldversuchen sollen nun Erkenntnisse über die Merkmalsstabilität kleistogamer Rapslinien in unterschiedlichen Umwelten gewonnen und die Zuverlässigkeit kleistogamer Rapslinien als biologische Confinement-Methode überprüft werden. Im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes „Entwicklung und Überprüfung von Confinement-Strategien für Raps“ wurden im Jahr 2009 Feldversuche in zwei Umwelten (Braunschweig (BS)-Völkenrode und Hohenheim) unter praxisüblicher Bewirtschaftung durchgeführt. Als Pollenquelle (Donor) wurde ein 0,25 Hektar großes Feld mit kleistogamem Raps (CLG) angebaut, an das in Windrichtung ein 0,25 Hektar großer Schlag mit nicht-kleistogamem Raps der Linie 'Marcant' als Pollenempfänger (Rezipient) angeschlossen war. An beiden Standorten lag eine Blühsynchronität zwischen Donor- und Rezipientenschlag vor. Dadurch war die Möglichkeit für eine Fremdbestäubung und somit eine Auskreuzung von CLG-Pollen in den 'Marcant'-Plot gegeben. Zum Erntezeitpunkt wurden auf beiden Versuchsflächen aus dem Rezipientenfeld ('Marcant') die Haupttriebe offen abgeblühter Rapspflanzen in jeweils 8 unterschiedlichen Distanzen zum Donorfeld (0 m, 3 m, 4,5 m, 6 m, 12,5 m, 25 m, 36 m und 50 m) geerntet, um die Samen für spätere molekularbiologische Untersuchungen zu gewinnen. Der Nachweis soll mittels des im Folgenden beschriebenen PCR-Verfahrens erfolgen.

Der kleistogame Phänotyp wird bedingt durch eine Mutation im Clg-Gen. Es handelt sich um eine Punktmutation, die zu einem Austausch einer Aminosäure in der Proteinsequenz führt (Lu et al. 2009). Die Clg-Mutation kann durch ein in Frankreich patentiertes Nachweisverfahren detektiert werden (Patent-Nr. 2923839), bei dem eine PCR mit einem anschließenden Restriktionsverdau kombiniert wird. Die Unterscheidung zwischen dem mutierten Genotypen (CLG) und dem Wild-Genotypen ('Marcant') beruht darauf, dass durch die Punktmutation im Clg-Gen von CLG eine Restriktionsschnittstelle entsteht. In den Clg-Gensequenzen von 'Marcant' ist diese Schnittstelle nicht vorhanden. Daher können die PCR-Produkte von CLG nach einem Verdau aufgrund des Längenunterschieds von ca. 20 bp im Agarosegel identifiziert werden. Dieses qualitative PCR-Nachweisverfahren soll genutzt werden, um in einem sog. Subsampling Verfahren die Auskreuzungsrate von CLG in den 'Marcant'-Plot zu ermitteln. Da im Versuch im 'Marcant'-Plot mit geringen Auskreuzungsraten gerechnet wird (bedingt durch die reduzierte Pollenemission im CLG-Plot), muss bei der Anwendung dieser Methode gewährleistet sein, dass auch in Samenproben mit einem geringen Anteil an ausgekreuzten Samen und somit einer geringen Anzahl an Clg-Genkopien aus CLG eine eindeutige Detektion möglich ist. Eine Anpassung der Methode und Bestimmung von Nachweisgrenzen ist daher genauso erforderlich wie die Erstellung von geeigneten Prüfplänen für das Subsampling Verfahren.

Literatur

- [1] Leflon, M., Hüsken, A., Njontie, C., Kightley, S., Pendergrast, D., Pierre, J., Renard, M., Pinochet, X. (2010) Stability of the cleistogamous trait during the flowering period of oilseed rape. *Plant Breeding* 129: 13-18.
- [2] Lu, Y. H.; Delourme, R.; Chalhoub, B.; Piel, N.; Falentin, C.; Renard, M.; Belcram, H. (2009) Producing a cleistogamous plant comprises inhibiting expression of the Clg1 gene. Patent FR 2923839.

40-6 - Dietz-Pfeilstetter, A.
Julius Kühn-Institut

Einfluss eines S/MAR-Elements aus Petunien auf die Stabilität der Transgen-Expression A S/MAR element from petunia affects the stability of transgene expression

Bei der Erzeugung gentechnisch veränderter Pflanzen ist das Ziel eine stabile und vorhersagbare Ausprägung der neuen Eigenschaften über mehrere Generationen. Neben den eingeführten regulatorischen Elementen, der Kopienzahl und dem Integrationsort im Pflanzengenom spielen für die Expression von Transgenen auch epigenetische Effekte eine Rolle. Dazu gehören vor allem verschiedene Formen des "gene silencing", also der Abschaltung von Genen. Epigenetisches "gene silencing" ist Teil der normalen Regulation von Genen während der Entwicklung, ist darüber hinaus aber auch ein Mechanismus zur Abwehr gegen Viren und zur Abschaltung von Transgenen (Eamans et al, 2008). Ein großer Teil der Faktoren, die das "Silencing" von Transgenen auslösen bzw. beeinflussen, sind mittlerweile bekannt. So ist bei Transformanten mit Einzelkopie-Insertionen in hypomethylierten Genombereichen die Wahrscheinlichkeit für die Erzeugung stabiler transgener Linien am größten. Aber auch bei diesen Pflanzen wird gelegentlich eine Abschaltung von Transgenen, insbesondere in den Folgegenerationen und bei Kombination mehrerer Transgene mit Sequenzhomologien, beobachtet (Charrier et al., 2000).

Die Genexpression in transgenen Pflanzen sowie deren Stabilität in Folgegenerationen kann durch Flankierung des Transgens mit sogenannten S/MARs (scaffold/matrix attachment regions) erhöht werden (Ülker et al., 1999; Levin et al., 2005). Wir haben ein S/MAR-Element aus Petunien (Petun-SAR) isoliert (Dietz et al., 1994) und in Markergenkonstrukte eingebaut. Mit den Petun-SAR-Konstrukten transformierte Tabakpflanzen zeigten – anders als Transformanten ohne Petun-SAR – bis zu zwei Kopien eine kopienzahlabhängige Expression des Reportergens. Bei transgenen Linien mit vielen Genkopien und Rearrangements wurde unabhängig von der S/MAR-Flankierung spätestens in der F1-Generation "gene silencing" beobachtet, das mit Methylierungen im Promotor- und im Genbereich assoziiert war. Daraus kann geschlossen werden, dass das Petun-SAR nicht gegen Silencing schützt, das durch multiple Transgen-Loci bedingt ist. Petun-SAR-Linien mit nur einer Genkopie exprimierten das Markergen dagegen in den zwei untersuchten Folgegenerationen stabil, während bei vergleichbaren S/MAR-freien Transformanten bei einem großen Teil der F2-Pflanzen das Transgen nicht mehr exprimiert wurde.

Untersucht wurde auch die Robustheit der Expressionsstabilität gegenüber der Einkreuzung von Transgenen aus instabilen Linien. Die Ergebnisse verschiedener Kreuzungsprodukte zwischen transgenen Linien mit und ohne Petun-SAR werden vorgestellt.

Literatur

- [1] B. Charrier, C. Scollan, S. Ross, E. Zubko, P. Meyer, Co-silencing of homologous transgenes in tobacco, *Molecular Breeding* 6 (2000) 407-419.
- [2] A. Dietz, V. Kay, T. Schlake, J. Landsmann, J. Bode, A plant scaffold attached region detected close to a T-DNA integration site is active in mammalian cells, *Nucl. Acids Res.* 22 (1994) 2744-2751.
- [3] A. Eamans, M.-B. Wang, N.A. Smith, P.M. Waterhouse, RNA silencing in plants: yesterday, today and tomorrow, *Plant Physiol.* 147 (2008) 456-468.
- [4] J.S. Levin, W.F. Thompson, A.S. Csinos, M.G. Stephenson, A.K. Weissinger, Matrix attachment regions increase the efficiency and stability of RNA-mediated resistance to *Tomato Spotted Wilt Virus* in transgenic tobacco, *Transgenic Res.* 14 (2005) 193-206.
- [5] B. Ülker, G.C. Allen, W.F. Thompson, S. Spiker, A.K. Weissinger, A tobacco MAR increases transgene expression and protects against gene silencing in the progeny of transgenic tobacco plants, *Plant J.* 18 (1999) 253-263.

40-7 - Ziegler, A.; Ulrich, D.; Weiß, K.; Wilhelm, R.
Julius Kühn-Institut

Stir Bar Sorptive Extraction GC-MS für die Charakterisierung von flüchtigen Inhaltsstoffspektren bei Kartoffel

Stir Bar Sorptive Extraction GC-MS for the characterization of volatile profiles in potato

Flüchtige Inhaltsstoffe bei Pflanzen (volatile organic compounds;VOC) sind ein bedeutender Faktor bei der direkten und indirekten Abwehr von herbivoren Insekten. Unterschiede in Inhaltsstoffspektren zwischen verschiedenen Genotypen einer Pflanzenart können ausreichend sein, um das Verhalten natürlicher Feinde zu beeinflussen. Daher haben die Phenotypisierung und Aufzeichnung der natürlichen Bandbreite von (flüchtigen) Metaboliten in Kulturpflanzen große Bedeutung. Die Analyse dieser Metaboliten kann Informationen über Stoffe liefern, die anziehend oder abweisend auf Insekten wirken. Sie kann so eine Basis bieten für die Beurteilung der

potentiellen Auswirkungen auf den integrierten Pflanzenschutz, durch gentechnische Veränderungen (z. B. Metabolic engineering) oder konventionelle Züchtungsmethoden.

Für Untersuchungen werden jedoch einfache und effiziente Methoden benötigt, um (anbau-) praxisgerechte Unterschiede zwischen verschiedenen Genotypen und innerhalb von Sorten und Populationen erfassen und bewerten zu können. Die sogenannte SBSE (Stir bar sorptive extraction) wird bereits genutzt, um flüchtige Stoffe in wässrigen Proben (z. B. Bier, Wein, Gewässerproben) zu messen. Wir haben nun die SBSE-Methode auf ihre Anwendbarkeit und Reproduzierbarkeit für die schnelle und Lösungsmittel-freie Messung von flüchtigen Inhaltsstoffen getestet, die von Kartoffelblättern emittiert werden.

40-8 - Cai, D.; Wang, Y.; Knecht, K.; Ye, W.Z.; Menkhaus, J.; Thurau, T.
Christian-Albrechts-Universität Kiel

Gentechnische Resistenz gegenüber sedentären Pflanzenparasitären Nematoden mittels des Chitinase-Gens *PjChi-1* aus dem entomopathogenen Pilz *Paecilomyces javanicus*

Genetic engineering of a broad spectrum resistance to sedentary plant parasitic nematodes by use of a novel chitinase gene, *PjChi-1* from the entomopathogenic fungus *Paecilomyces javanicus*

Sedentäre pflanzenparasitäre Nematoden sind weltweit ökonomisch bedeutsame Schädlinge an Kulturpflanzen. Gene, die für Enzyme mit nematizider Wirkung kodieren, können zur Erzeugung von gentechnischer Nematodenresistenz eingesetzt werden.

Im Rahmen dieses Projekts haben wir das pilzliche Chitinase-Gen, *PjChi-1*, in Zuckerrüben-Wurzeln, in Tomaten- und in Kartoffelpflanzen transferiert. Das erzeugte transgene Material wurde hinsichtlich der Wirkung des Transgens auf die Nematodenentwicklung untersucht. Dazu wurden die transgenen Wurzeln und Pflanzen einem Resistenztest gegenüber Zysten- (*Heterodera schachtii* und *Globodera pallida*) und Wurzelgallen- (*Meloidogyne incognita*) nematoden unterzogen. Die transgenen Wurzeln und Pflanzen wiesen dabei eine hohe Endochitinase-Aktivität und eine signifikante Reduktion der Anzahl der entwickelten Weibchen aller Nematodenarten im Vergleich zur Kontrolle auf. Zudem zeigten die Eier einen auffallenden verringerten Chitingehalt und eine verminderte Schlupffähigkeit. Dies zeigt, dass die Expression von *PjChi-1* in Pflanzen zur Verminderung sowohl von Zysten- als auch Gall-Nematoden führt, was sich durch eine verringerte Eimasse und die Unterdrückung der embryonalen Entwicklung von Nematoden auszeichnet. Obwohl die Wirkungsweise des *PjChi-1*-Gens noch nicht aufgeklärt wurde, zeigen unsere Ergebnisse das Potential des Chitinasegens *PjChi-1* bei der Bekämpfung pflanzenparasitärer Nematoden.

Sektion 41 – Integrierter Pflanzenschutz II

41-1 - Leiminger, J.¹⁾; Bahnweg, G.²⁾; Hückelhoven, R.¹⁾; Hausladen, H.¹⁾

¹⁾ Technische Universität München; ²⁾ Helmholtz Zentrum München

Charakterisierung und Differenzierung von *Alternaria solani* an Kartoffeln mittels molekulargenetischer Methoden

Die Dürffleckenkrankheit zählt weltweit zu einer der wichtigsten Pilzkrankheiten im Kartoffelbau. Als Schaderreger der Dürffleckenkrankheit sind die Pilzarten *Alternaria solani* und *Alternaria alternata* zu nennen. Vor dem Hintergrund einer zunehmenden Ausbreitung und Etablierung der Erreger hat im Verlauf der letzten Jahre die Dürffleckenkrankheit stark an Bedeutung gewonnen. Mehrjährige Untersuchungen belegen, dass die Krankheit auch unter deutschen Anbaubedingungen ertragsschädigend auftritt (Hausladen, 2006). So konnten in Praxisflächen mit stärkerem Befallsdruck Ertragsausfälle von mehr als 30 % aufgezeigt werden (Leiminger, 2008). Die Tatsache der Schadrelevanz erfordert für die deutsche Kartoffelproduktion die Notwendigkeit effektiver Bekämpfungsstrategien. Eine effektive und zielorientierte Bekämpfung setzt eine sichere Diagnose der Erreger voraus. Eine eindeutige Charakterisierung der Erreger anhand der im Feld auftretenden Symptomatik ist problematisch und oft unzutreffend. Neben morphologischen Identifikationsmethoden ermöglichen molekulargenetische Nachweisverfahren eine sichere Diagnose der Erreger, die unabhängig von Symptomausbildung und Sporulation angewendet werden können. So unterstützen erregerspezifische Untersuchungen die Prognose einer auftretenden *Alternaria*-Epidemie. Eine Methode der Differenzierung bietet die PCR-Analyse, wodurch die Erreger anhand artspezifischer DNA-Stücke mit Hilfe spezifischer Primer nachgewiesen werden können (Bahnweg, 1998).