

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

1.	Einleitung.....	1
2.	Stand des Wissens.....	4
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
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