

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 Marktbobstbau. 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 Intensivobstanbau 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 Pflanzenschutzmittel 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 ‚Morgenduft‘ 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 Obstbaugesbietes 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 -Glucoronidase (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 Apfelfeldart *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 Apfelfeldart *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; Schernthaner 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-dependent 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 interference‘ 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 integrierter T-DNAs berichtet (Fladung, 1999; Risseeuw 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; Risseeuw 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 photooxidativer 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 Nukleinsäuren, Proteinen oder Nukleinsäure-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 schorffresistenten 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 Nukleinsäuren 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).