

## 5. Diskussion

### 5.1. Vertikaler Gentransfer

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

Beim Apfel wird die Auskreuzungsrate als hoch eingeschätzt, weil dieser als Fremdbefruchter einen Kreuzungspartner benötigt und die Bestäubung durch Insekten erfolgt (Schütte et al., 2001).

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

#### 5.1.1. Versuchsanlage, befruchtungsbiologische Untersuchungen und Stichprobennahme

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **5.1.2. Bestimmung des vertikalen Gentransfers mittels morphologischer und molekularer Marker**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 5.1.3. Bestimmung der Auskreuzungsfrequenz

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

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

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

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

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

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



Sämlingen aus freier Abblüte wurde jeweils ein pollenspenderspezifisches Allel detektiert.

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

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

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

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

## **5.2. Stabilität der Integration und Expression von Transgenen bei Apfel**

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

### **5.2.1. Stabilität der Integration der T-DNA**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 5.2.2. Stabilität der Expression auf Transkriptions- und Translationsebene

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

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

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

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

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

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

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

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



(2003) bei transgenen Broccoli-Klonen gemacht. Nach Langzeit-In-vitro-Kultur war die T-DNA bei den Broccoli-Linien zwar stabil integriert, die Expression des Transgens war allerdings vermindert. Leljak-Levanic et al. (2004) berichteten über einen Einfluss der Zusammensetzung des Kulturmediums auf die DNA Methylierung. Bei somatischen Embryonen, die auf auxinfreiem Medium kultiviert wurden, stieg der Anteil der DNA Methylierung. Andere abiotische Faktoren können ebenfalls die Genexpression beeinflussen. Besonders Salz-, Kälte-, Hitze- oder Trockenstress kann zu einer Veränderung der Genexpression führen (El Ouakfaoui und Miki, 2005; Papazova et al., 2007). Die Überführung der Pflanzen aus der In-vitro-Kultur in die veränderten Gewächshausbedingungen sowie Veredelungsmaßnahmen sind als Einflussfaktoren auf die Stabilität der T-DNA Expression daher nicht auszuschließen.

Zwischen den Linien wurden große Unterschiede der translatierten NPTII-Proteinmenge festgestellt. Unterschiedliche Expressionslevel bei verschiedenen Linien wurde in der Literatur häufig auf den so genannten ‚Positionseffekt‘ zurückgeführt (Allen et al., 2000; Fagard und Vaucheret, 2000; Maqbool und Christou, 1999; Matzke et al., 1989; Wakimoto, 1998; Wallrath, 1998). Dabei wird die Expression von der Chromatinstruktur des Integrationsortes positiv oder negativ beeinflusst. Andere Autoren gaben dagegen an, dass die genomische Position keinen signifikanten Einfluss auf die T-DNA Expression hat (Gendloff et al., 1990; Hobbs et al., 1990; Nagaya et al., 2005). Hobbs et al. (1990) untersuchten vier unabhängige transgene Tabaklinien mit einer Einfachintegration der T-DNA, die an unterschiedlichen Positionen auf dem Chromosom lokalisiert waren. Alle Linien zeigten die gleiche Transgenexpression. Die flankierenden genomischen Bereiche der T-DNA wurden in dieser Analyse jedoch nicht identifiziert, weshalb nicht klar ist, ob die T-DNA in euchromatische oder heterochromatische Regionen integriert wurde. Bei den Analysen von Nagaya et al. (2005) war bei keiner der untersuchten Linien die T-DNA in heterochromatische Bereiche, wie Telomere oder Centromere integriert. Die Schlussfolgerung, dass die genomische Position keinen Einfluss auf die Genexpression hat, gilt daher nicht generell.

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

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

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

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

### **5.2.3. Transport von Transgenprodukten innerhalb veredelter Apfelgehölze**

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

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

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

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

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

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

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