

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

**urn:nbn:de:gbv:3-000015084**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000015084>]

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Stand des Wissens.....</b>	<b>4</b>
2.1.	Herkunft und Bedeutung des Apfels .....	4
2.2.	Grundlagen der Apfelmzüchtung.....	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
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
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
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
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
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>75</b>
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

---

<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>95</b>
<b>6.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>98</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>120</b>
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