Verhalten des *pat*-Gens in transgenem Raps und Mais im Freilandversuch Roggenstein

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Biologie

der Ludwigs-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Hilkea Rosenbrock

aus

Walsrode

Mai 2001

Teile der vorliegenden Arbeit sind publiziert:

Sandermann, H., Rosenbrock, H. and Ernst, D. (1997) Horizontaler Gentransfer bei Herbizid-Resistenz ? Der Einfluß der Genstabilität und Selektivität. In: Zukunft der Gentechnik, Hrg. P. Brandt, Birkhäuser Verlag, 209-220.

Ernst, D., Rosenbrock, H., Hartmann, A., Kirchhof, G., Bauer, S., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Sandermann, H. and Fischbeck, G. (1998) Sicherheitsforschung zu Freisetzungsversuchen in Roggenstein (Bayern). *Bundesgesundheitsblatt* **41,** 523-530.

Ernst, D., Rosenbrock, H. and Sandermann, H. (1998) Vorversuche zum horizontalen Gentransfer. In: vdbiol-Forum München, FORBIOSICH, Eigenverlag Verband Deutscher Biologen, München.

Ernst, D., Rosenbrock, H., Kirchhof, G. and Hartmann, A. (1998) Transgene DNA - ihr Verbleib und ihr Einfluß auf die Mikroflora. *Biologie in unserer Zeit* **29,** 185.

Die Dissertation wurde am 31.05.2001 bei der Ludwig-Maximilians-Universität München eingereicht und am 06.11.2001 von der Fakultät für Biologie angenommen.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Sandermann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-U. Koop

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2001

1.	**Einleitung**	8
1.1	Konventionelle Züchtung und Gentechnik	8
1.2	Methoden der Genübertragung	10
1.2.1	Gentransfer mit dem *Agrobacterium tumefaciens*	10
1.2.2	Gentransfer in Protoplasten	11
1.2.3	Gentransfer mittels der *„Particle-Gun*“-Methode	11
1.3	Ziele der Gentechnik in der Pflanzenzüchtung	12
1.3.1	Herbizidresistenz	13
1.3.2	Insektenresistenz	14
1.3.3	Virusresistenz	15
1.3.4	Pilzresistenz	15
1.3.5	Produktqualität	17
1.4	Freilandversuche mit transgenen Pflanzen	18
1.5	Herbizidresistenz, vermittelt durch das *pat*-Gen	21
1.5.1	Entdeckung von BASTA®	21
1.5.2	Wirkungsweise in nicht-transgenen Pflanzen	22
1.5.3	Entgiftung in transgenen Pflanzen	22
1.5.4	Metabolismus im Boden	23
1.5.5	Metabolismus von BASTA® in transgenen und nicht-transgenen Pflanzen	24
1.6	Pflanzliche Senezenz	25
1.7	Der Roggenstein-Freisetzungsversuch	35
1.8	Themenstellung dieser Arbeit (A4)	38
2.	**Material und Methoden**	41
2.1	Materialien	41
2.1.1	Chemikalien und Enzyme	41
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	41
2.1.3	Medien und Puffer	41
2.1.4	Probenmaterial	43
2.2	Biochemische Untersuchungsmethoden	47
2.2.1	Bestimmung des Chlorophyllgehaltes	47
2.2.2	Bestimmung des Gesamtflavonoidgehaltes	47

2.2.3	Bestimmung von ACC und MACC in Pflanzenzellen	47
2.2.4	Bestimmung des Gesamtproteingehaltes nach Bradford (1976)	48
2.2.5	Bestimmung der freien Aminosäuren im Blattmaterial	49
2.3	Molekularbiologische Methoden	50
2.3.1	Extraktion der DNA aus Pflanzenmaterial	51
2.3.2	Extraktion der DNA aus Honig und Propolis	51
2.3.3	Extraktion von DNA aus Boden und verrottenden Maispflanzen	51
2.3.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*	52
2.3.5	Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen	52
2.3.6	Northern-Blotting	53
2.3.7	Slot-Blot	53
2.3.8	Hybridisierungen	54
2.3.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	55
2.3.10	Kolonien-PCR	57
2.3.11	Sequenzieren der PCR-Produkte	57
2.4	Mikrobiologische Methoden	58
2.4.1	Anzucht von Bodenbakterien	58
2.4.2	Elektroporation	59
3.	**Ergebnisse**	60
3.1	Biochemische Untersuchungen	60
3.1.1	Chlorophyllgehalt	60
3.1.2	ACC- und MACC-Gehalt	61
3.1.3	Gesamtflavonoidgehalt	63
3.1.4	Gesamtproteingehalt	64
3.1.5	Ergebnisse aus der Bestimmung der freien Aminosäuren	66
3.2	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungsmethoden	75
3.2.1	Gewächshausvorversuche mit transgenen Maispflanzen	75
3.2.2	Ergebnisse der PCR der Maiskompostproben	79
3.2.3	Quantitative PCR	81
3.2.4	Ergebnisse der quantitativen PCR der Rapsblätter	83
3.2.5	Ergebnisse der quantitativen PCR der Rapsstengel	87

3.2.6	Ergebnisse der quantitativen PCR der Rapsblüten bzw. Schoten/Samen	90
3.2.7	Ergebnisse der quantitativen PCR der Rapswurzeln	94
3.2.8	Ergebnisse der PCR aus Honig und Propolis	97
3.2.9	Ergebnisse der quantitativen PCR im Boden	99
3.2.10	Sequenzierung der PCR-Produkte	100
3.2.11	Northern- und Slot-Blot-Analysen	101
3.3	Ergebnisse aus den mikrobiologischen Untersuchungen	106
3.3.1	Wachstum auf Minimalmedien	107
3.3.2	Wachstum auf Vollmedien	112
3.3.3	Elektroporation verschiedener Bodenbakterien mit dem *pat*-Plasmid	118
4.	**Diskussion**	120
4.1	Seneszenz transgener und nicht-transgener Pflanzen	120
4.1.1	Chlorophyll	120
4.1.2	ACC-und MACC-Gehalt	121
4.1.3	Flavonoide	122
4.1.4	Aminosäuren und Proteine	122
4.1.5	Seneszenz auf DNA-Ebene	125
4.1.6	Seneszenz auf RNA-Ebene	126
4.2	Horizontaler Gentransfer durch Persistenz der Gene in der Umwelt	128
4.2.1	Mechanismen der horizontalen Genübertragung	128
4.2.2	Mechanismen der nicht-horizontalen Genübertragung	130
4.2.3	Persistenz der DNA im Boden	130
4.2.4	Kompetenz von Mikroorganismen	135
4.2.5	Selektionsdruck durch BASTA®	137
4.2.6	Selektionsdruck durch BASTA® auf Bodenmikroorganismen unter Laborbedingungen	139
4.2.7	Gentransfer unter Laborbedingungen	141
4.2.8	Horizontaler Gentransfer von als Selektionsmarker verwendeten Antibiotikaresistenzgenen	143
4.2.9	Horizontaler Gentransfer durch homologe Rekombination	144
4.2.10	Aspekte zur Sicherheitsforschung	146

5. Zusammenfassung 148

6. Literaturverzeichnis 150

Abkürzungen

ACC	1-Amino-Cyclopropan-1-Carbonsäure
ATP / CTP / GTP / TTP	Adenosin-/ Cytidin-/ Guanosin-/ Thymidin-5`-triphosphat
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cab-Gen	Gen des Chlorophyll a/b-bindenden Proteins
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FG	Frischgewicht
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung bei Zentrifugationen
GC	Gaschromatograph
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-(Hydroxyethyl)-Piperazin N‘-2-Ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ID	Innendurchmesser
IPTG	Isopropyl-ß-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
MACC	1-(Malonylamino)-Cyclopropan-1-Carbonsäure
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
N	Normalität
nmol	Nanomol
OD	Optische Dichte
nos-Gen	Nopalin-Synthetase-Gen
pat-Gen	L-Phosphinothricin-Acetyltransferase-Gen

PEG	Polyethylenglykol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rbcS-Gen	Gen der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5 Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumeneinheit
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-ß-D-Galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Konventionelle Züchtung und Gentechnik

Neben der konventionellen Züchtung gewinnt die Gentechnologie immer mehr Bedeutung in der Landwirtschaft. Die Möglichkeiten der klassischen Pflanzenzüchtung, die auf dem Wege der Kombination von gewünschten Eigenschaften zu verbesserten Nutzpflanzen zu gelangen versucht, sind begrenzt. Kreuzungen waren ursprünglich nur innerhalb einer Pflanzengattung möglich (Fonds der Chemischen Industrie, 1996). Eine der neuesten Errungenschaften der klassischen Pflanzenzüchtung seit Beginn dieses Jahrhunderts ermöglicht auch Kreuzungen über diese Gattungsgrenzen hinaus, wobei z. B. die *Triticale*-Züchtung zu nennen ist (Nevers, 1991). Diese Verfahren sind sehr zeitaufwendig und erfordern immer wieder Rückkreuzungen mit den Wildtypen.
Mit Hilfe der Gentechnologie kann die gezielte Übertragung einzelner Gene, im Gegensatz zur Rekombination ganzer Genome, bei der klassischen Züchtung erfolgen. Genübertragungen sind zwischen Organismen möglich, die sich nicht miteinander kreuzen lassen; es ist eine Genübertragung über die Artengrenzen hinweg durchführbar. Die Gentechnik bedient sich molekularbiologischer Methoden zur Bildung von Konstrukten aus Genen oder Genanteilen aus verschiedenster Herkunft und überführt diese Genkonstrukte mittels Vektoren in geeignete Zellen oder Organismen, wo die Genexpression dieser Konstrukte im neuen zellulären Umfeld stattfinden soll. Der erste Gentransfer auf Pflanzen wurde 1983 mit dem *Agrobacterium tumefaciens* und dessen Ti-Plasmid durch Übertragung eines Antibiotikaresistenzgens auf Tabakpflanzen durchgeführt. Die folgende Abbildung zeigt die Vorgehensweisen bei konventionellen Methoden (rechte Spalte) und gentechnischen Methoden (linke Spalte). Die Unterschiede sind eingerahmt.

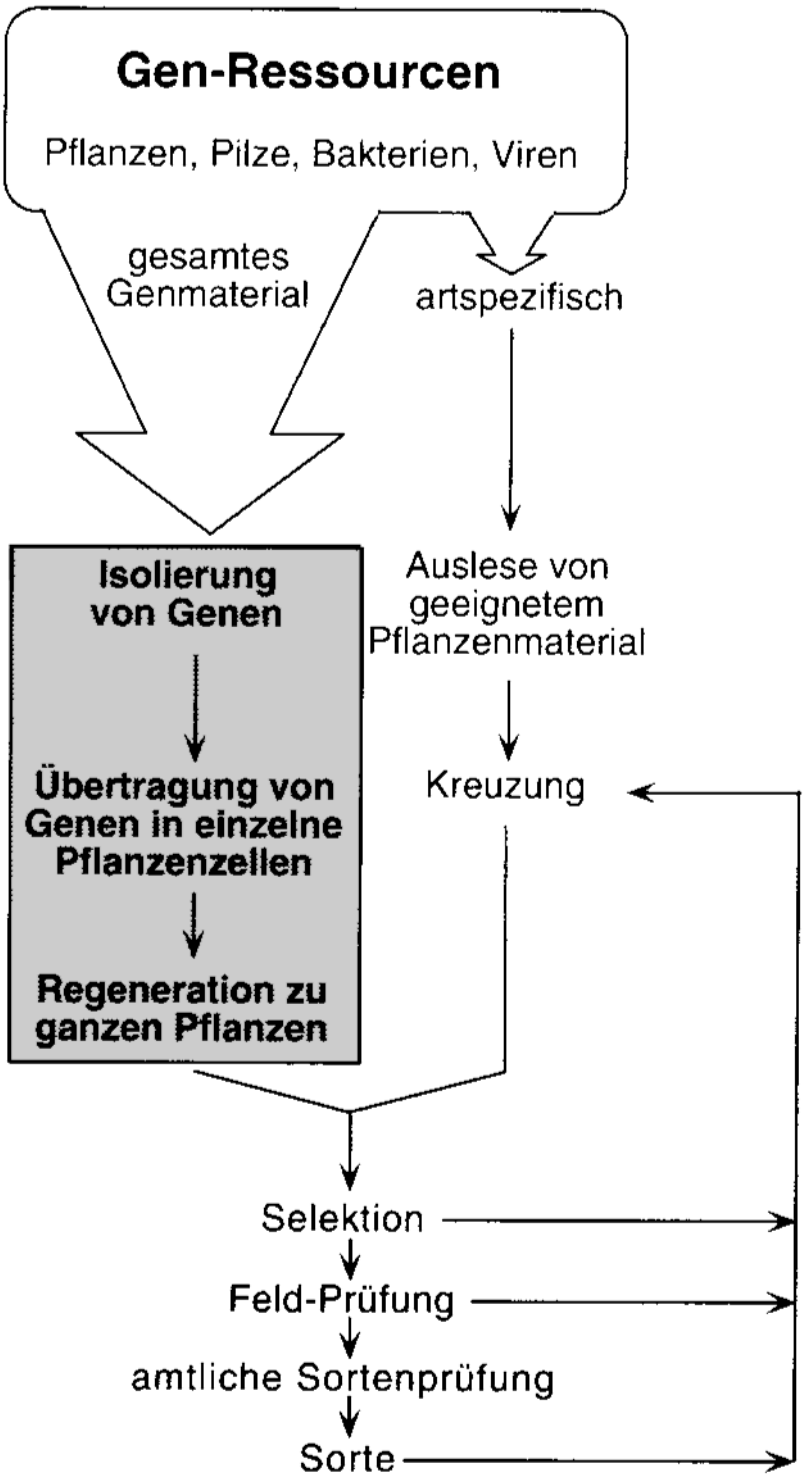


Abb.1: Vorgehensweise bei gentechnischen (dunkler Bereich) und klassischen Züchtungsmethoden (Gassen, Kemme, 1996).

1.2 Methoden der Genübertragung

Die Wahl einer bestimmten Methode zur Genübertragung wird hauptsächlich von den Eigenschaften der jeweiligen Pflanze bestimmt und nicht von der zu übertragenden DNA (Brandt, 1995). Im folgenden sollen einige verschiedene Methoden des Gentransfers genannt werden:

1.2.1 Gentransfer mit dem Agrobacterium tumefaciens

Bei vielen dikotyledonen *Angiospermen* und *Gymnospermen* treten Tumore (sog. Wurzelhalsgallen, Klumpen aus undifferenziertem Gewebe) auf, wenn verwundete Stellen mit dem gram-negativen Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* infiziert werden. Untersuchungen der Wurzelhalsgalle haben gezeigt, dass das *Agrobacterium tumefaciens* eine natürliche Vorgehensweise betreibt, mit der genetische Veränderungen in der Pflanze hervorgerufen werden, die dem Bakterium nützlich sind. Diese genetischen Veränderungen werden durch Plasmide induziert (tumor-inducing Plasmid). Man unterscheidet bei *Agrobacterium tumefaciens* Octopin- und Nopalin-induzierende Tumore. Octopin und Nopalin sind Verbindungen, die sich von Aminosäuren ableiten und normalerweise nicht in Geweben vorhanden sind. Sie dienen dem *Agrobacterium* als Nährstoffquelle. In allen Tumorzellen wird die vollständige DNA des Ti-Plasmids nicht vorgefunden, sondern nur ein kleiner, spezifischer Plasmidabschnitt mit einer Grösse von ungefähr 23 kb, der in die pflanzliche Kern-DNA integriert ist. Dieser DNA-Bereich wird als T-DNA (Transfer-DNA) bezeichnet. Die Integration der T-DNA kann unspezifisch und an verschiedenen Stellen der pflanzlichen Kern-DNA erfolgen. Die Nopalin-T-DNA ist in einem Stück eingebaut, die Octopin-T-DNA liegt gewöhnlich in zwei Fragmenten vor. Der Mechanismus der Integration scheint der Konjugation von Bakterien ähnlich zu sein. Das Ti-Plasmid stellt einen natürlichen Vektor für den Gentransfer in Pflanzen dar. Da seine T-DNA vom Bakterium in die Pflanze übertragen wird, wendet man diesen Vorgang auch in der Gentechnologie an. Die Wildtyp-Ti-Plasmide sind generell nicht als Vektoren geeignet, da undifferenziertes Wachstum in der Empfängerzelle ausgelöst wird. Eine Deletion der onkogenen Eigenschaften ist Bedingung. Zambryski *et al.,*1983, ersetzten den grössten Teil der T-DNA von pTiC58 durch Sequenzen des Plasmids pBR322, so dass nur noch die linken

und die rechten Übergangssequenzen und das *nos*-Gen vorhanden waren. Agrobakterien, die dieses neue Konstrukt (pGV3850) tragen, konnten die veränderten T-DNA-Moleküle in die Pflanzenzelle übertragen, ohne dass eine gleichzeitige Tumorbildung erfolgte. Die Fremd-DNA wird in die T-DNA eingebaut. Dafür wurde ein Zwischenvektor IV entwickelt, bei dem die T-DNA in pBR322-Plasmid-Vektoren von *E.coli* subkloniert wurde. Mit Standardvektoren kann jede beliebige DNA in die T-Region des IV-Vektors kloniert werden. Der IV-Vektor mit integrierter Fremd-DNA kann durch Konjugation in *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Old und Primrose, 1992; Zambryski *et al.,* 1989; Hemleben, 1990).

1.2.2 Gentransfer in Protoplasten

Eine andere Methode des Gentransfers erfolgt direkt in pflanzliche Protoplasten, die aus intakten Zellen durch Behandlung mit hydrolytischen Enzymen, wie Hemicellulasen, Pektinasen und Cellulasen, erhalten werden. Der Protoplast ist dann nur noch vom Plasmalemma umgeben. Die Aufnahme der Fremd-DNA erfolgt dann z. B. durch Elektroporation oder Zusatz von PEG oder Calciumionen. Bei der Durchführung der Elektroporation befinden sich die Gewebe oder Zellen in wässriger Lösung mit der zu übertragenden DNA. Bei der Entladung werden beim Plasmalemma kurzzeitig Poren geöffnet, durch die die Plasmide mit integrierter Fremd-DNA in die Zellen aufgenommen werden (D'Halluin *et al.,* 1992; Toriyama *et al.*, 1988). Der Einbau der DNA in die Pflanze ist zufällig und nicht zielgerichtet. Ob das fremde Gen exprimiert wird, ist von verschiedenen Faktoren abhängig, wie z. B. von der Vollständigkeit des DNA-Segments. Häufig wurde die DNA bei der Übertragung durch mechanische Belastung geschädigt.
Die transgenen Protoplasten werden im nächsten Schritt zu intakten, fertilen Pflanzen regeneriert. Dieser letzte Schritt ist der begrenzende dieser Methode; die Regeneration zu intakten Pflanzen ist inzwischen bei über 200 Species, besonders bei Tabak und Tomate, gegeben.

1.2.3 Gentransfer mittels der „Particle-Gun"- Methode

Diese Transformationsmethode kann bei allen Pflanzenspecies angewandt werden. Gold- oder Wolfram-Partikel, die mit DNA beschichtet sind, fungieren als Mikroprojektile und werden unter hohem Druck in die Zellen von Gewebeteilen, pflanzliche Embryonen

oder Zellkulturen geschossen. Die Gewebeteile oder Zellen befinden sich auf einer Trägerplatte. Auf diesem Wege wurden unter anderem transgene Pflanzen von Mais, Weizen und Gerste erzeugt.

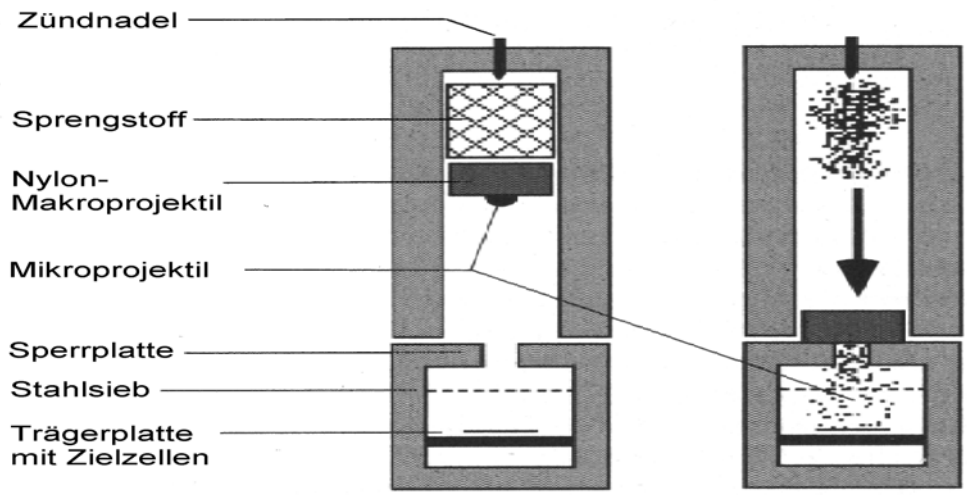


Abb. 2: Schematische Zeichnung des *„Particle-Gun"*- Gerätes (Gassen und Kemme, 1996).

Um die erfolgreiche Integration des Fremdgens zu überprüfen, werden bei all diesen Methoden bestimmte Markergene, wie z. B. Antibiotikaresistenzgene, mit eingebaut.

1.3 Ziele der Gentechnik in der Pflanzenzüchtung

Die Ziele der gentechnischen Züchtung sind der klassischen gleichgestellt, nämlich eine Optimierung der Pflanzen für die Nutzung durch den Menschen als Lebensmittel-, Rohstoff- und Energielieferant. Diese sollen mit einem geringen Einsatz an Betriebsmitteln und optimalen Ernten erreicht werden.

Im allgemeinen sind Pflanzen gegen die Mehrheit der Pflanzenpathogene resistent. Ein Pflanzenpathogen kann in einer Pflanzenart Schäden hervorrufen, aber sonst in kaum einer anderen. Diese pflanzenspezifische Resistenz wird als „Non-Host"-Resistenz bezeichnet (Staskawicz *et al.,* 1995). Die biochemischen Mechanismen, die dieser „Non-Host"- Resistenz zugrunde liegen, sind nur zum Teil geklärt. Pathogenresistenz kann auf

verschiedenen Wegen erfolgen; häufig besteht eine Korrelation mit einer hypersensitiven Reaktion. Bei der hypersensitiven Reaktion handelt es sich um eine Abwehrstrategie, bei der Pflanzenzellen in der unmittelbaren Umgebung von Pathogeninfektionen einem programmierten Zelltod unterliegen, um so die Ausbreitung der Infektion zu verhindern.

Viele der auf herkömmliche Art erzeugten Zuchtsorten zeigen eine hohe Anfälligkeit gegen Pathogenbefall. Die vorrangigen Züchtungsziele waren bisher die Steigerung des Ertrags und der Qualität, nicht aber die Resistenz gegen Schädlinge. Um hier verbesserte Eigenschaften zu erhalten, sind bei konventionellen Methoden zeitaufwendige Rückkreuzungen mit den resistenteren aber ertragsarmen Wildtypen notwendig. Häufig erfolgt dann der Pflanzenschutz mit Pestiziden, die das Ökosystem nachhaltig belasten können. Die Gentechnologie bietet die Möglichkeit, Pflanzen mit Resistenz- und Schutzmechanismen auf molekularer Ebene auszustatten. Dadurch sollte es möglich sein, den Verbrauch von chemischen Pflanzenschutzmitteln, wie Fungiziden, Herbiziden und Insektiziden, einzuschränken, bzw. auf solche Chemikalien zurückzugreifen, die in der Umwelt schnell abbaubar sind und eine geringe Toxizität für Mensch und Tier bedeuten. Nachfolgend sollen einige Beispiele der Möglichkeiten transgener Pflanzen aufgeführt werden:

1.3.1 Herbizidresistenz

Die heutige Landwirtschaft wäre ohne den Einsatz von Herbiziden nicht denkbar. Viele der heute verwendeten Herbizide haben eine geringe Toxizität für das Ökosystem. Diese Herbizide verfügen aber häufig nicht über die notwendige Selektivität und sind daher nicht bei Kulturpflanzen einsetzbar. Mittels gentechnischer Methoden können den Nutzpflanzen Resistenzgene übertragen werden, wodurch auch die Anwendung von Herbiziden mit einem weiten Wirkungsspektrum möglich ist (Brandt *et al.,* 1997). Eine Möglichkeit der Herbizidentgiftung besteht in der Expression von Enzymen in den Pflanzengeweben, die in der Lage sind, das Herbizid zu metabolisieren, wie es z. B. bei Pflanzen geschieht, denen das *pat*-Gen inseriert wurde (siehe Punkt 1.5). Eine ähnliche Strategie wird mit dem Herbizid Glyphosat verfolgt. Glyphosat-resistente Nutzpflanzen enthalten ein Gen, das eine modifizierte Form der 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthetase (EPSP) kodiert. Transgene Nutzpflanzen, die über eine modifizierte Form

des EPSP-Gens verfügen, sind in der Lage, durch Überproduktion des entsprechenden Enzyms Glyphosat zu tolerieren (Schulz *et al.,* 1985, Amrhein *et al.*, 1980).

1.3.2 Insektenresistenz

Einige Pflanzen verfügen über Schutzmechanismen gegen Schadinsekten. Bei einer Insektenattacke sind sie im Idealfall in der Lage, speziell nur gegen diese eine Insektenart ihre Abwehrmechanismen einzusetzen. Insektenresistenzen sind bisher durch die folgenden Verbindungen erzielt worden:

Lectine:
Durch die Einführung eines Lectin-kodierenden Gens aus *Galanthus nivalis* in Tabak erzielte Hilder *et al.*, 1995, eine verbesserte Resistenz gegen *Myzus persicae.*

Protease-Inhibitoren:
Protease-Inhibitoren greifen selektiv die proteolytischen Enzyme des Schädlings an. Hilder *et al.*, 1987, transferierten das Gen für einen Trypsin-Inhibitor aus *Vigna unguiculata* in Tabak und erreichten dadurch eine erhöhte Resistenz gegen *Heliothis virescens.*

α*-Amylase-Inhibitoren:*
Erbsensamen (*P. sativum)* konnten durch die Einführung eines α-Amylase-Inhibitor-Gens aus Bohnen (*Phaseolus vulgaris)* Resistenz gegen die Vorratsschädlinge *C. chinensis* und *C. maculatus* aufweisen (Shade *et al.,* 1994).

β*-Endotoxinproteine:*
β*-Endotoxinproteine* stammen aus dem sporenbildenden gram-positiven Bodenbakterium *Bacillus thuringiensis* (B.t). Es bildet kristalline Einschlüsse, die sich im Verdauungstrakt der Insekten auflösen und die Proteine *(*β*-Endotoxine)* freisetzen. Diese freigesetzten Proteine werden durch die Proteasen im Darm der Insekten aktiviert. Es kommt zu Interaktionen mit den Darmepithelzellen, was zur Zerstörung der

Zellmembran führt (Gill *et al.,* 1992).
Inzwischen wurden viele Nutzpflanzen mit B.t-Genen von *Bacillus thuringiensis* unterschiedlicher Spezifität transformiert.

1.3.3 Virusresistenz

Virusresistenz bei Pflanzen kann durch die Transformation mit kodierenden Sequenzen des viralen Genoms oder durch pflanzeneigene virale Abwehr-Faktoren erfolgen. Die meisten Viren, die Pflanzen befallen, enthalten einen einzelnen messenger-sense-RNA-Strang, der von einer Proteinhülle umgeben ist. Durch Insertion von Teilen der genetischen Information des viralen Genoms in das Genom der Pflanze ist es möglich, eine Resistenz gegen den betreffenden Virus zu erhalten. In die Pflanze wird der virale DNA-Abschnitt übertragen, der für das Virushüllprotein kodiert. Eine so vermittelte Resistenz konnte bisher für mindestens 20 unterschiedliche RNA-Viren erhalten werden (Schulte und Käppeli, 1996; Brandt, 1995).

1.3.4 Pilzresistenz

Bei der Züchtung von pilzresistenten Pflanzen wird zwischen monogener (vertikaler) und polygener (horizontaler) Resistenz unterschieden. Im Rahmen der monogenen Resistenz besitzt die Pflanze gegen einen bestimmten Schaderreger vollständige Resistenz. Die polygene Resistenz schliesst Abwehrmechanismen gegen mehrere Schaderreger ein, bietet aber nur einen Teilschutz (Flor, 1956). Im folgenden sollen die verschiedenen Stoffklassen und ihre Wirkmechanismen gegen Pilzbefall kurz erläutert werden:

Antifungale Proteine:
Durch Befall mit einem Schaderreger reagiert die Pflanze durch die Aktivierung der „defense-related genes“ (Bowles, 1990; Huub und Linthorst, 1991). Die dadurch gebildeten Proteine haben verschiedene Ansatzpunkte :
Um Schaderreger gleich beim Eindringen in die Pflanzenzelle abzuwehren bzw. Schäden zu reparieren, wird die Bildung verschiedener Zellwandproteine, wie z. B. von Glycoproteinen und Prolin- sowie Glycin-reichen Proteinen, beobachtet (Keller, 1993).
Resistenzen werden auch mittels PR-Proteinen („pathogenesis-related proteins“) erzielt.

PR-Proteine werden nur bei Pathogenbefall oder anderem Stress im pflanzlichen Organismus gebildet. Erhöhte Resistenz gegen die Oomyceten *Peronospora tabacina* und *Phytopthora parasitica* wurden von Alexander *et al.,* 1993, durch die Überexpression eines PR-1-Proteins in transgenem Tabak erzielt. Des weiteren kommt es zur Bildung von Proteinen, die eine direkte, antifungale Wirkung haben, z. B. Chitinasen und β-1,3-Glucanasen. Chitin und β-1,3-Glucan sind die Gerüstsubstanzen vieler pathogener Pilzarten, welche beim Eindringen in die Pflanze hydrolytisch mittels der beiden o.g. Enzyme abgebaut werden. Erste positive Erfolge durch die Überexpression von Chitinasen und Hydrolasen in der molekularen Resistenzzüchtung gelang Broglie *et al.,* 1991, mit der konstitutiven Expression einer Chitinase aus Bohnen in *Brassica napus* und *N. tabacum,* wodurch die Resistenz gegen *Rhizoctonia solanum* gesteigert werden konnte.

Durch die Bildung Ribosomen-inhibierender Proteine können die Ribosomen der Schaderreger blockiert werden und so deren Proteinsynthese unterbinden. Logemann *et al.,* 1992, isolierten ein Gen für ein Ribosomen-inhibierendes Protein aus Gerstensamen. Dieses Gen wurde zusammen mit dem wundinduzierenden Promotor *wun1* aus Kartoffeln in eine Tabaklinie transformiert, wodurch eine erhöhte Resistenz gegen *Rhizoctonia solani* erhalten wurde.

Phytoalexine:

Phytoalexine werden bei Befall mit Mikroorganismen von den Pflanzen synthetisiert und besitzen antimikrobielle Aktivität (Van Etten *et al.,* 1989). Als besonders wirkungsvoll erwies sich die Übertragung von Fremd-DNA für Biosynthese-Enzyme von Phytoalexinen (Lamb *et al.,* 1992). Allerdings muss beachtet werden, dass Hindernisse durch verzweigte Synthesewege und die evtl. zu geringe Anzahl von übertragenen Schlüsselenzymen einschränkend wirken können sowie die Phytotoxizität vieler Phytoalexine (Dixon *et al.,*1994).

1.3.5 Produktqualität

Im folgenden soll eine Auswahl der bestehenden Möglichkeiten der Gentechnik vorgestellt werden, die zur Veränderung der Produktqualität von Kulturpflanzen beitragen.

Kohlenhydrate

In höheren Pflanzen wird Stärke als Reservekohlenhydrat gespeichert. Die Hauptbestandteile der Stärke bestehen aus unverzweigter, helikaler Amylose und dem verzweigten Amylopektin. Die Stärke der Kartoffelknollen besteht zu 18-23% aus Amylose (Shannon und Gorwooll, 1994). Die Mischung aus Amylose und Amylopektin ist schwer zu trennen. Durch gentechnische Eingriffe wurde bewirkt, dass in Kartoffeln nur noch Amylopektin als Speicherkohlehydrat gebildet wird. Für die Bildung der Amylose ist das Enzym „granule bound starch synthase“ (GBSS) verantwortlich. Durch Antisense-Inhibierung gelang es, die Synthese dieses Enzyms zu unterbinden (Düring, 1993). Amylopektin findet z. B. Einsatz in der Textilweberei oder als Flockulierungsmittel in der Abwasseraufbereitung (Willmitzer und Brennicke, 1993).

Veränderung der Fruchtreife:

Tomate *Flavr-Savr*

Während der Reifung wirkt unter anderem das Enzym Polygalacturonase an der Depolymerisation des Pektins der Zellwände mit. Dieses Gen wurde aus *Lycopersicon esculentum* isoliert. Smith *et al.* (1988, 1990a, 1990b) transformierten die dazugehörige Sequenz in antisense Orientierung in die Pflanzen und konnten dadurch einen um 99% verringerten Gehalt an Polygalacturonase erreichen, wodurch das Weichwerden der Tomaten stark verzögert wurde.

Weiterhin werden in der Literatur (Brandt, 1995) die Veränderung des Fettsäuremusters bzw. Ölgehaltes, die veränderte Synthese von Proteinen, Stress-, Kälte- und Schwermetalltoleranz, und die der Blütenfarbe und pflanzlicher Entwicklungsprozesse sowie die Synthese pflanzenfremder Antikörper, Peptide und Polymere beschrieben.

1.4 Freilandversuche mit transgenen Pflanzen

Bevor eine gentechnisch veränderte Pflanze im grossen Maße kultiviert werden kann, muss sie unter definierten Gewächshausbedingungen und anschliessend im Freiland angebaut werden, um dort den Einfluss von natürlichen Faktoren zu testen.
Mit den Freisetzungsversuchen könnten aber auch Sicherheitsrisiken für die Umwelt verbunden sein.
Wird das Fremdgen auf andere Pflanzenarten, verwandte Sorten oder/und Unkräuter übertragen ? Es besteht die Gefahr der unerwünschten, unkontrollierten Ausbreitung der neu eingeführten Gene in andere Organismen (Syvanen, 1994; Jørgensen *et al.,* 1996), wie es z. B. schon bei Antibiotikaresistenzen geschehen ist.
Dies sind Fragen, die in der Forschung noch eingehender betrachtet werden müssen.

Um einen Gentransfer über Pollen möglichst zu unterbinden, ist es von Interesse, die Verbreitung der Pollen zu ermitteln. Es ist aus der Literatur (Fischbeck, 1998 und Morris *et al.,* 1994) bekannt, dass eine Mantelsaat von entsprechenden nicht-transgenen Pflanzen die grösste Menge der Pollen abfängt. Bei transgenen Pflanzen, von denen artverwandte, einheimische Pflanzen vorkommen, ist das Risiko des Gentransfers durch Pollen als besonders hoch einzustufen. Transgener Raps gehört zur Familie der *Brassicaceen;* somit bilden z. B. Rübsen (*Brassica rapa)* bei zeitgleicher Blüte ein Potential für die Übertragung des *pat*-Gens durch Pollen. Zudem ist das Genom von Rübsen vollständig im amphiploiden Rapsgenom enthalten. Aufgrund der Familienzugehörigkeit von Senf und Hederich zu den *Brassicaceen* wären diese beiden Unkräuter ebenfalls potentielle Empfänger des transgenen Pollens, wenn nicht der natürliche Zeitabstand in der Blütezeit bestehen würde (Fischbeck *et al.,* 1998).

Wie werden die Bodenmikroorganismen beeinflusst ? Kann das Gen in die Erbsubstanz von Pilzen und Bakterien übertragen werden?
Der horizontale Gentransfer beinhaltet die Weitergabe von genetischem Material auf nicht-sexuelle Art. Die bekannteste Form ist hier die Genübertragung mittels Transformation mit freier DNA sowie die Konjugation verschiedener Bakterien.

Der horizontale Gentransfer wurde bisher aus Sequenzhomologien abgeleitet. Der Weg des horizontalen Gentransfers ist allerdings nur schwer mittels Sequenzhomologien zu ermitteln. Deshalb wurde von Syvanen, 1994, ein stammesgeschichtlicher Kongruenztest postuliert, wobei durch das transformierte Gen Selektionsvorteile für den Rezipienten entstehen. Die homologen Gene des Gendonors und Genakzeptors müssen ortholog sein. Orthologe Gene sind Nachkommen eines einzelnen Gens, paraloge Gene hingegen sind durch Genduplikationen aus gemeinsamen Vorfahren entstanden. Mit dieser Methode können allerdings auch nur Hinweise auf einen möglichen horizontalen Gentransfer erhalten werden, aber keine endgültigen Beweise (Schulte und Käppeli, 1996).
Wichtig für den horizontalen Gentransfer in andere Organismen ist, dass die pflanzliche DNA zugänglich ist.
Als weitere notwendige Voraussetzung für einen Gentransfer aus Pflanzen in Mikroorganismen ist die Kompetenz des Rezipienten für die Aufnahme von fremder DNA. Unter Kompetenz des Bakteriums wird seine Aufnahmefähigkeit für fremde DNA aus seiner unmittelbaren Umgebung verstanden.

Dabei ist die Kompetenz von Bakterien sehr vom physiologischen Zustand (unter anderem von der exponentiellen oder stationären Wachstumsphase) abhängig. Ein weiterer Einflussfaktor sind Stressfaktoren, z. B. organische Lösemittel, Basen und Säuren, und die Verfügbarkeit von Nährstoffen (Lorenz und Wackernagel, 1994).

Weiterhin ist für den horizontalen Gentransfer von Bedeutung, wie lange das Fremdgen in der Pflanze bzw. im Boden und Kompost intakt vorliegt. Die DNA befindet sich im Boden an Partikel gebunden; diese Adsorption wird durch die Art und Wertigkeit der vorhandenen Kationen und dem pH-Wert beeinflusst (Khanna und Stotzky, 1992; Romanowski, 1991). Die DNA ist an Mineralien gebunden weniger angreifbar für Nukleasen (Romanowski, 1991). Je länger die Persistenz des Gens ist, um so grösser ist auch die Chance einer Übertragung auf andere Lebewesen.
Die DNA-Aufnahme ist wiederum von der Temperatur, vom pH-Wert und dem Adsorptionsmaterial abhängig. Ein niedriger pH-Wert verschlechtert die Transformationseffizienz (Khanna und Stotzky, 1992). Für an Sandkörner gebundene

DNA wurde eine erhöhte Transformationsrate festgestellt (Lorenz *et al.*, 1988). In der Umwelt hat chromosomale DNA eine bessere Transformationseffizienz als Plasmid-DNA (Chamier *et al.*, 1993). Hierbei ist aber nicht ausser acht zu lassen, dass die durch horizontalen Gentransfer aufgenommene DNA erst zu Veränderungen führt, wenn sie stabil ins Genom integriert, weitervererbt und exprimiert wird, und weiterhin einen Selektionsvorteil mit sich bringt. Zudem darf nicht vergessen werden, dass die homologe Rekombination für die Etablierung artfremder DNA im Genom eine starke Hemmschwelle darstellt, da Falschpaarungen zwischen den vier verschiedenen Desoxyribonukleotidbasen nur in geringem Maße vorkommen dürfen (Schäfer, 1996).
Freilandversuche mit rekombinanten Pflanzen werden erst dann durchgeführt, wenn die vorhergehenden Labor- und Gewächshausversuche bestätigt haben, dass das Fremdgen auch unter diesen Bedingungen stabil ins Genom integriert, weitervererbt und exprimiert wird und keine Gefahren für die Umwelt bestehen (Selbitschka *et al.*, 1997).

Nach Abschluss der Vorversuche im Labor und im Gewächshaus muss eine Genehmigung für die Freisetzung der gentechnisch veränderten Pflanzen vorliegen. Die Genehmigung erfolgt in Deutschland durch das Robert-Koch-Institut in Absprache mit der Biologischen Bundesanstalt. Das 1. Gentechnikgesetz in Deutschland trat am 1. Juli 1990 in Kraft (Hasskarl, 1991). Dieses wurde mittlerweile durch das „Erste Gesetz zur Novellierung des Gentechnikgesetzes“ vom 16.12.1993 modifiziert (Bekanntmachung der Neufassung des Gentechnikgesetzes vom 16.12.1993, Bundesgesetzblatt). Diese Gentechnik-Sicherheitsverordnung wurde am 14.03.1995 revidiert (Bekanntmachung der Neuordnung der Gentechniksicherheitsverordnung vom 14.03.1995, Bundesgesetzblatt). Bei beiden Änderungen wurden jeweils die Restriktionen gelockert, die sich als zu streng herausgestellt hatten.
Nach wie vor beinhaltet das Gentechnikgesetz die Klassifizierung in 4 Sicherheitsstufen. Grundlage für die Abschätzung der Risiken bilden der Spender des genetischen Materials und der Empfänger der gentechnisch veränderten DNA sowie die Genfähre und der gentechnisch veränderte Organismus selbst.
Ausser der Abklärung der Risiken werden im Freiland Versuche durchgeführt, um zu testen, ob sich die transgenen Pflanzen unter natürlichen Bedingungen analog wie im Labor bzw. im Gewächshaus verhalten und ob das Gen stabil im Genom integriert

wurde. Im allgemeinen werden Freisetzungsversuche über mehrere Jahre an verschiedenen Orten durchgeführt. In den USA müssen Freisetzungsvorhaben für einige Pflanzen mittlerweile nur noch bei den zuständigen Behörden angezeigt werden (Klug, 1997).

Der 1. Freisetzungsversuch überhaupt wurde 1986 in den USA durchgeführt. Es wurden transformierte Pseudomonaden getestet, die die Eisbildung auf Erdbeeren, im Gegensatz zu den nicht rekombinanten Arten, unterbinden (Gassen und Kemme, 1996).

In Deutschland wurde der 1. Freisetzungsversuch 1990 vom Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln, mit transgenen Petunien durchgeführt. Bei diesem Versuch sollte die Wirkungsweise von Transposons näher untersucht werden, die die Blütenfarbe beeinflussen sollten (Pressekonferenz, MPI, Köln, 1990). Dabei wurde im Freiland eine verstärkte Abhängigkeit der Genexpression des Transgens im Alterungprozess der Pflanzen und in Beziehung zu Umweltfaktoren festgestellt (Meyer *et al.,*1992*).*

In den Jahren 1994 bis 1997 fanden in Deutschland Freilandversuche mit gentechnisch veränderten Zuckerrüben (Resistenz gegen Rhizomania) mittels Insertion der cDNA des Hüllproteins BNYVV (Meulewater *et al.,* 1989) an verschiedenen Standorten statt. Bei Überwinterungsversuchen mit Zuckerrüben-Mangoldhybriden wurden Vergleiche zwischen transgenen und nicht-transgenen Pflanzen in bezug auf die Blütenbildung im Frühjahr angestellt. Für die transgenen Pflanzen wurde eine deutlich geringere Tendenz zur Blütenbildung ermittelt, was in Positions- und pleiotopen Effekten in den transgenen Proben begründet sein könnte (Pohl-Orf *et al.,* 1998).

Die überwiegende Anzahl an durchgeführten Freisetzungsexperimenten hatten bisher die Untersuchung der gentechnisch vermittelten Herbizidresistenz, besonders gegen die beiden Herbizide BASTA® und Glyphosat, zum Gegenstand (Brandt, 1995).

1.5 Herbizidresistenz, vermittelt durch das *pat*- Gen

1.5.1 Entdeckung von BASTA®

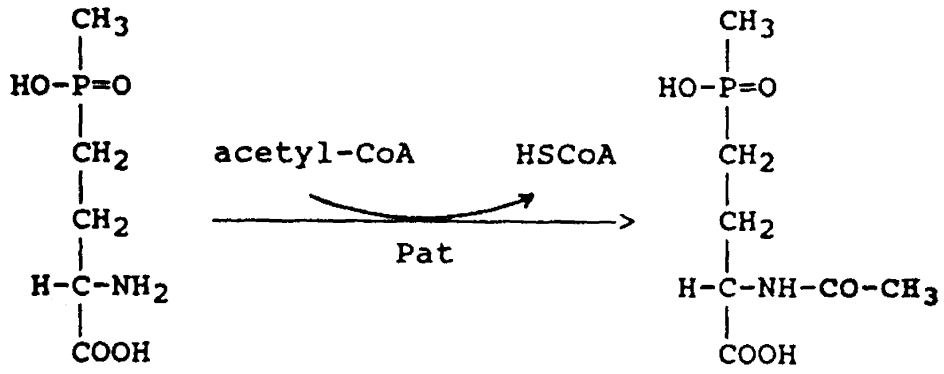
Bayer *et al.*, 1972, gelang es, aus *Streptomyces viridochromogenes* und Kondo *et al.*, 1973, aus *Streptomyces hygroscopicus* das Tripeptid Bialaphos zu isolieren. Das Tripeptid Bialaphos besteht aus 2 Alaninresten und einem Analogon der L-Glutaminsäure, dem L-Phosphinothricin (L-PPT).

1.5.2 Wirkungsweise in nicht-transgenen Pflanzen

Das Handelsprodukt BASTA® bzw. Glufosinate-Ammonium (D,L-Phosphinothricin-Ammonium) besteht aus dem Wirkstoff Ammonium-D,L-Homoalanin-4-yl(methyl)Phosphinat. Von den beiden enthaltenen Enantiomeren hat nur das L-PPT eine Wirkung. Phosphinothricin wird schnell von den Blättern und anderen grünen Pflanzenteilen aufgenommen und ist ein unspezifisches Kontaktherbizid. Es beeinflusst direkt das zentrale Enzym für den Stickstoffstoffwechsel der Pflanzen: Es kommt zur kompetitiven Hemmung der Glutaminsynthetase. Durch diese Hemmung kann das vorhandene Ammonium nicht mehr metabolisiert und damit entgiftet werden. Es reichert sich in der Zelle an. Es kommt zu Störungen des Photosyntheseprozesses und damit zum Absterben der betroffenen Gewebe und schliesslich zum Tod der ganzen Pflanze. Phosphinothricin hat eine schnelle Wirkung: Bereits einige Stunden nach der Applikation kann eine erhöhte Ammoniumkonzentration festgestellt werden.
Die Wirkungsweise des Herbizides ist abhängig von der aufgenommenen Menge. Die Empfindlichkeit der einzelnen Pflanzenarten ist hierbei sehr unterschiedlich (Ridley *et al.*, 1985*)*. Bei breitblättrigen, zweikeimblättrigen Pflanzen wird eine bessere Wirkung erzielt als bei Gräsern, die weniger Herbizidlösung aufnehmen. Pflanzen mit grösseren Speicherwurzeln bzw. mehrjährige Pflanzen werden ebenfalls nicht so nachhaltig beeinflusst, nur die oberirdischen, grünen Teile werden geschädigt.

1.5.3 Entgiftung in transgenen Pflanzen

Durch intrazelluläre Peptidasen wird aus Bialaphos der Wirkstoff L-Phosphinothricin freigelegt. Die beiden Bodenbakterien, aus denen Bialaphos isoliert wurde, verfügen über ein Gen, das sie vor Vergiftungen durch ihr eigenes Stoffwechselprodukt schützt. Aus *Streptomyces hygroscopicus* wurde von De Block *et al.,* 1987, das *bar*-Gen als Resistenzgen isoliert. Wohlleben *et al.,* 1988, isolierten aus *Streptomyces viridochromogenes* ein ähnliches Resistenzgen: Das *pat*-Gen. Die Nukleotidsequenzen der beiden Gene zeigen eine hohe Homologie (Thompson *et al.,* 1987*).* Die beiden kodierten Enzyme acetylieren die Aminogruppe des L-Phosphinothricins. Dabei wird N-Acetyl-L-PPT gebildet, das keine hemmende Wirkung mehr auf die Glutaminsynthetase ausübt. Pflanzen, die über das *pat*- oder *bar*-Gen verfügen, sind in der Lage, den Wirkstoff Phosphinothricin auf diesem Wege zu entgiften.



L-Phosphinothricin *N*-Acetyl-L-Phosphinothricin

Abb. 3: Enzymatische Reaktion der L-Phosphinothricin-Acetyl-Transferase (Dröge *et al.,*1992).

Zur Transformation des *pat*-Gens in die Pflanzen wurde die bakterielle DNA-Sequenz so modifiziert, dass der G/C-Anteil dem der pflanzlichen Nukleinsäuresequenzen entsprach. Die Abfolge der bakteriellen Aminosäurensequenz wurde dabei nicht verändert. Diese modifizierte Nukleinsäuresequenz wurde mit dem 35S-Promotor des „cauliflower mosaic"-Virus gekoppelt (Donn *et al.* 1992).

1.5.4 Metabolismus im Boden

Die Degradation im Boden durch die Mikroorganismen wurde von Tebbe (1988) und Smith (1989) untersucht. Hier ergab sich eine schnelle Degradation des L-Phosphinothricins zu der korrespondierenden Oxosäure 4-Methyl-Phosphinico-2-Oxo-Buttersäure (PPO). Dieses Intermediat wurde zu 3-Methyl-Phosphinico-Propionsäure (MPP) decarboxyliert, welches im Boden als Hauptmetabolit gefunden wurde. Die Halbwertzeit liegt bei 3-20 Tagen; nach 10 bis 30 Tagen sind 90% des Wirkstoffs abgebaut.

Für einige Mikroorganismen, wie *Trichoderma sp.,* wurde aber auch eine Schädigung durch die Applikation von BASTA® festgestellt (Ahmad *et al.*, 1995). *Rhizobium meliloti* reagiert ebenfalls sensitiv auf Phosphinothricin. Sensitive Species von *Rhizobium meliloti* zeigten ausserdem spontane Resistenz gegen L-Phosphinothricin (Kriete und Broer, 1996). Eine ungeklärte Frage ist also, ob L-Phosphinothricin-sensitive

Organismen aufgrund des Selektionsdrucks mittels horizontalem Gentransfer eine BASTA®-Resistenz erlangen können.

1.5.5 Metabolismus von BASTA® in transgenen und nicht-transgenen Pflanzen

Bevor ein Herbizid zur allgemeinen Anwendung freigegeben wird, muss seine Wirkungsweise auf den pflanzlichen Stoffwechsel geklärt werden. Es muss untersucht werden, ob und welche Veränderungen im pflanzlichen Metabolismus stattfinden und ob die Metabolisierung des Herbizids zur Bildung von Giftstoffen führt. Es ist bekannt, dass nur das L-Enantiomer des Phosphinothricins eine herbizide Wirkung hat und damit Stoffwechselaktivität besitzt. Das kommerziell erhältliche Phosphinothricin unter dem Namen BASTA® enthält das Racemat. Die derzeitig verfügbaren Daten, die aus Stoffwechselwegen von transgenen Pflanzen stammen, zeigen, dass das D-PPT stabil ist, denn nur die Hälfte des DL-PPT Racemates wird in transgenen Pflanzen acetyliert (Dröge *et al.,* 1992). Auch in nicht-transgenen Pflanzen wird BASTA® metabolisiert. Für das L-Enantiomer wurden in Maiszellkulturen die folgenden Stoffwechselprodukte identifiziert:

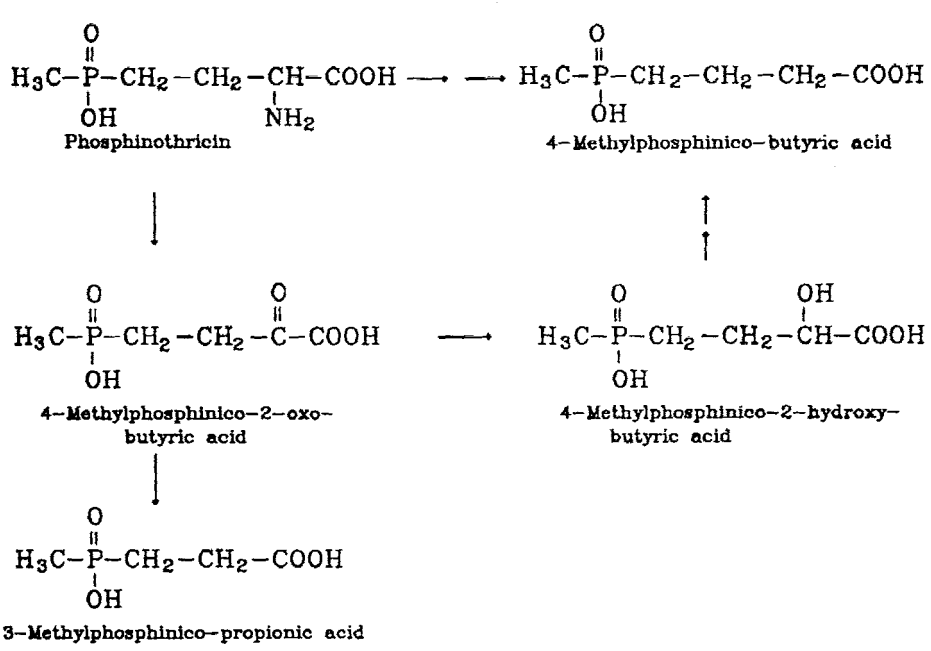


Abb. 4: Abbau von L-PPT in Maiszellkulturen (Komoßa und Sandermann, 1992).

1.6 Pflanzliche Seneszenz

Was ist Seneszenz ?

Bei der Seneszenz handelt es sich um eine Abfolge von biochemischen und physiologischen Ereignissen im Verlauf der pflanzlichen Vegetation: Von der Reifung bis zum Absterben. Diese während der Seneszenz stattfindenden Prozesse sind genetisch programmiert und bewirken Veränderungen in den pflanzlichen Zellen und Geweben.

Strukturelle Veränderungen werden zuerst bei den Chloroplasten beobachtet, wo der Abbau der Thylakoidmembranen mit dem sichtbaren Verlust an Chlorophyll im gesamten Blatt assoziiert ist. Wenn die Blätter ihre maximale Assimilationskapazität überschritten haben, beginnt das Mesophyllgewebe die grüne Farbe zu verlieren und geht in die gelbe Färbung über. Dieser Farbwechsel geschieht zunächst durch die Degradation des Chlorophylls. Visuell sichtbar wird die Seneszenz erst durch diesen Verlust an Chlorophyll und das damit einhergehende Vergilben der Blätter (Humbeck *et al.,* 1996). Der Chloroplast enthält bis zu 70% der Blattproteine. Infolgedessen stellt sein Abbau eine dramatische Veränderung für die Zelle dar (Gan und Amasino, 1997). In Konjugation mit dem Abbau der inneren chloroplastischen Struktur nimmt das cytoplasmatische Volumen und die Anzahl der cytoplastischen Ribosomen ab. Der Nukleus wird für die Gentranskription benötigt, die Mitochondrien für die Energieversorgung der Zelle; deshalb bleiben diese beiden Zellorganellen bis zu den letzten Stadien der Seneszenz intakt. Die Degradation der Chloroplastenproteine und Lipide ist assoziiert mit dem Verlust an Kohlenstoff und Stickstoff der seneszierenden Blätter. Deshalb wird die Seneszenz auch als Zeit der Nährstoffauswertung interpretiert, z. B. wird der Stickstoff der Blätter für die Synthese von Speicherproteinen verwendet, die dann im folgenden Frühjahr das erneute Wachstum unterstützen (Gan und Amasino, 1997).

Verschiedene Untersuchungen belegen, dass dieses Nährstoffsicherungssystem ein reguliert ablaufendes Programm ist. Im Verlauf der Seneszenz wird die Struktur des Photosyntheseapparats abgebaut und dessen Bestandteile in jüngere sich im Aufbau befindliche Gewebe oder Speicherorgane überführt. Mit der Ablösung des Blattes ist die Blattseneszenz abgeschlossen. Gleichzeitig werden neue Komponenten, wie Anthocyane und Phenole, synthetisiert. Auf enzymatischer Ebene treten Veränderungen

ein, an der verschiedene Proteasen, Nukleasen und andere Enzyme beteiligt sind. Die induzierte Synthese von Enzymen, die an der Degradation und am Umbau von zellulären Komponenten, wie Proteinen, Chlorophyll und Lipiden, beteiligt sind, sind auf Änderungen in der Genexpression zurückzuführen (Noodén und Leopold, 1988). Bei Betrachtung der gesamten Pflanze werden verschiedene Typen von Seneszenz definiert (Smart, 1994):

a) Monocarpische Seneszenz

Diese Art der Seneszenz erfolgt als Konsequenz der Vermehrung.

b) Sequentielle Seneszenz

Diese Form der Seneszenz beinhaltet den Resourcentransfer zwischen älteren Blättern, die sich im unteren Bereich der Pflanze befinden, zu sich neu entwickelnden Blättern.

c) Herbstliche Seneszenz

Die herbstliche Seneszenz, besonders bei Bäumen, ist eine Folge des abnehmenden Tageslichtes und der fallenden Temperatur.

Bei all diesen Formen wurde festgestellt, dass die Initiation der Seneszenz erfolgt, bevor sichtbare Symptome, wie z. B. die Gelbfärbung der Blätter, zu Tage treten. Vor dem Vergilben der Blätter haben sich auf molekularer Ebene und im Metabolismus der Pflanze einschneidende Veränderungen abgespielt (Buchanan-Wollaston, 1997). Es sind eine Reihe von physiologischen bzw. molekularen Parametern ermittelt worden, die die Differenzierung vom reifenden, grünen bis hin zum seneszierenden Blatt erfassen. Dazu zählt die Untersuchung des Photosyntheseapparates durch Detektion der Chlorophyll-Fluoreszenz, die Rate der Kohlendioxid-Fixierung durch Infrarotgasanalysen sowie die Veränderung des Transkriptions-Levels durch Northern Blotting Analysen etc.

Genexpression in der Seneszenz

Um die Regulation der Seneszenz, vor allen Dingen den auslösenden Faktor bzw. die Faktoren des Vorgangs zu erfassen, werden molekulare Techniken herangezogen. Biochemische Methoden sind häufig nicht sensitiv genug, z. B. sind Isoenzyme teilweise nicht einzeln differenzierbar. Das Klonieren seneszenzrelevanter Gene erlaubt Rückschlüsse auf den Zeitpunkt der Genexpression und die Funktion des

dazugehörigen Proteins. Einige Forschergruppen benutzen rekombinante DNA-Techniken, verbunden mit differentiellen und subtraktiven Hybridisierungen. Damit sollen cDNA-Klone identifiziert werden, die Gene repräsentieren, die differenziert im Verlauf der Seneszenz exprimiert werden. Es existieren verschiedene Arten von Seneszenz-assoziierten Genen.

Drei grosse Klassen von cDNA-Klonen können anhand ihrer Expressionsmuster ermittelt werden (Bleecker, 1998):

1. Klasse: cDNA-Klone, die im Verhältnis zur Gesamt-mRNA im Verlauf der Seneszenz abnehmen
2. Klasse: cDNA-Klone, die nur geringe Veränderungen im Verhältnis zur Gesamt-mRNA im Verlauf der Seneszenz zeigen
3. Klasse: cDNA-Klone, die im Verhältnis zur Gesamt-mRNA im Verlauf der Seneszenz zunehmen.

Eine Einschränkung all dieser Studien ist durch die Verwendung der Gesamt-RNA bedingt. Anhand dieser Gesamt-RNA wird der relative Gehalt an mRNA-Menge des relevanten Gens gemessen, ungeachtet der Tatsache, dass die Gesamt-RNA signifikant während der Seneszenz abnimmt. Dieses Problem wurde in einigen Studien umgangen, indem der RNA-Gehalt auf die Blattoberfläche bezogen wurde (Hensel *et al.,* 1993; Lohman *et al.,* 1994).

Viele der in der Seneszenz bedeutsamen Gene werden als *SAGs* (senescence associated genes) klassifiziert. Sie werden in noch grünen Blättern exprimiert und steigen im Verhältnis zur Gesamt-RNA in späteren Etappen der Seneszenz an. Einige dieser *SAGs* könnten allerdings einfach Gene sein, deren Expressionslevel in den Zellen unverändert aufrecht erhalten wurde, wohingegen die der meisten mRNA- und rRNA-Klassen abnehmen. Ein kleines Spektrum von geklonten cDNAs repräsentiert Gene, die deutlich nur in seneszierenden Zellen exprimiert werden (Buchanan-Wollston, 1997; Lohman *et al.,* 1994).

Die Unterscheidung zwischen diesen beiden Arten von Genen beinhaltet unterschiedliche Konsequenzen: Der relativ hohe Anteil einiger *SAGs* an der Gesamt-RNA während der Seneszenz ist eine Folge der Stabilität der Expression. Bei den anderen *SAGs* handelt es sich um solche, deren Transkription erst während der

Seneszenz aktiviert wird. Bemühungen zur Erstellung eines Expressionsmodelles führte zur Klassifizierung der verschiedenen *SAGs* (Buchanan-Wollaston, 1997). Auf der Basis der Expression der Gene und der Funktion der daraus folgenden Genprodukte wurden sechs Genklassen postuliert, die in Blattseneszenz involviert sind :

Seneszenzmodell nach Smart (1994)

Klasse 1: „Housekeeping"-Gene; sie kontrollieren die primären, metabolischen Aktivitäten der Zellen, einschliesslich rRNA- und Proteinsynthese. Diese Gene werden über den gesamten Lebenszeitraum des Blattes mit konstantem Level exprimiert.

Klasse 2: Gene, die im frühen Seneszenzstadium in den noch grünen Blättern exprimiert werden, deren Effekte aber erst zu einem späteren Zeitpunkt Auswirkungen haben. Hiermit sind z. B. solche Gene gemeint, die definieren, welcher Teil des Genoms eine verstärkte Expression erfährt, sowie Gene, die für mRNAs und Proteine kodieren und später im Leben des Blattes eine Rolle spielen.

Klasse 3: Gene, die für Pflanzenwachstum und Assimilation von Komponenten kodieren und somit am Fortschreiten der Seneszenz durch Hemmung der Synthese der für den Calvinzyklus notwendigen Enzyme und Thylakoidproteine beitragen.

Klasse 4: Regulatorische Gene, die die Initiation der Seneszenz kontrollieren und ihren zeitlichen Fortschritt überwachen.
Die Genklassen drei und vier werden noch vor Seneszenzbeginn in den grünen Blättern exprimiert. Mit Beginn der Seneszenz sinken sie auf einen nicht mehr nachweisbaren Wert ab.

Klasse 5: Gene, die RNAs bzw. Proteine kodieren, die eine gesteigerte Expression während der Seneszenz zeigen und in den Mobilisationsprozess involviert sind, z. B. Enzyme für den Pigmentabbau.

Klasse 6: Gene, die für Proteine kodieren, die Speicherstoffe remobilisieren. Derartige Gene sind aber auch in anderen Lebensphasen der Pflanzen aktiv, z. B. während der

Samenbildung.

Bei der Expressionsanalyse der seneszenzrelevanten cDNAs von *Brassica napus* wurden zusätzlich vier weitere Genklassen ermittelt (Buchanan-Wollaston, 1997).

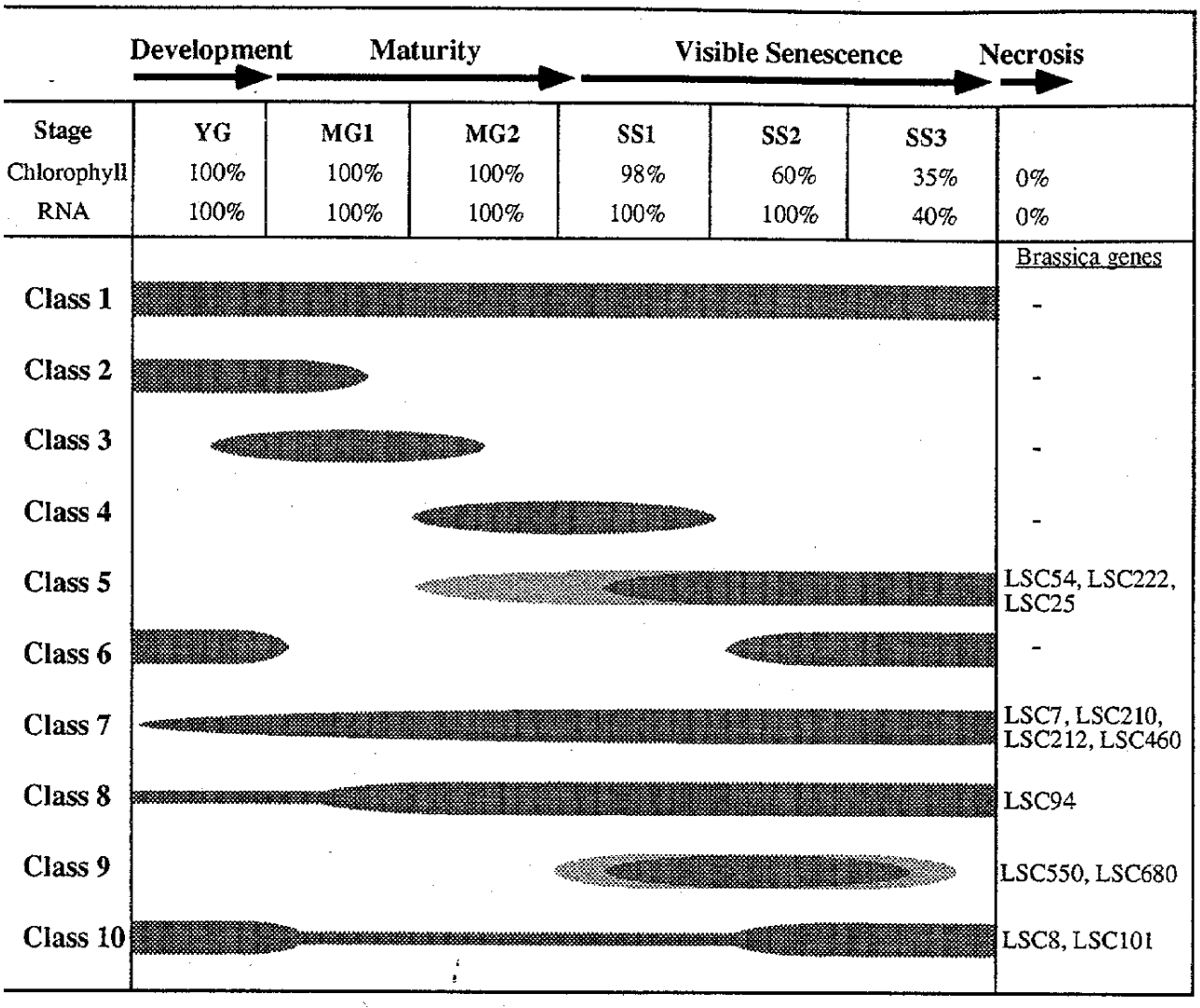


Abb.5: Expression der verschiedenen Gene während der Blattentwicklung nach Buchanan-Wollaston, 1997. Die Klassen 1-6 wurden von Smart, 1994, postuliert.

YG: mRNA aus Blättern von jungen, heranwachsenden Pflanzen

MG1: mRNA aus reifen, grünen Blättern von Pflanzen, die gerade mit der Blüte beginnen

MG2: mRNA aus Blättern, die mit der Samenentwicklung begonnen haben

SS1, SS2 und SS3 bezeichnet die mRNA von seneszierenden Blättern, die 98%, 60% und 35% des Chlorophylls von grünen Blättern enthalten.

Klasse 1: Mit den hier angewandten Methoden (differentielles Screening oder subtraktive Hybridisierung) wurden aufgrund der konstitutiven Expression für *Brassica napus* keine Gene identifiziert.

Klassen 2 und 3: Diese Gene haben eine reduzierte Expression während der Seneszenz und waren im Rahmen der von Buchanan-Wollaston, 1997, durchgeführten Untersuchungen nicht von Interesse.

Klasse 4: Diese Genklasse wurde bei *Brassica napus* nicht nachgewiesen, vermutlich werden sie in zu geringen Mengen exprimiert.

Klasse 5: Hier wurden die *Brassica napus*-Gene LSC54 (Metallothionin, Buchanan-Wollaston, 1994) und LSC222 (Chitinase, Hanfrey *et al.,* 1996) eingeordnet, die einen erhöhten mRNA-Level im SS1-Stadium zeigen. Das Gen LSC25 wurde auch dieser Klasse zugeordnet, obwohl seine Expression bereits zu einem früheren Stadium (MG2) beginnt.

Klasse 6: Für *Brassica napus* wurden bisher keine Klone dieses Typs erhalten, jedoch z. B. bei Gurken (Graham *et al.,* 1992).

Klasse 7: Bei dieser Genklasse steigt der mRNA-Level allmählich an, und zwar von der Blattentwicklung bis zur Seneszenz. Zu dieser Klasse gehören die Gene LSC7 (Cystein-Protease), LSC210 (Metallothionin II), LSC212 (fungizides Protein) und LSC460 (Glutamin-Synthetase), Buchanan-Wollaston und Ainsworth, 1997.

Klasse 8: Hierunter werden Gene zusammengefasst, die sich ähnlich wie die unter Klasse 7 verhalten, ausser, dass ihre Expression während der Blattentwicklung viel geringer ist. Zur Klasse 8 gehört das Gen LSC94 (PR-1a Protein, Hanfrey *et al.,* 1996).

Klasse 9: Hierzu zählen die *Brassica napus*-Gene LSC550 (Cytochrome-P450) und LSC680 (ATP Sulfurylase, Buchanan-Wollaston und Ainsworth, 1997), deren Expression in speziellen Stufen (SS1 und SS2) geschieht und vor Ende der Seneszenz gestoppt wird.

Klasse 10: Zu Beginn der Blattentwicklung und in den voll entwickelten Blättern werden die Gene LSC8 (NADH Ubiquinon Oxidoreduktase, Pogson *et al.,* 1995) und LSC101 (Fruktose 1,6 Bisphosphat Aldolase) verstärkt exprimiert. Der Unterschied zur Klasse 6 besteht darin, dass die Gene der Klasse 10 über den gesamten Lebenszeitraum hinweg detektierbar sind.

Bei all diesen Untersuchungen, deren Aussagen auf der Intensität der Genexpression beruhen, darf nicht unbeachtet bleiben, dass die mRNA-Level, die mittels der Northern Blot-Analyse erhalten wurden, wohl Indikator dafür sein können, aber nicht immer die transkriptionelle Aktivität der Gene widerspiegeln. Die Höhe des Northern-Blot-Signals ist abhängig von der Stabilität der mRNA und kann je nach Gen variieren.

Die Analyse dieser Gene und der von ihnen kodierten Proteine erlauben Einblicke in den komplexen Prozess, der während der Seneszenz stattfindet. Diese Komplexität reflektiert die vielen verschiedenen Stoffwechselwege, die wieder verschiedenen Mechanismen folgen.

Gene, die während der Blattseneszenz induziert werden, wurden schon aus verschiedenen Pflanzen durch die Isolation repräsentativer cDNA-Klone erhalten (Thomas und De Villiers, 1996; Gan und Amasino, 1997). Die Induktion dieser Gene erfolgt, bevor der Verlust an Chlorophyll eintritt. Aus der Literatur sind Seneszenz-relevante Gene beim Mais bekannt (Smart *et al.,* 1994). Sequenzanalysen bei *SAGs* haben zur Identifikation einer Reihe von Genen geführt, die in die Nährstoffverwertung eingebunden sind (Noodén und Guiamet, 1996; Gan und Amasino, 1997; Buchanan-Wollaston, 1997; Nam, 1997). In diesem Rahmen sind Gene nachgewiesen worden, die für Proteasen, Nukleasen, Lipid,- Zucker- und Stickstoff-metabolisierende Enzyme kodieren, sowie weitere Enzyme, die in die Mobilisation der Nährstoffe involviert sind. Eine andere Gruppe von Seneszenz-Genen nehmen protektive- oder stressassoziierte Funktionen wahr (Buchanan-Wollaston, 1997). Die Aufgabe dieser Gene im Rahmen der Seneszenz könnte in der Stabilisierung der Zelle liegen, während der Abtransport von Nährstoffen abgeschlossen wird. Möglich ist auch, das sie nur wegen des seneszierenden Zustands der Zelle exprimiert werden und überhaupt keine spezielle Funktion haben. Viele klonierte *SAG*-Sequenzen zeigten keine Aufgaben in bezug auf Nährstoffverwertung oder Zellschutz. Ob die Expression dieser Gene signifikant ist oder einfach nur auf molekularen Fehlern dieser letzten Zellphase beruhen, ist bisher nicht bekannt.

Eine Klasse von Genen, die für die genregulatorische Funktion verantwortlich ist, wurde auffälligerweise bisher nicht unter den *SAGs* ermittelt. Daher sind keine

Transkriptionsfaktoren beschrieben worden. Es besteht die Möglichkeit, dass differentiell exprimierte Transkriptionsfaktoren vorhanden sind, diese aber zu gering vorkommen, um mit den heutigen Techniken entdeckt zu werden. Alternativ könnten diese Transkriptionsfaktoren auch in anderen nicht-seneszierenden Zellen vorhanden sein. Bei dem Vergleich von *SAG12, SAG13, SAG15* (Gan, 1995) und *SEN1* (Oh *et al.,* 1996) haben die Sequenzanalysen der 5‘ regulatorischen Regionen keine bekannten Sequenzelemente enthüllt. Zusammenfassend zeigt die Vielfalt der Expressionsmodelle für *SAGs*, dass die direkte Regulation der Genexpression, die mit der Seneszenz einhergeht, komplex ist (Gan und Amasino, 1997; Nam, 1997; Wilson, 1997).

Einfluss von Cytokininen und Ethylen im Rahmen der Seneszenz

Ethylen spielt, genau wie die Cytokinine, eine wichtige Rolle im Rahmen der Seneszenz, dies besonders bei dikotylen Pflanzen. Dieses Pflanzenhormon hat einen entgegengesetzten Effekt zu den Cytokininen, da es die physiologischen Veränderungen, die mit der Seneszenz einhergehen, beschleunigt. Weiterhin ist die Blattseneszenz sehr abhängig davon, welches Pflanzensystem untersucht wird. Es gibt eindeutige Hinweise dafür, dass spezifische Hormone einen kontrollierenden Einfluss auf die Organseneszenz haben. Cytokinine üben einschneidende, verzögernde Effekte auf die Blattseneszenz bei einigen Pflanzen aus (Gan und Amasino, 1995). Ethylen beschleunigt die Seneszenz mancher Species. Einige neuere Studien belegen, dass Ethylen aber keine Voraussetzung für die Auslösung der Seneszenz in *Arabidopsis* oder Tomaten ist (John *et al.,* 1995; Grbic und Bleecker, 1996). Auf der anderen Seite ist Ethylen der Schlüsselfaktor der Seneszenz in Blüten einiger Species (O’Neill *et al.,* 1993).

Umweltfaktoren

Die Initiation der Blattseneszenz ist abhängig vom Alter des Blattes sowie von der reproduktiven Phase der Pflanze. Ebenso können Umweltfaktoren, wie Nährstoffmangel, Pathogenbefall, Trockenstress, Lichtmangel und die Temperatur, eine vorzeitige Seneszenz herbeiführen (Smart, 1994). Es wurde in Untersuchungen zur differentiellen Genexpression festgestellt, dass natürlich vorkommende *SAGs* auch durch äussere Faktoren (siehe oben) induziert werden können. Daraus lässt sich schliessen, dass

vielfältige Signalwege zur Induktion dieser Gene im Metabolismus der Pflanze vorhanden sind. Die Pflanzen haben Mechanismen entwickelt, mit denen sie die Blattseneszenz durch Stress-Symptome induzieren können, um Nährstoffe zu reproduktiven Organen zu transportieren. Durch diese Aktivitäten können sie ihren Lebenszyklus auch unter schlechten Konditionen vollenden.
Ozon ist bekannt als Stressfaktor, der verfrüht die Seneszenz in vielen Pflanzen auslöst, z. B. in Kartoffeln (Pell und Pearson, 1983). Miller *et al.,* 1999, untersuchen die Induktion seneszenzrelevanter Gene bei *Arabidopsis* unter Ozonbehandlung. Von zwölf untersuchten *SAGs* zeigten acht Gene einen erhöhten Gehalt auf Transkriptionsebene. Die zwei Metall-bindenden Proteine *CCH* (Kupfer Chaperon, Himelblau *et al.,* 1998) und *BCB* (blaues kupferbindendes Protein, Van Gysel, *et al.,* 1993; Lohmann, *et al.,* 1994; Weaver, *et al.,* 1997) sowie *ERD1* (Kiyosue *et al.,* 1993; Lohman *et al.,* 1994; Weaver, *et al.,* 1998) und auch das Gen *ACS6* (Vahala *et al.,* 1998; Arteca und Arteca, 1999), das zur Genfamilie der ACC-Synthetase gehört, wurden durch Ozon induziert. Die Transkriptionslevel für *SAG12* (Lohman *et al.,* 1994; Gan und Amasino, 1997), *SAG19* (bisher nicht veröffentlicht von Weaver und Amasino), *Atgsr2* (Peterman und Goodman *et al.,* 1991; Bernhard und Matile, 1994) und *MT1* (Zhou und Goldsbrough, 1994; Lohman *et al.,* 1994) werden nur während der natürlichen Seneszenz verstärkt induziert.

Weiterhin wurden *SAGs* aus *Brassica napus* isoliert. Die sequenzierten cDNAs zeigten Homologien zu cDNAs für ein *PR-1a*-Protein und zu einer *Chitinase IV*. Das bedeutet, dass einige Abwehr-Gene auch alternative Funktionen in der Pflanzenentwicklung haben, wie z. B. hier beim Prozess der Blattseneszenz (Hanfrey *et al.,* 1996). Viele dieser PR-Proteine sind keine wirklichen PR-Proteine und sollten deshalb als Abwehrproteine (DR-Proteine=defense-related proteins=abwehrassoziierte Proteine) bezeichnet werden (Quirino *et.al,* 2000). PR-Proteine sind mit hypersensitven Reaktionen und systemisch erworbenen Resistenzmechanismen assoziiert. Beides, Blattseneszenz und hypersensitive Reaktionen, sind Formen des programmierten Zelltods.
In einer Studie ermittelten Aharoni *et.al,* 1979, dass eine durch Lichtentzug ausgelöste Seneszenz bei Bohnen, Tabak und Zuckerrübenblättern eine hohe Ethylenproduktion und Respiration auslöst, die mit einer Phase rapiden Chlorophyllabbaus einhergeht.

Schatten auf niedrige Blätter durch höher angeordnete Blätter löst ebenfalls die Seneszenz in einigen Pflanzenarten aus, wohingegen die herbstliche Seneszenz durch das abnehmende Tageslicht und den Temperaturabfall beeinflusst wird (Gan und Amasino, 1997).

Die Transkriptionslevel von 11 verschiedenen SAGs wurden bei verschiedenen seneszenzauslösenden Behandlungen untersucht (Weaver *et al.,* 1998). Hierbei wurde die deutlichste Übereinstimmung zur altersbedingten Seneszenz durch Dunkelheit (Abdecken einzelner Blätter) erhalten. Die altersbedingte Seneszenz führte zu weniger massiven Änderungen wie die durch Dunkelheit eingeleitete Form der Seneszenz (Quirino *et al.,* 2000).

Kleber-Janke und Krupinska, 1997, induzierten bei Gerstenblättern durch Dunkelheit verfrüht die Seneszenz. Unter diesen Konditionen wird eine lichtreversible Abnahme der Effizienz des Photosystems II, einhergehend mit der Abnahme des Chlorophylls und einem veränderten Proteinmuster, erzielt. Fünf der erhaltenen cDNA-Fragmente repräsentieren Transkripte, die sowohl durch Dunkelheit als auch während der natürlichen Seneszenz unter Freilandbedingungen induziert werden. Einer dieser cDNA-Klone zeigte, einschliesslich eines kompletten „open reading frame“, Homologie zu der Sequenz eines bekannten Proteinaseinhibitors. Ein anderer cDNA-Klon, der mittels dieser Methode isoliert wurde, verfügt über eine hohe Sequenzhomologie zu einem Gen, das für die 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase kodiert.

Es ist von Interesse zu klären, ob transgene und nicht-transgene Pflanzen während der Seneszenz gleiches Verhalten zeigen und ob das inserierte *pat*-Gen über die gesamte Vegetationsperiode stabil erhalten bleibt. Die meisten Daten zum Seneszenzverhalten wurden unter Gewächshausbedingungen gewonnen.

1.7 Der Roggenstein-Freisetzungsversuch

1993 rief die Bayerische Forschungsstiftung den Forschungsverbund „Biologische Sicherheit“ (FORBIOSICH) ins Leben. Dieses Forschungsprojekt sollte durch die verstärkte Förderung der Sicherheitsforschung dazu beitragen, Zusammenhänge und evtl. Probleme bei der Anwendung der Gentechnik in verschiedenen Bereichen rechtzeitig zu klären.
Das Vorhaben FORBIOSICH umfasste sechs verschiedene Projektbereiche, in denen zwölf Forschungsprojekte gefördert wurden.

Übersicht der in FORBIOSICH geförderten Bereiche:

A) Modellhafter Anbau transgener Nutzpflanzen zum Studium ihrer Wechselwirkungen mit der Umwelt
B) Studium der horizontalen Übertragungsmechanismen von exogenen und endogenen Retroviren mit dem Ziel der Entwicklung sicherer Vektoren sowie von entsprechenden Nachweisverfahren für Retroviren
C) Entwicklung von Techniken zur Charakterisierung von Mikroorganismen im Boden, samt ihrer Wechselwirkungen untereinander sowie mit der für den Boden charakteristischen Flora und Fauna (dieser Projektbereich wurde durch das Projekt A mit abgedeckt)
D) Analyse des Verhaltens rekombinanter Organismen in Kläranlagen im Hinblick auf ihre Überlebensdauer, ihre Stabilität und Möglichkeit, ihr genetisches Material auf endogene mikrobielle Populationen in der Kläranlage zu übertragen
E) Analyse des Vorkommens „chemisch reiner“ DNA im Trinkwasser, in Körperflüssigkeiten (Tränen, Urin, Blut) sowie ihre Fähigkeit, von Säugerzellen aufgenommen zu werden
F) Analyse von in der Gentechnik verwendeten sowie neu zuzulassender Sicherheitsstämme auf Virulenzfaktoren und deren Überlebensfähigkeit im Säugerorganismus

Im Rahmen dieser Darstellung soll nur das Projekt A betrachtet werden. Es wurden Untersuchungen zur biologischen Sicherheit sowie zur Umweltverträglichkeit des Anbaus fremdbestäubender, transgener Nutzpflanzen mittels eines gentechnisch

vermittelten Markergens durchgeführt. An diesen Untersuchungen war ein Verbund von Instituten der TU München und Weihenstephan sowie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit in München-Neuherberg beteiligt. Bei dieser interdisziplinären Arbeit wurden wichtige Grundlagen zur biologischen Sicherheit in Verbindung mit dem Anbau transgener Pflanzen sowie der besseren Charakterisierung des mikrobiellen Ökosystems im Boden und des daraus resultierenden Einflusses durch pflanzenbauliche Massnahmen in zusammenhängender Weise untersucht.

Auf der Versuchsstation Roggenstein (Landkreis Fürstenfeldbruck) der TU München wurde für diese Untersuchungen ein dreijähriger Feldversuch mit transgenen Mais- und Winterrapspflanzen durchgeführt. Die Betreuung der Felder erfolgte durch die TU München, Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung. Die Genehmigung des Antrags auf den Freisetzungsversuch der gentechnisch veränderten Pflanzen erfolgte im Frühjahr 1994 für die Vegetationsperioden 1994 bis 1997. Das den Mais- und Winterrapspflanzen gentechnisch zu übertragende *pat*-Gen wurde dabei als identifizierbarer Marker für die Fremdbefruchtung durch Pollen gentechnisch veränderter Pflanzen eingesetzt.

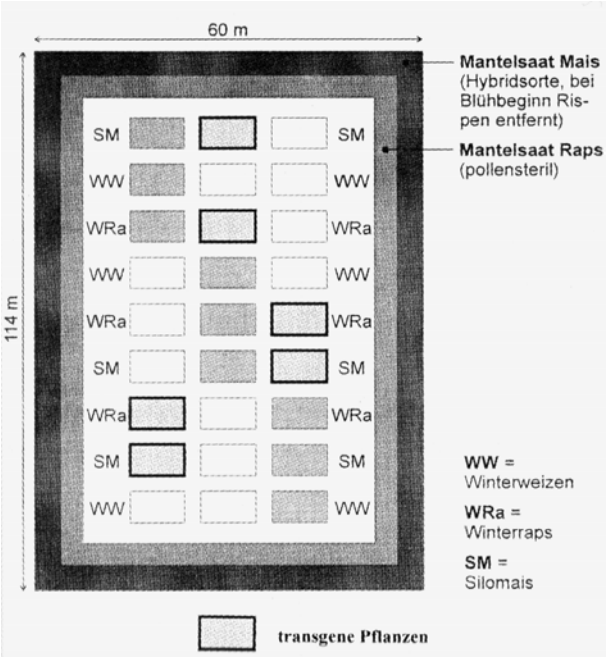


Abb. 6: Schema des Versuchsfeldes in Roggenstein.

Es wurden insgesamt 9 verschiedene Felder mit je 54 m^2 angelegt. Drei dieser Felder waren mit transgenem Raps (*Brassica napus* L.) bepflanzt, auf den anderen sechs Feldern befanden sich nicht-transgene Pflanzen. Bei dem transgenen Raps wurde für die Unkrautbekämpfung das Totalherbizid BASTA® (3,0 l/ha) eingesetzt, bei den nicht-transgenen Pflanzen wurden drei der Felder mit den handelsüblichen Herbiziden Butisan (1,0 l/ha) und Oleo (0,5 l/ha) behandelt. Die restlichen drei Felder wurden mit konventionellen Methoden bearbeitet. Die neun Versuchsparzellen wurden von einer 3m breiten Mantelsaat aus Rübsen *(Brassica rapa)* umschlossen.
Zusätzlich wurden auf dem Feld transgener Silomais sowie die genetisch nicht veränderten Ausgangspflanzen angebaut. Allerdings wurden die Maisfelder zwei Jahre hintereinander von unbekannten Tätern jeweils vor Blühbeginn zerstört.
Darüber hinaus wurde auf dem Feld Winterweizen zur Einhaltung der Fruchtfolge herangezogen.
Auf dem Versuchsfeld befanden sich ebenfalls zwei Bienenvölker.

Innerhalb des Bereichs A wurden vier verschiedene Teilprojekte bearbeitet:
A1: Auswirkungen des Anbaus transgener Nutzpflanzen mit *pat*-Gen vermittelter Herbizidresistenz auf die Umwelt (Prof. Fischbeck, TU München)
Innerhalb dieses Teilprojektes wurde die Ausbreitung des *pat*-Gens durch Pollenflug (bei Mais = Windbestäubung; bei Raps = Insektenbestäubung) sowie die Möglichkeit des horizontalen Gentransfers auf verwandte Unkrautflora untersucht. Nicht-transgene Ausgangsformen und transgene Pflanzen wurden in parallelen Bepflanzungen mit und ohne Herbizidbehandlung kultiviert. Die Übertragung des Fremdgens auf benachbarte nicht-transgene Sorten der gleichen bzw. verwandter Kulturpflanzen durch Pollenflug sollte durch das Auftreten Phosphinothricin-resistenter Ackerunkräuter getestet werden.

A2: *In situ*-Charakterisierung von Rhizosphären- und Bodenbakterien durch rRNA-Sequenzierung und Hybridisierung (Dr. Ludwig, TU München)
Im Verlauf der Evolution wurden ribosomale Ribonukleinsäuren (rRNAs) nur wenig verändert. Die Sequenzen der entsprechenden Gene bzw. Moleküle enthalten Regionen, die Rückschlüsse auf die Entwicklungsgeschichte und auf die phylogenetischen Beziehungen der heute lebenden Arten erlauben. Eine der

Standardmethoden ist die vergleichende rRNA-Sequenzierung der taxonomischen Analyse der Mikroorganismen.
Verwandte Gruppen von Mikroorganismen enthalten diagnostische rRNA-Molekülsequenzen, die als Zielregion für spezifische Hybridisierungssonden genutzt werden können. Die Kombination von Sequenzierung und Sondenhybridisierung ermöglicht die Untersuchung und Identifikation nicht kultivierbarer Mikroorganismen. Beide Techniken kamen bei den transgenen Pflanzen an Rhizosphären- und Bodenbakterien zum Einsatz. Es sollten Unterschiede bei den Bodenpopulationen in bezug auf die Artenvielfalt hinsichtlich der Standorte konventioneller und transgener Pflanzen ermittelt werden.

A3: Analyse des *pat*-Gens in der Rhizosphäre transgener Pflanzen und *in situ*-Identifizierung und Lokalisierung von Rhizosphärenbakterien mit Gensonden und neuen mikroskopischen Verfahren, Dr. Hartmann, GSF, Neuherberg
Im Rahmen dieser Gruppe wurde eine Abschätzung der Gefährdung von Lebensgemeinschaften von Bodenmikroorganismen bei einem Einsatz von transgenen Pflanzen und dem Totalherbizid BASTA® untersucht. Von besonderer Bedeutung war eine mögliche Verbreitung der Resistenz gegenüber dem Herbizid BASTA® durch Mikroorganismen. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen des Freilandexperimentes verschiedene Unkrautbekämpfungsmethoden angewandt und deren Einfluss auf die Bodenpopulation untersucht.
Innerhalb des geschilderten Gesamtprogramms hatte die vorliegende Dissertation die folgenden Aufgabe:

1.8 Themenstellung dieser Arbeit (A4)

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das ökologische Verhalten von herbizidresistenten transgenen Pflanzen untersucht werden. Insbesondere sollte geklärt werden, wie lange das fremde Gen intakt vorliegt und ob es sich im Ökosystem ausbreiten kann. Dabei konzentrierte sich die Arbeit auf drei Teilfragen:

1. Im Verlauf der Seneszenz finden Veränderungen verschiedener biochemischer Parameter statt. Sind diese Veränderungen bei transgenen und nicht-transgenen Pflanzen analog, oder liegen signifikante Unterschiede vor ?

2. Mittels molekularbiologischer Methoden wurde das *pat*-Gen in den Pflanzen parallel zu zwei endogenen Genen, die während der Photosynthese eine wichtige Rolle spielen, untersucht. Unterliegen die beiden Photosynthesegene in den Kontrollpflanzen dem gleichen Abbau wie in den transgenen Pflanzen ? Wie wird das *pat*-Gen im Vergleich zu den Kontrollgenen abgebaut ? Wie ist das Abbauverhalten im Boden nach dem Absterben der Pflanzen ? Wie schnell wird insbesondere das *pat*-Gen in verrottendem Raps und Mais abgebaut ?

3. In den Vorversuchen sollte ferner geprüft werden, welche Mikroorganismen BASTA®-sensitiv sind und ab welcher Herbizid-Konzentration eine Wirkung einsetzt. Kommt es durch Selektionsdruck zur BASTA®-Resistenz der betroffenen Mikroorganismen ? Vermittelt das *pat*-Gen aus Pflanzen Resistenz ?
   Schliesslich wurde aus Daten der Firmen Hoechst-Schering-AgrEvo und Monsanto errechnet, wie lange nach der empfohlenen Applikation der Herbizide BASTA® und Glyphosat Selektionsdruck auf empfindliche Bodenmikroorganismen besteht.
   Die verschiedenen Versuchsergebnisse ergaben Anhaltspunkte für einen horizontalen Gentransfer, dieser selbst bildet kein Thema der zunächst methodisch orientierten Dissertation.

Abb. 7: Rapsfeld mit Windmesser (Roggenstein, 1995).

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die üblichen verwendeten Laborchemikalien waren jeweils von analytischer Qualität und wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Aldrich Chemie, Steinheim; Bio-Rad Laboratories, München; Fluka-Feinchemikalien, Neu-Ulm; Merck, Darmstadt; Serva Feinchemikalien, Heidelberg oder Sigma Chemie, Deisenhofen bezogen.
Die Enzyme Lysozym, RNase A, Ligase T4 sowie die Restriktionsenzyme wurden von der Firma Roche, Mannheim, verwendet.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Filterpapier	:	Whatman 3MM	Whatman LTD, Maidstone
Röntgenfilm	:	Fuji RX 100	Fuji, Japan
		Hyperfilm MP	Amersham Pharmacia, Freiburg
Membran	:	Hybond N^+	Amersham Pharmacia, Freiburg
Phosphorimagerplatten			Fuji, Raytest

2.1.3 Medien und Puffer

Medien
Alle Medien wurden 20 Minuten bei 121°C und $1{,}013 \cdot 10^5$ Pa autoklaviert. Hitze-instabile Verbindungen wurden nach Absinken der Temperatur des Mediums auf ca. 45°C sterilfiltriert zugegeben. Den Nährmedien auf Agarbasis wurden vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar zugefügt. Die Zusammensetzung der Medien für die Bodenbakterien erfolgte nach Atlas, 1995.

LB (= Luria Bertani)-Medium (Sambrock *et al.,* 1989):

Bactotrypton 10,0 g; Hefeextrakt 5,0 g; NaCl 10,0 g; H_2O ad 1000 ml; pH7,5

Medien für Agrobakterien

Trypton-Hefeextrakt-Medium:

Bactotrypton 5,0 g; Hefeextrakt 3,0 g; $CaCl_2$ 0,3 g; H_2O ad 1000 ml; pH6,8-7,2

Medium D1:

Mannitol 15,0 g; LiCl 6,0 g; $NaNO_3$ 5,0 g; K_2HPO_4 0,5 g; $MgSO_4$ 0,5 g; $Ca(NO_3) \cdot 4\ H_2O$ 0,02 g; H_2O ad 1000 ml; pH7,2

Medien für *Bacillus subtilis*

ATCC Medium 21:

Glycerol 4,0 g; Zitronensäure 2,0 g; K_2HPO_4 0,5 g; $FeNH_4(SO_4)_2$ 0,5 g; $MgSO_4$ 0,5 g; H_2O ad 1000 ml; pH7,4

ATCC Medium 552:

Pepton 10,0 g; Laktose 5,0 g; NaCl 5,0 g; Rinder-Bouillon 3,0 g; K_2HPO_4 2,0 g; H_2O ad 1000 ml; pH7,2

Medium für *Pseudomonaden*:

ATCC Medium 820:

KH_2PO_4 1,0 g; $MgSO_4$ 0,2 g; KCl 0,1 g; Glukose 10,0 g; H_2O ad 1000 ml; pH6,5

Puffer:

20xSSC

NaCl 175,3 g; Tri-Natrium-Citrat $\cdot 2H_2O$ 88,2 g; H_2O ad 1000 ml; pH7

10 x TBE

Tris 108 g; Borsäure 55 g; EDTA 9,3 g; H_2O ad 1000 ml

Waschpuffer für erneute Hybridisierung von Membranen

Tris-HCl, (pH8) 5 mM; EDTA 2 mM; 0,1% Denhardt's Lösung

Elektroporationspuffer

Glycerol, 10%; HEPES, 1 mM, pH7

SOB-Puffer

2% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 20 mM $MgSO_4$; 20 mM $MgCl_2$

Gelpuffer/Laufpuffer für Formaldehydgele (10x):

200 mM MOPS; 50 mM Na-Acetat; 10 mM Na_2-EDTA; H_2O ad 1000 ml; pH7

IPTG

100 mM in dest. Wasser lösen

X-Gal

2% X-Gal (w:v) in Dimethylformamid

2.1.4 Probenmaterial

Ernte der Pflanzen

Die erste Ernte erfolgte kurz vor Blütebeginn der Rapspflanzen, am 24.04.95. Je Versuchsparzelle wurden zwei Pflanzen entnommen und getrennt nach Stengeln, Blättern, Wurzeln und Blüten bzw. später Schoten geerntet. Das Pflanzenmaterial wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und auf Trockeneis gelagert.
Die weitere Probenentnahme erfolgte jeweils im Abstand von ungefähr 14 Tagen, bis zum Absterben der Pflanzen und dem Unterpflügen des Pflanzenstrohs. Die letzte Ernte erfolgte 82 Tage nach der ersten Beprobung.

Tabelle 1: Zusammensetzung von Blüten bzw. Schoten zu den einzelnen Erntezeitpunkten

Erntezeitpunkte (Tagen)	**Zusammensetzung von Blüten bzw. Schoten**
0	Blüten
16	Blüten und Schoten
29	Blüten und Schoten
45	Schoten/Samen
60	Schoten/Samen
72	Schoten/Samen
81	Schoten/Samen

Abb. 8: Blühendes Rapsfeld und von unbekannten Tätern beschädigtes Hinweisschild, Roggenstein, 1995.

Bodenprobennahme

Nach dem Unterpflügen des Pflanzenstrohs wurden ca. alle vier Wochen sechs Bodenproben aus den Parzellen entnommen, die mit dem transgenen Raps bepflanzt waren. Dazu wurde ein Bohrstab verwendet, mit dem von der Bodenoberfläche bis auf 15 cm Tiefe Proben gezogen wurden. Der Boden wurde dann durchmischt. Die letzte Entnahme erfolgte im Januar 1996.

Maiskompostproben

Die transgenen Maispflanzen wurden von unbekannten Tätern kurz vor Beginn der Blüte im unteren Bereich der Stengel angeschnitten. Aufgrund dessen knickten die Stengel bei dem nächsten niedergehenden Regen um. Die Beprobung der transgenen Maisfelder konnte deshalb nicht im vorgesehenen Umfang durchgeführt werden. Die Pflanzenreste wurden gehäckselt und dann separiert. Von dem verrottendem Maismaterial wurden über zwei Jahre Proben entnommen und auf den Verbleib des *pat*-Gens getestet.
Die erste Beprobung erfolgte Mitte August 1994, die letzte Anfang Oktober 1996.

Abb. 9: Zerstörtes Maisfeld.

Alle aufgeführten Probenmaterialien wurden bei -80°C gelagert.

Bodenmikroorganismen

Im Verlauf dieser Arbeit getestete Mikroorganismen:

Tabelle 2: Agrobakterien

Nr.	Stamm	Herkunft
1	*Agrobacterium rhizogenes A4*	Stammsamml., Biop, GSF
2	„ „ *1724*	„ „ „
3	„ „ *2659*	„ „ „
4	„ *tumefaciens 82139*	„ „ „
5	„ „ *B0542*	„ „ „
6	„ „ *B6*	„ „ „
7	„ „ *C58*	„ „ „
8	„ „ *R16*	„ „ „
9	„ „ *EU6*	„ „ „
10	„ „ *Ant4*	„ „ „
11	„ „ *3.10*	„ „ „
12	„ „ *3.44*	„ „ „
13	„ „ *T1*	„ „ „

Im nachfolgenden Text werden anstelle der Stammbezeichnungen nur noch die zugeordneten Nummern angegeben.

Sonstige getestete Bodenmikroorganismen:

Bacillus subtilis WU3, Bodenökologie, GSF

Pseudomonas aeroginosa DSM 288

Pseudomonas fluorescens DSM 50090

„ „ „ *50119*

„ „ „ *50124*

Die *Pseudomonaden* wurden alle von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, bezogen.

2.2 Biochemische Untersuchungsmethoden

2.2.1 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wurde nach Arnon, 1949 durchgeführt. Dazu wurden 0,1 g Blattmaterial mit 1 ml 80%igem Aceton versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Anschliessend wurde zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Diese Prozedur wurde bis zu fünf Mal wiederholt, bis das Pellet weiss war. Anschliessend wurden die Proben mit 80%igem Aceton auf 10 ml aufgefüllt und photometrisch bei 645 und 663 nm vermessen. Die Berechnung des Gesamtchlorophyllgehaltes erfolgte nach der folgenden Formel:

20, 2 x OD 645 + 8,02 x OD 663 = Chlorophyll [mg/ml]

2.2.2 Bestimmung des Gesamtflavonoidgehalts

Die Methode wurde nach Dangl *et al.,* 1987, durchgeführt. Es wurden 0,1 g des Blattmaterials mit 1 ml 80%igem Methanol versetzt, 5 Sekunden gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zum Schluss 5 Minuten bei 100 g geschüttelt. Die Zentrifugation erfolgte bei 8000 g für die Dauer von 3 Minuten. Der Überstand wurde im Photometer bei 340 nm gegen 80%iges Methanol als Referenz gemessen.

2.2.3 Bestimmung von ACC und MACC in Pflanzenzellen

Die Bestimmumg von ACC bzw. MACC erfolgte nach Langebartels *et al.,* 1991, und beruht auf der von Lizada und Yang, 1979, veröffentlichten Methode.
200 mg des gemörserten Blattmaterials wurden mit 1,2 ml 2%iger Metaphosphorsäure und einer Spatelspitze PVPP versetzt und 15 Minuten geschüttelt. Anschliessend wurde 15 Minuten bei 8000 g zentrifugiert und der Überstand bei -80°C eingeforen.

ACC-Bestimmung

Auf Eis wurden 200 µl Extrakt mit 500 µl bidest. Wasser und 100 µl 10 mM $HgCl_2$-

Lösung versetzt. Am GC wurden 200 µl der Oxidationslösung (2:1 NaClO-Lösung (gebrauchsfertige 4% ige Lösung der Firma Sigma) und 10 M NaOH v:v) mit einer Spritze zugegeben, 10 Sekunden gemixt , 2,5 Minuten auf Eis inkubiert, nochmal 10 Sekunden durchmischt und dann 1 ml des Gasvolumens abgenommen und in den GC injiziert.

MACC-Bestimmung

200 µl des Extraktes wurden mit 40 µl 12 N HCL versetzt und 3 h bei 120°C hydrolisiert. Anschliessend erfolgte nach dem Abkühlen auf Eis die Zugabe von 240 µl 2 N NaOH. Auf Eis wurden 480 µl Extrakt, 220 µl bidest. Wasser und 100 µl der 10 mM $HgCl_2$-Lösung hinzugefügt. Vor der Messung mit dem GC erfolgte die Zugabe der Oxidationslösung, analog wie bei der ACC-Bestimmung beschrieben.

GC-Parameter

Gaschromatograph: Perkin Elmer Auto System XL GC; Säule: Supelco, Typ Porapak Q 80/100 mesh 2'x 1/8 '' SS; Gasflussraten: N_2 als Trägergas: 20 ml min^{-1}; H_2 als Detektorgas: 28 ml min^{-1}; Luft als Detektorgas: 250 ml min^{-1}; Säulentemperatur: 40°C; Injektionstemperatur: 150°C; Detektion: Flammenionisationsdetektor (FID)

Die Säule wurde nach jeder dritten MACC-Messung zur Reinigung ausgeheizt (Säulentemperatur 150°C). Die quantitative Auswertung erfolgte anhand einer Eichkurve, die mit einem Ethylen-Ethan-Standardgas mit definierter Konzentration vorgenommen wurde (siehe Dissertation Christian Betz, 1998).

2.2.4 Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach Bradford (1976)

Es wurden 0,1 g gemörsertes Pflanzenmaterial mit 1 ml 0,1 N NaOH versetzt und 3 Sekunden gemixt. Anschliessend erfolgte eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Dann wurde bei 6000 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -20°C eingefroren. Aus einer BSA-Stammlösung von 10 mg/ml wurden Verdünnungen für die Eichung hergestellt. Als Bradfordreagenz kam die Proteinassay-Lösung von Biorad, München, zum Einsatz. Es wurden jeweils 10 µl Probe und 200 µl Reagenz in Mikrotiterplatten pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Die Detektion erfolgte bei 595 nm

mittels eines ELISA-Readers (Thermomax, Molecular Devices, USA).

2.2.5 Bestimmung der freien Aminosäuren im Blattmaterial

Um die Veränderung der Konzentrationen der Aminosäuren während der Seneszenz mit zu verfolgen, sollten die frei im Blattmaterial vorliegenden Aminosäuren bestimmt werden. Für die Durchführung dieser Untersuchungen wurden verschiedene Lösungsmittel und Verfahren getestet (Weber *et al.*, 1995; Good *et al.*, 1994; Carpena-Ruiz, *et al.*, 1989). Die besten Resultate wurden mit 80%igem Ethanol erhalten (Shen *et al.*, 1989, Näsholm und Ericsson, 1990). 0,1 g gemörsertes Blattmaterial wurde mit 1 ml 80%igem Ethanol versetzt. Anschliessend wurden die Extrakte unter Vacuum (Uni vapa 150 H, Power Heater, Uniequip, Martinsried) bis zur Trockne eingeengt. Um die Aminosäuren besser detektieren zu können, wurde eine Derivatisierung mit Dabsylchlorid durchgeführt, was zu stabilen Reaktionsprodukten, einer guten Reproduzierbarkeit und einer guten spezifischen Detektion im sichtbaren Bereich führt (Jansen *et al.*, 1991). Das Dabsylchlorid wurde nach Lin *et al.,* 1975 bzw. Chang *et al.,* 1983 umkristallisiert und dann portionsweise bei -20°C eingeforen. Bei der Herstellung des Aminosäurenstandards wurden jeweils 2,5 nmol/µl in 0,12 N HCl gelöst und ebenfalls bei -20°C eingefroren. Die Derivatisierungsreaktion wurde, geringfügig verändert, nach Stocchi *et al.*, 1989, durchgeführt. Es wurden 200 µmol/ml Dabsylchlorid in Aceton gelöst. Zu dem Extraktionsrückstand wurden 100 µl Derivatisierungsreagenz und 50 µl 50 mM Na_2CO_3 (pH9) pipettiert. Hierbei war es wichtig, dass das Reaktionsgemisch ungefähr den pH-Wert 9 erreicht, damit die Derivatisierungsreaktion vollständig ablaufen kann. Dann wurde das Reaktionsgemisch zwölf Minuten bei 70°C auf dem Heizblock (Bioblock Scientific, Thermolyhe Corp. USA) erhitzt. Längere Derivatisierungszeiten führten zu einer schlechteren Produktausbeute. Die entstandenen Dabsylaminosäuren wurden direkt mit der HPLC aufgetrennt.

Versuchsparameter:

HPLC: Beckmann, Probenschleife: 20 µl, Säule: Bischoff Sperisorb ODS2, 250 x 4 mm, 5 µm, Vorsäule: Bischoff Sperisorb ODS2, 10 x 4 mm, 5 µm, Flussrate: 1ml/min, Lösung A: Natriumacetat (pH6,4 mit 4% Dimethylformamid), Lösung B: Acetonitril, Gradient: 0-15 min von 15% auf 24% B, 15-14 min von 24 auf 25% B, 17-19 min von 25 auf 27% B, 42-45 min 70% B, 45-47 min von 70 auf 15% B, 47-55 min 15% B isokratisch, Detektion:

UV 166 mit VIS- Lampe bei 435 nm.

Die Daten wurden mit der Gold-Software, Firma Beckmann, aufgezeichnet und mittels Excel, Version 7, ausgewertet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Benötigte Lösungen und Puffer, deionisiertes Formamid und Rinderserum-Albumin wurden nach dem Handbuch „Molecular Cloning“ (Sambrook *et al.,* 1989) hergestellt.

Sterilisation

Alle benötigten Puffer und Lösungen, deionisiertes Wasser und Pipettenspitzen wurden autoklaviert. Verwendete Glaswaren wurden 4 Stunden bei 200°C erhitzt.
Lösungen für die Extraktion von RNA wurden mit DEPC (Endkonzentration 0,1%) versetzt und autoklaviert.

Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentrationen

Die Bestimmung von Reinheit und Konzentration der Nukleinsäuren erfolgte spektrophotometrisch. Es wurde die OD bei 230, 260 und 280 nm bestimmt. Die Messung bei der Wellenlänge von 230 nm zeigt Verunreinigungen von Polysacchariden, bei 280 nm werden Phenole und Proteine detektiert. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} sollte >1,7 sein, der Quotient OD_{260}/OD_{230} > 2 (Sambrock *et al.*, 1989). Für die Quantifizierung der DNA und RNA-Mengen wurden die folgenden Parameter verwandt:

1 OD_{260} = 50 µg ml^{-1} DNA; 1 OD_{260} = 40 µg ml^{-1} RNA

Elektrophoretische Auftrennung der Nukleinsäuren

Um die Qualität der isolierten DNA und RNA zu überprüfen, wurden i. d. R. 1 µg auf einem 1% (w:v) Agarosegel, das vor der Auftrennung mit 0,5 µg ml^{-1} Ethidiumbromid versetzt worden war, elektrophoretisch getrennt. Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 bis 80 V mit einem Gerät der Firma AGS, Heidelberg.

2.3.1 Extraktion von DNA aus Pflanzenmaterial

Die Extraktion der DNA aus den Blättern, Wurzeln und Blüten bzw. Schoten erfolgte nach der „Miniprep-Methode“ (Dellaporta, 1994). 0,1 g gemörsertes Pflanzenmaterial wurde mit 750 ml Extraktionspuffer (50 mM Tris-Puffer, pH8; 10 nM EDTA, pH8; 100 mM Natriumchlorid, 1% SDS und 10 mM β-Mercaptoethanol) versetzt und 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Es folgten zwei Reinigungschritte mit je 1 ml 3 M Kaliumacetat. Die Fällung erfolgte mit 80%igem Ethanol bei -20°C. Anschliessend erfolgte eine Behandlung mit RNase A (Sambrock *et al.*, 1989).
Die DNA der Stengel konnte mit dieser Methode nicht isoliert werden, da der hohe Anteil an Polysacchariden störte. Hier wurde die DNA mit Hilfe des Genome Clean-Kits von AGS/Heidelberg isoliert. Mittels des Komplexbildners CTAB (Cetyltriethylammoniumbromid) wurden die störenden Polysaccharide entfernt. Die Methode wurde modifiziert, da auch hier parallel die Gesamt-RNA erhalten wurde. Anschliessend wurden entsprechende Reinigungsschritte mit Phenol bzw. Chloroform/IAA (24:1) (v:v) durchgeführt.

2.3.2 Extraktion von DNA aus Honig und Propolis

Bei der Isolation von DNA aus Honig bzw. aus Propolis wurden die besten Resultate mit der Methode nach Kliniynk *et al.,* 1993, bzw. nach Volkenandt *et al.,* 1993, erzielt. Eine stecknadelkopfgrosse Menge Honig oder Propolis wurden mit 40 µl 0,25 M NaOH versetzt und 30 Sekunden bei 100°C inkubiert. Zwei Minuten später wurden 40 µl 0,25 M HCl und 20 µl 0,5 M Tris-HCl (mit 0,25 v:v Nonidet P-40) versetzt. Dieser Reaktionsansatz wurde direkt für die PCR unter Verwendung der zwei verschiedenen Primerpaare für die kodierende Region und die Gesamtsequenz des *pat*-Gens eingesetzt (siehe Punkt 2.3.9).

2.3.3 Extraktion von DNA aus Boden und verrottenden Maispflanzen

Die einzelnen Proben wurden durchmischt und anschliessend die DNA-Isolierung nach Ernst *et al.,* 1996b durchgeführt. Dabei wurden vor Gewinnung der DNA die enthaltenen

Huminsäuren des Bodens durch eine Fällung mit Calciumchlorid (Zugabe von 2% w/v) entfernt. Die erhaltene DNA wurde spektrophotometrisch auf Reinheit und Menge überprüft sowie elektrophoretisch auf die Qualität vermessen.

2.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli

Anzucht der Bakterien

Aus einer Stammkultur (pUC18, *pat*-Gen, 35S-Promotor- und Terminatorregion oder der unter 2.1.4 beschrieben Stämme) wurden einige µl Zellen mit einem sterilen Zahnstocher entnommen. Diese Zellen wurden dann in einem LB-Kulturmedium, Sambrock *et al.,*1989 (versetzt mit 25 mg ml^{-1} Ampicillin bei *E.coli* JM 109), herangezogen. Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 37°C und unter Rotation bei 100 g.

DNA-Isolation

Die DNA-Extraktion erfolgte aus der Übernachtkultur mittels des Qiaprep Spin, Plasmid Mini- oder Midi prep Kits (Qiagen GmbH, Düsseldorf), nach dem Protokoll des Herstellers. Nach Resuspension der Zellen fand eine alkalische Lysis der Zellwände statt. Daran anschliessend folgte die Neutralisation und Adsorption der Lösung auf einer Anionen-Austauscher Matrix. Es folgten Waschschritte und abschliessend die Elution der Plasmid-DNA. Für die Fällung wurde Isopropanol verwandt.
Alternativ wurde eine andere Variante der Plasmid-Präparation durchgeführt. Hier schloss sich an die Zentrifugation der Zellen aus der Übernachtkultur eine Behandlung mit Lysozym (10 mg/ml) an. Die Fällung der Plasmid- DNA erfolgte mit Isopropanol bei -70°C für die Dauer einer Stunde. Die Ausbeute und Qualität wurden bestimmt. Da es sich bei dem pUC18-Plasmid um einen „high-copy“ Vektor handelt, wurden 3-8 µg DNA ml^{-1} Zellen erhalten.

2.3.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen

0,5 g unter flüssigem Stickstoff gemörsertes Pflanzenmaterial wurde mit 1 ml Guanidin-HCl-Puffer (8M Guanidinhydrochlorid, pH7; 20 mM MES; 20 mM EDTA, 50 mM β-Mercaptoethanol) und 0,5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v:v:v) versetzt und 15 Minuten geschüttelt. Im Anschluss daran wurde zentrifugiert (2000 g, 15

Minuten, 4°C) und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäss überführt, zur Fällung mit 0,7 Vol Ethanol und 1/20 Vol Essigsäure versetzt und eine Stunde bei -70°C gelagert. Die gefällte RNA wurde anschliessend zentrifugiert und mittels mehrmaliger Waschschritte mit 3 M Kaliumacetat und einem Waschschritt mit 70%igem Ethanol von Polysacchariden, DNA und Proteinen getrennt. Die Ausbeute und die Reinheit wurden photometrisch und elektrophoretisch bestimmt.

2.3.6 Northern Blotting

Die RNA (je 15-20 µg) wurde im Verhältnis 10:8 (RNA:Puffer) mit dem Probenpuffer (500 µl Gelpuffer, 830 µl Formaldehyd, 8700 µl Formamid, 100 ml Farbmarker) versetzt. Die Denaturierung der RNA erfolgte für 10 Minuten bei 65°C. Anschliessend wurde die Elektrophorese in einem denaturierenden 1,5%igem Agarosegel, versetzt mit 2 M Formaldehyd, vorgenommen. Die sich anschliessende Elektrophorese im Laufpuffer (pH8,0) erfolgte für 6 Stunden bei 60 V. Der Transfer der Nukleinsäuren mittels Kapillarblot (nach Sambrock *et al.,* 1989) auf eine Nylonmembran (Hybond N^{TM}, Amersham Pharmacia, Freiburg) wurde mit 20 X SSC als Transferpuffer durchgeführt. Dieser Transfer dauerte ca.15 Stunden bei Raumtemperatur. Anschliessend wurde die Membran 1 Stunde getrocknet und dann durch Bestrahlung mit UV-Licht fixiert (UV Crosslinker 1800, Stratagene, Heidelberg). Die Membran wurde bei 4°C gelagert.

2.3.7 Slot-Blot

Für den Slot-Blot wurden 5 µg der RNA mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Diese 10 µl wurden mit 30 µl Auftragspuffer (bestehend aus 1 ml deionisiertem Formamid, 350 ml Formaldehyd und 150 µl 20 X SSC-Puffer) versetzt und 15 Minuten bei 68°C denaturiert. Anschliessend wurden auf Eis 2 Vol 20 X SSC (vorgekühlt auf 4°C) hinzugefügt.
Der Blot wurde mit der Apparatur von MilliBlot^{TM}-D-Systems (Firma Millipore, Eschborn) durchgeführt. Der Transfer erfolgte nach den Angaben des Herstellers bzw. nach Sambrock *et al.,* 1989. Die Membran wurde eine Stunde an der Luft getrocknet und dann mit UV-Licht fixiert.

2.3.8 Hybridisierungen

Erstellen der Sonden

pat-Sonde:

Die Anzucht der Bakterien (*E.coli* JM 109) und die Plasmid-Isolation erfolgte wie unter Punkt 2.3.4 beschrieben. Das DNA-Insert wurde aus dem pUC18-Vektor mit dem Restriktionsenzym Eco RI ausgeschnitten. Dazu wurden 10 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl (1x Restriktionspuffer, DNA, Enzym 10 Units) während ein bis drei Stunden bei 37°C inkubiert. Auf einem Agarosegel wurde der gesamte Restriktionsansatz elektrophoretisch getrennt und das Insert mittels des Jetsorb Gel-Extraction Kits/300 (Genomed, Bad Oeynhausen) aus dem Gel extrahiert.

Glutaminsynthetase-Sonde

Aus der Literatur (Buchanan-Wollaston und Ainsworth, 1997) ist die Nukleinsäuresequenz der Glutaminsynthetase von *Brassica napus* bekannt. Mittels PCR (siehe Punkt 2.3.9) wurde aus der Gesamtlänge von 213 bp ein 171 bp umfassender Bereich amplifiziert (Primer siehe Punkt 2.3.9). Nach der elektrophoretischen Auftrennung auf einem 1%igem Agarosegel wurde die Sonde aus dem Gel extrahiert.

Markierung des Inserts mit ^{32}P-Nukleotiden

Die Markierung der Sonde wurde mit α [^{32}-P]-dCTP (Amersham Pharmacia, Freiburg) und mit „random priming“ (Nona Primer Kit I und II von Appligene, Heidelberg) durchgeführt. Der ganze Kit basiert auf der „random priming“-Methode nach Feinberg und Vogelstein (1983 und 1984). Nicht eingebaute Nukleotide wurden nach Vorgaben des Herstellers mittels Waschlösungen entfernt. Die Hybridisierung der beiden Sonden wurde nach der Arbeitsvorschrift von Sambrock *et al.,* 1989, durchgeführt. Die Auswertung der eingescannten Membranen erfolgte mit der Tina-Software, Version 9, von Raytest (Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt).

Entfernung der Gensonden

Um die Membranen erneut mit anderen Gensonden zu hybridisieren, wurden sie für zwei Stunden bei 65°C in einem Puffer (siehe Punkt 2.1.3) gewaschen. Anschliessend wurden sie kurz getrocknet und dann gleich wieder verwendet oder bei 4°C gelagert.

2.3.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Quantitative PCR

Durchgeführtes Protokoll:

In die PCR wurden jeweils 0,5 µg der isolierten DNA eingesetzt, ebenfalls wurden 0,2 µM Primer; 2,5 Units Taq-DNA-Polymerase, 2 mM dNTP`s, 1x PCR-Puffer der 100 mM Tris-HCl, pH8,3; 500 mM KCl; 15 mM $MgCl_2$ und 0,01% (w/v) Gelatine enthielt, eingesetzt. Die Denaturierung erfolgte für 2 Minuten bei 92°C. Anschliessend wurde für die Dauer von 2 Minuten auf 56°C gekühlt, wobei die Hybridisierung der Primer stattfand. Die nachfolgende Replikation wurde für 2 Minuten bei 72°C durchgeführt. Das Protokoll umfasste 30 Zyklen bei der pflanzlichen DNA und 35 Zyklen bei den Boden- und Kompostproben. Bei jeder PCR wurde eine positive Kontrollprobe, die 0,5 µg Plasmid-DNA (pUC18-Vektor mit der *pat*-Sequenz) enthielt, parallel amplifiziert. Als negative Kontrollprobe wurde jeweils ein Versuchsansatz ohne Zugabe von DNA eingesetzt.

Herstellung eines internen Standards

Mittels des Restriktionsenzyms Eco RV (Roche, Mannheim) wurden aus der 1,3 kb grossen *pat*- Sequenz 190 bp herausgeschnitten. Anschliessend erfolgte eine Ligation. Die verkürzte DNA wurde in den pUC18-Vektor transformiert. Die Anzucht und die Plasmid-Isolation erfolgte wie unter Punkt 2.3.4 beschrieben. Zu jedem PCR-Ansatz wurde ein Aliquot des internen Standards in einer Verdünnung 1:500 hinzugefügt. Die PCR-Produkte wurden auf ein 2%iges Agarosegel, versetzt mit 5 µl Ethidiumbromid-Lösung (1 mg Ethidiumbromid/ ml dest. Wasser), aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die quantitative Bestimmung der Amplifikate erfolgte durch die Fluoreszenz der Ethidiumbromidbanden mittels des Programms Scan (von A. Kraxenberger, Institut

für Strahlenbiologie, GSF). Die erhaltenen Werte wurden mittels Excel, Version 7, mathematisch ausgewertet.

Amplifizierte Gene

Als Kontrolle zu dem künstlich eingefügten *pat*-Gen wurden zwei native pflanzliche Gene parallel bestimmt. Als Vergleich dienten die bekannten Sequenzen des Chlorophyll a/b-bindenden Proteins (*cab*-Gen) und die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5 Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (*rbcS*-Gen) in *Brassica napus*. Die Sequenz des *rbcS*-Gens besteht aus 2006 Basen, die des *cab*-Gens aus 2036 Basen. Um bei der Quantifizierung einen Vergleich zur *pat*-Sequenz zu ermöglichen, wurden die Primer so gewählt, dass der zu amplifizierende Bereich in einer vergleichbaren Grössenordnung lag. Das *pat*-Gen einschliesslich Promotor- und Terminatorregion wurde in einer Grössenordnung von 1335 bp amplifiziert. Die kodierende Sequenz von 606 bp wurde ebenfalls amplifiziert. Bei der PCR wurden für das *cab*-Gen 1231 bp und für das *rbcS*-Gen 1183 bp betrachtet.
Im folgenden sind Primersequenzen dargestellt, die bei den Pflanzen- und Bodenproben eingesetzt worden sind:

pat- Gen :

5'- CAT GGA GTC AAA GAT TCA AAT AGA GGA CC- 3'	upstream, 29-mer
5'- GAG CTC GGT ACC CAC TGG ATT TTG G- 3'	downstream, 25-mer

pat- Gen (kodierender Bereich):

5'- GTA CCC GGG GAT CCT CTA GAG TC- 3'	upstream, 23-mer
5'- GAT TTC AGC GGC ATG CCT GCA GGT C- 3'	downstream, 25-mer

rbcS- Gen:

5'- GCC ACG TGG CCT TAA CAT AGT GGT CAG- 3'	upstream, 27-mer
5'- CGG AAA GTA ACC AAG ACG AAG AAG C-3'	downstream, 25-mer

cab- Gen:

5’ - GCC AAT ATC TGG GTA TTC GAG ACA CCG-3’ upstream, 27-mer
5’- CCC AAC CAT AGT CGC CGG GAA ACT C- 3’ downstream, 25-mer

Da bei den Bodenproben davon ausgegangen werden muss, dass die DNA nicht mehr vollständig intakt vorlag, wurden kürzere Fragmente in der Grössenordnung des kodierenden Bereichs des *pat*-Gens (606 bp) auch für das *cab*- und *rbcS*-Gen amplifiziert. Für das *rbcS*-Gen wurden die Primer (*rbcS3)* so gewählt, dass ein 572 bp grosses Fragment amplifiziert wurde, beim *cab*-Gen (*cab3)* grenzten die Primer ein 628 bp grosses Fragment ein.
Primersequenzen, die nur bei den Bodenproben verwendet wurden:
rbcS3:
5’- GGC TTC CTC TAT GCT TTC CTC CGC- 3’ upstream, 24-mer
5’- GCT ACA CAC ACG TGA GAA TTC C- 3’ downstream, 22-mer

cab3:
5’- GCT TTT GGA GTT AAC AAA GGC- 3’ upstream, 21-mer
5’- GGT GGA GCC TTT AGT CTG TCC-3’ downstream, 21-mer

Primersequenz für die Glutaminsynthetase:
5‘- CGA TAA ATT GGG ACT GAG AC-3‘ upstream, 20-mer
5‘- CCT TTC CCT TCT TTC TCT G-3‘ downstream, 19-mer

2.3.10 Kolonien-PCR

Von einer Agarplatte wurde eine einzelne Kolonie von *E.coli* mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und in ein Reaktionsgefäss mit 20 µl sterilem Wasser gegeben. Nach 10minütiger Inkubation bei 100°C wurde die PCR wie unter Punkt 2.3.9 beschrieben durchgeführt.

2.3.11 Sequenzieren der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte des *cab-, rbcS*- und *pat*-Gens wurden mit Hilfe des Thermo-Sequenase-Kits der Firma Amersham Pharmacia (Freiburg) sequenziert. Hierbei wurde

ein Aliquot des PCR-Reaktionsgemisches mit der Exonuklease I behandelt, um einzelsträngige DNA und Primer, die als Nebenreaktionen bei der PCR produziert werden, auszugrenzen. Eine Alkalische-Phosphatase aus Krabben wurde zugegeben, um nicht verbrauchte NTP's der PCR abzubauen, da diese die Sequenzierreaktion behindern können. Beide Enzyme wurden nach Anleitung des Herstellers eingesetzt. Die anschliessende Sequenzierung erfolgte mit ^{33}P-markierten Nukleotiden nach dem Protokoll von Amersham Pharmacia, Freiburg.

Klonieren von PCR-Produkten in Vektoren

Da der direkte Einsatz der PCR-Produkte bei der Sequenzierung häufig nicht so gute Resultate liefert wie klonierte Produkte, wurden die *pat-, cab- und rbcS*-PCR-Produkte aus einem Agarose-Gel mittels des „Gel Extraction-Kits" der Firma Genomed, Bad Oeynhausen, nach Herstellerangaben isoliert. Die erhaltenen Fragmente wurden in den pMOS*Blue* Vektor transformiert.

2.4 Mikrobiologische Methoden

2.4.1 Anzucht von Bodenbakterien

Die verschiedenen Bodenmikroorganismen (siehe Punkt 2.1.4) wurden zum Teil aus der Stammsammlung der Arbeitsgruppe Ernst, BIOP, GSF, entnommen oder von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, bezogen. Das Herbizid BASTA® wurde freundlicherweise von der Firma Hoechst/Agrevo in der handelsüblichen Formulierung zur Verfügung gestellt.

Die Bodenmikroorganismen wurden in einer 10 ml Vorkultur in dem jeweiligen für sie empfohlenen Vollmedium (siehe Punkt 2.1.3) bei 30°C und 100 g herangezogen, bis eine OD_{600} von ca. 1,0 erreicht war. Von den Vorkulturen wurden jeweils 300 µl in Reagenzgläser überführt und BASTA®-Konzentrationen zwischen 20 bis 0,01 µg/ml ausgesetzt. Es wurden pro BASTA®-Konzentration drei Parallelansätze und drei Kontrollproben getestet. Die Inkubation erfolgte bei 30°C und 100 g. Das Wachstum wurde über die OD-Messung verfolgt.

2.4.2 Elektroporation

Herstellung von elektrokompetenten Zellen

Aus den Agrobakterien-Stämmen sowie aus *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas aeruginosa* wurden elektrokompetente Zellen hergestellt. Alle Stämme wurden auf den entsprechenden Vollmedien gezüchtet und bis zu einer OD_{600} von 0,7 bis 0,9 angezogen. Dann erfolgte eine 10minütige Zentrifugation bei 4°C. Die Pellets wurden dreimal mit eisgekühltem Elektroporationspuffer gewaschen. Der Abschluss bildete eine Resuspendierung in 10%igem Glycerol. Die Endkonzentration betrug ca. 10^{11} Zellen/ml. Die Lagerung erfolgte bei -20°C (Cooley *et al.,*1991).

Durchführung der Elektroporation

Die Elektroporation wurde mit dem Gene-Pulser und den entsprechenden 0,2 µm Küvetten der Firma Biorad, München, durchgeführt. Hierzu wurden 40 µl der tiefgefrorenen Zellen auf Eis aufgetaut und mit 3 µl *pat*-Plasmid-DNA (4,5 ng/µl) bzw. der *pat*-Insert-DNA sowohl ohne als auch mit der 35S-CaMV-Region versetzt, in die vorgekühlten Küvetten gegeben. Dann wurde sofort elektroporiert (Feldstärke 12,5 kV/cm, Puls Controller 200 Ω, Gene Pulser 25 µF; Cooley *et al.,*1991). Anschliessend wurde 1 ml SOB-Puffer zugefügt und die Suspension in einem sterilen Gefäss bei 30°C für die Zeit von 1-2 Stunden inkubiert. Ein Aliquot des Ansatzes wurde auf LB-Medium unter Verwendung des *lac-Operons* zur Selektion ausplattiert. Dabei wurden 100 ml LB-Medium (bei 42°C) mit 167 µl X-Gal und 333 µl IPTG versetzt und auf Petrischalen verteilt.

Von den angewachsenen Kolonien wurden einige Zellen unter sterilen Bedingungen entnommen und eine Kolonien-PCR unter Verwendung der *pat*-Primer durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Biochemische Untersuchungen

3.1.1 Chlorophyllgehalt

Die frühesten Veränderungen, die mit der Seneszenz in Verbindung gebracht werden, geschehen in den Chloroplasten der Blätter (Thimann, 1980; Woolhouse, 1984). Dieses Pflanzenorganell durchläuft Veränderungen hinsichtlich der Kapazität der Photosynthese, und zwar von der Reifung bis zur Seneszenz. An der Photosynthese sind mehrere Pigmente beteiligt. Die Hauptpigmente bilden das Chlorophyll a und b, welche beide charakteristische Absorptionsspektren besitzen. Der Verlust von Chlorophyll ist eines der bedeutendsten Merkmale der Seneszenz. Der Abbau des Chlorophylls gilt als allgemeines Kriterium der Blattseneszenz und ist ein Maß für die abnehmende Photosynthesekapazität (Thimann, 1980; Thomas und Stoddart, 1980).

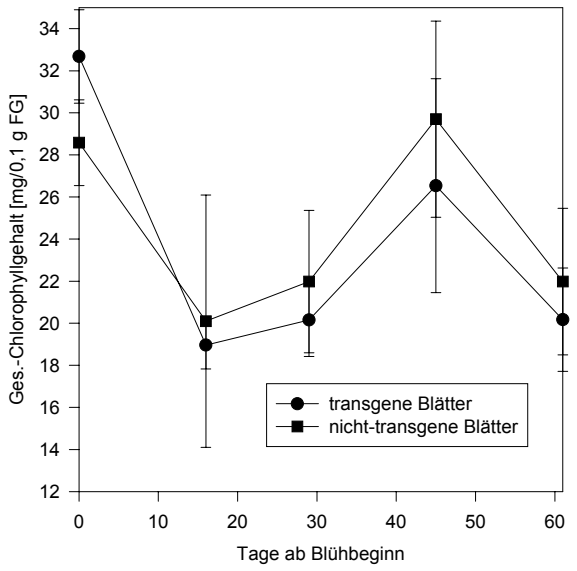


Abb.10: Gesamtchlorophyllgehalt nach Arnon in transgenen und nicht-transgenen Rapsblättern ab Blühbeginn bis zum Absterben über einen Zeitraum von 62 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E. ($n_{transgen}$= 6; $n_{nicht\text{-}transgen}$=12).

Der Gesamtchlorophyllgehalt der transgenen Blätter ist zu Beginn der Blüte um 12,5% höher als in den nicht-transgenen Blättern. 16 Tage später ist die detektierte Menge an Chlorophyll in den transgenen Pflanzen um 42% und in den nicht-transgenen um 30% gesunken. Im weiteren Kurvenverlauf zeigen transgene und nicht-transgene Blätter einen parallelen Verlauf, wobei der Gehalt an Chlorophyll in den nicht-transgenen Blättern geringfügig höher ist. 45 Tage nach dem Blühbeginn ist, gemessen an dem Wert, der 16 Tage davor ermittelt wurde, ein allerdings nicht signifikanter Anstieg der Chlorophyllmenge zwischen 26 und 24% detektiert worden. Beim letzten Erntezeitpunkt hatte der Chlorophyllgehalt wieder abgenommen. Bei den transgenen Blättern war, gemessen an dem Ausgangswert beim Blühbeginn bis zum Abfallen der Blätter, eine Gesamtabnahme an Chlorophyll um 38% und bei den nicht-transgenen Proben um 23% zu beobachten.

3.1.2 ACC- und MACC-Gehalt

Die Alterung und Seneszenz höherer Pflanzen ist ein sowohl genetisch als auch durch Umweltbedingungen regulierter Prozess, der auch an hormonelle Interaktionen gekoppelt ist. Einer der an diesem Prozess beteiligten Stoffen ist Ethylen. Ethylen wird von den meisten höheren Pflanzen produziert. Der Einfluss dieses Hormons auf das Pflanzenwachstum ist eingehend untersucht und nachgewiesen worden, bezüglich der Alterung und Seneszenz, die mit einer Zunahme an Ethylen einhergeht (Liebermann, 1979 und Abeles *et al.,*1992). Das Phytohormon ist als Hemmstoff für das Zellwachstum bekannt und wird in der Praxis zur Beschleunigung der Fruchtreife eingesetzt. Die Bildung von Ethylen im Stoffwechsel vollzieht sich auf folgendem Weg:

Met → SAM → ACC → Ethylen

ACC fungiert als Vorläufer der Ethylenbildung. Die Verfügbarkeit von ACC kann die Produktion von Ethylen limitieren. Der Schritt, bei dem SAM (S-Adenosyl-Methionin) zu ACC umgewandelt wird, wird von der ACC-Synthase katalysiert. Eine andere limitierende Reaktion ist die Konjugation von ACC, wobei 1-Malonylamino-Cyclopropan-1-Carboxylsäure (MACC) als Hauptmetabolit gefunden wurde.

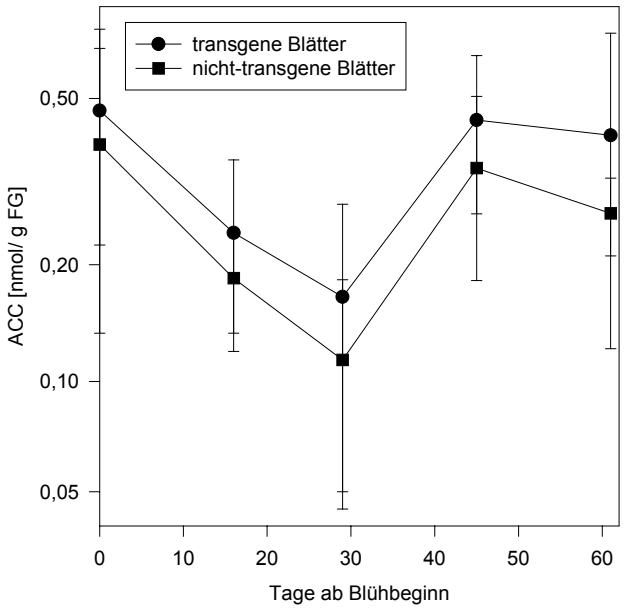


Abb.11: ACC-Gehalt in transgenen und nicht-transgenen Rapsblättern ab Blühbeginn bis zum Absterben über einen Zeitraum von 62 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E. ($n_{transgen}$= 6; $n_{nicht\text{-}transgen}$= 12).

Bei der Bestimmung des ACC-Gehaltes zeigte sich zu Beginn der Blüte ein relativ hoher Gehalt im Blattmaterial. Der Wert in den transgenen Blättern lag um 17% über der der nicht-transgenen Blätter. In den folgenden 29 Tagen war eine Abnahme des ACC zu beobachten; in den transgenen Proben betrug diese 23%, bei den nicht-transgenen 29%, im Vergleich zu dem Ausgangswert. Nach 45 Tagen stieg der gemessene Wert bei den transgenen und auch den nicht-transgenen Blättern wieder auf ungefähr den Wert, der zu Beginn der Blüte ermittelt worden war. Zum letzten Erntezeitpunkt war der Gehalt an ACC wieder etwas gesunken. Über die gesamte Messzeit war der Gehalt in den transgenen Blättern höher als in den verglichenen nicht-transgenen Proben.

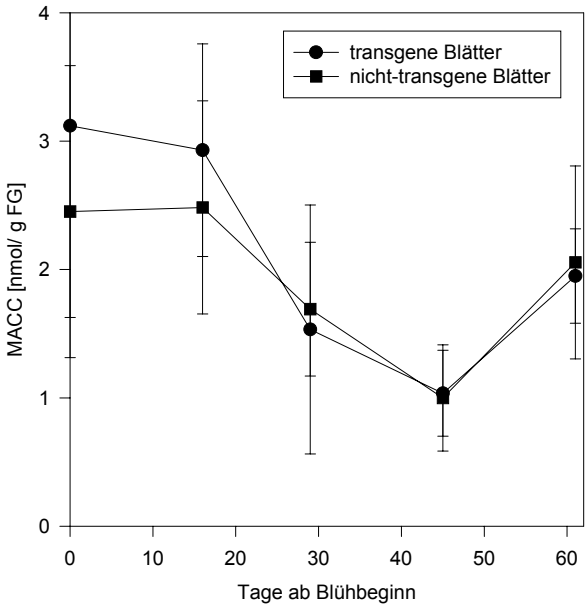


Abb. 12: Gehalt an MACC in transgenen und nicht-transgenen Rapsblättern ab Blühbeginn bis zum Absterben über einen Zeitraum von 62 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E. ($n_{transgen}$=6; $n_{nicht\text{-}transgen}$=12).

Zu Beginn der Blüte war der Gehalt an MACC im Blattgewebe der transgenen Pflanzen um 21% über dem der nicht-transgenen Proben. Bis zu 45 Tage danach nahm der Gehalt in beiden Blattmaterialien stetig ab; bei den transgenen Blättern um 67%, bei den nicht-transgenen um 59%. Bei der letzten Probenahme wurde wiederum ein Anstieg ermittelt. Signifikante Unterschiede zwischen transgenen und nicht-transgenen Blättern wurden nicht festgestellt.

3.1.3 Gesamtflavonoidgehalt

Flavonoide sind als die umfangreichste und wichtigste Gruppe der pflanzlichen Phenole bekannt. Ihnen allen ist das Flavon-Molekülgerüst gemeinsam. Bis jetzt ist nicht bekannt, ob sie degradiert werden bzw. welche Stoffwechselwege durchlaufen werden, oder ob es im Verlauf der Seneszenz zu einer Komplexierung kommt, die ihre Extrahierung unterbindet (Stafford, 1990). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Gehalt an Flavonoiden in den Blättern über die Vegetationsperiode betrachtet.

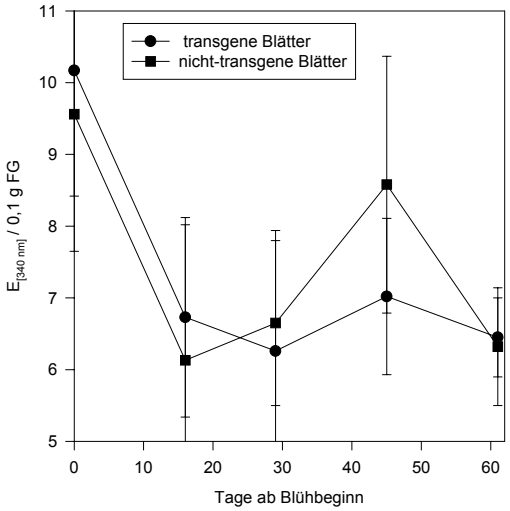


Abb.13: Flavonoidgehalt nach Dangl *et al.* (1987) in transgenen und nicht-transgenen Rapsblättern ab Blühbeginn bis zum Absterben über einen Zeitraum von 62 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E. ($n_{transgen}$=6; $n_{nicht\text{-}transgen}$=12).

Zu Beginn der Blüte war der Gehalt an Flavonoiden in den transgenen Blättern um 5,9% höher als in den nicht-transgenen Vergleichsproben. 14 Tage nach dem ersten Erntedatum war der Gehalt an nachweisbaren Flavonoiden bei den transgenen Proben um 34% gesunken; bei den nicht-transgenen Blättern fiel der Wert um 36% ab. Gegen Ende der Vegetationsperiode war der Anteil der Flavonoide bei den transgenen Blättern auf 64% gesunken und bei den nicht-transgenen Blättern auf 66%, bezogen auf den Anfangswert. Da bei der gemessenen Wellenlänge auch viele andere Substanzen mit erfasst werden, ist allg. von einer Abnahme der polyaromatischen Verbindungen auszugehen.

3.1.4 Gesamtproteingehalt

Mit Beginn der Anthese wird fast der gesamte Anteil des organischen Stickstoffs auf die vegetativen, pflanzlichen Organe übertragen. Der Abtransport in den Blättern und Stengeln beträgt im allgemeinen ca. 65% (Noodén und Leopold, 1988). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Rückgang an organischem Stickstoff in der Form des Gesamt-

verlustes an Proteinen in den Blättern zu den verschiedenen Erntezeitpunkten bestimmt.

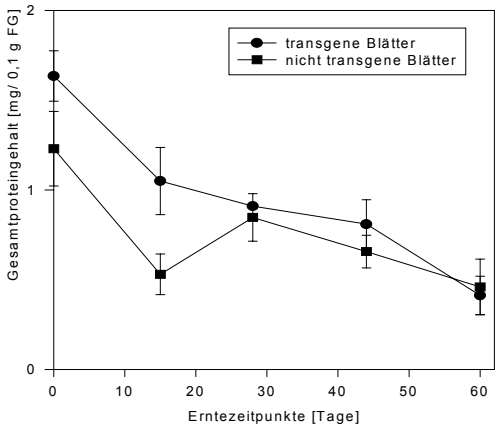


Abb.14: Gesamtproteinbestimmung nach Bradford (1976) in transgenen und nicht-transgenen Rapsblättern ab Blühbeginn bis zum Absterben über einen Zeitraum von 62 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E. ($n_{transgen}$=6; $n_{nicht\text{-}transgen}$=12).

Der Proteingehalt war in den transgenen Blättern zu Beginn der Blüte um fast 25% höher als in den nicht-transgenen Proben. Die stärkste Abnahme an verfügbarem Protein wurde 16 Tage nach dem Blühbeginn ermittelt, sie betrug 36% bei den transgenen Blättern und 57% bei den nicht-transgenen Vergleichsproben. 27 Tage nach Blühbeginn wurde bei den nicht-transgenen Blättern eine Zunahme des Proteingehalts auf fast den gleichen Wert wie bei den transgenen Blättern festgestellt. Ab diesem Zeitpunkt verlief die abfallende Kurve bei den transgenen und nicht-transgenen Blättern nahezu parallel bis zum Blattfall. Die Gesamtabnahme an Protein betrug bei den transgenen Blättern 75% und bei den nicht-transgenen Proben 63%. Die Standardabweichungen zu jedem Erntezeitpunkt wurden bei den nicht-transgenen Proben aus jeweils 12 verschiedenen Pflanzen, von denen drei Parallelproben vermessen wurden, gebildet. Bei den transgenen Blättern wurden aus sechs verschiedenen Pflanzen, bei denen je eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde, die Standardabweichung berechnet.

3.1.5 Ergebnisse aus der Bestimmung der freien Aminosäuren

Aminosäuren bilden die Grundbausteine der Proteine. Sie erfüllen im Stoffwechsel eine Vielzahl an Aufgaben; sie dienen als Ausgangsverbindungen bei Biosynthesen, z. B. der Alkaloide, Porphyrine, Vitamine, Hormone etc., oder steuern funktionelle Gruppen bei, wie Serin und Glycin als aktive C1-Körper. Aminosäuren werden in Keimlingen durch die Mobilisierung von Reserveproteinen und auch bei der Samenbildung der Pflanzen freigesetzt und dienen so nach entsprechendem Umbau als Substrate für wichtige Biosynthesen oder gehen in die Dissimilation zur Energiegewinnung ein. Auch während der Seneszenz werden die Proteine in ihre Bestandteile, die Aminosäuren zerlegt, um in andere Pflanzenteile transportiert zu werden und dort für neue Biosynthesen zu dienen. Die aktuelle Konzentration an freien Aminosäuren reflektiert den momentanen Status zwischen Transportprozessen, Proteolyse und Biosynthese zu bzw. weg von den betroffenen Organellen. Diese Prozesse sind vom jeweiligen Entwicklungsstadium, aber auch von Umweltfaktoren, abhängig. Das Totalherbizid BASTA® übt eine Hemmung auf die Glutaminsynthetase aus. Durch diese Hemmung wird die Bildung von Glutamin unterbunden, und es kommt zur Akkumulation von Ammonium (siehe Einleitung). Im folgenden soll gezeigt werden, ob der Abbau der Aminosäuren in transgenen und nicht-transgenen Pflanzen während der Seneszenz analog ist und ob das in den Aminosäurestoffwechsel eingreifende Herbizid Veränderungen bei den transgenen Pflanzen bewirkt.

Aus den von transgenen und den von nicht-transgenen Pflanzen stammenden Blattextrakten wurden die folgenden Aminosäuren als Dabsylderivate analysiert: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, Serin, Glycin, Alanin und Prolin. Es wurden pro Erntezeitpunkt 12 nicht-transgene und 6 transgene Pflanzen untersucht. Die Tabelle zu der positiven Anzahl n der untersuchten Proben enthält die Anzahl der Proben, bei denen sich die jeweilige Aminosäure detektieren liess. Die Durchführung des Student's t-Tests auf signifikante Unterschiede ($p<0,05$) wurde mit dem Programm SigmaPlot 2.0 (Jandel Scientific) durchgeführt. Im folgenden soll ein Vergleich zwischen transgenen und nicht-transgenen Proben zu den verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt werden.

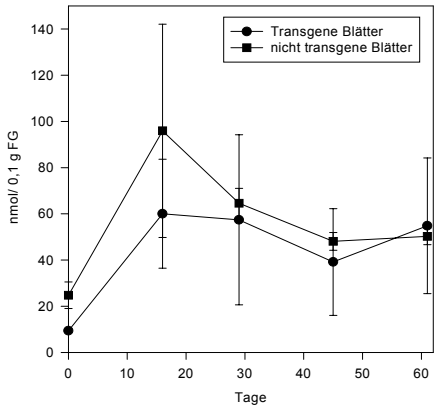


Abb.15: Asparaginsäure in transgenen und nicht-transgenen Rapsblättern ab Blühbeginn bis zum Absterben über einen Zeitraum von 62 Tagen.

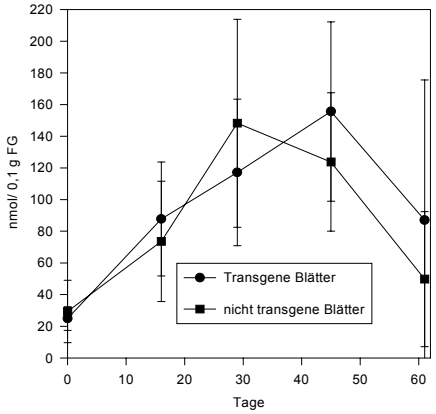


Abb.16: Glutaminsäure in transgenen und nicht-transgenen Rapsblättern ab Blühbeginn bis zum Absterben über einen Zeitraum von 62 Tagen.

Asparaginsäure:

Zu Beginn der Blüte wurde hier bei den nicht-transgenen Pflanzen ein um 62% höherer Gehalt an Asparaginsäure festgestellt, 16 Tage später hatte sich dieses Gefälle prozentual gesehen auf 37% verringert. Nach 29 Tagen war ein starker Abfall (36%) bei den nicht-transgenen Blättern zu verzeichnen, der bei den transgenen Pflanzen viel schwächer ausfiel. Der Gehalt in den beiden miteinander verglichenen Proben war nun ungefähr auf einem Level und der Kurvenverlauf war bis zum Abfallen der Blätter parallel. Nach 45 Tagen war ein weiterer Abfall zu verzeichnen und zum letzten Zeitpunkt ein erneuter Anstieg. Der Ausgangswert wird allerdings nicht wieder erreicht.

Glutaminsäure:

Bei der Glutaminsäure hatten transgene und nicht-transgene Blätter zum Erntebeginn ungefähr den gleichen Gehalt. Bei den nicht-transgenen Proben wurde der maximale Gehalt nach 31 Tagen erreicht, bei den transgenen Pflanzen war dies erst 16 Tage später der Fall. Bis kurz vor dem Abfallen der Blätter war bei beiden Proben wieder ein Absinken des Glutaminsäure-Gehaltes zu beobachten, was bei den transgenen Blättern stärker ausgeprägt war. Bezogen auf den maximalen Gehalt war ein Absinken um 66%

bei den nicht-transgenen Blättern, und um 44% bei den transgenen Pflanzen nachgewiesen worden.

Tabelle 3: Asparaginsäure, Anzahl der untersuchten positiven Proben zu den einzelnen Erntezeitpunkten

Erntezeitpunkte [Tage]	0	16	29	45	62
Anzahl n transgene Proben	2	6	6	4	5
Anzahl n nicht-transgene Proben	2	10	9	10	6

Tabelle 4: Glutaminsäure, Anzahl der untersuchten positiven Proben zu den einzelnen Erntezeitpunkten

Erntezeitpunkte [Tage]	0	16	29	45	62
Anzahl n transgene Proben	6	6	6	4	6
Anzahl n nicht-transgene Proben	11	12	12	12	11

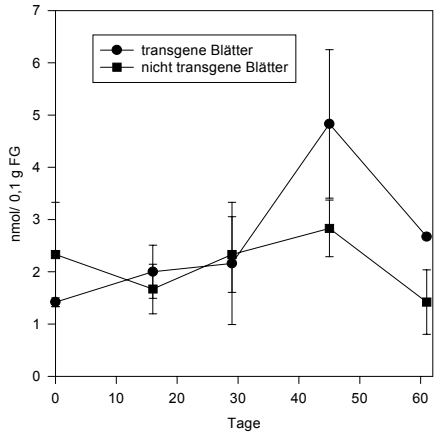


Abb.17: Asparagin in transgenen und nicht-transgenen Rapsblättern ab Blühbeginn bis zum Absterben über einen Zeitraum von 62 Tagen.

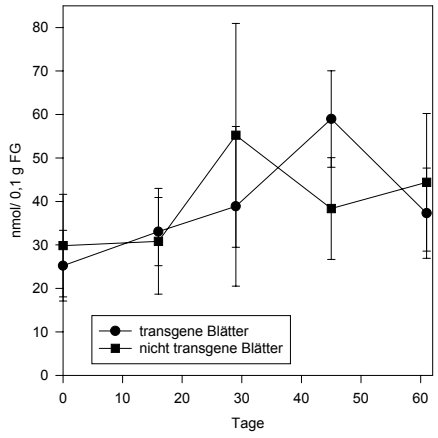


Abb.18: Glutamin in transgenen und nicht-transgenen Rapsblättern ab Blühbeginn bis zum Absterben über einen Zeitraum von 62 Tagen.

Asparagin:

Auch hier wurde eine um 39% höhere Menge an Asparaginsäure in den nicht-transgenen Proben vorgefunden. Bei den transgenen Pflanzen zeichnete sich eine starke Zunahme um bis zu 71% an frei vorliegendem Asparagin bis zu 52 Tagen nach Beginn der Blüte ab. Die nicht-transgenen Pflanzen zeigten hier nur einen Anstieg um 18%. Am letzten Erntezeitpunkt verzeichneten beide Proben einen starken Abfall an frei verfügbarem Asparaginsäure, fast bis hinunter auf den Anfangswert.

Glutamin:

Der Gehalt an Glutamin zu Beginn der Blüte war bei den transgenen Blättern geringfügig (15%) unter dem der nicht-transgenen Parallelproben. Die nicht-transgenen Pflanzen erreichten ihr Maximum an frei verfügbarem Glutamin bereits nach 31 Tagen; bei den transgenen Pflanzen wurde es erst nach 45 Tagen erreicht, wo bei den anderen Proben schon wieder eine Abnahme zu beobachten war.

Tabelle 5: Asparagin, Anzahl der untersuchten positiven Proben zu den einzelnen Erntezeitpunkten

Erntezeitpunkte [Tage]	0	16	29	45	62
Anzahl n transgene Proben	3	4	2	3	1
Anzahl n nicht-transgene Proben	6	7	6	6	3

Es ergaben sich rechnerisch bei Testung des Signifikanzniveaus auf dem Level von $p<0,05$ Unterschiede zwischen der transgenen und nicht-transgenen Proben zum vierten Erntezeitpunkt.

Tabelle 6: Glutamin, Anzahl der untersuchten positiven Proben zu den einzelnen Erntezeitpunkten

Erntezeitpunkte [Tage]	0	16	29	45	62
Anzahl n transgene Proben	6	6	6	4	6
Anzahl n nicht-transgene Proben	12	12	12	12	12

Es resultieren rechnerisch bei Testung des Signifikanzniveaus auf dem Level von $p<0,05$ Unterschiede zwischen der transgenen und nicht-transgenen Proben zum vierten Erntezeitpunkt.

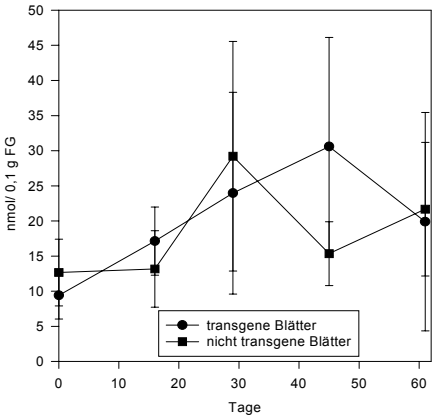


Abb.19: Serin in transgenen und nicht-transgenen Rapsblättern ab Blühbeginn bis zum Absterben über einen Zeitraum von 62 Tagen.

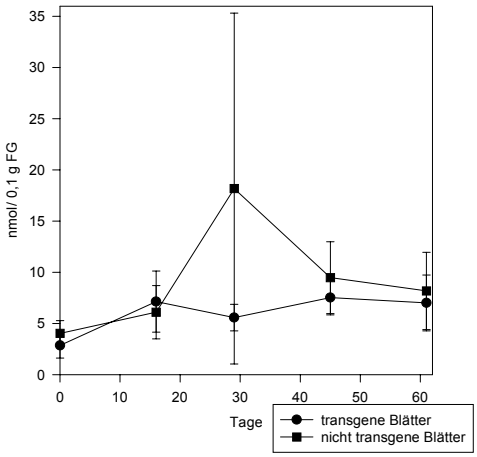


Abb. 20: Glycin in transgenen und nicht-transgenen Rapsblättern ab Blühbeginn bis zum Absterben über einen Zeitraum von 62 Tagen.

Serin:

Beim Serin war der Anfangsgehalt in den nicht-transgenen Proben wieder geringfügig höher. Bei den transgenen Proben wurde der maximale Gehalt an Serin nach 45 Tagen erreicht, das Maximum der nicht-transgenen Pflanzen war 16 Tage vorher. Für den letzten Erntezeitpunkt war bei den nicht-transgenen Blättern wieder ein Anstieg der Konzentration an Serin zu beobachten. Der Wert beider Proben war zum Schluss fast gleich.

Glycin:

Der Kurvenverlauf der transgenen Blätter zeigte hier im Gegensatz zu den nicht-transgenen einen nur geringfügig veränderten Trend während der Seneszenz. Auch hier war bei den transgenen Proben das Maximum nach 45 Tagen erreicht. Bezogen auf den Anfangswert, war ein Anstieg um 62% analysiert worden. Bei den nicht-transgenen Pflanzen lag dieser bei 78%. Hier lag das Maximum auch schon nach 29 Tagen vor.

Tabelle 7: Serin, Anzahl der untersuchten positiven Proben zu den einzelnen Erntezeitpunkten

Erntezeitpunkte [Tage]	0	16	29	45	62
Anzahl n transgene Proben	6	6	6	4	6
Anzahl n nicht-transgene Proben	12	12	12	12	12

Bei rechnerischer Auswertung der Testergebnisse auf Signifikanz auf dem Level von $p<0,05$ wurden Unterschiede zwischen der transgenen und nicht-transgenen Proben zum vierten Erntezeitpunkt erhalten.

Tabelle 8: Glycin, Anzahl der untersuchten positiven Proben zu den einzelnen Erntezeitpunkten

Erntezeitpunkte [Tage]	0	16	29	45	62
Anzahl n transgene Proben	6	6	6	4	6
Anzahl n nicht-transgene Proben	12	12	12	12	12

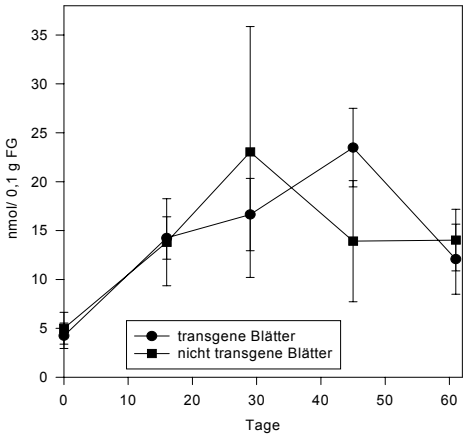


Abb.21: Alanin in transgenen und nicht-transgenen Rapsblättern ab Blühbeginn bis zum Absterben über einen Zeitraum von 62 Tagen.

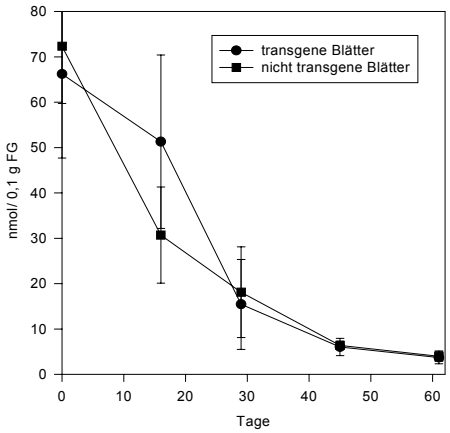


Abb.22: Prolin in transgenen und nicht-transgenen Rapsblättern ab Blühbeginn bis zum Absterben über einen Zeitraum von 62 Tagen.

Alanin:

Zu Beginn der Blüte und bis zu 16 Tagen danach zeigten transgene und nicht-transgene Pflanzen einen fast identischen Alanin-Gehalt. Auch hier wurde die maximale Konzentration bei den nicht-transgenen Proben nach 29 Tagen und bei den transgenen Proben 16 Tage später erhalten.

Prolin (Pro):

Für die Aminosäure Prolin wurde ein ganz anderer Kurvenverlauf als bei den bisher betrachteten Aminosäuren festgestellt. Zu Beginn der Blüte lag der höchste Gehalt an Prolin vor, der dann im Verlauf der Seneszenz immer mehr abfiel. Verglichen mit dem ersten Erntezeitpunkt war ein Rückgang der Prolin-Konzentration bei den transgenen Proben um 94% und bei den nicht-transgenen Proben um 95% festgestellt worden.

Tabelle 9: Alanin, Anzahl der untersuchten positiven Proben zu den einzelnen Erntezeitpunkten

Erntezeitpunkte [Tage]	0	16	29	45	62
Anzahl n transgene Proben	6	6	6	4	6
Anzahl n nicht-transgene Proben	12	12	12	12	12

Tabelle 10: Prolin, Anzahl der untersuchten positiven Proben zu den einzelnen Erntezeitpunkten

Erntezeitpunkte [Tage]	0	16	29	45	62
Anzahl n transgene Proben	6	6	6	4	6
Anzahl n nicht-transgene Proben	12	12	12	11	12

Transgene und nicht-transgene Proben unterschieden sich rechnerisch signifikant beim zweiten Erntezeitpunkt.

Bei Blühbeginn der Rapspflanzen war die am häufigsten vorkommende freie Aminosäure das Prolin, gefolgt von Glutamin und Glutaminsäure. Bei den nicht-transgenen Pflanzen war weiterhin noch ein relativ hoher Gehalt an Asparaginsäure nachweisbar. 16 Tage später war der Anteil an Asparaginsäure und Glutaminsäure in den Blättern am höchsten, Prolin war nun die dritthäufigste Aminosäure. 29 Tage nach dem Blühbeginn war bei den nicht-transgenen Pflanzen Glutaminsäure die Aminosäure mit der höchsten Konzentration, bei den transgenen Pflanzen wurde hier Asparaginsäure vorgefunden. Asparaginsäure war bei den nicht-transgenen Pflanzen die zweithäufigste freie Aminosäure, bei den transgenen Pflanzen war es das Glutamin. 16 Tage danach war sowohl bei den transgenen als auch bei den nicht-transgenen Blättern die Glutaminsäure die mit Abstand grösste Fraktion, gefolgt von Glutamin bei den transgenen und Asparaginsäure bei den nicht-transgenen Blättern. Der Prolinanteil war stark zurückgegangen. Auch 61 Tage nach dem Blütestart waren Glutamin- und Asparaginsäure, gefolgt von Glutamin, die Hauptbestandteile der beiden

Vergleichspflanzen. Glutamin hatte den grössten Gehalt in den transgenen Pflanzen;

bei den nicht-transgenen Proben waren Glutamin- und Asparaginsäure in ungefähr gleichem Verhältnis enthalten.

Aus den hier erhaltenen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass bei den transgenen Pflanzen für einige der hier betrachteten freien Aminosäuren (Serin, Alanin, Glutaminsäure, Glutamin, Asparaginsäure) das Maximum später erreicht wurde als bei den nicht-transgenen Pflanzen. Die Menge an frei im Blattmaterial zur Verfügung stehenden Aminosäuren zum Zeitpunkt der maximalen Menge ist bei den transgenen Pflanzen für Glutaminsäure, Asparagin, Glutamin, und Serin höher. Nur bei den Aminosäuren Asparaginsäure und Glycin zeigten die nicht-transgenen Pflanzen eine höhere maximale Konzentration als die transgenen Vergleichsproben. Hier ist allerdings einschränkend zu erwähnen, dass für Glycin bei den transgenen Blättern kein Maximum festgestellt werden konnte. Der höchste Gehalt an frei vorliegenden Aminosäuren zum gleichen Zeitpunkt konnte bei Asparaginsäure und Asparagin ermittelt werden. Ein Maximum von gleicher bzw. identischer Höhe wurde nur bei Alanin vorgefunden.

Einige der Aminosäuren zeigten bei den nicht-transgenen Proben ein um 16 Tage früheres Maximum und dann kurz vor dem Abfall der Blätter wieder einen Anstieg der Konzentration (Glutamin, Serin). Bei der Aminosäure Asparaginsäure wurde sowohl für die transgenen als auch für die nicht-transgenen Blätter die Höchstkonzentration nach 29 Tagen erhalten. Beide Proben zeigten zum letzten Erntezeitpunkt wieder ein Ansteigen des Gehaltes.

Des weiteren war die Konzentration bei den freien Aminosäuren Asparaginsäure, Asparagin, Glutamin, Serin, Glycin und Prolin im transgenen Blattmaterial zu Beginn der Blüte geringer als die der nicht-transgenen Pflanzen. Nur in zwei Fällen war der Gehalt der beiden miteinander verglichenen Proben gleich bzw. annähernd identisch (Glutaminsäure, Alanin).

Die Abnahme des Gesamtproteins korrelierte mit dem Ansteigen des Gehaltes an freien Aminosäuren im Blattmaterial, was den Abbau der Proteine in ihre kleinsten Bestandteile, die Aminosäuren widerspiegelt. Die einzige Ausnahme bildet das Prolin. Bis zu 45 Tagen nach der Ernte war bei allen hier betrachteten frei vorliegenden Aminosäuren ein Anstieg zu verzeichnen gewesen. Kurz vor dem Blattfall wurde z.T.

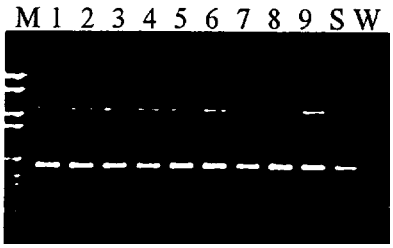
wieder ein starker Rückgang der frei vorliegenden Aminosäuren beobachtet, da zu diesem Zeitpunkt der Abbauprozess der Proteine schon als überwiegend abgeschlossen betrachtet werden kann. Ein Grossteil der löslichen Proteine ist schon in Aminosäuren zerlegt und in andere Pflanzenorgane transportiert worden (siehe Proteinbestimmung nach Bradford, Punkt 3.1.4).

3.2 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungsmethoden

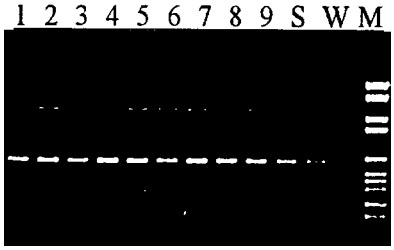
3.2.1 Gewächshausvorversuche mit transgenen Maispflanzen

Im Rahmen des Gesamtprojektes erfolgten zusätzliche Gewächshausuntersuchungen mit transgenen Maispflanzen in Zusammenarbeit mit J. Reske, Diplomarbeit.

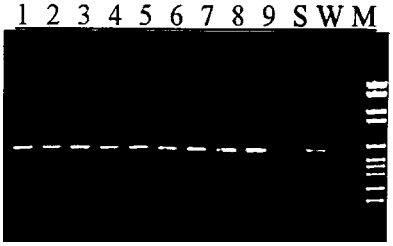
Für die Versuche wurde die Sorte *Zea mays* L. (B73XT25)sf in der fünften Inzuchtgeneration eingesetzt. Diese transgenen Pflanzen enthielten das *pat*-Gen, das auch den Rapspflanzen inseriert worden war. Die Maispflanzen wurden im Gewächshaus herangezogen. Anschließend kamen die Pflanzen in begehbare Klimakammern (Heraeus-Vötsch, Balingen) bei einer Tageslänge von 14 Stunden und einer Beleuchtungsstärke von etwa 150 µE $m^{-2}s^{-1}$, gemessen am Blatt in 1 m Höhe. Die relative Luftfeuchte betrug 70% bei einer Temperatur von 25°C tagsüber und von 18°C während der Dunkelphase. Der Luftdurchsatz betrug 60 m^3h^{-1}. Nach sechs Wochen wurden die Pflanzen in 5-Liter-Töpfe umgesetzt. Nach acht Wochen erfolgte die Behandlung der Pflanzen mit dem Herbizid BASTA® entsprechend der Gebrauchsanleitung des Herstellers. Die erste Probennahme erfolgte zwei Wochen vor Blühbeginn und ab diesem Zeitpunkt in 14tägigen Intervallen bis zum Absterben. Zu jedem Erntezeitpunkt wurden Proben von vier verschiedenen Maispflanzen entnommen und getrennt nach Stengeln, Kolben und Wurzeln aufgearbeitet. Die Blätter wurden einzeln behandelt, wobei das oberste Blatt (Blattprobe 1) jeweils das jüngste war. Bei all diesen Proben wurde genomische DNA und die RNA isoliert. Mittels PCR- und Northern-Blot-Analysen wurde das eingefügte Gen auf DNA-Ebene detektiert und seine Expression untersucht.



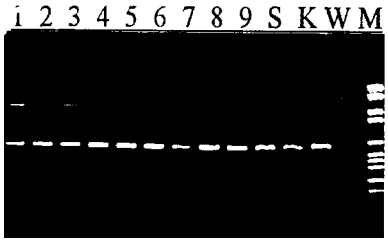
A1: 14 Tage vor der Blüte.



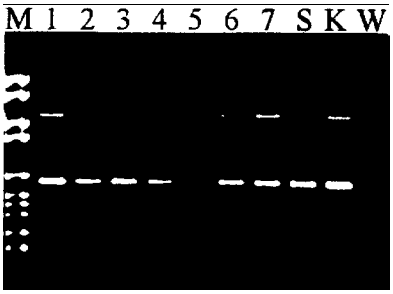
A2: Blüte.



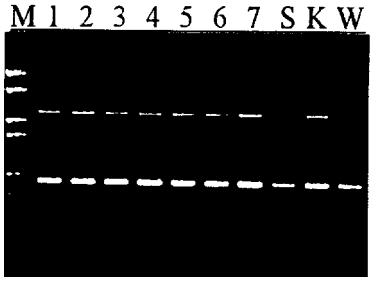
A3: 14 Tage nach der Blüte.



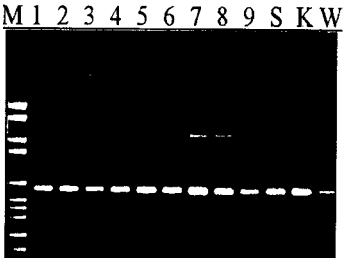
A4: 28 Tage nach der Blüte.



A5: 42 Tage nach der Blüte.



A6: 56 Tage nach der Blüte.



A7: 70 Tage nach der Blüte.

Abb. 23 (A1-A7): Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte, Auftragung der Proben nach Blättern (1-9) getrennt, zählweise von der Triebspitze zur Basis (jüngstes Blatt = 1) S = Stengel, K = Kolben, W = Wurzelprobe, M = Molekulargewichtsmarker VI (Roche Mannheim), 1. Probe: *pat*-DNA einschliesslich Promotor- und Terminatorsequenz 1348 bp, 2. Probe: kodierender Bereich des *pat*-DNA, 552 bp.

Generell konnte die *pat*-DNA über die gesamte Vegetationsperiode in allen Pflanzenteilen nachgewiesen werden. Der kodierende Bereich war besser detektierbar als die Gesamt-Sequenz, was wahrscheinlich an der Länge des Fragments lag.
Im folgenden werden die Northern-Blots der Maispflanzen dargestellt:

pat mRNA:

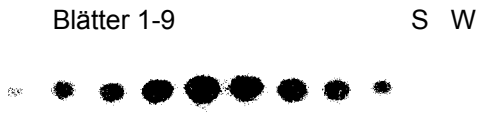


Abb. B1: 14 Tage vor der Blüte.

Abb. B2: Blüte.

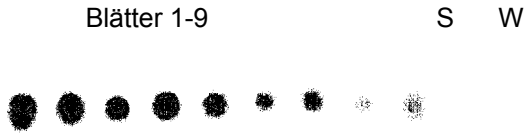


Abb. B3: 14 Tage nach der Blüte.

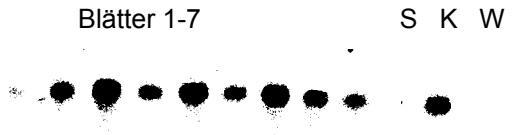


Abb. B4: 28 Tage nach der Blüte.

Abb. B5: 42 Tage nach der Blüte.

Blätter 1-7 S K W

Abb. B6: 56 Tage nach der Blüte.

Blätter 1-7 S K W

Abb. B7: 72 Tage nach der Blüte.

Abb. 24 (B1 - B7): Autoradiographien der Northern-Blot-Analysen, Auftragung der Proben, getrennt nach Maisblättern (1-9) getrennt, zählweise von der Triebspitze zur Basis (jüngstes Blatt = 1) S = Stengel, K = Kolben, W = Wurzelprobe ab 14 Tage vor der Blüte bis zu 72 Tagen nach der Blüte.

Anhand der Northern-Blot-Analysen lässt sich ableiten, dass das *pat*-Gen auf der Transkriptionsebene deutlich bis zu 28 Tage nach der Blüte detektierbar war. 42 Tage nach Blühbeginn wurde nur noch in einem der Blätter ein schwaches Signal erhalten. Auf der Transkriptionsebene war das *pat*-Gen, wie erwartet, über einen viel kürzeren Zeitpunkt nachweisbar als auf DNA-Ebene.
Die Versuche mit den Maispflanzen sollten im Freiland fortgeführt werden. Da die Maisfelder in zwei aufeinander folgenden Jahren (1995 und 1996) von unbekannten

Tätern zerstört wurden, behandelt diese Arbeit nur die Rapspflanzen im Freiland. Die Überreste der Maisfelder wurden kompostiert und auf das Vorhandensein des Fremdgens getestet.

3.2.2 Ergebnisse der PCR der Maiskompostproben

Die folgende Tabelle zeigt die Daten, zu denen der Kompost beprobt wurde, sowie die Anzahl und das Aussehen des Materials und das Ergebnis der PCR-Reaktion.

Tabelle 11: Maiskompostproben

Datum	**Tage**	**Proben-anzahl**	**Aussehen der Proben**	**Anzahl der positiven PCR-Reaktionen**
11.08.94	0	6	Blätter noch visuell grün	alle positiv
23.09.94	43	12	Pflanzen braun-grau, zerfallen, Blätter faulig grün, gelb oder braun, Kompost von Pilzen befallen	4
20.10.94	70	5	siehe Spalte vom 23.09.1994	2
15.02.95	ca. 6 Monate	4	keine Veränderung zum Oktober	Maiskolbenfragmente positiv
16.06.95	ca. 10 Monate	8	braune, zersetzte Pflanzenteile, teils Erde, Probennahme erfolgte mit Bohrstab	6
20.07.95	ca. 11 Monate	5	siehe 16.06.95	1
16.10.95	ca. 14 Monate	6	siehe 16.06.95	3
19.06.96	ca. 23 Monate	6	noch Pflanzenteile und Erde vorhanden, alles bereits stark von anderen Pflanzen überwuchert	1
26.06.96	ca. 23 Monate	3	siehe 19.06.96	2
02.10.96	ca. 27 Monate	4	kaum noch kompostiertes Maismaterial vorhanden	0

1 2 3 4 5 6 7 8 9

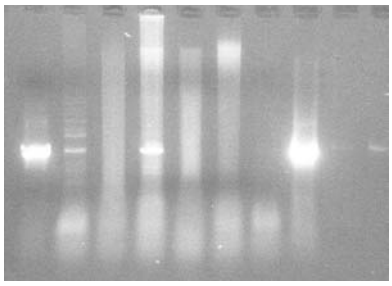


Abb. 25: PCR- Amplifikate der Beprobung vom 15.02.95:

Probe Nr.1 und 8: kodierender Bereich des *pat*-Gens, Positiv-Kontrollen

Probe Nr. 2: Amplifikat aus Kolbenmaterial

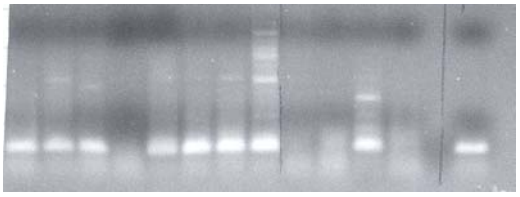
Probe Nr. 3: Amplifikat aus Maisbart

Probe Nr. 4: Amplifikat aus Maiskörnern

Probe Nr. 5 bis 7: Kompostmaterial

Probe Nr. 9: Negativ-Kontrolle

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26

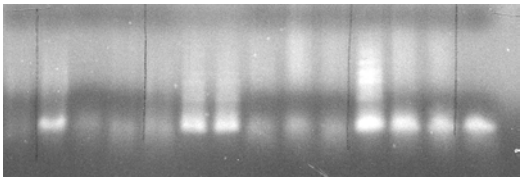


Abb. 26: PCR- Amplifikate des Kompostmaterials von verschiedenen Erntezeitpunkten:

Probe Nr. 1 bis 8: 16.6.95

Probe Nr. 9 bis 12 und 14: 20.07.95

Probe Nr. 13 und 26: Positives Amplifikat des kodierenden Bereichs des *pat*-Gens

Probe Nr. 15 bis 17 und 23 bis 25: 16.10.95

Probe Nr. 18 bis 22: Juni 96

Die Auswahl des Probenmaterials für die DNA-Extraktion wurde im allg. so gewählt, dass noch visuell sichtbare Pflanzenreste mit dabei waren.
Zu Beginn der Kompostierung der Maispflanzen (Mitte August) wurden Proben entnommen, die in der PCR-Reaktion alle das Vorhandensein der *pat*-DNA bestätigten. Zu diesem Zeitpunkt waren die Blätter noch grün. 43 Tage später waren die Pflanzen braun-grau und zerfallen, die Blätter waren faulig und noch grün oder gelb. Der Kompost war von Pilzen befallen. Bei Durchführung der PCR-Reaktion wurden von insgesamt zwölf Proben nur vier Proben ermittelt, die das Vorhandensein des kodierenden Bereichs der *pat*-Sequenz nachwiesen. 70 Tage später hatte sich der Zustand des Komposts nicht wesentlich verändert. Zu diesem Zeitpunkt wurden fünf Proben entnommen, von denen zwei die *pat*-DNA enthielten. Die nächste Beprobung des Komposts erfolgte im Februar, ca. sechs Monate nach der ersten Probennahme. Es hatte sich visuell keine Veränderung zu dem vorherigen Beprobungszeitpunkt ergeben. Die DNA aus den Maiskolbenfragmenten ergaben positive Signale. Zehn Monate nach der ersten Probennahme bestand der Kompost aus braunen, zersetzten Pflanzenteilen und Erde; die Entnahme von acht Proben erfolgte mittels Bohrstab. In sechs der acht Proben war der Nachweis der *pat*-DNA des kodierenden Bereichs positiv.
Da fast zwei Jahre nach dem Kompostieren transgenes Pflanzenmaterial vorlag, konnte auch das *pat*-Gen über diesen langen Zeitraum detektiert werden.

3.2.3 Quantitative PCR

Bei der PCR-Reaktion handelt es sich um eine initiierte Reaktion mit wenigen Ausgangsmolekülen. Die Produkte jedes Reaktionszyklus bilden die Substrate für den nächsten Zyklus. Damit steigt die Menge des PCR-Produkts exponentiell an. Unter idealen, theoretischen Bedingungen verdoppelt sich die Menge des Produkts mit jedem Zyklus. Aufgrund dieser Bedingungen wurde die Quantifizierung der PCR-Produkte durch eine Variationsfunktion berechnet, wobei nach dem Verfahren der kleinsten Abweichungsquadrate eine Exponentialkurve durch die Punkte in einem Koordinatensystem gelegt wurde.
Unter realen Bedingungen ist die Menge des Substrates, die während eines Zyklus vervielfältigt wird (Amplifikationseffizienz), der kritische Faktor der quantitativen PCR.

Die Amplifikationseffizienz wird durch die folgende Gleichung beschrieben (Siebert, 1993):

$$N = N_0 (1+E)^n$$

N = Anzahl der amplifizierten Moleküle
N_0 = Anzahl der initiierenden Moleküle
n = Anzahl der Amplifikationszyklen
E = Amplifikationseffizienz

Aufgrund des exponentiellen Reaktionsverhaltens kann eine geringe Veränderung von E grosse Unterschiede in der Produktausbeute mit sich bringen. E ist abhängig von der zu amplifizierenden Sequenz, der Primersequenz, der Sequenzlänge und Verunreinigungen in der Probe.
Die Menge an DNA, die zu Beginn der Reaktion vorliegt, nimmt zunächst, wie theoretisch beschrieben, exponentiell zu. Mit der Anzahl an Substratmolekülen flacht die Produktionsrate ab und erreicht schliesslich einen Grenzwert (Plateaueffekt). Bei der quantitativen PCR ist darauf zu achten, dass die Quantifizierung in dem Bereich durchgeführt wird, in dem noch exponentielles Verhalten vorhanden ist.

Mit dem Verlauf der Seneszenz werden die Nukleinsäuren einem Abbauprozess unterworfen. Dabei sollten transgene Nukleinsäuren aufgrund der Universalität des genetischen Codes ein analoges Abbauverhalten durch Nukleasen, wie natürliche Pflanzengene, zeigen. Während der Seneszenz wurde mittels quantitativer PCR auf das Vorhandensein des 35S-CaMV-*pat*-Gens (1356 bp) in Stengeln, Blättern, Wurzeln und Blüten bzw. Schoten getestet. Unter gleichen Bedingungen wurden zwei endogene Gene der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase Oxygenase (*rbcS)* und des Chlorophyll a/b-bindenden Proteins (*cab)* untersucht. Diese beiden Gene spielen eine wichtige Rolle bei der Photosynthese. Die Sequenz des *rbcS*-Gens hat in *Brassica napus* die Länge von 2006 Basen; das *cab*-Gen ist in einer Grösse von 2036 Basen vertreten. Bei der Amplifizierung des *rbcS*-Gens handelte es sich um ein 1183 bp grosses Fragment, bei der des *cab*-Gens um 1231 bp. Die zu amplifizierenden Längen

wurden in der Grössenordnung des *pat*-Gens, einschliesslich Terminator- und Promotorregion (1135 bp), gewählt. Um bei der Quantifizierung eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu erreichen, wurden jeweils transgene und nicht-transgene Pflanzenbestandteile parallel betrachtet.

Bei allen hier duchgeführten PCR-Reaktionen wurde die kodierende Region des *pat*-Gens parallel amplifiziert und derselben Quantifizierung unterworfen wie die anderen betrachteten Gene und in den graphischen Darstellungen mitberücksichtigt, aber nicht diskutiert. Da es sich bei der kodierenden Region des *pat*-Gens um ein nur 606 bp grosses Fragment handelt, ist unter diesen Umständen die Quantifizierung nicht mit gleicher Genauigkeit möglich und ein Vergleich mit den anderen Sequenzen schwierig. Die 606 bp grosse Sequenz wurde amplifiziert, um eine verbesserte Nachweisbarkeit des Fremdgens zu erreichen.

3.2.4 Ergebnisse der quantitativen PCR der Rapsblätter

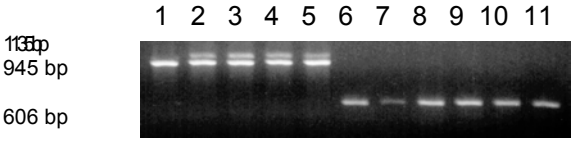


Abb. 27: Amplifikate der transgenen Blätter zum dritten Erntezeitpunkt, die ersten fünf Proben (Nr.1-5) zeigen das 35S-CaMV-*pat*-Gen sowie den internen Standard (945 bp), bei den sechs nachfolgenden Proben (Nr.6-11) handelt es sich um Amplifikate des *pat*-Gens mit einer Länge von 606 bp.

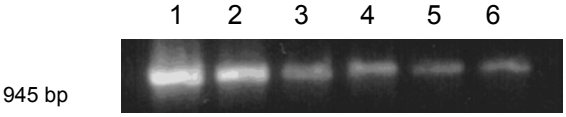


Abb. 28: Externer Standard zum dritten Erntezeitpunkt, 945 bp , Probe 1: 4,5 ng/µl DNA, Probe 2: 0,45 ng/µl DNA, Probe 3: 0,045 ng/µl DNA, Probe 4: 0,0225 ng/µl DNA, Probe 5: 0,009 ng/µl DNA, Probe 6: 0,0045 ng/µl DNA, mit diesem Standard wurde das 35S-CaMV-*pat*-Gen sowie das *pat*-Gen mit einer Länge von 606 bp quantifiziert.

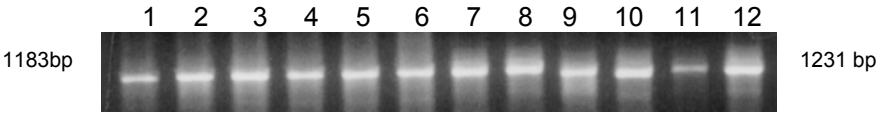


Abb. 29: Transgene Blatt-DNA Amplifikate (dritter Erntezeitpunkt), die Proben 1-6 zeigen das *rbcS*-Gen (1183 bp), die Proben 7-12 stellen das *cab*-Gen (1231 bp) dar.

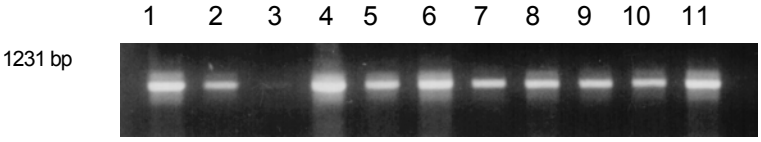


Abb. 30: Amplifikate (Proben 1-11) der nicht-transgenen Blatt-DNA des *cab*-Gens zum dritten Erntezeitpunkt. Probe 3 ergab eine deutlich geringere Menge an Amplifikat, Gründe hierfür: DNA liegt methyliert vor, DNA degradiert etc..

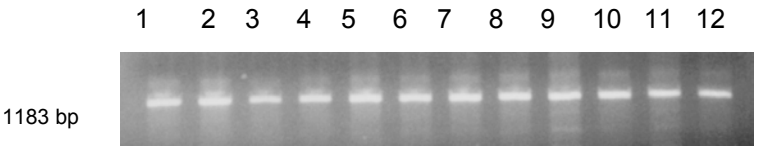


Abb. 31: Amplifikate (Proben 1-12) der nicht-transgenen Blatt-DNA des *rbcS*-Gens zum dritten Erntezeitpunkt.

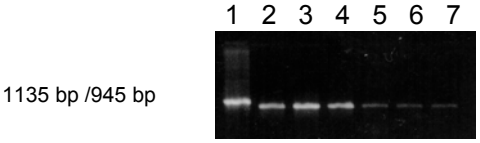


Abb. 32: Externer Standard mit 945 bp, mit dessen Hilfe die Quantifizierung des oben abgebildeten *cab*- und *rbcS*-Gens zum dritten Erntezeitpunkt durchgeführt wurde, bei der 1. Probe handelt es sich um die Positiv-Kontrollprobe, die darauffolgenden sechs Proben (Nr. 2-7) stellen den verkürzten DNA-Standard dar, der auch als interner Standard verwandt wurde (Konzentrationen: Probe 2: 4,5 ng/µl DNA, Probe 3: 0,45 ng/µl DNA, Probe 4: 0,045 ng/µl DNA, Probe 5: 0,0225 ng/µl DNA, Probe 6: 0,009 ng/µl DNA, Probe 7: 0,0045 ng/µl DNA, mit diesem Standard wurde das 35S-CaMV-*pat*-Gen sowie das *pat*-Gen mit einer Länge von 606 bp quantifiziert).

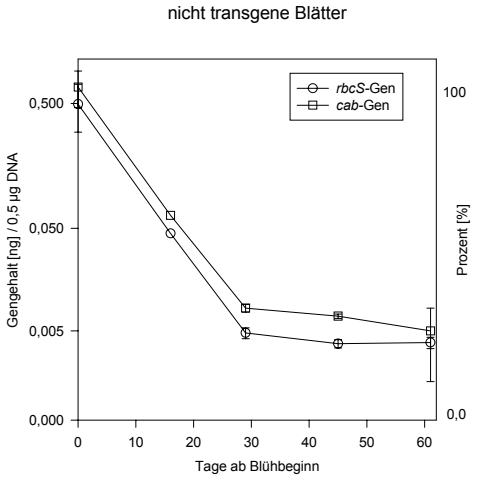


Abb. 33: Abnahme der DNA der Gene *rbcS* und *cab* bei nicht-transgenen *Brassica napus* L.-Blättern ab Blüte bis zum vollständigen Blattfall.

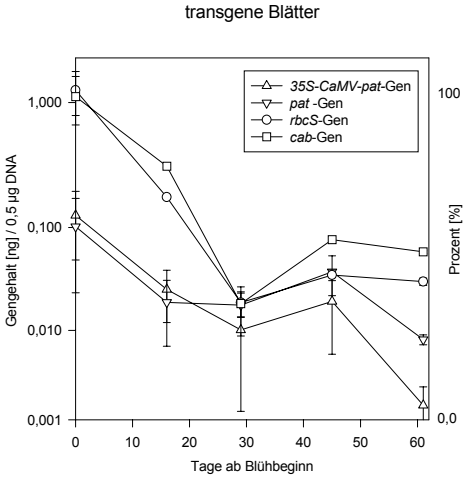


Abb. 34: Abnahme der DNA der Gene *rbcS* und *cab* in transgenen Blättern bei *Brassica napus* L. und des Fremdgens (35S-CaMV-*pat*-Gen) sowie dessen kodierende Region ab Blüte bis zum vollständigen Blattfall.

Zum ersten Erntezeitpunkt lag der Gehalt des *rbcS*-Gens in den transgenen Blättern um 11% höher als der des *cab*-Gens. Bei den nicht-transgenen Blättern war der Anteil des *cab*-Gens um 24% höher als der des *rbcS*-Gens. Die Menge des *rbcS*-Gens nahm in den nicht-transgenen Blättern am stärksten ab, und zwar auf 0,76%. Bei den parallel betrachteten transgenen Blättern sank das *rbcS*-Gen auf 3,8% ab. Das *cab*-Gen der transgenen Blätter reduzierte sich auf 5,45% und bei den nicht-transgenen Proben auf 0,77%. Das eingefügte Gen war mit einer ungefähr um 10% geringeren Menge im Vergleich zu dem *cab*- und *rbcS*-Gen enthalten. Von der Anfangskonzentration aus betrachtet, sank der Gehalt an vorhandenem transgenen Material auf 1,16%. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Abnahme der betrachteten Gene *cab* und *rbcS* bei den nicht-transgenen Blättern stärker als bei den transgenen Vergleichsproben war.

Die Daten für die Darstellungen ergeben sich aus je zwölf nicht-transgenen und sechs transgenen Pflanzen pro Erntezeitpunkt. Nicht alle DNA-Extrakte zeigten bei der Durchführung der PCR positive Amplifikate. In der folgenden Tabelle wird die Anzahl der

positiven Proben angegeben, aus denen sich die Daten für die Graphen zusammensetzen.

Der Anstieg aller betrachteten Gene (*cab,- rbcS,- pat,-* und 35S-CaMV-*pat*-Gen) ergaben zum 4. Erntezeitpunkt einen unplausiblem Wiederansteig, wobei ausser beim 35S-CaMV-*pat*-Gen diese Anstiege im Vergleich zu dem dritten Erntezeitpunkt signifikant waren. Dieser Wiederanstieg könnte z.B. mit der Witterung zusammenhängen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die seneszierende Pflanze durch ihren veränderten Metabolitengehalt weniger Störsubstanzen bildet, die die PCR-Reaktion negativ beeinflussen. Insgesamt resultierte eine Abnahme der hier untersuchten Gene (*cab,- rbcS,- pat,-* und 35S-CaMV-*pat*-Gen).

Tabelle 12: Anzahl der positiven Amplifikate pro Entezeitpunkt bei den Blättern

Erntezeit-punkte (Tage)	**nicht-transgene Blätter (*rbcS*-Gen)**	**nicht-transgene Blätter (*cab*-Gen)**	**transgene Blätter (*rbcS*-Gen)**	**transgene Blätter (*cab*-Gen)**	**transgene Blätter (35S-CaMV-*pat*-Gen)**
0	12	12	6	6	6
16	12	11	6	6	4
29	12	11	6	6	5
45	12	12	6	6	6
61	11	12	6	6	6

3.2.5 Ergebnisse der quantitativen PCR der Rapsstengel

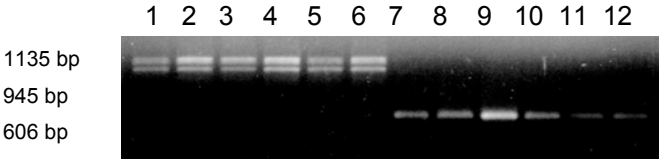


Abb. 35: Amplifikate der transgenen Rapsstengel-DNA zum ersten Erntezeitpunkt: die ersten sechs Proben (Nr.1-6) zeigen das 35S-CaMV-*pat*-Gen, die restlichen sechs Proben (Nr. 7-12) resultieren aus der kodierenden Region des *pat*-Gens.

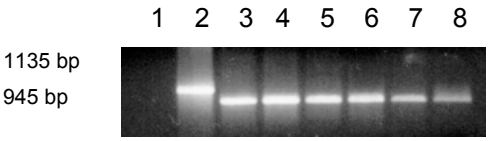


Abb. 36: Externer Standard (erster Erntezeitpunkt): Bei der 1. Probe (nicht sichtbar) handelt es sich um die Positiv-Kontrollprobe, die 2. Probe zeigt die nicht verkürzte *pat*-Sequenz, die 3. bis 8. Probe (945 bp), mit dessen Hilfe die Quantifizierung des oben abgebildeten 35S-CaMV-*pat*-Gens vom ersten Erntezeitpunkt durchgeführt wurde (Konzentrationen: Probe 3: 4,5 ng/µl DNA, Probe 4: 0,45 ng/µl DNA, Probe 5: 0,045 ng/µl DNA, Probe 6: 0,0225 ng/µl DNA, Probe 7: 0,009 ng/µl DNA, Probe 8: 0,0045 ng/µl DNA, mit diesem Standard wurde das 35S-CaMV-*pat*-Gen sowie das *pat*-Gen mit einer Länge von 606 bp quantifiziert).

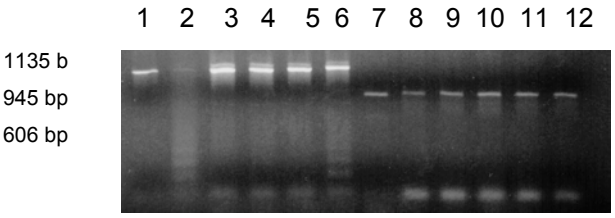


Abb. 37: Amplifikate der transgenen Stengel-DNA zum zweiten Erntezeitpunkt: Die erste Probe zeigt das 35S-CaMV-*pat*-Gen, für die zweite Probe (Probe Nr. 2) wurde kein positives Signal erhalten, bei den vier folgenden Proben handelt es sich wieder um das 35S-CaMV-*pat*-Gen, die restlichen sechs Proben (Nr. 7-12) resultieren aus der kodierenden Region des *pat*-Gens.

Nicht-transgene PCR-Amplifikate:

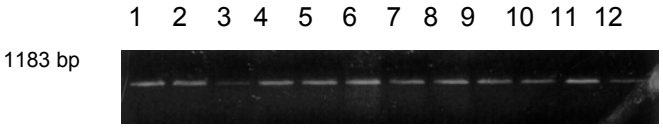


Abb. 38: Amplifikate (Probe Nr. 1-12) der nicht-transgenen Stengel-DNA des *rbcS*-Gens zum zweiten Erntezeitpunkt.

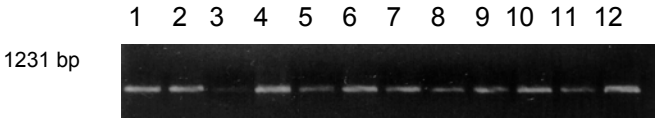


Abb. 39: Amplifikate (Probe Nr. 1-12) der nicht-transgenen Stengel-DNA des *cab*-Gens zum zweiten Erntezeitpunkt.

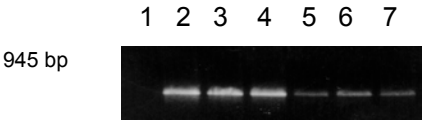


Abb. 40: Die erste Probe zeigt die Blindprobe, ab Probe 2 externer Standard mit 945 kb, mit dessen Hilfe die Quantifizierung des oben abgebildeten *rbcS*- und *cab*-Gens vom zweiten Erntezeitpunkt durchgeführt wurde (Konzentrationen: Probe 2: 4,5 ng/µl DNA, Probe 3: 0,45 ng/µl DNA, Probe 4: 0,045 ng/µl DNA, Probe 5: 0,0225 ng/µl DNA, Probe 6: 0,009 ng/µl DNA, Probe 7: 0,0045 ng/µl DNA, mit diesem Standard wurde das 35S-CaMV-*pat*-Gen sowie das *pat*-Gen mit einer Länge von 606 bp quantifiziert).

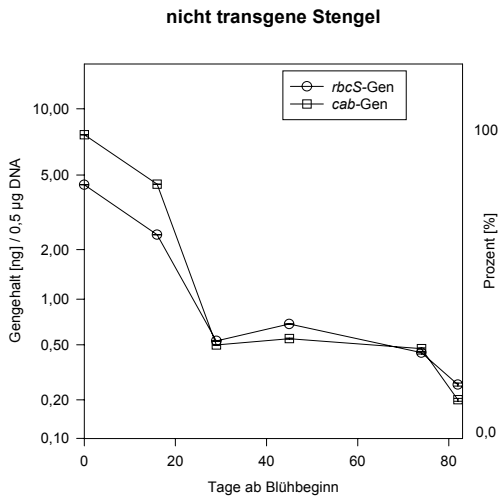


Abb. 41: Abnahme der DNA der Gene *rbcS* und *cab* bei nicht-transgenen *Brassica napus* L.-Stengeln ab Blüte bis zur Ernte.

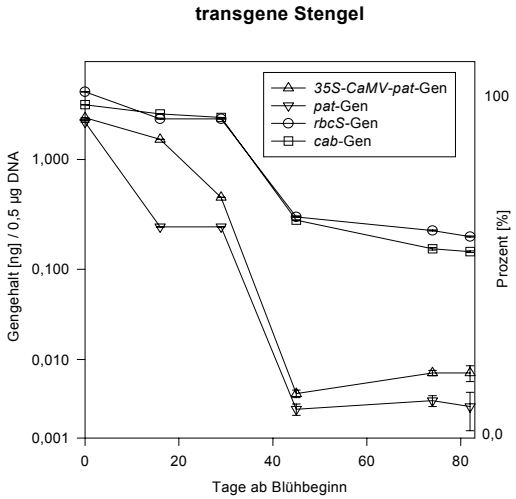


Abb. 42: Abnahme der DNA der Gene *rbcS* und *cab* in transgenen Stengeln bei *Brassica napus* L. und des Fremdgens (35S-CaMV-*pat*-Gen) sowie dessen kodierende Region ab Blüte bis zur Ernte.

Die Werte, die bei der Betrachtung der Stengel ermittelt worden sind, lagen über denen der anderen Pflanzenbestandteile. Da die Stengel-DNA aufgrund ihres hohen Gehaltes an Polysacchariden mit dem Genome-Clean Kit (Firma AGS, Heidelberg) isoliert wurde, konnte wahrscheinlich DNA gewonnen werden, die sich besser amplifizieren liess.
Analog zu den Blättern zeigten auch die nicht-transgenen Stengel einen zu Beginn um 42% höheren Gehalt des *cab*-Gens, im Vergleich zum *rbcS*-Gen. Bei den transgenen Pflanzen lag das Gegenteil vor, der Anteil des *rbcS*-Gens war um 19% über dem des *cab*-Gens. Im Verlauf der Seneszenz wurde bei den nicht-transgenen Stengeln für das *rbcS*-Gen eine Abnahme auf 5,8% und für das *cab*-Gen auf 2,6% vorgefunden. Die transgenen Vergleichsproben zeigten für das *cab*-Gen eine Reduzierung auf 5,8% und bei dem *rbcS*-Gen auf 6,6%. Das transgene Gen war in fast der gleichen Menge vorhanden wie die beiden mitbetrachteten Photosynthesegene. Allerdings zeigte sich ein stärkerer Rückgang als bei den endogenen Genen, und zwar auf 0,3%, bezogen auf die Anfangsmenge.

Nicht alle Proben ergaben bei der Durchführung der PCR-Reaktion Amplifikate. Die Daten für die Darstellung resultieren nur aus Proben, die positive Signale zeigten. In der folgenden Tabelle werden die Anzahl der positiven Amplifikate zu den verschiedenen Erntezeitpunkten angegeben.

Tabelle 13: Anzahl der positiven Amplifikate zu den verschiedenen Erntezeitpunkten bei den Stengeln

Erntezeit-punkte (Tage)	**nicht-transgene Stengel (*rbcS*-Gen)**	**nicht-transgene Stengel (*cab*-Gen)**	**transgene Stengel (*rbcS*-Gen)**	**transgene Stengel (*cab*-Gen)**	**transgene Stengel (35S-CaMV-*pat*-Gen)**
0	11	11	4	6	6
16	12	11	5	6	4
29	12	12	6	6	5
61	12	12	6	6	6
72	12	12	6	6	6
81	8	8	6	6	6

3.2.6 Ergebnisse der quantitativen PCR der Rapsblüten bzw. Schoten/Samen

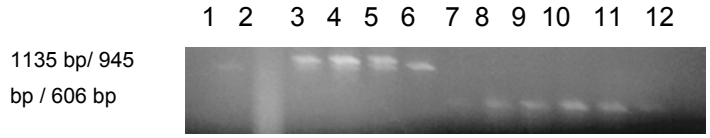


Abb. 43: Amplifikate der transgenen Schoten/Samen-DNA zum fünften Erntezeitpunkt: Die ersten sechs Proben (Nr.1-6) zeigen das 35S-CaMV-*pat*-Gen, die restlichen sechs Proben (Nr. 7-12) resultieren aus der kodierenden Region des *pat*-Gens.

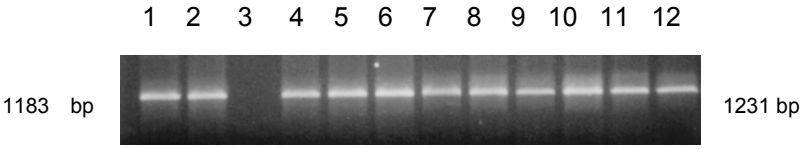


Abb. 44: Transgene Blüten- und Schoten-DNA Amplifikate: Die Proben 1-6 zeigen das *rbcS*-Gen (1183 bp), die Proben 7-12 stellen das *cab*-Gen (1231 bp) zum dritten Erntezeitpunkt dar.

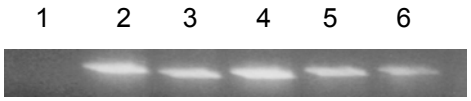


Abb. 45: Externer Standard 945 kb, mit dessen Hilfe die Quantifizierung der oben abgebildeten transgenen Proben des fünften Erntezeitpunktes durchgeführt wurde, die erste Probe zeigt die Blindprobe (Probe 2: 4,5 ng/µl DNA, Probe 3: 0,45 ng/µl DNA, Probe 4: 0,045 ng/µl DNA, Probe 5: 0,0225 ng/µl DNA, Probe 6: 0,009 ng/µl DNA, mit diesem Standard wurde das 35S-CaMV-*pat*-Gen sowie das *pat*-Gen mit einer Länge von 606 bp quantifiziert).

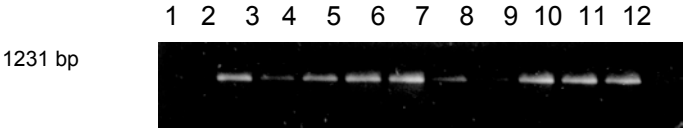


Abb. 46: Amplifikate (Proben Nr. 1-12) der nicht-transgenen Schoten/Samen-DNA des *cab*-Gens zum fünften Erntezeitpunkt.

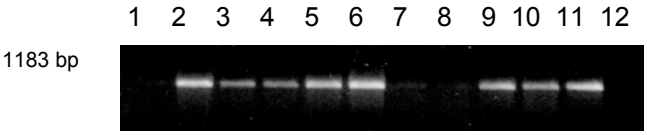


Abb. 47: Amplifikate (Proben Nr. 1-12) der nicht-transgenen Schoten/Samen-DNA des *rbcS*-Gens zum fünften Erntezeitpunkt.

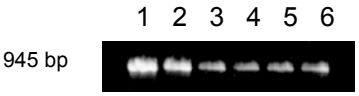


Abb. 48: Externer Standard 945 bp, mit dessen Hilfe die Quantifizierung des oben abgebildeten *rbcS*- und *cab*-Gens beim fünften Erntezeitpunkt durchgeführt wurde (Konzentrationen: Probe 1: 4,5 ng/µl DNA, Probe 2: 0,45 ng/µl DNA, Probe 3: 0,045 ng/µl DNA, Probe 4: 0,0225 ng/µl DNA, Probe 5: 0,009 ng/µl DNA, Probe 6: 0,0045 ng/µl DNA, mit diesem Standard wurde das 35S-CaMV-*pat*-Gen sowie das *pat*-Gen mit einer Länge von 606 bp quantifiziert).

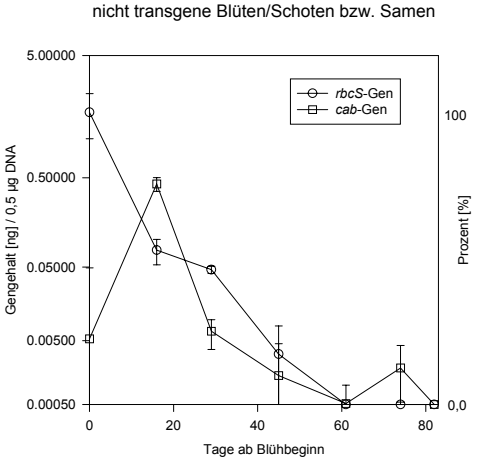


Abb. 49: Abnahme der DNA der Gene *rbcS* und *cab* bei nicht-transgenen *Brassica napus* L.-Blüten und Schoten/Samen ab Blüte bis zur Ernte.

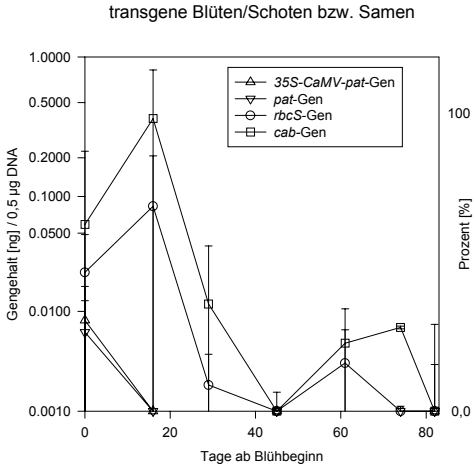


Abb. 50: Abnahme der DNA der Gene *rbcS* und *cab* in transgenen Blüten und Schoten/Samen bei *Brassica napus* L. und des Fremdgens (35S-CaMV-*pat*-Gen) sowie dessen kodierende Region ab Blüte bis zur Ernte.

Zum ersten Erntedatum setzte sich das Probenmaterial nur aus Blüten zusammen. Bis zur dritten Ernte wurden sowohl Blüten als auch Schoten vorgefunden. Ab dem 4. Erntezeitpunkt war die Blüte abgeschlossen. Das Probenmaterial bestand nur noch aus

Schoten. Der Gehalt des *rbcS*-Gens in den nicht-transgenen Blüten war zu Beginn der Blüte ausserordentlich hoch und erreichte, im Gegensatz zu den Vergleichsproben und Vergleichsgenen, sein Maximum nicht zum zweiten Erntedatum. Ab diesem Zeitpunkt war der Kurvenverlauf des *rbcS*-Gens analog zu den anderen Kurven und zeigte eine Gesamtabnahme auf $6x10^{-3}$%. Bei dem *cab*-Gen der nicht-transgenen Blüten wurde eine Absenkung auf 0,02% detektiert, bei den transgenen Proben auf 0,2%. Das Gen der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5 Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase der transgenen Proben nahm auf $2,8x10^{-3}$% ab. Bei diesen Angaben wurde jeweils immer der maximale Gehalt als Berechnungsgrundlage gewählt. Das *pat*-Gen zeigte bei Blütestart den höchsten Gehalt an genetischem Material. Ab dem zweiten Erntezeitpunkt bis zum Unterpflügen der Pflanzen wurde eine fast gleichbleibende Menge des transgenen Gens vorgefunden, der in der gleichen Grössenordnung lag, wie die der Vergleichsgene.

Bei Durchführung der PCR-Reaktion wurden nicht von allen DNA-Proben der Blüten bzw. Schoten Amplifikate erhalten. Die Daten zu den obigen graphischen Abbildungen setzen sich nur aus den positiven Reaktionen zusammen. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Anzahl der positiven Amplifikate zu den einzelnen Erntezeitpunkten.

Tabelle 14: Anzahl der positiven Amplifikate zu den einzelnen Erntezeitpunkten der Blüten bzw. Schoten

Erntezeit-punkt (Tage)	**nicht-transgene Blüten/Schoten/ Samen (*rbcS*-Gen)**	**nicht-transgene Blüten/Schoten/ Samen (*cab*-Gen)**	**transgene Blüten/ Schoten/Samen (*rbcS*-Gen)**	**transgene Blüten/ Schoten/Samen (*cab*-Gen)**	**transgene Blüten/ Schoten/Samen (35S-CaMV-*pat*-Gen)**
0	9	9	6	6	6
12	12	12	6	6	2
29	10	10	5	6	0
45	12	12	5	5	2
60	8	8	3	3	4
72	11	11	2	2	0
81	1	1	3	3	1

3.2.7 Ergebnisse der quantitativen PCR der Rapswurzeln

Transgene Wurzeln:

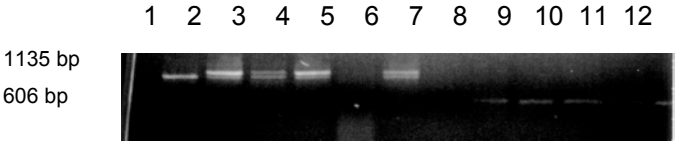


Abb. 51: Amplifikate der transgenen Wurzel-DNA zum zweiten Erntezeitpunkt: Die ersten vier Proben, sowie die sechste Probe zeigen das 35S-CaMV-*pat*-Gen. Die fünfte Probe ergab kein positives Signal, die restlichen positiven Proben resultieren aus der kodierenden Region des *pat*-Gens, auch hier waren zwei der Amplifikate negativ.

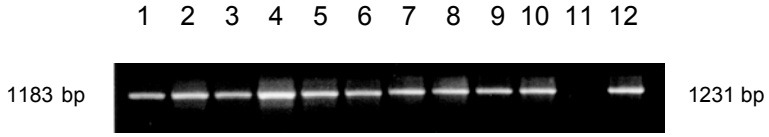


Abb. 52: Die ersten sechs Proben (Nr. 1-6) zeigen positive Amplifikate des *rbcS*-Gens in den transgenen Wurzeln zum zweiten Erntezeitpunkt, die restlichen Proben (Nr. 7-12) resultieren aus Amplifikaten des *cab*-Gens zum gleichen Erntezeitpunkt, wobei die vorletzte Probe (Nr. 11) kein positives Signal bei der PCR ergab.

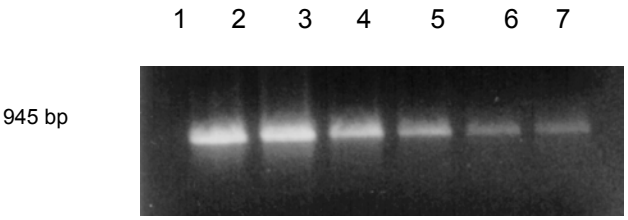


Abb. 53: Externer Standard 945 kb, mit dessen Hilfe die Quantifizierung der oben abgebildeten transgenen Proben zum zweiten Erntezeitpunkt durchgeführt wurde: Die erste Probe zeigt die Blindprobe (Konzentrationen: Probe 2: 4,5 ng/µl DNA, Probe 3: 0,45 ng/µl DNA, Probe 4: 0,045 ng/µl DNA, Probe 5: 0,0225 ng/µl DNA, Probe 6: 0,009 ng/µl DNA, Probe 7: 0,0045 ng/µl DNA, mit diesem Standard wurde das 35S- CaMV-*pat*-Gen sowie das *pat*-Gen mit einer Länge von 606 bp quantifiziert).

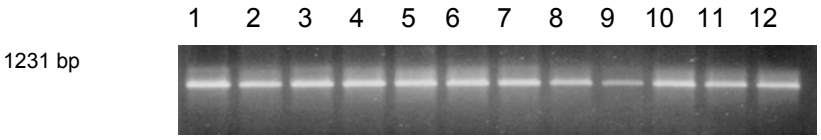


Abb. 54: Amplifikate (Proben Nr. 1-12) der nicht-transgenen Wurzel-DNA des *cab*-Gens zum zweiten Erntezeitpunkt.

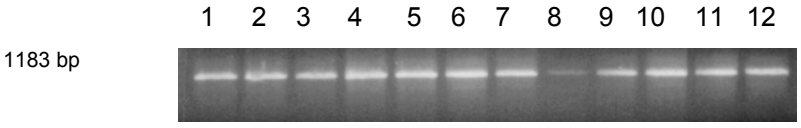


Abb. 55: Amplifikate (Proben Nr. 1-12) der nicht-transgenen Wurzel-DNA des *rbcS*-Gens zum zweiten Erntezeitpunkt.

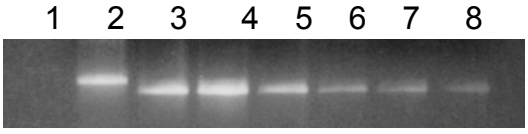


Abb. 56: Externer Standard mit 945 bp, mit dessen Hilfe die Quantifizierung des oben abgebildeten *cab*- und *rbcS*-Gens zum zweiten Erntezeitpunkt durchgeführt wurde: Bei der ersten Probe handelt es sich um die Negativ-Kontrolle, bei der zweiten um die positive Kontrollprobe, die darauffolgenden sechs Proben (Nr. 3-8) stellen den verkürzten DNA-Standard dar, der auch als interner Standard verwandt wurde (Konzentrationen: Probe 3: 4,5 ng/µl DNA, Probe 4: 0,45 ng/µl DNA, Probe 5: 0,045 ng/µl DNA, Probe 6: 0,0225 ng/µl DNA, Probe 7: 0,009 ng/µl DNA, Probe 8: 0,0045 ng/µl DNA, mit diesem Standard wurde das 35S-CaMV-*pat*-Gen sowie das *pat*-Gen mit einer Länge von 606 bp quantifiziert).

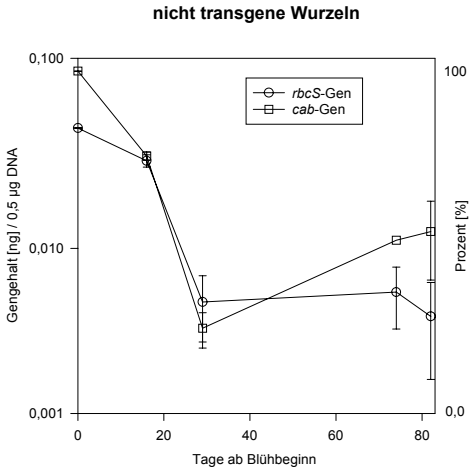


Abb. 57: Abnahme der DNA der Gene *rbcS* und *cab* bei nicht-transgenen *Brassica napus* L.-Wurzeln ab Blüte bis zur Ernte.

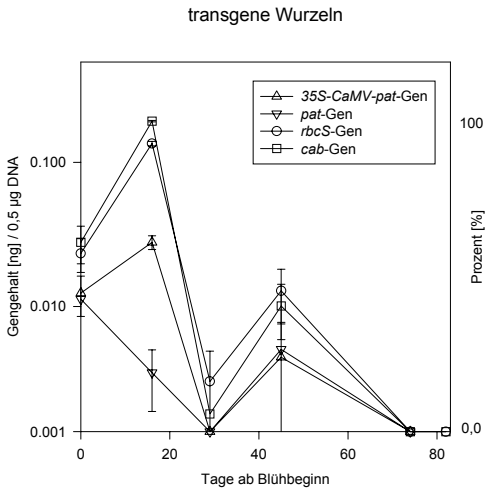


Abb. 58: Abnahme der DNA der Gene *rbcS* und *cab* in transgenen Wurzeln bei *Brassica napus* L. und des Fremdgens (35S-CaMV-*pat*-Gen) sowie dessen kodierende Region ab Blüte bis zur Ernte.

Bei den transgenen Wurzeln wurde ein ähnlicher Kurvenverlauf wie bei den Blüten analysiert, auch dort lag das Maximum der hier betrachteten Gene zum zweiten Erntezeitpunkt vor. Das *pat*-Gen verhielt sich hier analog, es ist im Vergleich zu den endogenen Kontrollgenen aber in einer sehr viel geringeren Menge vorgefunden worden und ab der vierten Ernte überhaupt nicht mehr nachweisbar. Ab diesem Zeitpunkt war auch die kodierende Region des Fremdgens nicht mehr detektierbar. Bei den transgenen Wurzeln wurden das *cab*-Gen und das Gen der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5 Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase in vergleichbarer Grössenordnung vorgefunden, das Maximum zum zweiten Erntezeitpunkt war allerdings für das *cab*-Gen um 29% höher als beim *rbcS*-Gen. Für die nicht-transgenen Proben wurde bei den Wurzeln ein um 48% höherer maximaler Gehalt des *cab*-Gens im Gegensatz zum *rbcS*-Gen erhalten. Gemessen an der maximalen Konzentration ergab sich bei den transgenen Wurzeln für das *rbcS*-Gen eine Abnahme auf 4% und für das *cab*-Gen auf 14%. Die nicht-transgenen Vergleichsproben zeigten beim *cab*-Gen ebenfalls einen Rückgang auf 14% und bei dem *rbcS*-Gen auf 9%. Insgesamt liess sich für die

endogenen Gene in den Wurzeln keine so drastische Zersetzung von genetischem Material feststellen wie bei den anderen Pflanzenorganen. Allerdings waren bei den letzten beiden Erntezeitpunkten in den transgenen Wurzeln die endogenen Kontrollgene nicht mehr detektierbar.

Bei der PCR der Wurzel-DNA wurden zum Teil nur bei wenigen Proben Amplifikate erhalten, aus denen sich die Werte für die obigen Diagramme zusammensetzen. Die folgende Tabelle gibt die Anzahl der positiven Amplifiakte zu den verschiedenen Erntezeitpunkten wieder.

Tabelle 15: Anzahl positiver Amplifikate zu den verschiedenen Erntezeitpunkten bei den Wurzeln

Erntezeit-punkte (Tage)	**nicht-transgene Wurzeln (*rbcS*-Gen)**	**nicht-transgene Wurzeln (*cab*-Gen)**	**transgene Wurzeln (*rbcS*-Gen)**	**transgene Wurzeln (*cab*-Gen)**	**transgene Wurzeln (35S-CaMV-*pat*-Gen)**
0	4	3	4	4	2
16	12	12	6	5	4
29	12	12	2	1	0
45	8	8	6	6	5
72	2	1	1	1	0
81	5	5	0	0	0

In allen Pflanzenteilen konnte das künstlich eingefügte Gen gleichzeitig mit den endogenen Kontrollgenen über die gesamte Vegetationsperiode nachgewiesen werden. Die einzige Ausnahme bildeten die Wurzeln, bei denen das *pat*-Gen zu den letzten beiden Ernten nicht mehr detektiert werden konnte. In den Blüten bzw. Schoten wurde die geringste Menge an genetischem Material vorgefunden, in den Stengeln der höchste Wert. Da die DNA der Stengel aber mittels einer anderen Methode isoliert wurde, ist hier eine direkte Vergleichbarkeit mit den anderen Pflanzenteilen nicht möglich.

Das *pat*-Gen war in allen Pflanzenteilen in geringerer Menge vorhanden als die mituntersuchten Photosynthesegene.

3.2.8 Ergebnisse der PCR aus Honig und Propolis

Um Informationen über den Verbleib des *pat*-Gens im Honig zu erhalten, wurde im

Rahmen dieser Arbeit auf die Nachweisbarkeit des fremden Gens mittels PCR-Reaktion getestet. Zum Vergleich wurde ein Rapshonig, der garantiert *pat*-Gen-frei ist, mituntersucht. Von den zwei weiteren Honigsorten stammte einer direkt von dem Versuchsfeld, der andere von einem Bienenvolk, das sich 1 km entfernt von dem Feld befand. Das Propolis stammte von dem Bienenvolk direkt vom Versuchsfeld. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen konnte das *pat*-Gen weder im Honig noch in Propolis nachgewiesen werden. Auch der Nachweis des kodierenden Bereichs ergab keine Amplifikate.

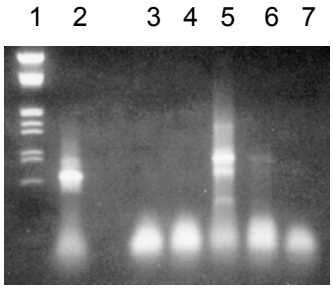


Abb. 59: 1. Probe: Molekulargewichtsmarker III von Roche/Mannheim; 2. Probe: pUC18-Plasmid mit 35S-CaMV-*pat*-Gen (Positiv-Kontrolle); 3. und 4. Probe: Pollen-Amplifikate ohne positives Resultat, 5. und 6. Probe: Pollen mit Plasmidzugabe zeigten positive PCR-Amplifikate, 7. Probe: Negativ-Kontrolle.

Abb. 60: Bienenvolk auf dem Versuchsfeld in Roggenstein.

3.2.9 Ergebnisse der quantitativen PCR im Boden

Nach dem Unterpflügen des strohigen Raps-Pflanzenmaterials am Ende der Vegetationsperiode wurden aus den transgenen Parzellen Bodenproben entnommen. Die daraus isolierte DNA wurde in die quantitative PCR eingesetzt. Im folgenden Diagramm sind die Ergebnisse, die bei der Untersuchung der Rapsstengel erhalten wurden, bis zum siebten Erntezeitpunkt mit enthalten.

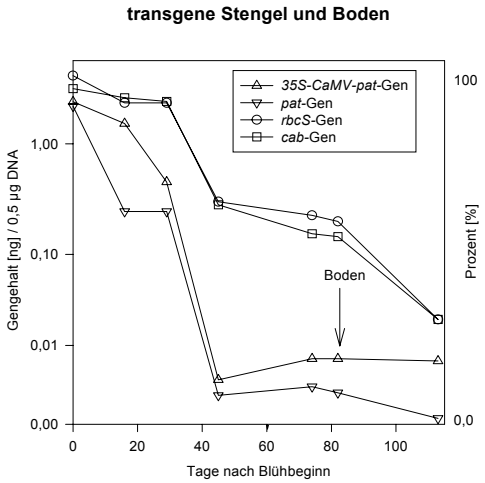


Abb. 61: Ab Blühbeginn bis zu 80 Tagen danach wurde die DNA-Menge der Gene *rbcS* und *cab* und des künstlich eingefügten *pat*-Gens dargestellt (kodierende Sequenz sowie Region einschliesslich der Terminator-und Promotorregion). Nach 80 Tagen wurde der Boden auf den Verbleib der drei verschiedenen Gene examiniert.

Nach dem Unterpflügen des Pflanzenstrohs waren auf den Feldern, auf denen die transgenen Pflanzen wuchsen, noch 31 Tage später die Photosynthesegene und das *pat*-Gen nachweisbar. Es wurden für alle Gene je drei positive Amplifikate erhalten. Für die endogenen Gene wurden weiterhin noch andere Primer benutzt, die einen kleineren Sequenzbereich in der Grössenordnung des kodierenden Bereichs des *pat*-Gens eingrenzten, wodurch aber keine verlängerte Nachweisbarkeit erzielt wurde.

3.2.10 Sequenzierung der PCR-Produkte

Zur Bestätigung der korrekten Amplifikation der zur Quantifizierung herangezogenen Sequenzen wurde die Abfolge der Nukleinsäurenzusammensetzung der PCR-Produkte überprüft. Für jedes der hier betrachteten Gene wurde je eine Stichprobe aus den Blätteramplifikaten entnommen und der „Upstream"- und „Downstream"-Bereich im Sequenz-Anfangsbereich untersucht.
Es wurden für die hier betrachteten Gene die korrekten Sequenzen erhalten.

3.2.11 Northern- und Slot-Blot-Analysen

Um Informationen über die Induktion von Genen auf Transkriptionsebene zu erhalten, wurde die auf Membranen fixierte Gesamt-RNA mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert.

pat-Sonde

Die Hybridisierung mit der *pat*-Sonde erfolgte nach der Slot-Blot-Technik. Bei der Durchführung wurde von allen transgenen Blattproben (pro Erntezeitpunkt von sechs verschiedenen Proben) die RNA isoliert. Die RNA der nicht-transgenen Blätter (12 pro Erntezeitpunkt) wurde analog isoliert.

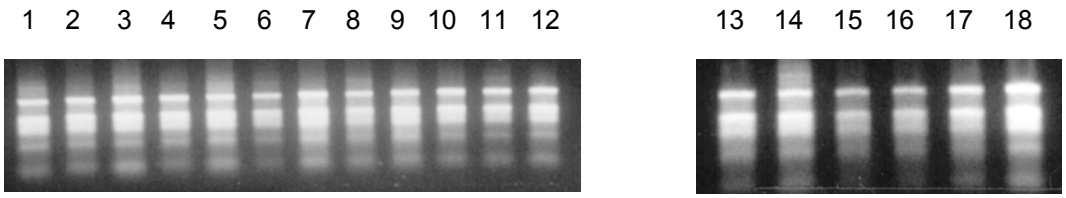


Abb. 62: Gesamt-RNA (Agarose-Gel): Bei den RNA-Proben Nr. 1-12 handelt es sich um die nicht-transgenen Blattproben eines Erntezeitpunktes. Die andere Abbildung mit den RNA-Proben (Nr. 13-18) zeigt die transgenen Proben. Es handelt sich hier um RNA-Extrakte der letzten Blattprobennahme. Zwei Wochen später waren alle Blätter abgefallen. Bei den früheren Erntezeitpunkten war die RNA nach dem gleichen Verfahren extrahiert worden.

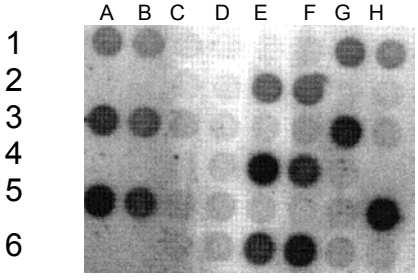


Abb. 63a: Slot-Blot mit transgener und nicht-transgener Raps-RNA aus Blättern vom ersten bis zum dritten Erntezeitpunkt, wobei der codierende Bereich des *pat*-Gens als Sonde verwendet wurde. Charakterisierung der einzelnen Spots:

1A, 1B, 1G, 1H, 2E, 2F: transgene Proben, erster Erntezeitpunkt

1C, 1D, 1E, 1F, 2A, 2B, 2C, 2D, 2G, 2H: nicht-transgene Proben

3A, 3B, 3G, 3H, 4E, 4F: transgene Proben, zweiter Erntezeitpunkt

3C, 3D, 3E, 3F, 4A, 4B, 4C, 4D, 4G, 4H: nicht-transgene Proben

5A, 5B, 5G, 5H, 6E, 6F: transgene Proben, dritter Erntezeitpunkt

5C, 5D, 5E, 5F, 6A, 6B, 6C, 6D, 6G, 6H: nicht-transgene Proben

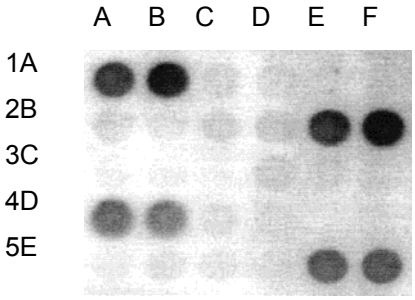


Abb. 63b: Slot-Blot Slot-Blot mit transgener und nicht-transgener Raps-RNA aus Blättern vom vierten bis zum fünften Erntezeitpunkt, wobei der codierende Bereich des *pat*-Gens als Sonde verwendet wurde. Charakterisierung der einzelnen Spots:

1AA, 1AB, 2BE, 2BF: transgene Proben, vierter Erntezeitpunkt

1AC bis 2BD: nicht-transgene Proben

4DA, 4DB, 5EE, 5EF: transgene Proben, fünfter Erntezeitpunkt

3CA bis 5BD: nicht-transgene Proben

Auf die Membranen wurden sowohl transgene als auch nicht-transgene RNA-Extrakte transferiert. Die Signale resultieren von dem *pat*-Transkript, die nicht-transgene RNA fungierte als Kontrolle. Mittels Phosphorimager (Raytest, Straubenhardt) erfolgte die Auswertung, wobei die Schwärzung sich parallel zur Radioaktivität verhält. Die Markierung mit der *pat*-Sonde ergab die nachfolgenden Resultate:

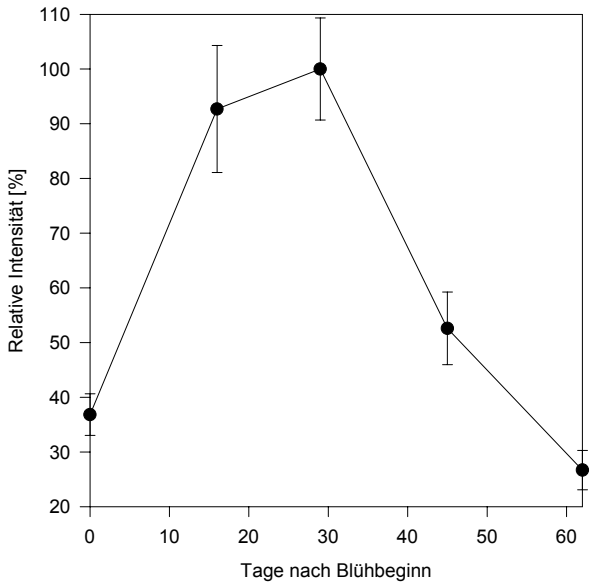


Abb. 64: Slot-Blot-Ergebnisse von *pat*-Transkripten aus transgenen Blättern in *Brassica napus* L. vom Blühbeginn bis zum Blattfall.
Dargestellt sind die Mittelwerte S.E. ± n= 6, die Berechnung berücksichtigt nur Proben mit einem positiven Signal.

Die höchste Menge an *pat*-Transkript wurde am dritten Erntezeitpunkt detektiert. Zu Beginn der Blühperiode war die Menge an vorhandenem Transkript um 37% niedriger. Im Vergleich zum maximalen Wert, der zum dritten Erntezeitpunkt erreicht war, sank der Gehalt an Transkript bis zum Blattfall auf 26% ab. Nicht alle transgenen Proben ergaben bei der Hybridisierung ein Signal; diese Proben wurden in der obigen Abbildung nicht berücksichtigt.

Tabelle 16: Anzahl der Proben mit positivem Intensitätssignal zu den verschiedenen Erntezeitpunkten

Erntezeitpunkte [Tage]	0	16	29	45	62
Anzahl n der Proben mit Induktion	6	5	5	4	4

Bei der Durchführung des Student's t-Tests ($p<0,05$) ergaben sich für alle Proben signifikante Unterschiede. Ausnahme bildeten der zweite und dritte Erntezeitpunkt.

Glutaminsynthetase-Sonde

Aus der Literatur (Buchanan-Wollaston und Ainsworth, 1997) ist bekannt, dass unter anderem die Glutaminsynthetase im Rahmen der Blattseneszenz einen Anstieg der Expression zeigt.

Aus den verschiedenen transgenen bzw. nicht-transgenen Blattproben der verschiedenen Erntezeitpunkte wurden Mischproben hergestellt. Die isolierte RNA wurde auf eine Nylonmembran geblottet und mit der Sonde für die Glutaminsynthetase hybridisiert.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

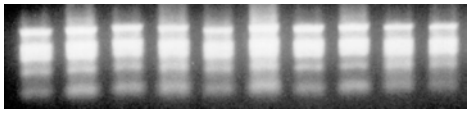


Abb. 65: Gesamt-RNA (Agarose-Gel): Pro Erntedatum wurden je eine transgene und eine nicht-transgene Probe zubereitet. Die Mischproben bestanden pro Erntezeitpunkt jeweils aus zwölf nicht-transgenen Blattproben und sechs transgenen. Transgene und nicht-transgene Proben wurden jeweils im gleichen Verhältnis gemischt (Proben Nr. 1, 3, 5, 7, 9: transgene RNA, Proben Nr. 2, 4, 6, 8, 10: nicht-transgene RNA).

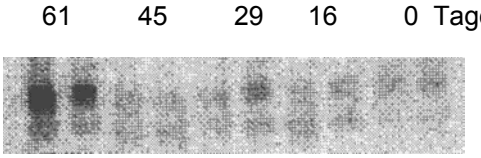


Abb. 66: Northern Blot: Von links: Fünfter Erntezeitpunkt bis erster Erntezeitpunkt, beginnend mit einer aus transgenem Material bestehenden Mischprobe. Infolge wechseln sich transgene und nicht-transgene Proben ab.

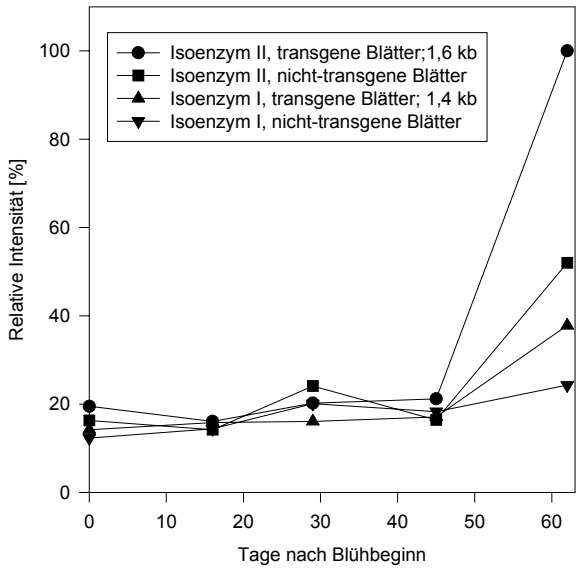


Abb. 67: Northern-Blot-Ergebnisse von Glutamin-Synthetase-Isoenzym Transkripten in transgenen und nicht-transgenen Blättern, vom Blühbeginn bis zum Blattfall.

Die Glutaminsynthetase kommt in *Brassica napus*-Blättern in zwei verschiedenen Isoenzymen vor. Beim Isoenzym II (BNGS18) handelt es sich um ein in den Chloroplasten lokalisiertes Protein mit einer Grösse von 1,6 kb. Diese Form ist vorwiegend in den Blättern lokalisiert. Das Isoenzym I der Glutamin-Synthetase (BNGSR1) hat die Grösse von 1,4 kb (Ochs *et al.,* 1995). Da es sich hier um zwei

verschieden grosse Fragmente handelt, wurde ein Northern-Blot durchgeführt.

Isoenzym I der Glutaminsyntethase

Bei Betrachtung des Gens BNGSR1 war der Gehalt an Transkript in den transgenen Blättern bei Blütebeginn um 15% höher als in den nicht-transgenen Proben. 16 Tage später war die Menge an Transkript bei den transgenen und nicht-transgenen Blättern um ca. 10% gestiegen. Im folgenden Verlauf zeigte sich analoges Verhalten wie bei dem Gen, dass das Isoenzym II kodiert. Auch hier stieg bis zum Blattfall die Transkriptmenge weiter an. Das Gen für das Isoenzym II der Glutaminsynthetase war zum Ende der Vegetationsperiode in den transgenen Blättern um 62% stärker induziert als das Gen des Isoenzyms I in den transgenen Proben. Auch bei den nicht-transgenen Blättern war der Transkriptgehalt des Gens, das das Isoenzym II kodiert, zum Schluss der Seneszenz um 53% über dem des Gens für das Isoenzym I.

Isoenzym II der Glutaminsythetase

Zu Beginn der Blüte war das Gen BNGS18 in den transgenen Blättern um 16% höher induziert als in den nicht-transgenen Blättern. 16 Tage später war die Transkriptmenge bei den transgenen Blättern um 21%, bezogen auf den Ausgangswert, gesunken; bei den nicht-transgenen Blättern betrug die Abnahme 15%. Ab diesem Zeitpunkt stieg die Intensität der Glutamin-Synthetase wieder bis zum Blattfall an. Bei den transgenen Blättern war eine Zunahme bis auf die 5-fache Menge, bezogen auf den Anfangswert, festgestellt worden. Bei den nicht-transgenen Proben wurde im Verlauf der Seneszenz ein Anstieg um die ungefähr 3-fache Menge gemessen.

3.3 Ergebnisse aus den mikrobiologischen Untersuchungen

Um zu ermitteln, ob der Wirkstoff Phosphinothricin für Bodenmikroorganismen einen wachstumsmindernden bzw. stark toxischen Einfluss ausübt und ab welcher Konzentration diese Wirkung erzielt wird, wurden die folgenden Untersuchungen mit einer Auswahl von Stämmen durchgeführt, die unter Laborbedingungen kultivierbar sind. Phosphinothricinsensitive Stämme sollten aufgrund der für sie erschwerten Wachstumsbedingungen einem Selektionsdruck ausgesetzt werden, der ihre Bereitschaft erhöhen könnte, das Resistenzgen auf dem Wege des horizontalen

Gentransfers in ihr Erbgut zu integrieren. Aus der Literatur (Lorenz und Wackernagel, 1994; Brandt, 1995) ist ein Gentransfer zwischen Prokaryonten und Pflanzen bekannt. Im folgenden werden den verschiedenen getesteten Agrobakterien entsprechende Nummern zugeordnet. Um welchen Stamm es sich jeweils handelt, ist in Kapitel Material und Methoden, Punkt 2.2., nachschlagbar. Allgemein wurde für die hier durchgeführten Versuche eine Konzentration von 1,5 bis 2 kg/ha BASTA® zugrunde gelegt, welche nach Hoechst, 1982, als Aufwandsmenge für weniger empfindliche Unkrautarten angegeben wird.

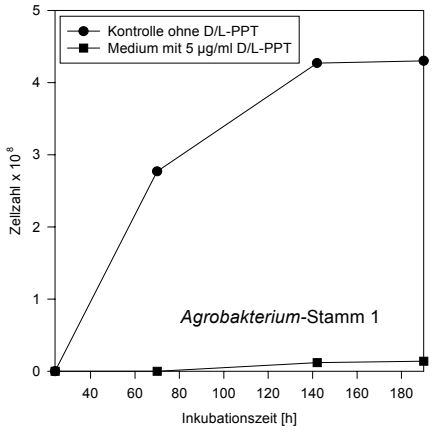
3.3.1 Wachstum auf Minimalmedien

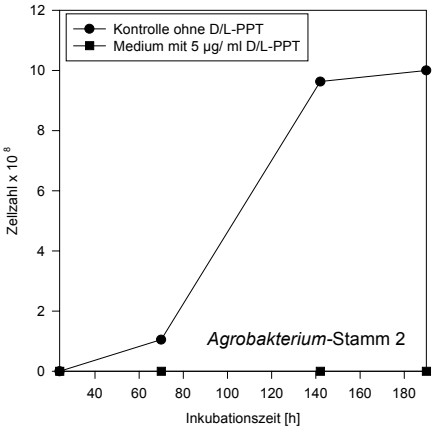
Wachstum der Agrobakterien-Stämme auf D1-Medium

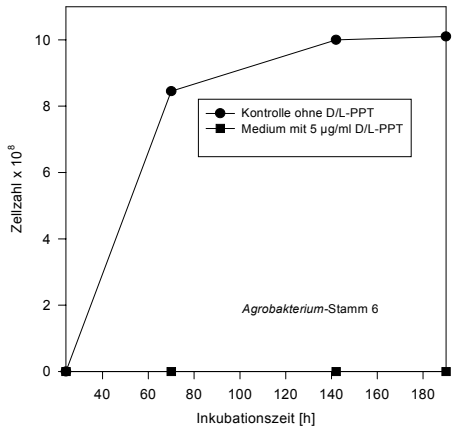
Die verschiedenen Agrobakterien wurden auf dem D1-Medium (Minimalmedium), das eine Konzentration von 5 µg/ml (27,6 µM) D/L-PPT enthielt, ausplattiert. Entsprechende Kontrollen ohne D/L-PPT wurden parallel betrachtet. Nach 12stündiger Inkubation wurden für die Kontrollen bei den Stämmen 4, 5, 9, 11 und 12 keine Kolonien erhalten. Für die mit D/L-PPT versetzten Platten konnte bei allen getesteten Stämmen kein Wachstum festgestellt werden. Nach einer 100stündigen Inkubationszeit wurde die Bildung von Kolonien bei dem Stamm 3 beobachtet. Kolonienbildung wurde nach 145 Stunden Inkubation bei dem Stamm 11 detektiert.

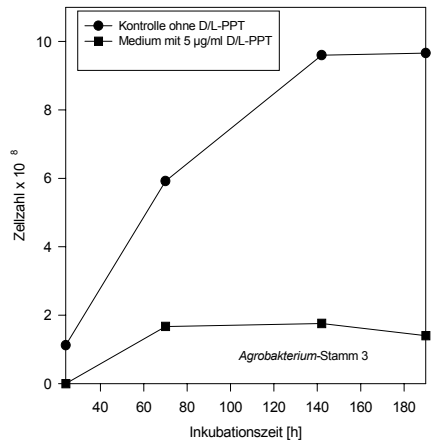
Wachstum der Agrobakterien-Stämme in Flüssig-D1-Medien

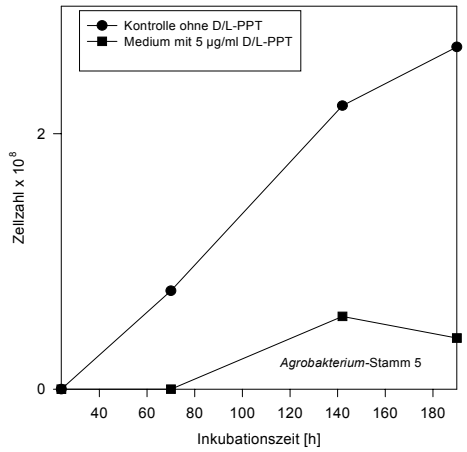
Die verschiedenen Agrobakterien-Stämme wurden in 10 ml Reagenzglaskulturen angesetzt. Dem Medium wurden 5 µg/ml (27,6 µM) D/L-PPT zugefügt. Parallel dazu wurden Kontrollen ohne D/L-PPT betrachtet.

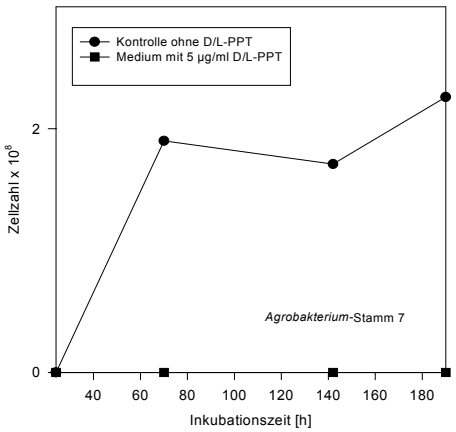

Kontrolle ohne D/L-PPT
Medium mit 5 µg/ml D/L-PPT
Zellzahl x 10^8
Agrobakterium-Stamm 1
Inkubationszeit [h]


Kontrolle ohne D/L-PPT
Medium mit 5 µg/ ml D/L-PPT
Zellzahl x 10^8
Agrobakterium-Stamm 2
Inkubationszeit [h]


Kontrolle ohne D/L-PPT
Medium mit 5 µg/ml D/L-PPT
Zellzahl x 10^8
Agrobakterium-Stamm 6
Inkubationszeit [h]


Kontrolle ohne D/L-PPT
Medium mit 5 µg/ml D/L-PPT
Zellzahl x 10^8
Agrobakterium-Stamm 3
Inkubationszeit [h]


Kontrolle ohne D/L-PPT
Medium mit 5 µg/ml D/L-PPT
Zellzahl x 10^8
Agrobakterium-Stamm 5
Inkubationszeit [h]


Kontrolle ohne D/L-PPT
Medium mit 5 µg/ml D/L-PPT
Zellzahl x 10^8
Agrobakterium-Stamm 7
Inkubationszeit [h]

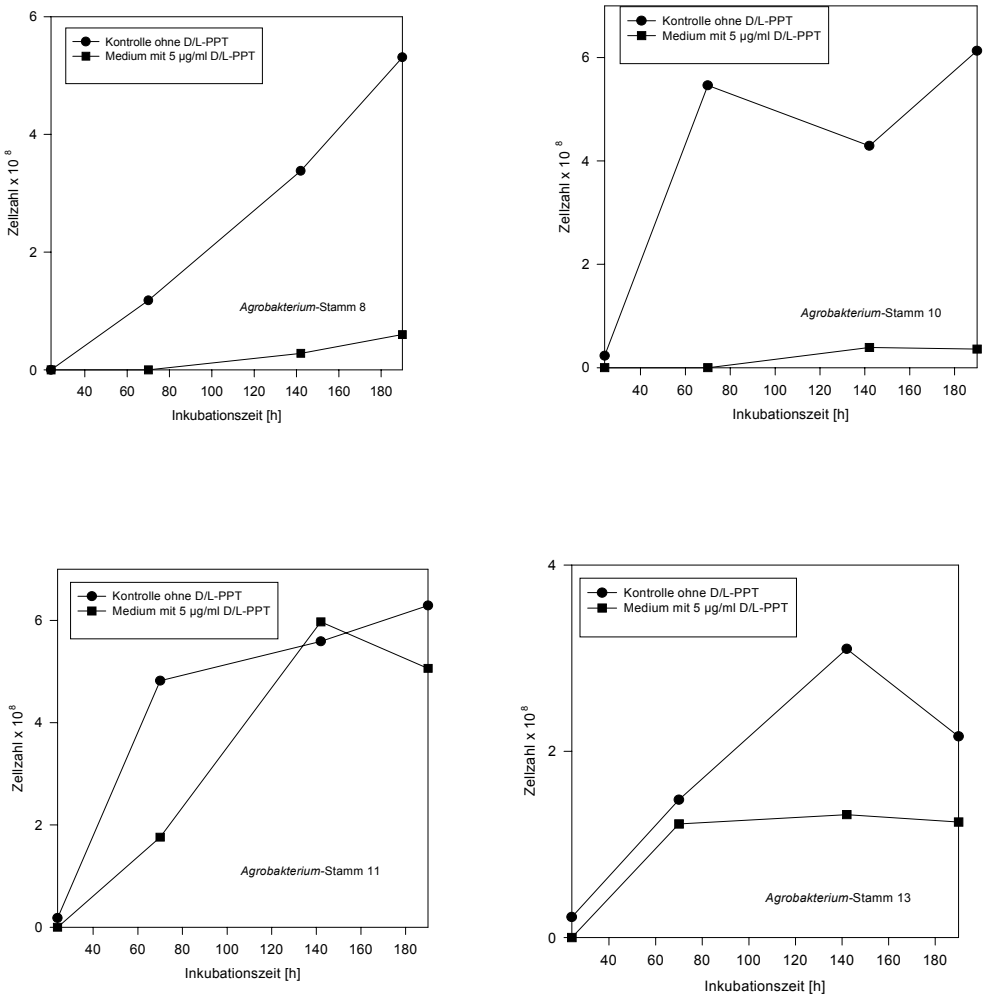


Abb. 68*:* Agrobakterien auf D1-Minimalmedium, Ermittlung des Wachstumsverlaufs über die Messung der Zelldichte mittels der OD bei 600 nm. Es wurden jeweils eine Kontrollkultur und eine Kultur versetzt mit 5 µg/ml (27,6 µM) D/L-PPT vermessen.

Bei dem Agrobakterien-Stamm 1 wurde beim Zusatz von D/L-PPT zu dem Medium ein sowohl stark vermindertes als auch verzögertes Wachstum im Vergleich zu dem Medium ohne Herbizidzusatz festgestellt. Die Anzahl der angewachsenen Zellen ist so vernachlässigbar gering, dass fast von einer vollständig toxischen Wirkung von D/L-PPT auf den Agrobakterien-Stamm 1 gesprochen werden kann.

Bei dem Agrobakterien-Stamm 2 ergab sich bei Zusatz von D/L-PPT zum Medium eine vollständige Unterbindung des Wachstums. Die Kultur ohne Herbizidanteil zeigte eine normale Wachstumsverlaufskurve.

Bei der Aufnahme der Wachstumskinetik des Agrobakterien-Stammes 3 wurde bei dem mit D/L-PPT versetzten Medium ein um 24 Stunden verzögertes Anwachsen festgestellt. Des weiteren zeigte die Kultur eine sehr viel geringere Populationdichte. Nach 142 Stunden Inkubation war bei der Kontrolle eine um 82% höhere Zellzahl ermittelbar.

Bei der Inkubation des Agrobakterien-Stammes 4 wurden weder bei der Kontrolle noch bei D/L-PPT-Zusatz eine Zellbildung erhalten.

Beim Agrobakterien-Stamm 5 wurde im Vergleich zu der Kultur ohne D/L-PPT ein um 46 Stunden verspätetes Wachstum festgestellt. Hier wurde ausser dieser Verzögerung eine sehr viel geringere Zellzahl erhalten. Nach 142 Stunden war die maximale Zellkonzentration in dem D/L-PPT haltigen Medium erreicht, dessen Gehalt an Zellen um 79% unter denen der Kontrollkultur lag.

Im Verlauf der Populationsbildung des Agrobakterien-Stammes 6 wurde bei der Kontrolle ohne D/L-PPT ein gutes Wachstum festgestellt. Bei dem Zusatz von D/L-PPT wurde eine vollständige Wachstumshemmung erzielt.

Bei der Beobachtung des Wachstums von *Agrobacterium* 7 ergab die mit D/L-PPT versetzte Kultur eine vollständige Hemmung, wohingegen bei der Kontrolle ein Wachstum stattfand.

In dem D/L-PPT-haltigen Medium wurden nach 142 Inkubationsstunden ein um 92% verringertes Wachstum - im Vergleich zur Kontrollkultur - bei dem Agrobakterien-Stamm 8 festgestellt.

Bei der Untersuchung des Agrobakterien-Stammes 9 wurden mit dem D1-Medium

weder bei der Kontrolle noch bei D/L-PPT-Zusatz ein Wachstum beobachtet.

Bei der Inkubation des Agrobakterien-Stammes 10 wurde ein geringes sowie verzögertes Wachstum mit D/L-PPT-Zusatz erhalten. Nach 190 Stunden Inkubation lag eine um 94% höhere Zellzahl bei der Kontrolle vor. Das Anwachsen auf dem D/L-PPT-haltigem Medium war um 70 Stunden verzögert.

Bei der Inkubation des *Agrobacterium*-Stammes 11 konnte auch bei dem D/L-PPT-haltigen Medium ein gutes Wachstum, das mit dem der Kontrollkultur vergleichbar ist, ermittelt werden. Nach 24 Stunden konnte in der D/L-PPT-haltigen Kultur noch keine Zellbildung detektiert werden, 46 Stunden später lag die Zellkonzentration in der Kontrolle 63% über der mit Herbizid versetzten Kultur. Nach insgesamt 142 Stunden liegt die Zellzahl in der D/L-PPT-haltigen Kultur um 6,4% über der der Kontrollprobe. Gegen Ende der Inkubationszeit liegt allerdings die Kontrollprobe wieder mit 19,6% höherer Zellzahl vor.

Für den Agrobakterien-Stamm 12 wurden in Zusammenhang mit dem D1-Medium keine Zellen bei der Kontrolle, und auch nicht bei D/L-PPT-Zusatz erhalten.

Bei der Inkubation des Agrobakterien-Stammes 13 zeigte die Kultur, die mit D/L-PPT versetzt war, wieder eine Wachstumsverzögerung von 46 Stunden gegenüber der Kultur ohne D/L-PPT. Nach 72 Stunden war bei der herbizidhaltigen Kultur fast die Zelldichte (bis zu 82%) der Kontrollkultur erreicht. Ab diesem Zeitpunkt war bei der D/L-PPT-haltigen Kultur die stationäre Phase erreicht. Nach bis zu 142 Stunden Inkubationszeit war bei der Kontrollkultur ein Maximum erreicht, das um 43% über dem der herbizidhaltigen Kultur lag.

Flüssigkulturen des Bacillus subtilis auf ATCC 21 Medium mit Zusatz verschiedener D/L-PPT-Konzentrationen

Den Kulturmedien wurden verschiedene Konzentrationen an D/L-PPT zugegeben (0,1 µg/ml (0,552 µM); 1,0 µg/ml (5,52 µM); 2,5 µg/ml (13,8 µM); 5 µg/ml (27,6 µM); 10 µg/ml (55,2 µM); 20 µg/ml (110,4 µM). Bei den Kontrollen zeigte sich eine Zunahme der

Zelldichte nach 24stündiger Inkubationszeit, was schon bei dem Versuch mit den Agarplatten beobachtet worden war. Die mit D/L-PPT versetzten Flüssigkulturen zeigten auch nach 144 Inkubationsstunden keine Zunahme der Zelldichte, was wiederum im Einklang mit den vorher getesteten Agarplatten steht. Bei dem *Bacillus subtilis* kann also von einer vollständigen Wachstumshemmung durch das Herbizid D/L-PPT ausgegangen werden.

3.3.2 Wachstum auf Vollmedien

Wachstum der Agrobakterien-Stämme auf Trypton-Hefeextraktmedium

Die verschiedenen Agrobakterien wurden auf Trypton-Hefeextraktmedium, mit einem Zusatz von 0,01 µg/ml (0,0552 µM); 1 µg/ml (5,52 µM); 1,25 µg/ml (6,9 µM); 2,5 µg/ml (13,8 µM) und 5 µg/ml (27,6 µM) D/L-PPT bzw. als Kontrollen ohne D/L-PPT-Zusatz, ausplattiert.

-bei 5,0 µg/ml (27,6 µM) D/L-PPT kein Wachstum : 4, 5, 8, 9, 12, 13
-bei 2,5 µg/ml (13,8 µM) „ „ „ : 4, 8, 9, 12, 13
-bei 1,25 µg/ml (6,9 µM) „ „ „ : 4, 8, 9, 12
-bei 1,0 µg/ml (5,52 µM) „ „ „ : 9, 12
-bei 0,01 µg/ml (0,0552 µM) „ „ „ : alle Stämme sind gewachsen

Für die Stämme 1, 2, 3, 6, 7, 10 und 11 erwiesen sich die hier angewandten D/L-PPT-Konzentrationen als nicht toxisch und sie zeigten gutes Wachstum.
Um für alle Stämme toxische Wirkung zu erzielen, wurden diese auf ein Trypton-Hefeextraktmedium mit einem Zusatz von 20 µg/ml (110,40 µM) D/L-PPT plattiert. Zusätzlich wurde die Inkubationszeit verlängert. Nachstehend werden jetzt die Stämme aufgeführt, die kein Wachstum zeigten.

-nach 15 Stunden kein Wachstum auf D/L-PPT : 1, 4, 5, 19, 12, 13
- „ „ „ geringes „ „ „ : 2, 3, 6, 7, 8
- „ „ „ Wachstum „ „ : 10, 11
- nach 31 Stunden kein Wachstum auf D/L-PPT : 1, 4, 5, 9, 12, 13

- „ 54 „ „ „ „ „ : 4, 5, 9, 12, 13
- „ 78 „ „ „ „ „ : 4, 5, 9, 13
- „ 126 „ „ „ „ „ : 4, 9, 13
- „ 318 „ „ „ „ „ : 4, 9, 13

Ermittlung der D/L-PPT-Toleranzgrenze in LB-Vollmedium

Im folgenden wurde ein Stamm von den Agrobakterien, sowie einer der *Pseudomonadenstämme* und ein *Bacillus subtilis*-Stamm auf ihre D/L-PPT-Toleranz in LB-Vollmedium getestet. Die dabei angewandten D/L-PPT-Konzentrationen betrugen 20 µg/ml (110,4 µM); 10 µg/ml (55,2 µM); 5 µg/ml (27,6 µM); 2,5 µg/ml (13,8 µM); 1,25 µg/ml (6,9 µM); 0,625 µg/ml (3,45 µM); 0,3125 µg/ml (1,725 µM); 0,156 µg/ml (0,86 µM); 0,078 µg/ml (0,43 µM); 0,039 µg/ml (0,22 µM); 0,0195 µg/ml (0,108 µM). Parallel wurden Kontrollansätze untersucht. Bei allen hier durchgeführten Versuchen wurden n=3 Proben herangezogen.

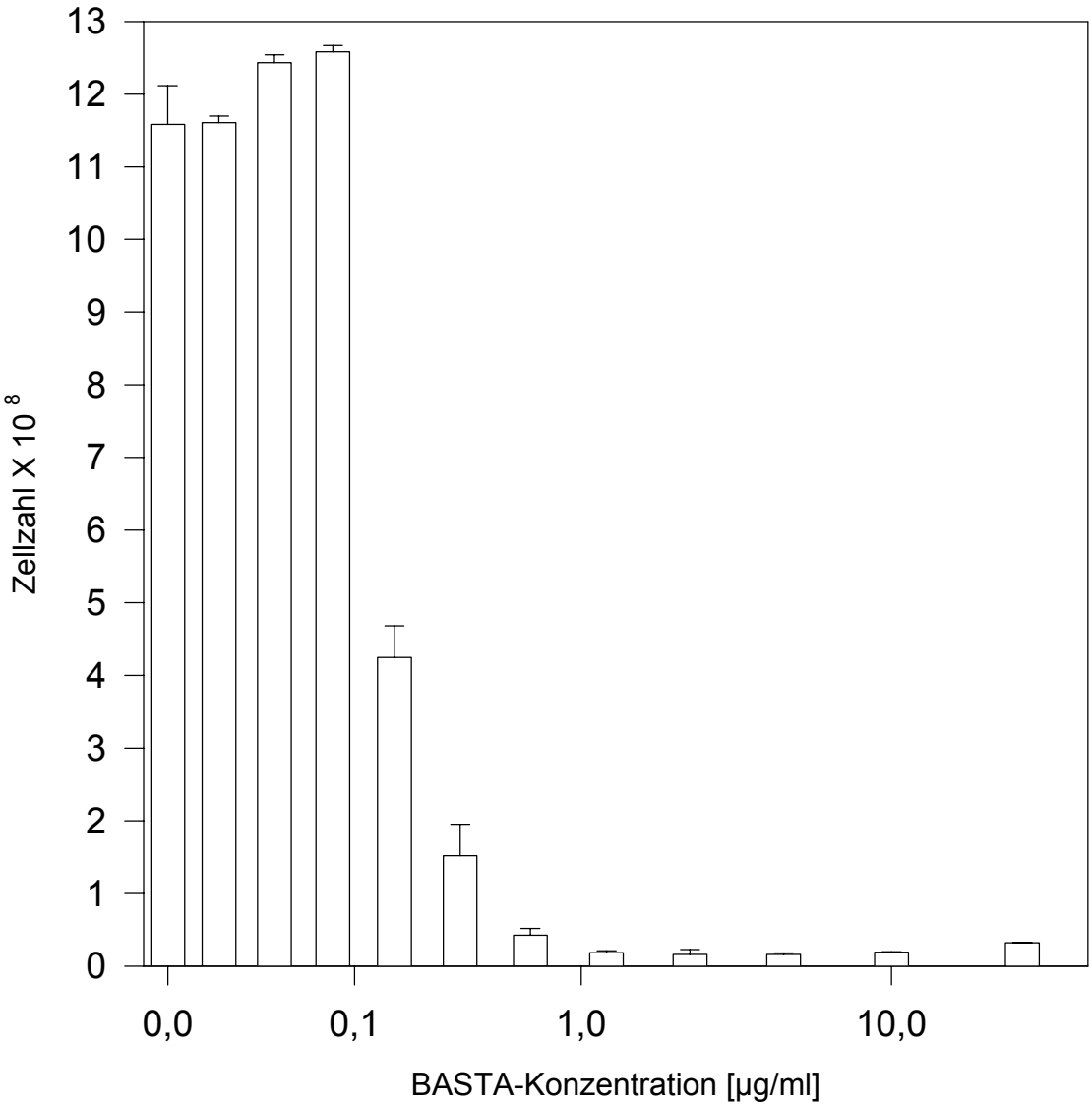


Abb. 69: Toxische D/L-PPT-Konzentration bei *Bacillus subtilis* in LB-Vollmedium.

Ausgehend von einer Vorkultur des ***Bacillus subtilis*** mit einer OD_{600} von 1,7 wurden zu den verschiedenen Ansätzen je 200 µl zellhaltiges Medium hinzugefügt. 24 Stunden später wurde die OD der einzelnen Kulturen vermessen. Die Ansätze, die mit den drei geringsten D/L-PPT-Konzentrationen versetzt waren, zeigten sogar ein besseres

Wachstum als die Kontrollkultur. Bis hin zu einer Herbizidkonzentration von 0,078 µg/ml (0,43 µM) nahm das Zellwachstum um 8,6% zu. Ab einer Konzentration von 0,156 µg/ml (0,86 µM) D/L-PPT wurde eine drastische Hemmung beobachtet (verglichen mit der Kontrollprobe um 63%). Bei Zugabe von 0,3125 µg/ml (1,725 µM) D/L-PPT war eine weitere Hemmung zu beobachten, verglichen mit dem Kontrollwert um 87%. Betrug die D/L-PPT-Konzentration des Mediums 0,625 µg/ml (3,45 µM), so wurde nochmals ein Wachstumsstopp von 96%, bezogen auf die Kontrollprobe, erhalten. Bei nochmaliger verdoppelter D/L-PPT-Zugabe (1,25 µg/ml (6,9 µM)) wurde eine Reduzierung bis zu 98% erzielt. Bei *Bacillus subtilis* kann also ab einer D/L-PPT-Konzentration von 1,25 µg/ml (6,9 µM) von einer vollständigen Wachstumshemmung ausgegangen werden. Nach einer 48stündigen Inkubation konnte auch bei den Konzentrationen von 0,625 µg/ml (3,45 µM) und 0,3125 µg/ml (1,725 µM) D/L-PPT eine vermehrte Zellbildung festgestellt werden. Die verlängerte Inkubationszeit ergab keine Zellzunahme bei der hier festgestellten 98%igen Wachstumshemmung bei Zugabe von 1,25 µg/ml (6,9 µM) Herbizid.

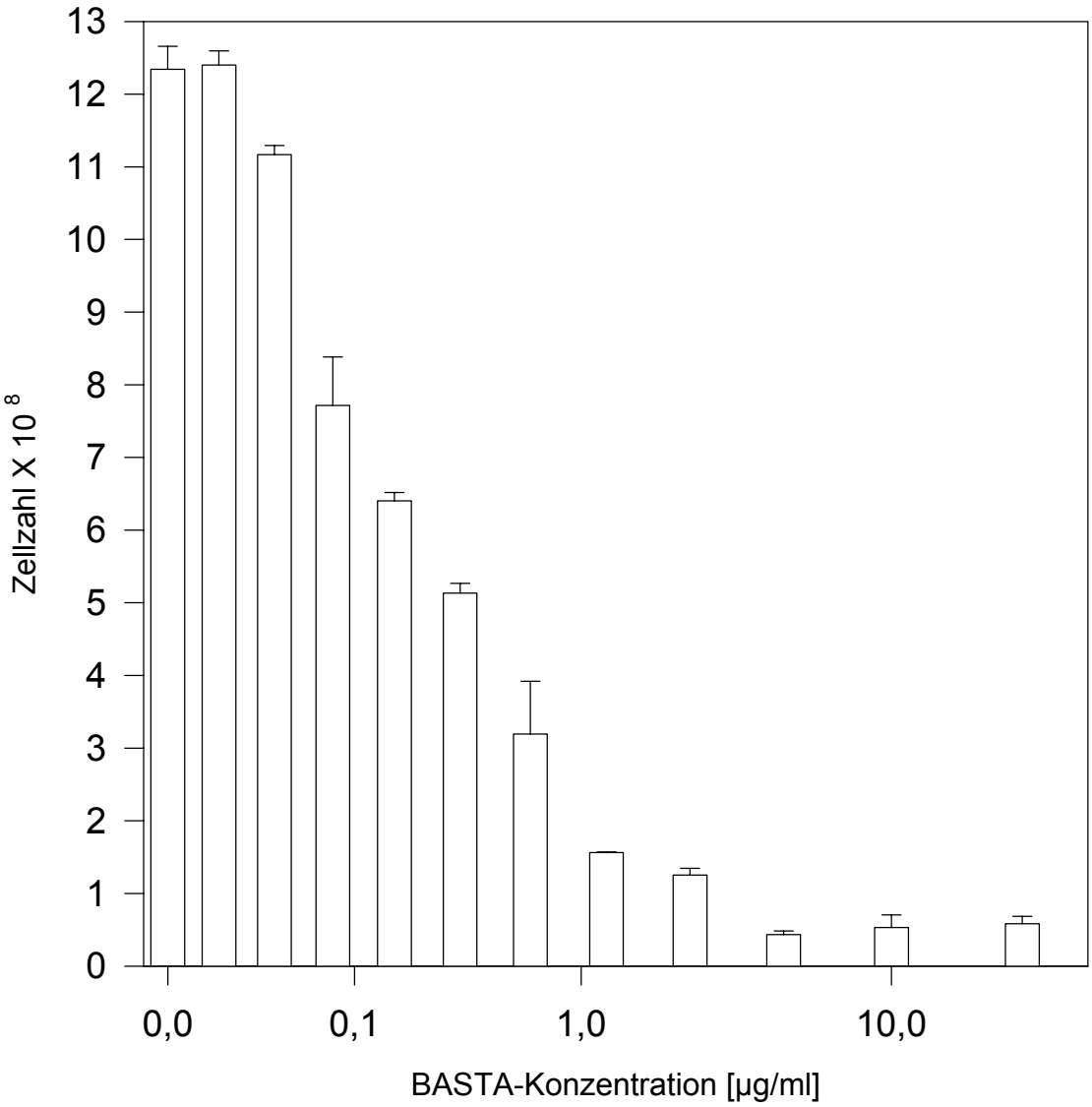


Abb. 70: Toxische D/L-PPT-Konzentration bei *Pseudomonas fluorescens,* DSM 50099 in LB-Vollmedium.

Mit 200 µl einer Vorkultur (OD_{600} = 1,464) von *Pseudomonas fluorescens* (DSM 50099) wurden die verschiedenen Kulturen angesetzt. Nach 24 Stunden wurde die OD gemessen. Die geringste D/L-PPT-Konzentration ergab eine um 0,4% höhere Zellzahl

als die Kontrollkultur. Bei der D/L-PPT-Konzentration von 0,039 µg/ml (0,22 µM) war die Zellbildungsrate um 13% geringer. Mit steigendem Herbizidgehalt ging eine kontinuierliche Abnahme der Zellzahl einher. Bei einem D/L-PPT-Zusatz von 0,625 µg/ml (3,45 µM) war die Zellanteil um 17% geringer, verglichen mit der Kontrolle. Die niedrigsten Zellraten wurden in den drei höchsten D/L-PPT-Konzentrationen festgestellt. Ab einer Zugabe von 5 µg/ml (27,6 µM) Herbizid war eine Wachstumshemmung bis zu 97% erreicht. Vier Tage nach dem Animpfen der Kulturen bildeten sich bei den drei höchsten D/L-PPT-Konzentrationen Niederschläge. Um zu testen, ob es sich hierbei um lebende Zellen handeln könnte, wurden von einer Kultur 20 µl Lösung entnommen und auf LB-Agar ausplattiert. Nach einer Inkubation über Nacht wurden keine Kolonien erhalten.

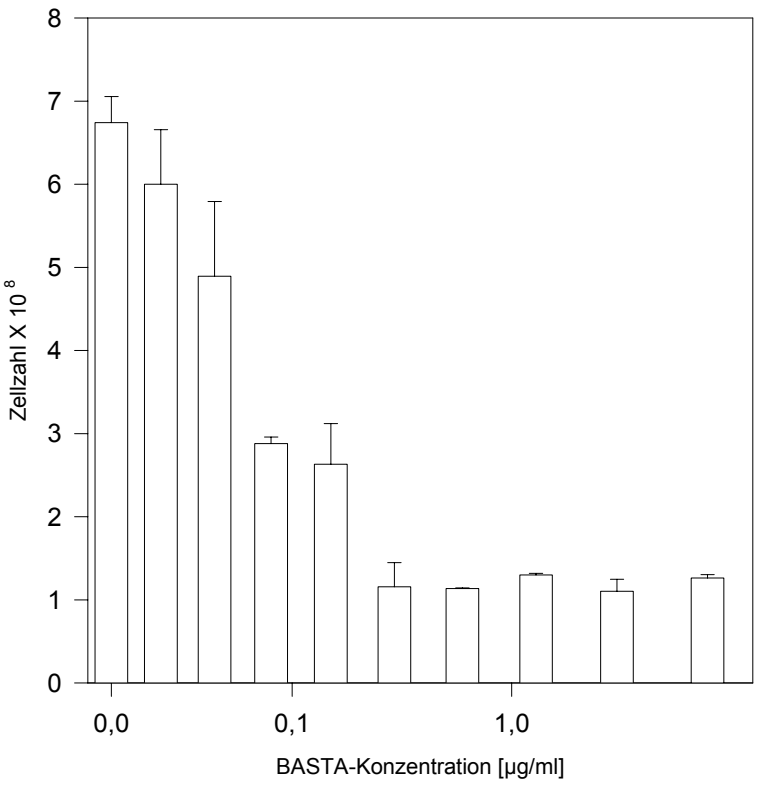


Abb. 71: Toxische D/L-PPT-Konzentration bei *Agrobacterium 6* in LB-Vollmedium

Stellvertretend für die Agrobakterien wurde der Stamm 6 getestet. Die Kulturen mit den verschiedenen Zusätzen wurden mit 200 µl einer Vorkultur des *Agrobacterium*-Stammes 6 (OD_{600} = 1,731) versetzt. Nach drei Tagen Inkubation wurden die Zellbildungsraten überprüft. Dabei ergab sich für die niedrigste D/L-PPT-Konzentration eine um 11% geringere Zellanzahl, verglichen mit der Kontrolle. Bis zu einer D/L-PPT-Konzentration von 0,156 µg/ml (0,86 µM) war das Wachstum der Zellen auf 39% vermindert. Bei der Zugabe von 0,3125 µg/ml (1,725 µM) Herbizid wurde eine Wachstumshemmung von 83% erreicht, die auch bei Zugabe höherer D/L-PPT-Mengen nicht wesentlich verstärkt wurde. Um eine vergleichbare toxische Konzentration in der Grössenordnung der anderen beiden getesteten Stämme (*Pseudomonas fluorescens* und *Bacillus subtilis*) zu ermitteln, wurden Kulturen mit höheren D/L-PPT-Konzentrationen (75 µg/ml (414 µM); 37,5 µg/ml (207 µM); 18,75 µg/ml (103,5 µM); 9,38 µg/ml (51,8 µM); 4,69 µg/ml (25,9 µM); 2,34 µg/ml (12,9 µM)) angesetzt. Die beiden Lösungen mit der höchsten Herbizidkonzentrationen zeigten auch nach einer Woche Inkubation keinen Bewuchs. Bei einer Zugabe von 18,75 µg/ml (103,5 µM) und 9,38 µg/ml (51,8 µM) D/L-PPT wurde ein Bodensatz gebildet, aber es fand keine Zellbildung statt. Die Kulturen mit den geringsten zwei D/L-PPT-Zugaben zeigten analoges Verhalten, wie im Diagramm abgebildet.

3.3.3 Elektroporation verschiedener Bodenbakterien mit dem pat-Plasmid

Mittels Elektroporation wurde getestet, ob die Bodenbakterien in der Lage sind, das Fremdgen zu exprimieren. Bei der Elektroporation wurde die *pat*-Sequenz einschliesslich der in den Pflanzen verwendeten Promotor- und Terminatorregion des „cauliflower mosaic“-Virus, sowie nur die kodierende Region von 606 bp verwendet. Die DNA sollte chromosomal in das Genom oder in ein bakterielles Plasmid integriert werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass unter bestimmten günstigen Voraussetzungen die Bodenbakterien *Bacillus subtilis, Acinetobacter calcoaceticus* sowie *Pseudomonas stutzeri* fremde DNA in ihr Erbgut aufnehmen können (Chamier *et al.* 1993, Lorenz *et al.*, 1988; 1990). Dabei hat sich chromosomale DNA als effizienter im Vergleich zu Plasmid-DNA herausgestellt (Chamier *et al.* 1993). Es wurden sowohl die BASTA®-sensitiven Agrobakterien-Stämme getestet als auch die toleranten. Damit sollte geklärt werden, ob die Stämme bei Präsenz des *pat*-Gens analoges Verhalten zeigen

bzw. ob eine gesteigerte Resistenz gegen BASTA® erreicht werden kann. Nach Durchführung der Elektroporation erfolgte das Ausplattieren auf Agarplatten. Mit Hilfe des *lac*-Operons wurde selektioniert. Als Kontrolle wurde das *pat*-Plasmid (pUC18) in die verschiedenen Bodenbakterien mit der gleichen Methode integriert. Aufgrund der durchgeführten Kolonien-PCR wurden hier Amplifikate des *pat*-Gens nachgewiesen. Die Kolonien, die das *pat*-Plasmid enthielten, sind nicht in der Lage, das *pat*-Gen zu replizieren, da der Replikationsursprungsort nicht erkannt wird, pUC18-Plasmide werden nur in Enterobakteriaceen repliziert (Mitteilung der Fa. Hoechst).
Bei der Verwendung der *pat*-DNA wurden keine positiven Amplifikate erhalten.

4 Diskussion

4.1 Seneszenz transgener und nicht-transgener Pflanzen

Seneszenz erfolgt in nahezu allen lebenden Organismen und führt zum Abbau von Zellkomponenten und anderem biologischem Material. Charakteristische pflanzliche Seneszenzabläufe werden sehr deutlich bei einjährigen, krautigen Pflanzen. Ab dem Zeitpunkt der Blüte setzen Abbauprozesse in Blüten, Früchten, Blättern, Wurzeln und Stengeln ein. Die Seneszenzprozesse bedingen eine starke Mobilisierung zahlreicher Verbindungen und Mineralien. Das visuell offensichtlichste Symptom des Seneszenzprozesses ist der Verlust an Chlorophyll. Zusätzlich findet eine Biosynthese von hydrolytischen Enzymen statt, welche den katabolischen Metabolismus fördern. Diese Prozesse erfolgen nach einem genau festgelegten genetischen Schema. Biochemischer Abbau von Proteinen, Nukleinsäuren und sekundären Inhaltsstoffen etc. findet statt. Die umfangreichen physiologischen und biochemischen Vorgänge der Blattseneszenz mit den molekularen Abläufen, die in den Prozess involviert sind, sind noch nicht vollständig erforscht (Buchanan-Wollaston, 1994). Gerade aus dem Bereich der Freilanduntersuchungen sind bisher nur sehr wenige Daten bekannt.

4.1.1 Chlorophyll

Die Degradation des Chlorophylls ist das erste sichtbare Anzeichen der Seneszenz. Die Zersetzung von Chlorophyll wird daher als Seneszenzmarker untersucht. Seine Degradation geschieht am Ort der Photosynthese, in den Chloroplasten. Bei den im Rahmen dieser Arbeit unter Freilandbedingungen durchgeführten Untersuchungen nahm der Chlorophyllgehalt in den Rapsblättern im Verlauf der Vegetation bis auf 62% bei den transgenen und auf 77% bei den nicht-transgenen Blättern ab. Eine andere Studie, die ebenfalls den Chlorophyllgehalt im Freiland bei Gerstenblättern analysierte, stellte einen höheren Verlust an Chlorophyll auf ca. 20% des Ausgangswertes fest (Humbeck *et al.,* 1996). Eine andere unter Freilandbedingungen durchgeführte Studie gibt für Gerstenblätter eine Abnahme des Chlorophylls zwischen 25-40% an (Kleber-Janke und Krupinska, 1997). Aus der Literatur sind auch höhere Verlustraten an

Chlorophyll bei im Gewächshaus gezogenen Pflanzen bekannt.
Oh *et al,* 1996, stellten bei Untersuchungen zur Seneszenz bei *Arabidopsis thaliana* einen Rückgang auf bis zu 40% fest. Für Rapsblätter wurde ein Verlust an Chlorophyll auf bis zu 35% des anfänglichen Gehaltes festgestellt, Hanfrey *et al.,* 1996. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist ein geringerer Chlorophyllabbau festgestellt worden, insgesamt ist die Tendenz aber identisch. Zwischen transgenen und nicht-transgenen Blattproben ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die auffällige Zunahme des Chlorophyllgehalts zum 4. Erntezeitpunkt könnte verschiedene Ursachen haben wie z.B. Witterung, Erntebedingungen etc. und ist bei Betrachtung der endgültig resultierenden Gesamtabnahme des Chlorophylls ohne Belang.

4.1.2 ACC- und MACC-Gehalt

Das Pflanzenhormon Ethylen ist an verschiedenen pflanzlichen Reaktionen beteiligt, z. B. Verwundung, Pathogenreaktion und Stress. Unter anderem beeinflusst es in hohem Maße das Pflanzenwachstum und die Entwicklungsprozesse, wie Samenbildung, Seneszenz, Ablösung der Blätter und Blüten sowie Reifung der Früchte (Abeles *et al.,* 1992). Versuche mit transgenen Pflanzen haben ergeben, dass Ethylen einen Einfluss auf die Seneszenz hat, dass es aber kein essentieller Regulator ist (Buchanan-Wollaston, 1997). Die Aminosäure Methionin ist der Vorläufer des Pflanzenhormons Ethylen. Methionin wird in SAM durch eine Methionin-Adenosyl-Transferase umgewandelt. SAM wird anschliessend zur Bildung von 1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure (ACC) mittels des Enzyms ACC-Synthetase benötigt. ACC wiederum wird mit Hilfe der ACC-Oxidase letztendlich zu Ethylen katalysiert. Bei den hier erhaltenen Ergebnissen war der Anteil an ACC und auch an MACC über die gesamte Vegetationsperiode sehr gering. Zum Ende der Seneszenz wurde für den ACC-Spiegel eine Zunahme auf ungefähr den Anfangsgehalt erhalten, der MACC-Spiegel sank im Verlauf der Seneszenz kontinuierlich. In den transgenen Blättern war die Konzentration an ACC über den gesamten betrachteten Zeitraum höher. Zusammenfassend hat sich die Untersuchung des ACC- und MACC-Gehaltes als nicht geeignet für die Bestimmung als Seneszenzparameter bei *Brassica napus* erwiesen.

4.1.3 Flavonoide

Flavonoide werden aus Phenylpropanoiden gebildet, welche über den Shikimat-Weg aus L-Phenylalanin und drei Acetatmolekülen entstehen. Die Chalkon-Synthase ist hier das Schlüsselenzym für die Synthese: Es katalysiert die Kondensation von aktiven Vorläufern, besonders 4-Coumaroyl Coenzym A (Bors *et al.,* 1996).

Der Nachweis der Flavonoidkomponenten im Blattextrakt zeigte im Laufe der Seneszenz, besonders zu Beginn, eine starke Abnahme. Wie die Zusammensetzung der einzelnen Flavonoidkomponenten für *Brassica napus* aussieht, bzw. welche Veränderungen im Verlauf der Seneszenz durchschritten werden, ist nicht bekannt und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht behandelt. Insgesamt lässt sich eine Abnahme der extrahierten phenolischen Bestandteile bis auf 64% feststellen. Zwischen transgenen und nicht-transgenen Pflanzen wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden. Die auffällige Zunahme der Flavonoidkomponenten zum 4. Erntezeitpunkt ist nicht signifikant.

4.1.4 Aminosäuren und Proteine

Stickstoff ist essentiell für das Pflanzenwachstum und oft in unzureichender Menge verfügbar. Die Pflanzen haben deshalb verschiedene Strategien entwickelt, um org. Stickstoff zu konservieren. Als das am besten dokumentierte Beispiel ist die Samenentwicklung und Reifung zu nennen. Mit der Anthese wird der gesamte Stickstoff in Richtung der vegetativen Organe verlegt. Hierbei stammt der grösste Anteil aus dem Abbau der Blattproteine, gefolgt von den Stengelproteinen. Der Proteingehalt der Wurzeln ist am geringsten (Noodén und Leopold, 1988).

Im Verlauf der Seneszenz der Pflanzen werden Proteine durch verschiedene proteolytische Enzyme in ihre kleinsten Einheiten, die Aminosäuren, zersetzt. Proteinabbau findet zunächst bei der Erneuerung von älteren Proteinen statt, dem sogenannten „turn over“. Die durch Proteolyse freigesetzten Aminosäuren werden z.T. für die Synthese neuer Proteine verwandt oder werden durch Transaminierung bzw. oxidative Deaminierung in 2-Oxocarbonsäuren überführt. Die Hauptkomponenten der Aminosäuren, die im Phloem von seneszierenden Blättern abtransportiert werden, sind Glutamin und Asparagin (Kamachi *et al.,* 1992; Feller und Fischer, 1994).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Aminosäuren und Proteine während der Seneszenzphase von transgenen und nicht-transgenen Pflanzen untersucht. Mit der Abnahme des Gesamtproteingehaltes nahm die Menge an frei vorliegenden Aminosäuren zu. Eine Ausnahme bildete das Prolin. Diese Aminosäure dient ausser zur Neusynthese von Proteinen auch zur Energielieferung (Shimada *et al.,* 1993). Hingegen ermittelten Good *et al.,* 1994, bei Trockenstress in *Brassica napus* einen auffälligen Anstieg des Prolins. Analoge Ergebnisse wurden für Luzerne erhalten (Girousse *et al.,* 1996).

Als Hauptkomponenten bei der Aminosäurenzusammensetzung ergaben sich Prolin, Glutaminsäure, Glutamin und Asparaginsäure. Diese Aminosäuren waren auch die Hauptkomponenten bei Trockenstress. Die gleichen Aminosäuren, wie hier im Falle der Seneszenz, zeigten eine deutliche Zunahme, während der Proteingehalt sank (Shen *et al.,* 1989; Good *et al.,* 1994; Girousse *et al.,* 1996). Bei der Kiefer (*Pinus sylvestris* L.) wurde ebenfalls eine Zunahme der Aminosäuren mit der Fertilisation detektiert, die wesentlichsten bildeten Glutaminsäure, Glutamin und Asparagin sowie Prolin (Näsholm und Ericsson, 1990). Bei einer Vergleichanstellung bezüglich des Gehaltes an Aminosäuren zwischen transgenen und nicht-transgenen Pflanzen wurden vor allem bei dem vorletzten Erntezeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede erhalten. Zum vierten Erntezeitpunkt wurde bei Asparagin, Glutamin und Serin und zur zweiten Ernte für Prolin signifikante Differenzen zwischen transgenen und nicht-transgenen Blättern erhalten. Der auch schon bei anderen Komponenten, wie z.B. Chlorophyll, festgestellte Stoffanstieg zum 4. Erntezeitpunkt war hier nur beim Asparagin der transgenen Blätter signifikant. Bei der Bewertung dieser statistischen Unterschiede sollte nicht ausser acht gelassen werden, dass es sich hier um Probenmaterial aus dem Freiland handelt und daher schon eine sehr viel grössere Schwankungsbreite gegeben ist.

Da das Herbizid BASTA® die Glutaminsynthetase hemmt und damit die nachfolgende Aminosäuresynthese, sind die Aminosäuren Glutaminsäure und Glutamin hier von besonderem Interesse. Infolge der verhinderten Glutaminbildung ist die Synthese weiterer Stoffwechselfolgeprodukte blockiert. L-Phosphinothricin verhindert die Umwandlung von Glutaminsäure zu Glutamin. Die Konvertierung zu Glutamin wird enzymatisch durch die Glutaminsynthetase bewirkt. Die Glutaminsynthetase liegt in den Blättern in zwei verschiedenen Isoformen vor: Die cytosolische (GS1) und die in den

Plastiden lokalisierte (GS2) (Kamachi *et al.,* 1991). Die zunehmende Expression der GS1 wird in den seneszierenden Blättern beobachtet, sie ist eine Bedingung für den Abtransport von metabolisiertem Stickstoff aus den Blättern. Analog nimmt die Expression des Gens zu, das für die Asparaginsynthetase kodiert. Das ist wiederrum die Voraussetzung für die Synthese des Asparagins aus den Blättern (King *et al.,* 1995). Glutamin dient als Amid-Donor für Asparagin und ist auch ein Vorläuferprodukt von Prolin. Somit beeinflusst die Glutaminsynthese den gesamten nachfolgenden Stoffwechselweg. Bei einem Vergleich der hier besonders involvierten Aminosäuren konnte zwischen transgenen und nicht-transgenen Pflanzen analoges Verhalten festgestellt werden. Transgene und nicht-transgene Pflanzen zeigten in bezug auf den Gehalt an Asparagin, Serin und Alanin zum vierten Erntezeitpunkt, sowie zum zweiten Erntezeitpunkt beim Prolin signifikante Unterschiede, die mit den vielfältigen Einflüssen unter Freilandbedingungen erklärbar sind.

Die Auswahl der im Rahmen dieser Arbeit betrachteten Aminosäuren erfolgte nach den Veröffentlichungen von Hoerlein, 1994, und Shimada *et al.,* 1993, und Wendler und Wild*,* 1990, die den Einfluss von Phosphinothricin bzw. Bialaphos auf den Aminosäurestoffwechsel beschreiben.

Shimada *et al.,* 1993, beschreibt die Auswirkungen auf die Aminosäurenkonzentrationen in Reispflanzen bei Applikation von 0,1 nM Bialaphos zum Zeitpunkt der Meiose. Die Konzentration an Aminosäuren in diesen Pflanzen war in den Staubgefässen um ein vielfaches geringer (1,36 nM pro Staubgefäss / Kontrollpflanzen enthielten 15,41 nM pro Staubgefäss). In den Kontrollpflanzen war der prozentuale Anteil an Prolin doppelt so hoch wie in den mit Bialaphos behandelten, aber dafür enthielten sie die 4- bis 6-fach geringere Menge an Asparaginsäure und Glutaminsäure. Besonders auffällig war bei den mit Bialaphos behandelten Pflanzen die Zunahme an Glutaminsäure.

Die Untersuchung der freien Aminosäuren in *Sinapis alba* nach erfolgter D,L-PPT-Applikation zeigte, dass die Ammoniumakkumulation in den Blättern gleichzeitig mit einer drastischen Abnahme von Glutamin, Glutaminsäure und Asparaginsäure einhergeht (Wendler und Wild*,* 1990).

Hoerlein, 1994, beschreibt die Analytik der freien Aminosäuren in nicht-transgenen Rapsblättern nach der Behandlung mit 1 mM D,L-PPT. 180 Minuten nach Applikation wurde eine drastische Abnahme der Konzentrationen von Glutaminsäure, Glutamin,

Asaraginsäure, Alanin, Serin und Glycin sowie eine geringerer Verlust von Asparagin erhalten. Durch Zugabe von 20 mM Glutaminsäure zu der 1 mM D,L-PPT-Lösung wurde, im Gegensatz zu einer alleinigen D,L-PPT Gabe, eine Konzentrationszunahme von Glutaminsäure, Serin, Glycin, Alanin und Asparaginsäure in den Blättern festgestellt.

Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen wurden in den transgenen Pflanzen keine Veränderungen der Aminosäuregehalte im Vergleich zu den nicht-transgenen Pflanzen ermittelt, die nicht auf einer natürlichen Schwankungsbreite beruhten. In diesem Freilandversuch wurden nur die transgenen Rapspflanzen mit 3 l/ha BASTA® behandelt, nachdem die Pflanzen mindestens fünf Blätter hatten. Der nicht transgene Raps wurde entweder mit den Herbiziden Butisan (1l/ha) und Oleo (0,5 l/ha) behandelt, oder die Unkrautbekämpfung wurde mit konventionellen Methoden durchgeführt. Die Beprobung der Rapsfelder erfolgte erstmals kurz vor der Blüte, also lange Zeit nach der Applikation von BASTA® auf die transgenen Pflanzen. Der Einfluss von BASTA® auf die Aminosäuresynthese sollte in den transgenen Pflanzen durch die Acetylierung des L-Phosphinothricins nicht vorhanden sein. Im Verlauf der Seneszenz konnte eine Konzentrationszunahme von Glutaminsäure, Asparaginsäure, Asparagin, Glutamin, Serin, Glycin und Alanin in transgenen und nicht-transgenen Pflanzen festgestellt werden. Zum letzten Erntezeitpunkt waren die Aminosäurenanteile an Glutaminsäure und Asparagin im Vergleich zum vorherigen Erntezeitpunkt gesunken. Bei den nicht-transgenen Blättern wurde bei Glutaminsäure und Serin nochmals ein Anstieg der Werte vom vorletzten zum letzten Erntedatum ermittelt.

4.1.5 Seneszenz auf DNA-Ebene

Während der Seneszenz kommt es zum Abbau von Nukleinsäuren. Stabil in das Pflanzengenom integrierte DNA sollte den gleichen Abbauprozessen durch Nukleasen ausgesetzt sein, wie natürliche vorkommende pflanzeneigene DNA. Aus der Literatur sind bisher keine Daten bekannt, die den Abbau spezifischer Gene auf DNA-Ebene im Freiland untersucht haben. Bei den hier erhaltenen Ergebnissen wurde für das künstlich eingeführte *pat*-Gen ein permanentes Vorhandensein in allen Pflanzenteilen in der Seneszenzabfolge der Rapspflanzen festgestellt (Ernst *et al.,* 1996a). Somit sollte über die gesamte Vegetationsperiode Resistenz gegen das Herbizid BASTA® bestehen. Im

Vergleich zu den beiden endogenen Photosynthesegenen war das *pat*-Gen immer in geringerer Menge vorhanden. Das *cab*- und das *rbcS*-Gen zeigten eine Abnahme im Verlauf der Seneszenz, genau wie das *pat*-Gen, was auch aufgrund der Universalität des genetischen Codes erwartet worden war. Die unplausible Zunahme der Gehalte des *35S-CaMV-pat*-Gens, des *pat,- rbcS,-* und *cab*-Gens zum 4. Erntezeitpunkt spiegeln auch einige der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten biochemischen Parameter, wie z.B. das Chlorophyll, wieder. Vermutet wird, dass es sich hier um einen scheinbaren Anstieg handelt, der auf Abwesenheit von Störsubstanzen beruht. Somit ist ein realer Wiederanstieg auszuschliessen. Die Zunahme ist also auf verbesserte Reaktionsbedingungen zurückzuführen. Weitere Möglichkeiten, z.B. Freilandeffekte, wie Witterung oder Erntebedingungen, wären ebenfalls eine mögliche Erklärung. Insgesamt hat dieser Anstieg im Hinblick auf den letzten Erntezeitpunkt, bei dem sich dieser ansteigende Trend nicht fortsetzt, keine Relevanz.

Der Abbau der Fremd-DNA unterschied sich in keiner erkennbaren Weise von dem nativer Pflanzen-DNA. Das *pat*-Gen war über die gesamte Vegetationsperiode vorhanden und könnte prinzipiell für einen horizontalen oder vertikalen Gentransfer zur Verfügung gestanden haben. Die transgene DNA der Gewächshaus-Maispflanzen konnte ebenfalls während der gesamten Vegetationsperiode detektiert werden (Ernst *et al.,* 1995).

4.1.6 Seneszenz auf RNA-Ebene

Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen wurde das *pat*-Gen sowie das Gen für die Glutaminsynthetase auch auf der Transkriptionsebene untersucht.

pat-Sonde

Mit dem Abbau der DNA sollte auch eine Abnahme der RNA einhergehen. Speziell über das Verhalten des *pat*-Transkripts im Freiland sind keine Daten in der Literatur vorhanden. Bei der Untersuchung des *pat*-Gens mittels der Slot-Blot-Technik wurde der höchste Transkriptionslevel zum zweiten und dritten Erntezeitpunkt erreicht. Daraus resultierte eine starke Abnahme des *pat*-Gens auf der Transkriptionsebene. Diese verstärkte Abnahme könnte auch durch Umwelteinflüsse auf den 35S-CaMV-Promotor

hervorgerufen worden sein. Es wurde gezeigt, dass transgene Pflanzen mit diesem Promotor bei induzierten pflanzlichen Abwehrmechanismen mit einer „Downregulation“ reagieren (Fischer, 1994).

Die Ergebnisse aus der quantitativen PCR zeigten für die transgenen Blätter die maximale Konzentration am ersten Erntezeitpunkt. Bis zum Ende der Vegetationsperiode wurde sowohl auf DNA- als auch auf RNA-Ebene ein starker Rückgang der Nukleinsäuren in bezug auf das *pat*-Gen detektiert. Der Abbau auf Transkriptionsebene war verzögert.

Glutaminsynthetase-Sonde

Bei der Hybridisierung mit der Glutaminsythetase-Sonde wurden zwei verschiedene Isoformen identifiziert. Zwischen den beiden Isoformen besteht eine Homologie von 58% (Buchanan-Wollaston und Ainsworth, 1997). Mit dem Fortschreiten der Seneszenz wird von der Pflanze unter anderem Stickstoff benötigt. Dieser Stickstoff wird zum Teil aus Nukleinsäuren und Proteinen durch Abbau in transportable Stoffe, wie z. B. Amide, Glutamin und Asparagin, welches die Hauptkomponenten der Aminosäuren sind, erhalten. Der Transport dieser Substanzen aus den seneszierenden Blättern erfolgt über das Phloem (Feller und Fischer, 1994; Kamachi *et al.,* 1992). Es ist anzunehmen, dass im Verlauf der Seneszenz das Ammonium durch die Deamination der Aminosäuren und dem Katabolismus der Nukleinsäuren in Glutamin mittels der Glutaminsynthetase umgebaut wird.

Parallel zur Steigerung des Transkriptionslevels der Glutaminsynthetase konnte auch eine Zunahme an frei vorliegendem Glutamin festgestellt werden. Bei den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse wurde eine starke Zunahme eines Glutaminsynthetase-Transkripts beobachtet. Besonders bei den transgenen Blattproben war die Zunahme sehr hoch.

Aus der Literatur sind einige seneszenzassoziierte Gene bekannt. So berichten Kleber-Janke und Krupinska, 1997, von zwei cDNA-Klonen mit hoher Homologie zu einem Protease-Inhibitor und zu einer 4-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase in Gerstenblättern. Hanfrey *et al.*, 1996, identifizierten aus *Brassica napus* zwei seneszenzrelevante cDNA-Klone, die eine hohe Verwandtschaft mit einem PR-1A-Protein und einer Chitinase IV zeigten. Weitere im Rahmen der Seneszenz eine Rolle spielende cDNA-Klone von

Brassica napus zeigten hohe Homologien zu verschiedenen Proteasen, zu einer Glutaminsynthetase, einer ATP-Sulphurylase, Katalasen, Metallothionein, Ferritin und einem Protein mit Fungizidwirkung (Buchanan-Wollaston und Ainsworth, 1997). In Anbetracht der hohen Anzahl von Enzymen, die in den Degradationsprozess und in Stressreaktionen involviert sind, die während der Seneszenz auftreten, ist es sehr schwierig, den auslösenden Faktor für die Regulation des Mechanismus auszumachen.

4.2 Horizontaler Gentransfer durch Persistenz der Gene in der Umwelt

Im folgenden wird mit den hier ermittelten Daten eine Risikoabschätzung des horizontalen Gentransfers (im Gegensatz zum vertikalen, der Vererbung an die Nachkommen) anhand des Modellversuchs in Roggenstein durchgeführt werden.

4.2.1 Mechanismen der horizontalen Genübertragung

Ein horizontaler Gentransfer von Pflanzen auf Mikroorganismen könnte prinzipiell möglich sein bzw. während der Evolution stattgefunden haben (Syvanen, 1994). Für den wahrscheinlichsten Mechanismus eines horizontalen Gentransfers von Pflanzen auf Bakterien wird die natürliche Transformation diskutiert. Unter Transformation wird die aktive Aufnahme von freier DNA aus der Umgebung und deren Etablierung als integraler Bestandteil des Bakteriengenoms verstanden. Bedingungen für diesen Prozess sind, dass es zur Freisetzung von DNA aus Zellen durch Autolyse, Lyse durch Befall mit Bakteriophagen, Exkretion von DNA oder zur Freisetzung von DNA durch Verrottungsprozesse kommt. Die nächste Voraussetzung ist, dass Bakterien sich im Zustand der Kompetenz befinden und es dann zu Wechselwirkungen kompetenter Zellen mit der extrazellulären DNA und zu deren Aufnahme kommt. Die DNA wird über homologe Rekombination, die eine hohe Sequenzübereinstimmung zum Genom erfordert, integriert. Divergenzen von nur 10-20% sind dabei schon zuviel (Schäfer, 1996). Durch die Nutzung von bakteriellen Sequenzen in den transgenen Pflanzen könnte daher eine erhöhte Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen Transformationsereignisses von Bakterien durch pflanzliche DNA gegeben sein.

Kompetente Bakterien mit homologen Sequenzen zur transgenen DNA sowie die

Lebensdauer solcher DNA sind wichtige Faktoren für das Stattfinden von Transformationsereignissen (siehe Punkt 4.2.3 und Punkt 4.2.4).

Gentransfer zwischen Mikroorganismen einer oder verschiedener Species wird in der Natur ausserdem durch Konjugation und Transduktion möglich.

Bei der bakteriellen Konjugation findet ein Transfer genetischer Information durch unmittelbaren Zellkontakt zwischen der Donor- und einer Rezipientenzelle statt. Konjugation kann nur stattfinden, wenn konjugative Plasmide oder Transposons im Donor vorhanden sind. Für den Zellkontakt wird ein „Sex-Pilus“ ausgebildet; dabei handelt es sich um einen Fortsatz auf der Donorzelloberfläche. Anschliessend läuft in der Donorzelle der Transfermechanismus ab. Grampositive Bakterien nehmen Kontakt ohne Pili auf. Hier gibt die aufnahmebereite Zelle Substanzen ab, die den potentiellen Spender stimuliert, bestimmte Proteine zu produzieren. Diese Proteine fungieren als „Verklumpungsfaktoren“ und führen die Partner zusammen. Bei Aneinanderlagerung der Zellen werden die für den DNA-Transfer notwendigen Verbindungsporen ausgebildet (Miller, 1998). Bei grampositiven und gramnegativen Bakterien kommt es zur Komplexbildung von Proteinen mit dem *oriT*-Bereich (Ursprung der transfer-Replikation). Darauf folgt die Einführung eines Einzelstrang-Bruches („Nick“) am *oriT*-Bereich durch ein Enzym, das am 5‘-Ende kovalent gebunden ist. Nach Entwindung des DNA-Strangs wird er in 5‘$\rightarrow$3‘-Richtung in die Rezipientenzelle übertragen. In der Rezipientenzelle findet dann die Rezirkularisierung und Replikation statt. Die Konjugation hat eine grosse Bedeutung für den horizontalen Gentransfer. Sie ist sehr unspezifisch und kann auch zwischen phylogenetisch weit entfernten Species stattfinden. Häufig besitzen natürlich vorkommende mobilisierbare oder konjugative Plasmide und konjugative Transposons einen weiten Wirtsbereich. Plasmide bauen sich nur selten ins Bakterienchromosom ein; sie führen eine unabhängige Existenz und werden nicht zum festen Bestandteil des Erbguts des neuen Wirts (Miller, 1998). Durch Konjugation können auch chromosomale Gene übertragen werden.

Ein weiterer Mechanismus des Gentransfers wird als Transduktion bezeichnet. Diese ist durch Bakteriophagen vermittelt; dabei werden infolge von fehlerhafter Verpackung chromosomale DNA oder Plasmide des Wirts anstelle der Phagen-DNA im Phagenkopf gespeichert. Mittels entsprechender Indikatorbakterien wurden bis zu 10^7 Phagen pro Gramm Boden erhalten. Durch die Anlagerung an Bodenpartikel können die Phagen

längere Zeit überdauern, ihre geringe Beweglichkeit im Boden setzt ihre Gelegenheiten zum Kontakt mit Wirtszellen herab. Aufgrund dessen dürfte die Transduktion für den interspezifischen Gentransfer von nur untergeordneter Bedeutung sein.

4.2.2 Mechanismen der nicht-horizontalen Genübertragung

Aus der Literatur sind nicht-horizontale Genübertragungen durch Pollenflug bekannt (Dale, 1992 und Jørgensen, 1996; Morris und Kareiva, 1994). Um transgene Pflanzen effektiv von verwandten, nicht-transgenen Pflanzen zu trennen und so einen Gentransfer durch Pollenflug zu vermeiden, werden verschiedene Strategien angewandt: 1. Es wird eine Isolationszone ohne Vegetation um das Feld herum gezogen, um das Hinaustragen der transgenen Pollen durch Insekten oder Wind von den transgenen Feldern zu unterbinden. 2. Die „Fangpflanzen“, d.h. nicht-transgene Varianten der betreffenden transgenen Pflanze, werden benachbart zu den transgenen gepflanzt und können so Insekten, die transgene Pollen übertragen, sowie mit dem Wind transportierte Pollen transgenen Ursprungs abfangen. Bei dem in Roggenstein durchgeführten Versuch fungierten *Brassica rapa*-Pflanzen, die das transgene Versuchsfeld umgaben, als Fangpflanzen. Bei der Untersuchung des Pollenflugs und der Fremdbestäubung durch den Wind oder Bienen ergaben sich in Roggenstein für den Raps messbare Übertragungsraten, die allerdings insgesamt geringer waren als bei anderen Freisetzungsversuchen (Ernst *et.al,* 1998). Im Rahmen des Roggenstein-Versuchs erfolgte im Honig und in Pollen bzw. Propolis kein Nachweis des *pat*-Gens, was aber auch mit der angewendeten Methode zusammenhängen könnte. Da es sich bei Pollen um ein sehr stabiles Material handelt, konnten die Pollen aller Wahrscheinlichkeit nicht genügend aufgeschlossen werden. Waiblinger *et al.,* 1999, veröffentlichten den Nachweis des *pat*-Gens in transgenen Pollen, wenn diese vorher mit Glasperlen aufgeschlossen wurden.

4.2.3 Persistenz der DNA im Boden

Im Bodenbereich spielt die Dauer der DNA-Präsenz eine wichtige Rolle. Durch Adhäsion an Bodenpartikel kann die DNA geschützt gegen den Abbau durch Nukleasen lange in der Umwelt intakt überdauern. Divalente Kationen begünstigen die Adsorption an Bodenpartikel. Die DNA ist besonders durch Komplexbildung in Böden mit einem hohen

Anteil an $MgCl_2$ geschützt (Paget und Simonet, 1994). Liegt die DNA komplexiert vor, ist vor ihrer Aufnahme durch Mikroorganismen ein zusätzlicher Desorptionsschritt notwendig. In trockenen Böden hat die vorhandene DNA ebenfalls eine erhöhte Stabilität, was wahrscheinlich an der Inaktivierung von DNasen unter diesen Bedingungen liegt (Lorenz *et al.,* 1992; Lorenz und Wackernagel, 1992). Ein niedriger pH-Wert hat einen günstigen Einfluss auf die Absorption. Lehm- und Sandböden inhibieren ebenfalls die DNAase-Aktivität.

Chromosomale DNA hat eine grössere Effizienz bei der Genübertragung als Plasmid-DNA (Chamier *et al.,* 1993). Verglichen mit den Transformationsfrequenzen von Plasmid-DNA waren die mit Pflanzen-DNA oder Pflanzenhomogenaten beobachteten Transformationsraten deutlich niedriger (Gebhard und Smalla, 1998). Bei den im Rahmen dieser Arbeit betrachteten transgenen Rapspflanzen war das Fremdgen chromosomal eingebaut. Der Boden der Parzelle des Versuchsguts Roggenstein, auf dem der Anbau der transgenen Pflanzen erfolgte, wird laut Bodenschätzungskarte (Gesellschaft für Dienstleistungen in Landwirtschaft und Umwelt GmbH, Oberhummel) als humusreicher, schwarzer, sandiger Lehm mit einem pH-Wert von 7 charakterisiert. Für einen Gentransfer wäre die Bodenbeschaffenheit als günstig anzusehen, bezüglich des pH-Wertes wäre ein saurerer Boden geeigneter.

Bei dem ersten deutschen Freilandversuch mit transgenen Petunien in Köln konnte noch acht Wochen nach dem Unterpflügen der Pflanzen das *nptII*-Gen in 4 von 400 Bodenproben nachgewiesen werden (Becker *et al.,* 1994). In der letzten Zeit wurden viele Freisetzungsversuche mit genetisch veränderten Pflanzen durchgeführt. Die meisten der unter Freilandbedingungen getesteten gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten Selektionsmarkergene, wie z. B. bakerielle Antibiotikaresistenzgene. Der hypothetische Erwerb der in den Pflanzen enthaltenen Antibiotikaresistenzgene durch bakterielle Gemeinschaften ist oft als unerwünschter Effekt bei Langzeitapplikationen von gentechnisch veränderten Pflanzen diskutiert worden, besonders im Hinblick auf das Wissen um Antibiotika-resistente Bakterien in der Medizin (siehe Punkt 4.2.8). Der experimentelle Beweis, dass horizontaler Gentransfer aus dem genetischen Material von Pflanzen auf Bakterien stattfindet, liegt bisher nicht vor. Kürzlich wurde die Transformation von *Acinetobacter sp.* BD413 mit DNA von verschiedenen transgenen Pflanzen, die das *nptII*-Gen enthielten, durch Detektion der bakteriellen Transformation,

basierend auf der rekombinanten Reparatur des unvollständigen *nptII*-Gens in den *Acinetobacter sp.*-Stämmen, demonstriert (Gebhard und Smalla, 1998; De Vries und Wackernagel, 1998). Die Wiederherstellung des *nptII*-Gens, bei dem 317 bp fehlten, konnte durch die kanamycinresistenten Transformanten nachgewiesen werden. Dieser Vorgang wurde mit Pflanzen-DNA bzw. Pflanzenhomogenaten mit einer Frequenz von $5 \cdot 10^{-9}$ und 10^{-16} erreicht (Gebhard und Smalla, 1998). Bisher ist nicht bekannt, in wieweit diese Ergebnisse auf einen möglichen horizontalen Gentransfer von Pflanzen auf Bakterien unter Freilandbedingungen übertragbar sind. Hohe Konzentrationen des Antibiotikums Kanamycin hemmten das Wachstum von *Acinetobacter sp*. bis unterhalb der Nachweisgrenze. Im Gegensatz zu der chromosomal vermittelten *nptII*-Resistenz erwies sich die plasmidkodierte (pFG4) als nicht stabil bei einer 31tägigen Inkubationsperiode in vitro (Nielsen *et al.,* 2000b).

Widmer *et al.,* 1996, untersuchten die Persistenz des *nptII*-Gens unter Laborbedingungen in schlammigem Lehmboden (71,7% Schlick; 22,4% Lehm und 5,9% Sand) bei verschiedenen Temperaturen (4; 20 oder 36°C) und Feuchtigkeitsgehalten (10, 40 oder 80%). Dabei korrelierten steigende Temperaturen positiv mit der Bodenmikroorganismen-Aktivität und der der freien DNasen im Boden. Die maximale Mikroorganismenaktivität wurde bei 40% Feuchtigkeit erreicht. Wurde das *nptII*-Gen als linearisiertes Plasmid in das Bodensystem gegeben, waren 40 Tage später noch 0,08% der anfänglichen Sequenz detektierbar. Wurde frisch gemörsertes transgenes Blattmaterial, das das *nptII*-Gen enthielt, in den Boden eingearbeitet, waren nach 120 Tagen noch 0,14% der anfänglichen *nptII*-Sequenz detektierbar. Unter Freilandbedingungen konnte während der ersten 14 Tage das *nptII*-Gen aus transgenen Tabakblättern, die 10 cm in den Boden eingearbeitet waren, bis zu 0,36% detektiert werden. Nach 77 Tagen war das Gen bis zu 0,06% der anfänglichen Aktivität nachweisbar. DNA wird aus verrottetem Pflanzenmaterial freigesetzt. Auf einem anderen Feld konnte das *nptII*-Gen in Kartoffelpflanzenresten, die auf der Bodenoberfläche lagen, bis zu 37 Tage lang detektiert werden (Widmer *et.al,* 1997). Wird diese DNA umgehend durch extrazelluläre DNasen degradiert, ist es unwahrscheinlich, dass diese DNA von kompetenten Bakterien aufgenommen wird. Um zu klären, welche biologische Signifikanz tote Bakterienzellen im Boden auf den intra- und interspecies-Gentransfer durch natürliche Transformation haben, wurden von

Nielsen *et.al,* 2000a, Kanamycin-resistente Rezipienten des Stammes *Acinetobacter sp.* BD413(pFG4) Lysaten von Kanamycin-resistenten Donor-Bakterien (*Acinetobacter sp, Pseudomonas fluorescens* und *Burkholderia cepacia*) ausgesetzt. Bei Hitzebehandlung (80°C für 15 Minuten) der Zell-Lysate zur Transformation des *Acinetobacter sp.* BD413 wurden nach vier Tagen Inkubation in sterilen Böden und bis zu acht Stunden in nicht sterilen Böden Transformanten vorgefunden. Die beobachteten Transformationseffizienzien waren *in vitro* und *in situ* mit verschiedenen Lysaten gleich und lagen zum Teil über der Effizienz, die mit konventionell gereinigter DNA erreicht wurde. Das Vorhandensein von Zellresten behinderte die Transformation im Boden nicht, wahrscheinlich bewahren die Zellreste die DNA vor schneller biologischer Inaktivierung. Die relativ kurze biologische Aktivität der chromosomalen DNA im Boden steht hier im Gegensatz zu ihrer physikalischen und funktionellen Verfügbarkeit.

Gentransfer durch Konjugation wird als ein wichtiger Mechanismus betrachtet, um neue genetisch bedingte Eigenschaften in verschiedenen Umgebungen zu etablieren. In der Natur leben die meisten Bakterien in Biofilmen auf Oberflächen oder in Zwischenräumen. Die relative räumlich bedingte Stabilität von Bakterien in Biofilmen begünstigt die Konjugation. Faktoren, die die Frequenz des Gentransfers beeinflussen, sind die Zelldichte, Wachstumsphase, Temperatur, pH, Kationen, Salzgehalt, gelöster Sauerstoff und die Nährstoffverfügbarkeit. Bei den von Hauser und Wuertz, 1999, durchgeführten Arbeiten wurde *E.coli* GM16 als Donor-Stamm, *E.coli* CM404 als Helferstamm und *A.eutrophus* AE104 als Rezipientenstamm in einem künstlich geschaffenen Biofilm getestet. Es zeigte sich, dass die Zeit eine signifikante Rolle spielte und die Nährstoffkonzentration ebenfalls zeitabhängig ist. Die Bildung von Zellaggregaten bei niedrigen Nährstoffkonzentrationen ergaben die höchsten Transferraten.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben die Persistenz von freier DNA, gebunden an Bodenkomponenten und Lehmpartikel, beschrieben (Aardema *et al.,* 1983; Lorenz und Wackernagel, 1987; Romanowski *et al.,* 1991; Khanna und Stotzky, 1992; Paget *et al.,* 1992; Romanowski *et al.,* 1992; Chamier *et al.,* 1993; Nielsen *et al.,* 1997a-c; Lorenz und Wackernagel, 1994; Paget und Simonet, 1994; Widmer *et al.,* 1996). DNA, adsorbiert an mineralischen Oberflächen, scheint geschützt vor dem Angriff von Nukleasen zu sein und daher eine Transformationskapazität zu behalten (Khanna und

Stotzky, 1992; Romanowski *et al.,* 1992; Chamier *et al.,* 1993; Nielsen *et al.,* 1997a-c; Gallori *et al.,* 1994). Häufig waren die untersuchten Bodensysteme künstlich (Lorenz und Wackernagel, 1987; Romanowski *et al.,* 1991; Khanna und Stotzky, 1992; Paget *et al.,* 1992; Romanowski *et al.,* 1992; Chamier *et al.,* 1993; Paget und Simonet, 1997). Die Langzeitpersistenz eines gewissen Prozentsatzes der freigesetzten pflanzlichen DNA ist die Voraussetzung für eine erhöhte Wahrscheinlichkeit des Transformationsprozesses. Seit 1993 werden von der „Planta Angewandte Pflanzengenetik und Biotechnologie GmbH“, Einbeck, Freisetzungen mit transgenen Zuckerrüben mit *Rhizomania*-Resistenz durchgeführt. Mit Hilfe gentechnischer Methoden war in das Genom der Zuckerrüben das Hüllproteingen des BNYVV („beet necrotic yellow vein virus“), unter der Kontrolle des 35S-CaMV-Promotors, geschleust worden. Um die durch Agrobakterien vermittelten Gentransfer entstandenen Transformanten selektieren zu können, waren zusätzlich zu der gewünschten Veränderung das Km-Resistenzgen *nptII,* das für eine Neomycinphospho-Transferase kodiert und auf dem Transposon Tn5 vorkommt, und das Markergen, das aus *Streptomyces hygroscopicus* stammende BASTA-Resistenzgen *bar*, inseriert. Beide Gene stehen unter Kontrolle des bidirektionalen Promotors TR1/TR2 aus *Agrobacterium tumefaciens.* Bei Feldversuchen mit transgenen Zuckerrüben konnte das *nptII*-Gen über einen Zeitraum von 6 Monaten bis zu 2 Jahren vorgefunden werden (Smalla und Gebhardt, 1995 und 1999). Im Rahmen zur Langlebigkeit der *pat*-DNA im Boden wurde eine 7monatige Persistenz der DNA festgestellt; zur Kontrolle wurde die DNA des Gens der Phosphoenolpyruvatcarboxylase über 4 Monate im Boden detektiert (Feldmann *et al.,* 1996). Mittels PCR konnte bis zu 23 Monaten nach dem Absterben von transgenen Maispflanzen die *pat*-DNA im Kompost nachgewiesen werden. Inwieweit es sich hier um DNA aus teilverrottetem Pflanzenmaterial, freie an Bodenpartikel gebundene DNA oder transformierte Mikroorganismen handelte, kann nicht gesagt werden (Ernst *et al.,* 1998; Ernst und Sandermann, 2000). Ohne eine Isolierung der Bakterien, die konstruktspezifische Sequenzen aufgenommen haben, können solche Signale lediglich als Hinweis, jedoch nicht als Beweis für einen horizontalen Gentransfer unter Umweltbedingungen gewertet werden. Ebenfalls konnte im Rahmen der hier behandelten Arbeit das Fremdgen und die zwei endogenen Kontrollgene in *Brassica napus* über 4 Wochen nach dem Unterpflügen des gehäckselten Materials detektiert werden. Das genetische Material

war hier wesentlich kürzer nachweisbar als z. B. beim Mais, was an der Grösse der Pflanzenreste und an der Tiefe des Unterpflügens gelegen haben könnte. Die Verrottung von biologischen Materialien wird hinsichtlich der Zusammensetzung als auch durch das C/N-Verhältnis bestimmt. Danach sollten Raps und Mais ungefähr die gleiche Zeit für die Verrottung benötigen (Haug*,* 1990; Oehmichen*,* 1983*).*

4.2.4 Kompetenz von Mikroorganismen

Nicht nur die Persistenz bzw. Verfügbarkeit der DNA spielt beim horizontalen Gentransfer eine Rolle, sondern auch die Mikroorganismenpopulation.
Unter Kompetenz wird die Fähigkeit von Mikroorganismen verstanden, vorliegende DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Kompetenz für die Transformation wurde für eine Vielzahl von Bakterien aus marinem und terrestrischem Umfeld unter Laborkonditionen demonstriert (Lorenz und Wackernagel, 1994; Romanowski *et al.,* 1993). Bisher ist wenig bekannt über kompetente Bakterien in Umweltproben und die Umweltstimulanzien, die Auslöser der bakteriellen Kompetenz unter natürlichen Konditionen sind. Die natürliche Transformation von *Acinetobacter sp.* (früher *Acinetobacter calcoaceticus*) und *Pseudomonas stutzeri* durch bakterielle DNA in nicht sterilen Böden wurde bisher demonstriert (Nielsen *et al.*, 1997a-c; Sikorski *et al.*, 1998). Einschränkend ist anzumerken, dass bei beiden Studien die kompetenten Bakterien in den Boden eingeführt wurden. Andere Studien zeigten, dass verschiedene Umweltfaktoren, die das bakterielle Wachstum fördern, die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass boden- oder pflanzenassoziierte Bakterien kompetent werden (Nielsen *et al.*, 1997a-c; Bertolla *et al.,* 1997). Bis jetzt ist noch wenig darüber bekannt, wie oft sich Boden- oder pflanzenassoziierte Bakterien in der Kompetenzphase befinden. Bertolla *et al.,* 1997, und Nielsen *et al.,* 1997a-c, 1998, beschreiben, dass wachstumsstimulierende Faktoren unmittelbare Auswirkungen auf die Ausbildung von Kompetenz haben. Optimale Transformationsbedingungen sind wahrscheinlich am ehesten in der Rhizosphäre vorhanden. Einschränkend ist zu beachten, dass weniger als 10% der einheimischen Bodenmikroflora kultivierbar ist, was bedeutet, dass noch eine hohe Anzahl von Bakterien im Boden vorhanden sind, die als potentiell kompetent zu betrachten sind. Von Wackernagel und Lorenz wurde 1994 die natürliche Kompetenz ermittelt und die Häufigkeit dieser Ereignisse mit 10^{-2} bis 10^{-7} angegeben. Sie ist bei

vielen Mikroorganismen in der stationären Phase besonders hoch, z. B. bei Pseudomonaden, Acinetobacter und Azotobacter. Wachstumsregulierende Konzentrationen von einigen Nährstoffen, wie Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphatverbindungen, können ebenfalls die Transformation stimulieren. Für das Bakterium *Pseudomonas stutzeri* konnte gezeigt werden, dass es in Medien auf Bodenbasis nur schlecht wächst und nicht transformierbar ist. In einem mit reichhaltigem Angebot an den oben genannten Nährstoffen versetzten Medium konnte eine natürliche Kompetenz erreicht werden. Gebhard und Smalla, 1998, konnten zum ersten Mal die Transformation natürlich kompetenter *Acinetobacter sp.* mit transgener Pflanzen-DNA und mit Zellhomogenaten zeigen. Weder der Gehalt an nicht spezifischer DNA noch die höhere Methylierungsrate von Pflanzen-DNA - im Vergleich zu bakterieller DNA (Finnegan *et al.,* 1993) - verhinderten eine Transformation von *Acinetobacter sp.* BD413(pFD4) durch transgene Pflanzen-DNA. Im Vergleich mit gereinigter Pflanzen-DNA waren die Transformationsfrequenzen mit Pflanzenhomogenaten deutlich geringer. Für diese Reduktion könnte die geringere Konzentration an verfügbarer DNA, deren Assoziation mit Chromatinproteinen oder Zellmembranen, verantwortlich sein. Auch De Vries und Wackernagel (1998) zeigten, dass eine 10 bp-Deletion des *nptII*-Gens in *Acinetobacter sp.*BD413 nach Transformation mit DNA verschiedener transgener Pflanzen mit dem *nptII*-Markergen wiederhergestellt wurde. Durch organische Lösungen, Säuren, Basen und andere Detergenzien wird die Häufigkeit eines erhöhten Gentransfers erheblich gesteigert, was wahrscheinlich durch eine stressbedingte und verminderte Restriktionsbereitschaft des bakteriellen Rezipienten bedingt ist (Schäfer *et al.,* 1994a, 1994b). Diese Ergebnisse beruhen auf einem Gentransfer mittels Konjugation und Transduktion, wären aber ebenfalls bei der natürlichen Transformation denkbar. Diese durch Stress hervorgerufene Kompetenz bei Bodenbakterien könnte auch durch die Applikation von Herbiziden, wie z. B. BASTA®, möglich sein. Eine halbmaximale Hemmung des pflanzlichen Wachstums durch D,L-PPT wurde bei 21 g/ha festgestellt (Logusch *et al.,* 1991). Die natürlichen Peptidderivate von L-PPT waren aufgrund der höheren Aufnahmeraten wesentlich aktiver (Bayer *et al.,* 1972). Über die Beeinflussung auf die Bodenvitalität liegen nur wenige Daten vor, die keine Hemmung zeigen (Hoerlein, 1994 und Domsch, 1992). Aufgrund der Datenlücken wird für sensitive Organismen der Hemmwert des Herbizids Glyphosat von 10 µM übernommen (Logusch

et al., 1991 und Hoerlein, 1994).

4.2.5 Selektionsdruck durch BASTA®

Ebenso sind die Halbwertszeiten von L-PPT im Boden im Vergleich zu Glyphosat weniger gut untersucht worden. Es werden Halbwertszeiten von 3-10 Tagen (Hoerlein, 1994) und 7-21 Tage (Domsch, 1992) genannt. Vom Hersteller sind für BASTA® Aufwandsmengen von 0,6 bis 1 kg/ha für empfindliche und 1,5 bis 2,0 kg/ha für weniger empfindliche Unkrautarten vorgegeben (Hoechst, 1982). Dabei entspricht eine Applikation von 0,91 kg/ha L-PPT ungefähr 9,1 µg L-PPT/ cm^2 Boden. Ein typischer oberer Bodenbereich mit bis zu 10 cm Tiefe enthält eine Wassersäule von ca. 1 cm (Rueppel *et al.,* 1977). Mit dem Wert für das Molekulargewicht von 181,1 Da ergibt sich eine 50 µmolare anfängliche Herbizidkonzentration im Boden. Frühere Berechnungen in der Literatur haben mit anderen Annahmen ca. 10fach höhere anfängliche Konzentrationen im Bodenwasser für praxisübliche Aufwandsmengen von Glyphosat (Rueppel *et al,* 1977) und L-PPT (Ahmad *et al.,* 1995) ergeben. Mit mittleren Bodenhalbwertszeiten von 10 Tagen bei L-PPT und 60 Tagen bei Glyphosat ergibt sich, dass ein Abklingen um 90% (auf 5 µmolar) 33 Tage für L-PPT und 200 Tage für Glyphosat erfordern. Für diesen Zeitraum wäre nach dieser Berechnung ein Selektionsdruck in der Bodenlösung vorhanden. Nach diesen Daten übt L-PPT über 4-5 Wochen im Boden einen Selektionsdruck aus. Diese Werte sind zum jetzigen Zeitpunkt nur anhand publizierter Daten berechnet worden und sind noch nicht durch exakte Messergebisse belegt. Für die Dauer der BASTA®-Behandlung (zu Beginn der Vegetation) wäre ein möglicher Gentransfer besonders im Rhizosphärenbereich der Wurzeln denkbar. Bisherige Untersuchungen im Rahmen des Roggenstein-Freilandversuchs ergaben keinen Hinweis auf einen horizontalen Gentransfer des *pat*-Gens in Mikroorganismen (Kirchhof *et al.,* 1996). Bei dem Roggenstein-Versuch wurde eine Menge von 3 l/ha BASTA® appliziert, hierbei handelt es sich die vom Hersteller empfohlene Menge für *Brassica napus* (Hoechst, 1982). Bei dieser relativ geringen Menge kann nicht davon ausgegangen werden, dass ein Selektionsdruck ausgeübt wurde. Für Zuckerrüben wäre nach der Modellierung der Firmendaten ein wesentlich höherer Selektionsdruck zu erwarten gewesen. Auch kann bei Verwendung anderer Herbizide ein Selektionsdruck errechnet werden, so dass jeder Anbau gentechnisch

veränderter Pflanzen im Freiland eine eigene Risikoabschätzung einschliesslich einem ergänzenden Monitoring erhalten sollte (Ernst *et al.,* 1998).

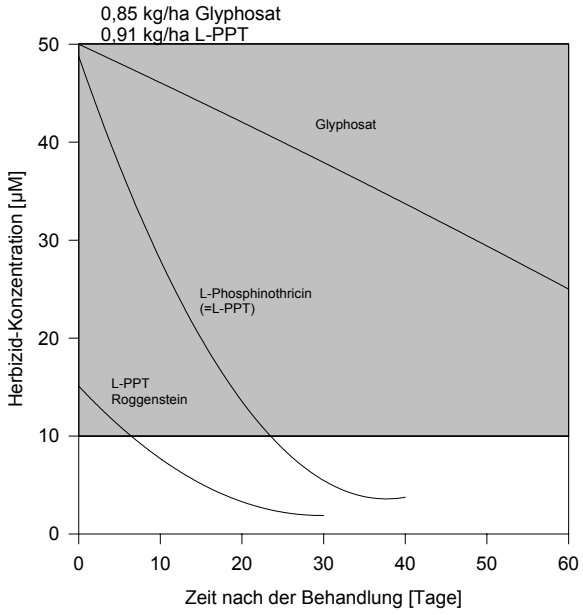


Abb. 72: Abklingkurven der Herbizde L-Phosphinothricin und Glyphosat im Boden.
Die Herbizidmengen sind in µmolarer Konzentration in der Bodenlösung aufgetragen (Ordinate). Die Mengen (kg/ha) an ausgebrachtem Glyphosat oder L-PPT, die dem Punkt 50 µmolar entsprechen, sind angegeben. Die berechnete Abklingkurve für die BASTA®-Parzelle des Roggenstein-Versuchs ist ebenfalls eingezeichnet. Die Masseinheit der Abzisse ist der Zeitraum (Tage) nach Ausbringung des Herbizids. Im Bereich oberhalb der waagerechten Linie bei 10 µmolar sind beide Herbizide für empfindliche Pflanzen und Mikroorganismen toxisch, d.h. es ist ein Selektionsdruck anzunehmen.

Ungeklärt ist momentan noch, ob eine Bindung von L-PPT (Hoerlein, 1994) an Bodenpartikel die Bioverfügbarkeit und damit die Selektionswirkung unterbindet. Die möglichen Partikelbindungen von BASTA®, DNA und Mikroorganismen führen zu einem Milieu, in dem ein horizontaler Gentransfer an Oberflächen begünstigt sein könnte.

4.2.6 Selektionsdruck durch BASTA® auf Bodenmikroorganismen unter Laborbedingungen

Um eine Aussage über den Einfluss von BASTA® auf Bodenmikroorganismen treffen zu können, wurde eine Auswahl an Bodenbakterien in Laborversuchen mit verschiedenen BASTA®-Konzentrationen versetzt.

Bei einer Vorlaufbehandlung von Feldflächen mit BASTA® wird eine Aufwandsmenge von ungefähr 1 kg/ha verwendet (Gallina *et al.,* 1992 und Smith *et al.,* 1989). Mit dieser Applikationsmenge ergibt sich eine ungefähre Konzentration von 1 mM Phosphinothricin in den oberen Bodenschichten (Bartsch und Tebbe, 1989). Auf der Grundlage dieser Berechnung wurde von Tebbe und Reber, 1991, sowie Ramos *et al.,* 1991, für das Screening nach phosphinothricinresistenten Bodenbakterien eine Konzentration von 1 mM Phosphinothricin eingesetzt.

Die hier im Ergebnisteil angegebenen Konzentrationsangaben beziehen sich auf den Wirkstoff D/L-PPT. Hier ist weiterhin zu beachten, dass nur das L-Phosphinothricin eine Wirkung auf die Organismen erzielt. Bei einer D/L-PPT-Konzentration von 0,0552 µM wurde keine Hemmung der verschiedenen, hier getesteten Agrobakterien-Stämme ermittelt. Für die Stämme 9 und 12 war ein Gehalt von 5,52 µM toxisch, für Stamm 4 und 8 erwiesen sich 6,9 µM als tödlich. Für den Stamm 13 ergab sich eine Applikation 13,8 µM als inhibierend. Stamm 5 erwies sich als das *Agrobacterium* mit der höchsten D/L-PPT-Toleranz von bis zu 27,6 µM. Die Wachstumsbedingungen für die Agrobakterien waren bei diesem Versuch optimal (Vollmedien), und damit weit entfernt von den Lebensbedingungen in der Natur. Da unter diesen optimalen Bedingungen schon toxische Effekte bei D/L-PPT-Aufwandsmengen von 0,55 µM schädigende Wirkungen zeigten, lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass im Freiland die Lebensbedingungen von Agrobakterien durch das Herbizid negativ beeinflusst sind. Bei der Durchführung der gleichen Versuche mit Minimalmedien waren nur erschwertere Wachstumsbedingungen für die Bakterien erreicht worden. Daher ist davon auszugehen, dass die hier getesteten Agrobakterien-Stämme nicht in der Lage sind, Phosphinothricin als Nährstoffquelle zu nutzen, wie es einige andere Mikroorganismen können. Viele mikrobielle Organismen besitzen die Eigenschaft, Herbizide oder andere

Moleküle als Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Phosphatquelle zu nutzen. Zum Beispiel ist *Chlamydomonas reinhardtii* fähig, Phosphinothricin als Stickstofflieferant zu nutzen (Franco *et al.,* 1996). Tebbe*,* 1988, konnte feststellen, dass auch die Bodenbakterien *Rhodococcus DX-55* und *Pseudomonas paucimobilis* Phosphinothricin als N-Quelle nutzen können. Das Herbizid diente keinem der in dieser Literatur getesteten Mikroorganismen als C- oder P-Quelle.

Für eine *Trichoderma* Art erwies sich eine Konzentration von 1 mM Phosphinothricin als tödliche Dosis (Ahmad *et al.,* 1995). Eine vollständige Wachstumshemmung lag auch für *Pseudomonas putida* 2440 ab einer Konzentration von 1 mM Phosphinothricin vor (Ramos *et al.,* 1991). BASTA®-sensitive *Rhizobium meliloti*-Stämme reagierten mit spontaner Resistenz auf Selektionsdruck und konnten sich dadurch auch in Gegenwart des Herbizids einen Lebensraum schaffen (Kriete und Broer, 1996).
Die Aussagen, die hier über die Agrobakterien-Stämme gemacht worden sind, treffen auch auf die im Rahmen dieser Arbeit getesteten *Pseudomonaden*-Stämme und *Bacillus subtilis* zu. Im folgenden wurden die Versuche deshalb immer mit Vollmedien durchgeführt, um optimale Wachstumsbedingungen zu schaffen. Für *Bacillus subtilis* wurde bei einem Zusatz von bis zu 0,86 µM D/L-PPT ein verbessertes Wachstum festgestellt, ab einer Konzentration von 1,725 µM D/L-PPT waren toxische Effekte zu beobachten. Bei *Pseudomonas fluoreszenz* hatte die Zugabe von 0,22 µM D/L-PPT keinen Einfluss auf das Wachstum, bei einer Konzentration von 27,6 µM D/L-PPT ergab sich eine Verminderung um 97%. Als besonders sensitiv erwies sich der Agrobakterien-Stamm 6: Hier bewirkte schon ein Zusatz von 0,86 µmol eine 40%ige Wachstumshemmung. Aufgrund dieser Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass für die hier getesteten Bodenmikroorganismen bei einer Applikation von D/L-PPT ein toxischer Effekt erzielt wird. Keines der Bakterien war in der Lage, die theoretisch angenommene Konzentration von 1 mM in den oberen Bodenschichten zu kompensieren. Inwieweit die hier ermittelten Daten, die mit Agarmedien bzw. in Flüssigkulturen durchgeführt wurden, sich auf die Praxis übertragen lassen, ist nicht bekannt. Für den Abbau von D/L-PPT im Boden liegen Daten vor. Inwieweit die Zersetzungprodukte die Toxizität steigern oder senken, kann hier nicht gesagt werden. Wie sich eine D/L-PPT Applikation auf eine Vielzahl von Mikroorganismen, wie sie ja im

Ökosystem Boden vorkommt, auswirkt, ob hier z. B. ein schnellerer Metabolismus durch die Mikroorganismengemeinschaft stattfindet, die D/L-PPT evtl. teilweise als Nährstoffquelle nutzen könnten und damit die Toxizität auf andere sensitive Arten vermindert wird, ist bisher nicht bekannt. Es wäre auch möglich, dass D/L-PPT-Moleküle, an Bodenpatikel gebunden, dem Ökosystem in einer viel geringeren als der angenommenen Konzentration zur Verfügung stehen, dafür aber über einen längeren Zeitraum an die Umgebung abgegeben werden.

4.2.7 Gentransfer unter Laborbedingungen

Um zu testen, ob die hier als Modellorganismen verwandten Mikroorganismen Resistenz gegen das Herbizid auf genetischer Basis erlangen könnten, wurde unter Laborbedingungen versucht, mittels Elektroporation das *pat*-Gen (mit und ohne Promotor-und Terminatoregion) in die Mikroorganismen zu inserieren. Inwieweit diese Ergebnisse Aussagen in bezug auf im Freiland vorliegende Ereignisse zulassen, ist im Rahmen dieser Arbeit nur anhand der hier durchgeführten Untersuchungen möglich. Versuche, das Gen einschliesslich Promotor und Terminatorsequenz bzw. nur die kodierende Sequenz mittels Elektroporation in die Zellen zu transformieren, sind fehlgeschlagen. Die Elektroporation unter Verwendung des pUC18-Plasmids einschliesslich der *pat*-Sequenz und des 35S-CaMV-Bereichs war dagegen erfolgreich. Das könnte daran liegen, dass die Plasmid-DNA stabiler vorliegt und infolgedessen nicht so schnell durch Restriktionsenzyme zersetzt wird. Bei der Risikoabschätzung des horizontalen Gentransfers ist zu berücksichtigen, dass das *pat*-Gen in den Pflanzen chromosomal vorliegt. Die Integration der *pat*-DNA fand unter optimalen Transformationbedingungen mittels Elektroporation nicht statt. Daher ist davon auszugehen, dass unter natürlichen Bedingungen ein horizontaler Gentransfer auf die untersuchten Bodenmikroorganismen als extrem unwahrscheinlich einzustufen ist.

Eine Strategie, die in der Pflanzenzüchtung verfolgt wird, beinhaltet die Inhibition von phytopathogenen Bakterien durch genetische Modifikationen, die der Pflanze die Fähigkeit verleihen, antibakterielle Proteine zu exprimieren. Diese Strategie wird z. B. bei Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L.) angewandt, die Bakteriophagen-T4-Lysozym exprimieren und in die interzellulären Bereiche abgeben. Diese transgenen

Kartoffelpflanzen sind weniger anfällig für die Infektion durch *Erwinia carotorova.* Da das T4-Lysozym auf einzelne Bakterienspecies unterschiedlich aktiv ist, könnte durch die Anwendung von Pflanzen mit dem T4-Lysozym-Gen Verschiebungen der bakteriellen Population und damit ein Selektionsdruck einhergehen. Bei der näheren Untersuchung dieser Fragestellung ermittelten Heuer und Smalla, 1999, dass die katabolische Aktivität der gesamten bakteriellen Gemeinschaft keine Unterschiede aufwies. Differenzen zwischen Kontrollpflanzen und den T4-Lysozym-Pflanzen ergaben sich bei den kultivierbaren Bakterienspecies, besonders deutlich natürlich bei *Erwinia sp.*, geringere Unterschiede wurden für die gram-negativen Bakterien und beim *Agrobacterium* in der Phyllosphäre ermittelt. Insgesamt sind diese beobachteten Effekte als gering einzustufen, besonders im Hinblick auf die natürliche Variabilität, die im allgemeinen bei Freilandproben vorgefunden wird. Die transgenen Kartoffeln könnten nachteilige Effekte auf die Bodenbakterien durch die Freisetzung von T4-Lysozym in der Rhizosphäre haben. Ahrenholtz *et al.,* 2000, untersuchten diese Auswirkungen und entwickelten dazu eine Methode, mit deren Hilfe Zellen von *Bacillus subtilis* auf den Haarwurzeln der Pflanzen assoziiert wurden. Die Kartoffelwurzeln, die das T4-Lysozym-Gen exprimieren, zeigten eine signifikant höhere (1,5- bis 3,5fach) Todesrate für *Bacillus subtilis* als die Kontrollpflanzen. Das T4-Lysozym wird von den Wurzelepidermiszellen abgegeben und kann so auf die umgebenden Bodenmikroorganismen einen Selektionsdruck ausüben.
Versuche mit transgenen Kartoffeln und dem Pathogen *Erwinia chrysanthemi* zeigten, dass ein horizontaler Gentransfer unter natürlichen Bedingungen nicht nachweisbar war. Theoretische Modellberechnungen ergaben eine Transferrate von $2{,}0 \times 10^{-17}$ in Abwesenheit eines Selektionsdrucks (Schlüter *et al.,* 1995). Ein horizontaler Gentransfer unter nicht selektiven Bedingungen könnte somit höchstens als singuläres Ereignis eintreten. Bisher lässt sich nicht angeben, wo innerhalb dieses weiten Bereichs die Transferraten von Herbizid-Resistenzgenen zu erwarten sind. Aus den bisherigen Untersuchungen auf dem Versuchsgut Roggenstein sind keine Fälle von horizontalem Gentransfer von BASTA®-resistenten Pflanzen auf Bodenmikroorganismen ermittelt worden (Kirchhof *et al.,* 1996).

Bei der Ernte der reifen Rapspflanzen fielen eine nicht unerhebliche Menge der Rapssamen aus den Hülsen und gelangten auf den Boden. Da es sich um eine

winterfeste Rapssorte handelt, behalten die Samen über Jahre ihre Keimfähigkeit, sodass das Resistenzgen für eine längere Zeit im Genpool des Bodens verbleibt (Ernst und Sandermann *et al.,* 2000).

4.2.8 Horizontaler Gentransfer von als Selektionsmarker verwendeten Antibiotikaresistenzgenen

Die Resistenzen gegen allg. gebräuchliche Antibiotika im medizinischen Bereich nehmen zu, es treten immer mehr Keime auf, die gegen eines oder sogar gegen verschiedene Stoffwechselprodukte der Mikroorganismen oder ihrer chemischen Abwandlungen oder synthetischen Analoga gefeit sind, so dass sie nur äusserst schwer unter Kontrolle zu bringen sind. Die sich häufenden Resistenzen bewirken, dass selbst in Industrienationen zunehmend wieder Menschen an bestimmten ansteckenden Krankheiten, wie z. B. Tuberkulose, sterben müssen; Erkrankungen, die bis vor kurzem als weitgehend eingedämmt galten (Levy, 1998). Antibiotika greifen in mikrobielle, ökologische Zusammenhänge ein. Nicht nur beim behandelten Patienten ändern sich Artengemisch und Dichte der Bakterienpopulation, sondern auch das Verhältnis von empfindlichen und widerstandsfähigen Krankheitskeimen, auch das Umfeld, z. B. von Kontaktpersonen, wird verändert. Demzufolge können sich resistente Stämme immer schneller ausbreiten. Bakterien, die antibiotikaresistent sind, haben bei deren Einsatz einen deutlichen Selektionsvorteil: Die überlebenden Bakterien haben kaum mehr Konkurrenten. Antibiotika sollten deshalb nur verabreicht werden, wenn es unbedingt notwendig ist. Das Auftreten von Resistenzen wird durch verschiedene Faktoren begünstigt. Am bedeutsamsten scheint die Existenz von Genen zu sein, mittels denen Bakterien Proteine produzieren, die wiederum gegen antibiotische Effekte schützen sowie das Ausmass der Anwendung der Antibiotika.

Bei der Transformation von Pflanzen wird in vielen Fällen zum eigentlichen DNA-Konstrukt auch zusätzlich ein Markergen (im allg. Antibiotikaresistenzgen) mitübertragen, um die transformierten Pflanzen einfacher selektieren zu können. Deshalb bestehen Befürchtungen, dass Lebensmittel, die aus transgenen Pflanzen mit Antibiotikaresistenzgenen auf human-pathogene Bakterien übertragen werden und damit die therapeutische Anwendung in der Medizin vereiteln. Die als pflanzliche

Markergene grösstenteils eingesetzten Gene sind das *nptII*-Gen (Neomycin-Phosphotransferase-Gen), das *kan*-Gen (Kanamycin-Phosphotransferase-Gen) sowie das *hph*-Gen (Hygromycin-Phosphotransferase). Da diese nur eingeschränkt medizinische Anwendung finden, sind die hierdurch hervorgerufenen Befürchtungen als gering einzustufen, aber nicht völlig auszuschliessen (Brandt, 1999). Die im Roggenstein-Versuch angebauten transgenen Rapspflanzen enthielten als Selektionsmarkergen das *pat*-Gen. Unter dem Selektionsdruck durch Antibiotika sind Transferraten für Resistenzgene zwischen Mikroorganismen im Bereich von 10^{-3} bis 10^{-8} publiziert worden (Mazodier und Davis, 1991; Lorenz und Wackernagel, 1994). Die publizierten Transferraten für Resistenzgene unterscheiden sich somit um einen Faktor von etwa 10^{10} (10 Milliarden). Zur Beurteilung einer möglichen Aufnahme, z. B. von Antibiotikaresistenzgenen, transgener Pflanzen durch kompetente Bakterien muss berücksichtigt werden, dass einige der in transgenen Pflanzen in Kombination mit Markergenen verwendeten Promotoren (z. B. TRI/TRII) in Bakterien nicht funktionieren, d.h. eine hypothetische Übertragung des TRI/TRII-Promotors mit dem *nptII*-Gen würde nicht zu einem Km-resistenten Bakterium führen und damit kein Selektionsvorteil für den Transformanten bestehen. Eine Verringerung der Probleme durch antibiotikaresistente Bakterien ist nach wie vor in der Verringerung des Selektionsdrucks durch eine stärkere Einschränkung der therapeutischen und nutritiven Anwendung von Antibiotika zu sehen.

4.2.9 Horizontaler Gentransfer durch homologe Rekombination

Einige Bakterien nehmen bevorzugt homologe DNA ihrer eigenen Species auf, andere, wie z. B. *Bacillus subtilis* und *Acinetobacter,* nehmen DNA-Fragmente unabhängig von ihrer Sequenz auf. Wenn diese Bakterien DNA unspezifisch aufnehmen, könnte auch DNA aus nicht-homologen Quellen, wie z. B. Pflanzen-DNA, in das Cytoplasma dieser Bakterien gelangen (Lorenz und Wackernagel, 1994).

Die meisten Bakterien, die DNA einzelsträngig aufnehmen, verfügen über keine Restriktionsenzyme, die diese DNA abbauen. Restriktionsbarrieren können so umgangen werden (Bickle *et al.,* 1993).

Um die DNA auf Dauer im Bakterium zu stabilisieren, muss sie aus dem Cytoplasma heraus mit dem Replikationsursprung verbunden werden und so in die Chromosomen oder in ein Plasmid integriert werden. Die Integration von Genen in das Genom des Rezipienten wurde bisher nur bei hohen Sequenzhomologien beobachtet. Die geringe Homologie zwischen Pflanzen-DNA und bakterieller DNA wird als hohe genetische Barriere zwischen den beiden Artenreichen verstanden. Durch verschiedene Veränderungen in den transgenen Pflanzen ändern sich diese Voraussetzungen und könnten ein Risikopotential darstellen. Sequenzhomologien mit bakterieller DNA können in transgenen Pflanzen durchaus gegeben sein, wenn die inserierte DNA in Vektoren kloniert mit flankierenden prokaryontischen Sequenzen vorliegt. Regulatorische und proteinkodierende Sequenzen sind auch in transgenen Pflanzen vorhanden (Rissler und Mellon, 1996). Für *Escherichia coli* wurde ermittelt, dass für eine homologe Rekombination eine minimale Homologie von nur 20 bp erforderlich ist. Diese kurzen homologen Bereiche können schon eine Rekombination vermitteln (Shen und Huang, 1986). Gesetzt den Fall, dass die eingeführte DNA nicht mittels eines *Agrobacteriums* in das Pflanzengenom integriert wurde, sondern durch Elektroporation oder Particle Gun-Methoden, werden im allgemeinen intakte Plasmide mit einem Replikationsursprungsort (oriV) verwandt. Aufgrund dessen kann zwischen der künstlich in die Pflanzen eingeführten DNA die notwendige Homologie zum bakteriellen Rezipienten durch das Plasmid vermittelt werden (Andre *et al.,* 1986). Solche möglichen Homologien, hergestellt durch den Replikationsursprungsort oriV in Plasmid- und Rekombinationsmutanten, könnten es möglich machen, dass trotz geringer Homologie pflanzliche DNA in bakterielle Rezipienten aufgenommen wird. Natürliche Transformationen können prinzipiell mit DNA von jeder Species stattfinden, wenn diese in transgenen Pflanzen vorliegt.

Das natürlich kompetente Bodenbakterium *Acinetobacter calcoaceticus* ist unter optimalen Laborbedingungen nicht mit chromosomaler pflanzlicher DNA transformierbar (Nielsen *et.al,* 1997a-c). Die Transformationsfrequenzen spiegelten klare Effekte auf der Basis von Homologien wieder, jedoch wurde keine Transformation bei der Nutzung transgener Pflanzen-DNA festgestellt. Diese Ergebnisse lieferten eine Transformationsfrequenz, die unter 10^{-13} (Transformation pro Rezipienten) bei optimalen Bedingungen liegt. Unter realen Gegebenheiten ist ein Minimum von 10^{-16} anzunehmen.

Es ist nicht davon auszugehen, dass das Bakterium im Boden stabil transformierbar mit nicht-homologer DNA ist. Bei einer bestehenden Homologie könnte ein Gentransfer mit einer sehr geringen Frequenz in Erwägung gezogen werden (Nielsen *et al,* 1997a-c).
Aus der Literatur (De Vries und Wackernagel, 1998) ist eine Methode zum Nachweis des *nptII*-Gens mittels Nutzung der homologen Rekombination bekannt. Der Assay beruht auf der Rekombination eines *nptII*-Gens, dem 10 bp deletiert wurden. Die Aufnahme eines *nptII*-Gens durch Transformation stellt die Kanamycinresistenz wieder her. Diese Methode ergibt je nach DNA der verschiedenen transgenen Pflanzen, die das *nptII*-Gen als Markergen enthalten, kanamycinresistente Transformanten in annähernd der Konzentration der Menge des *ntpII*-Gens, wie sie in den Pflanzen vorhanden sind. Die Regeneration des *nptII*-Gens geschieht ab einem Überschuss an Pflanzen-DNA von mehr als 6 $x10^6$.
Inwieweit die Möglichkeit eines Gentransfers des *pat*-Gens mittels Sequenzhomologien auf andere Bodenmikroorganismen besteht, ist nicht bekannt. Das *pat*-Gen wurde chromosomal in das pflanzliche Genom integriert, eine Übertragungmöglichkeit auch bei geringer Homologie durch den Replikationsursprungsort ist daher auszuschliessen. Ob für einen Gentransfer ausreichende Sequenzhomologien zwischen dem *pat*-Gen und den Sequenzen anderer Bodenbakterien bestehen, ist bisher nicht bekannt.

4.2.10 Aspekte zur Sicherheitsforschung

1992 fand ein internationales Symposium statt, dass sich mit dem Thema der Risiken durch transgene Nutzpflanzen beschäftigte. Ziel war es, die neusten wissenschaftlichen Forschungsergebnisse zu diskutieren und den zukünftigen Forschungsbedarf zu definieren. Zu diesem Zeitpunkt waren schon ungefähr 800 verschiedene Freisetzungsversuche mit genetisch veränderten Organismen durchgeführt worden, die meisten davon in den USA. Im allgemeinen waren nur Daten über die Produkteffizienz erhoben worden, aber keine Aussagen über evtl. Risiken für die Umwelt gemacht werden (Seidler und Levin, 1994). Der Gesetzgeber hat in den USA transgene Pflanzen mit Herbizid- oder Insektenresistenz für den grossflächigen Anbau zugelassen. Dies, obwohl auch schon 1989 die von der Ecological Society of America publizierten Prüfkriterien nahelegt wurden (Tiedje, *et al.,* 1989). In Deutschland handelt es sich um

weitaus kleinflächigere Freisetzungsversuche, die zum Teil der ökologischen Risikoforschung dienen, jedoch Anlass zu politischen Kontroversen geben. Weltweit werden an die 40 Millionen Hektar Land bereits mit transgenen Nutzpflanzen für kommerzielle Zwecke genutzt. In der Europäischen Union sind transgene Pflanzen bereits zugelassen, der Anteil der Resistenzen gegen Herbizide und Insektizide überwog (Ernst und Sandermann, 2000).

5 Zusammenfassung

1. Im Rahmen dieser Arbeit wurden transgene und nicht-transgene Rapspflanzen auf ihre biochemischen Unterschiede untersucht. Weiterhin wurde das Abbauverhalten des künstlich eingefügten Gens im Vergleich zu zwei endogenen Kontrollgenen im Verlauf der Seneszenz, im verrottenden Pflanzenmaterial und im Boden überprüft. Verschiedene Mikroorganismen wurden einem Selektionsdruck durch BASTA® ausgesetzt und unter diesen Bedingungen auf entstehende Resistenzen gegenüber dem Herbizid getestet.

2. Bei der Untersuchung der verschiedenen Seneszenzparametern ergaben sich für das Chlorophyll zwischen den transgenen und den nicht-transgenen Rapspflanzen keine Unterschiede. Die Bestimmungen von ACC und MACC sowie der Flavonoide hatten sich als nicht seneszenzrelevant für *Brassica napus* erwiesen. Bei der Analytik des Gesamtproteingehalts und der verschiedenen Aminosäuren zeigten die transgenen und nicht-transgenen Blätter ebenfalls analoges Verhalten.

3. Bei der Durchführung der quantitativen PCR wurden das *rbcS-,* das *cab*- und das *pat*-Gen über die gesamte Vegetationsperiode detektiert. Dabei war das *pat*-Gen immer in geringerer Menge nachgewiesen worden als die beiden Photosynthesegene. Der höchste Gehalt an den hier betrachteten Genen befand sich in den Stengeln. Auch im Rahmen dieser Untersuchungen zeigten die transgenen Pflanzen in ihrem Abbauverhalten keinen Unterschied zu den nicht-transgenen Pflanzen. Da das Fremdgen über gesamte Zeitdauer intakt vorlag, wäre theoretisch ein horizontaler Gentransfer möglich gewesen. Die Untersuchung des *pat*-Transkripts reflektierte ebenfalls den Abbau mit fortschreitender Seneszenz. Auch hier war die Detektion bis zum Ende der Vegetationsperiode möglich. Bei der Durchführung der Hybridisierung wurden für die Glutaminsynthetase zwei Transkripte detektiert. Beide Transkripte der Isoformen wurden im Verlauf der Seneszenz verstärkt exprimiert. Zusammenfassend zeigten die transgenen und die nicht-transgenen Blätter auch bei diesen Untersuchungen analoges Verhalten.

4. Das *pat*-Konstrukt konnte im Boden parallel zu den endogenen Pflanzengenen bis zu vier Wochen nach dem Unterpflügen der Rapspflanzen gegen Ende der Vegetationsperiode nachgewiesen werden. In den kompostierten Maispflanzen liess sich die kodierende Sequenz von 606 bp über einen Zeitraum von 23 Monaten detektieren. Während dieser Zeit stand es für einen horizontalen Gentransfer intakt zur Verfügung. Bei den Untersuchungen, unter Ausübung eines Selektionsdrucks auf verschiedene Agrobakterien-Stämme, *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas fluorescens,* wurden keine spontanen Resistenzen erzielt. Auch konnte das 35S-*pat*-Gen-Konstrukt nicht erfolgreich in die Mikroorganismen transformiert werden.
   Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse ist ein horizontaler Gentransfer als eher unwahrscheinlich einzustufen, kann aber vor allem in Anwesenheit eines Selektionsdrucks nicht ausgeschlossen werden.

6 Literaturverzeichnis

Aardema, B. W., Lorenz, M. G. and Krumbein, W. E. (1983) Protection of the sediment-adsorbed transforming DNA against enzymatic inactivation. *Appl. Environ. Microbiol.* **46,** 417-420.

Abeles, F. B., Morgan, P. W. and Saltveit, Jr. M. E. (1992) Ethylene in plant biology. 2nd edn. San Diego, Academic Press.

Aharoni, N., Liebermann, M. and Sisler, H. D. (1979) Patterns of ethylene production in senescing leaves. *Plant Physiol.* **64,** 796-800.

Ahmad, I., Bissett, J. and Malloch, D. (1995) Effect of phosphinothricin on nitrogen metabolism of *Trichoderma species* and its implications for their control of phytopathogenic fungi. *Pestic. Biochem. Physiol.* **53,** 49-59.

Ahrenholtz, I., Harms, K., De Vries, J. and Wackernagel, W. (2000) Increased killing of *Bacillus subtilis* on hair roots of transgenic T4 lysozyme-producing potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* **66,** 1862-1865.

Alexander, D., Goodman, R. M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, C., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T., Ward, E. and Ryals, J. (1993) Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90,** 7327-7331.

Amrhein, N., Schab, J. and Steinrücken, H. C. (1980) The mode of action of the herbicide glyphosate. *Naturwissenschaften* **67,** 356-357.

Andre, D., Colau, D., Schell, J., van Montagu, M. and Hernalsteens, J. P. (1986) Gene tagging in plants by T-DNA insertion mutagen that generates APH (3') II-plant gene fusions. *Mol. Gen. Genet.* **204,** 512-518.

Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris. Plant Physiol.* **24,** 1-15.

Arteca, J. M. and Arteca, R. N. (1999) A multi-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthetase (*ACS6*) in mature *Arabidipsis* leaves. *Plant Mol. Biol.* **39,** 209-219.

Atlas, R. M. (1995) Handbook of media for environmental microbiology. CRC Press, Boca Raton, USA.

Bartsch, K. and Tebbe, C. (1989) Initial steps in the degradation of phosphinothricin (glufosinate) by soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **55,** 711.

Bayer, E., Gugel, K. H., Hagele, K., Hagenmaier, H., Jessipow, S., König, W. A. and Zähner, H. (1972) Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. Phosphinothricin und Phosphinothricylalanyl-alanin. *Helv. Chim. Acta* **55,** 224-239.

Becker, J., Siegert, H., Logemann, J. and Schell, J. (1994) Begleitende Sicherheitsforschung zur Freisetzung genetisch veränderter Petunien. In: Projektträger Biologie, Energie, Ökologie, ed., Biologische Sicherheit, WeKa-Druck, Limnich 3, 563-578.

Bernhard, W. R. and Matile, P. (1994) Differential expression of glutamine synthetase genes during the senescence of *Arabidopsis thaliana* rosette leaves. *Plant Sci.* **98,** 7-14.

Bertolla, F., Van Gijsegem, F., Nesme, X. and Simonet, P. (1997) Conditions for natural transformation of *Ralstonia solanacearum. Appl. Environ. Microbiol.* **63,** 4965-4968.

Betz, C. (1998) Rolle der Ethylenbiosynthese bei der Empfindlichkeit von Pflanzen gegenüber oxidativem Stress. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bickle, T. A. and Krüger, D. H. (1993) Biology of DNA restriction. *Microbiol. Rev.* **57,** 434-450.

Bleecker, A. B. (1998) The evolutionary basis of leaf senescence: Method of the madness ? *Curr. Opin. Plant Biol.* **1,** 73-78.

Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Stettmaier, K. (1996) Flavonoids and Polyphenols: Chemistry and Biology, In: Handbook of Antioxidants. Cadenas, E., Packer, L., Marcel Dekker, Inc. New York.

Bowles, D. J. (1990) Defense related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* **59,** 873-907.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72,** 248-254.

Brandt, P. (1995) Transgene Pflanzen, Herstellung, Anwendung, Risiken und Richtlinien. Birkhäuser Verlag, Basel.

Brandt, P. (1997) Zukunft der Gentechnik, Birkhäuser Verlag, Basel.

Brandt, P. (1999) Antibiotika-Resistenzgene als Marker in gentechnisch veränderten Pflanzen. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, Springer-Verlag **42,** 51-57.

Broglie, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C. J. and Broglie, R. (1991) Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* **254,** 1194-1197.

Buchanan-Wollaston, V. (1994) Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. *Plant Physiol.* **105,** 839-846.

Buchanan-Wollaston, V. (1997) The molecular biology of leaf senescence, *J. Exp. Bot.* **48,** 181-199.

Buchanan-Wollaston, V. and Ainsworth, C. (1997) Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Mol. Biol.* **33,** 821-834.

Carpena-Ruiz, R., Sopena, A. and Ramon, A. M. (1989) Extraction of free amino acids from tomato leaves. *Plant and Soil* **119,** 251-254.

Chamier, B., Lorenz, M. G. and Wackernagel, W. (1993) Natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* by plasmid DNA adsorbed on sand and groundwater aquifer material. *Appl. Environ. Microbiol.* **59,** 1662-1667.

Chang, J.-Y., Knecht, R. and Braun, G. D. (1983) Amino acid analysis in the picomole range by precolumn derivatization and high performance liquid chromatography. *Methods in Enzymology* **91,** 41-48.

Cooley, M. B., D'Souza, M. R. and Kado, C. I. (1991) The *virC* and *virD* operons of the *Agrobacterium* Ti Plasmid are regulated by the *ros* chromosomal gene: Analysis of the cloned *ros* gene. *J. Bacteriol.* **173,** 2608-2616.

Dale, P. J. (1992) Spread of engineered genes to wild relatives. *Plant Physiol.* **100,** 13-15.

Dangl, J. L., Hauffe, K. D., Lipphardt, S., Hahlbrock, K. and Scheel, D. (1987) Parsley protoplasts retain differential responsiveness to UV light and fungal elicitor. *EMBO J.* **6,** 2551-2556.

De Block, M., Botterman, J., Vandewiele, M., Dockx, J., Thoen, C., Gossele, V., Rao Movva, N., Thompson, C., Van Montagu, M. and Leemans, J. (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* **6,** 2513-2518.

Dellaporta, S. (1994) Plant DNA miniprep and microprep. In: The maize handbook. M. Freeling, V. Walbot, eds., Springer Verlag, New York.

De Vries, J. and Wackernagel, W. (1998) Detection of *nptII* (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. *Mol. Gen. Genet.* **257,** 606-613.

D`Halluin, K., Borne, E., Bossut, M., De Beackeleer, M. and Leemans, J. (1992) Transgenic maize plants by tissue electroporation. *The Plant Cell* **4,** 1495-1505

Dixon, R. A., Maxwell, C. A., Ni, W., Oommen, A. and Paiva, N. L. (1994) Genetic manipulation of lignin and phenylpropanoid compounds involved in interactions with microorganisms. In: Genetic engineering of plant secondary metabolism. Ellis, B. E., Kuroki, G. W., Stafford, H. A. Recent Advances in Phytochemistry **28,** 153-178, Plenum Press, New York.

Domsch, K.H. (1992) Pestizide im Boden, VCH-Verlag, Weinheim.

Donn, G., Eckes, P. and Müllner, H. (1992) Genübertragung auf Nutzpflanzen. *BioEngineering* **8,** 40-46.

Dröge, W., Broer, I. and Pühler, A. (1992) Transgenic plants containing the phosphinothricin-*N*-acetyltransferase gene metabolize the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta* **187,** 142-151.

Düring, K. (1993) Freisetzung gentechnisch veränderter Nutzpflanzen. *Nach. Chem. Techn. Lab.* **41,** 231-233.

Ernst, D., Kiefer, E., Reske, J., Giunaschwill, N and Sandermann, H. (1995) In: Proc. Internat. Symp. on Weed and Crop resistance to herbicides. De Prado R., Garcia-Torres L., Jorrin J., eds, Cordoba, Spain, 165.

Ernst, D., Rosenbrock, H., Kiefer, E. and Sandermann, H. (1996a) Feldversuche mit Phosphinithricin-resistenten transgenen Pflanzen: Analyse des *pat*-Gens während der Seneszenz. In: Gesellschaft für Pflanzenzüchtung, eds, 3. GPZ-Tagung Köln, Th. Mann Verlag, Gelsenkirchen, 223-224.

Ernst, D., Kiefer, E., Drouet, A. and Sandermann, H. (1996b) A simple method of DNA extraction from soil for detection of composite transgenic plants by PCR, *Plant Mol. Biol. Rep.* **14,** 143-148

Ernst, D., Rosenbrock, H., Hartmann, A., Kirchhof, G., Bauer, S., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Sandermann, H. and Fischbeck, G. (1998) Sicherheitsforschung zu Freisetzungsversuchen in Roggenstein (Bayern). *Bundesgesundheitsblatt* **12,** 523-530.

Ernst, D. and Sandermann, H. (2000) Gentechnik bei Nutzpflanzen. *GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit* **14,** 63-70.

Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132,** 6-13.

Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1984) Addenum: „A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity“. *Anal. Biochem.* **137,** 266-267.

Feldmann, R. C., Hankeln, T. and Schmidt, E. R. (1996) In: Transgenic Plants-from the lab to the field. Gesellschaft für Pflanzenzüchtung, eds., Druckerei Liddy Halm, Göttingen, 151-163.

Feller, U. and Fischer, A. (1994) Nitrogen metabolism in senescing leaves. *Crit. Rev. Plant Sci*. **13,** 241-273.

Finnegan, E. J., Brettell, R. I. S. and Dennis; E. S. (1993) The role of DNA methylation in the regulation of plant gene expression. In: DNA Methylation, Molecular Biology and Biological Significance, Jost J. P.; Saluz, H. P., Birkhäuser Verlag Basel/Schweiz, 218-261.

Fischbeck, G. (1998) Einführung und Ergebnisse zur Pollen- und Samenverbreitung transgener Erbeigenschaften. In: vdbiol-Forum München, FORBIOSICH, Eigenverlag Deutscher Biologen, München.

Fischer, R. (1994) Optimierung der heterologen Expression von Stilbensynthasegenen für den Pflanzenschutz, Dissertation, Universität Hohenheim.

Flor, H. H. (1956) The complementary gene system in flax and flax rust. *Advan. Genet.* **8,** 29-54.

Fonds der chemischen Industrie (1996) Frankfurt.

Franco, A. R., López-Siles, F. J. and Cárdenas, J. (1996) Resistance to Phosphinothricin (Glufosinate) and its utilization as a nitrogen source by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62,** 3834-3839.

Gallina, M. A. and Stephenson, G. R. (1992) Dissipation of [^{14}C] glufosinate in two Ontario soils. *J. Agr. Food Chem.* **40,** 165.

Gallori, E., Bazzicalupo, M., Dal Canto, L., Fani, R., Nannipieri, P., Vettori, C. and Stotzky, G. (1994) Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on clay in non sterile soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15,** 119-126.

Gan, S. (1995) Molecular characterization and genetic manipulation of plant senescence, PhD thesis, University of Wisconsin, Madison.

Gan, S. and Amasino, R. M. (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270,** 1986-1988.

Gan, S. and Amasino, R. M. (1997) Making sense of senescence. *Plant Physiol.* **113,** 313-319.

Gassen, H. G. and Kemme, M. (1996) Gentechnik, Fischer Verlag, Frankfurt.

Gebhard, F. and Smalla, K. (1998) Transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **64,** 1150-1554.

Gebhard, F. and Smalla, K. (1999) Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28,** 261-272.

Gill, S. S., Cowles, E. A. and Pietrantonio, P. V. (1992) The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* **37,** 615-636.

Girousse, C., Bournoville, R. and Bonnemain, J. - L. (1996) Water deficit-induced changes in concentrations in proline and some other amino acids in the phloem sap of alfalfa. *Plant Physiol.* **111,** 109-113.

Good, A. G. and Zaplachinski, S. T. (1994) The effects of dought stress on free amino acid accumulation and protein synthesis in *Brassica napus. Physiol. Plant.* **90,** 9-14.

Graham, I. A., Leaver, C. J. and Smith, S. M. (1992) Induction of malate synthetase gene expression in senescent and detached organs of cucumber. *Plant Cell* **4,** 349-357.

Grbic, V. and Bleecker, A. B. (1996) Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis. Plant J.* **8,** 595-602.

Hanfrey, C., Fife, M. and Buchanan-Wollaston, V. (1996) Leaf senescence in *Brassica napus:* Expession of genes encoding pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* **30,** 597-609.

Hasskarl, H. (1991) Gesetz zur Regelung von Fragen der Gentechnik vom 20. Juni 1990, Gentechnikrecht. Textsammlung (Gentechnikgesetz und Rechtsverordnungen, Editio Cantor Verlag, Aulendorf.

Haug, G. (1990) Pflanzenproduktion im Wandel Neue Aspekte in den Agrarwissenschaften, Verlag Chemie, Weinheim.

Hausner, M. and Wuertz, S. (1999) High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65,** 3710-3713.

Hemleben, V. (1990) Molekularbiologie der Pflanzen, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Hensel, L. L., Grbic, V., Baumgarten, D. A. and Bleecker, A. B. (1993) Developmental and age related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5,** 553-564.

Heuer, H. and Smalla, K. (1999) Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme-producing transgenic variants. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28,** 357-371.

Hilder, V. A., Gatehouse, A. M. R., Sheerman, S. E., Barker, R. F. and Boulter, D. (1987) A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* **300,** 160-163.

Hilder, V. A., Powell, K. S., Gatehouse, A. M. R., Gatehouse, J. A., Gatehouse, L. N., Shi, Y., Hamilton, W. D. O., Merryweather, A., Newell, C. A., Timans, J. C., Peumans, W. J., Van Damme, E. and Boulter, D. (1995) Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgenic Res.* **4,** 18-25.

Himelblau, E., Mira, H., Lin, S. J., Culotta, V. C., Penarrubia, L. and Amasino, R. M. (1998) Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene *ATX1* from *Arabidopsis. Plant Physiol.* **117,** 1227-1234.

Hoechst (ed) Produktinformation (1982) BASTA® Glufosinate: Ein Totalherbizid zum Einsatz in Obst- und Weinbau, auf Nichtkulturland sowie zur Ernteerleichterung bei Kartoffeln, Frankfurt.

Hoerlein, G. (1994) Glufosinate (PPT), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties. *Rev. Environm. Contam. Toxicol.* **138,** 73-145.

Humbeck, K., Quasr, S. and Krupinska, K. (1996) Functional and molecular changes in the photosynthetic apparatus during senescence of the flag leaves from field-grown barley plants. *Plant, Cell Environ.* **19,** 337-344.

Huub, J. M. and Linthorst, H. J. M. (1991) Pathogenesis-related proteins of plants. *Crit.l Rev. Plant Sci.* **10,** 123-150.

Jansen, E. H. J. M., Van den Berg, R. H., Both-Miedema, R. and Doorn, L. (1991) Advantages and limitations of pre-column derivatization of amino acids with dabsyl chloride. *J. Chromatogr.* **553,** 123-133.

John, I., Drake, R., Farrell, A., Cooper, W., Lee, P., Horton, P. and Grierson, D. (1995) Delayed leaf senescence in ethylene deficient ACC-oxidase antisense tomato plants, Molecular and physiological aspects. *Plant J* **7,** 483-490.

Jørgensen, R. B., Hauser, T., Raundahl Mikkelsen, T. and Ostergard, H. (1996) Transfer of engineered genes from crop to wild plants. *Trends Plant Sci.* **10,** 356-358.

Kamachi, K., Yamaya, T., Mae, T. and Ojima, K. (1991) A role for glutamine synthetase in the remobilisation of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. *Plant Physiol.* **96,** 411-417.

Kamachi, K., Yamaya, T., Hayakawa, T., Mae, T. and Ojima, K. (1992) Changes in cytosolic glutamine synthetase polypeptide and its mRNA in a leaf blade of rice plants during natural senescence. *Plant Physiol.* **98,** 1323-1329.

Keller, B. (1993) Structural cell wall proteins. *Plant Physiol.* **101,** 1127-1130.

Khanna, M. and Stotzky, G. (1992) Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effects of DNAase on the transforming ability of bound DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **58,** 1930-1939.

King, G. A., Davies, K. M., Stewart, R. J. and Borst, W. M. (1995) Similarities in gene-expression during the post-harvest-induced senescence of spears and natural foliar senescence of asparagus. *Plant Physiol.* **108,** 125-128.

Kirchhof, G., Eckert, B., Ruth, B. and Hartmann, A. (1996) Bodenmikrobiologische Untersuchungen zum Anbau von Glufosinat-resistenten transgenen Mais-und Rapspflanzen. In: Gesellschaft für Pflanzenzüchtung, eds, 3. GPZ Tagung Köln, Th. Mann Verlag, Gelsenkirchen, 61-63.

Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1993) Characterization of cDNA for a dehydration-inducible gene that encodes a Clp A, -B like protein in *Arabidopsis thaliana* L.. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196,** 1214-1220.

Kleber-Janke, T. and Krupinska, K. (1997) Isolation of cDNA clones for genes showing enhanced expression in barley leaves during dark-induced senescence as well as during senescence under field conditions. *Planta* **203,** 332-340.

Kliniynk, V. I., Caroll, B. J., Thomas, C. M. and Jones, J. D. G. (1993) Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis. *Plant J.* **3,** 493-494.

Klug, J. (1997) UDBio-Forum “Freilandversuche mit gentechnisch veränderten Organismen“. *Biospektrum* **3,** 55.

Komoßa, D. and Sandermann, H. (1992) Plant metabolism of herbicides with C-P bonds: Phosphinothricin. *Pestic. Biochem. Physiol.* **43,** 85-94.

Kondo, Y., Shomura, T., Ogawa, Y., Tsuruoka, T., Watanabe, H., Totukawa, K., Suzuki, T., Moriyama, C., Yoshida, J., Inouye, S. and Niida, T. (1973) Studies on a new antibiotic SF-1293, 1. Isolation and physico-chemical and biological characterization of SF-1293 substances. *Sci. Rep. Meiji Seika* **13,** 34-41.

Kriete, G. and Broer, I. (1996) Influence of the herbicide phosphinithricin on growth and nodulation capacity of *Rhizobium meliloti. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46,** 580-586.

Lamb, C. J., Ryals, J. A., Ward, E. R. and Dixon, R. A. (1992) Emering strategies for enhancing crop resistance to microbial pathogens. *Biotech.* **10,** 1436-1445.

Langebartels, C., Kerner, K., Leonardi, S., Schraudner, M., Trost, M., Heller, W. and Sandermann, H. (1991) Biochemical plant responses to ozone I. Differential induction of polyamine and ethylene biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* **95,** 882-889.

Levy, S. B. (1998) Antibiotikaresistenz: eine globale Herausforderung. **Spektrum der Wissenschaft** 34-41.

Liebermann, M. (1979) Biosynthesis and action of ethylene. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **30,** 533-591.

Lin, J. - K. and Chang, J. - Y. (1975) Chromaphoric labeling of amino acids with 4-Dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonylchloride. *Anal. Chem.* **47,** 1634-1638.

Lizada, C. and Yang, S. F. (1979) A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal. Biochem.***100,** 140-145.

Logeman, J., Jach, G., Tommerup, H., Mundy, J. and Schell, J. (1992) Expression of a barley ribosome-inactivating protein leeds to increase fungal protection in transgenic tobacco plants. *Biotech.* **10,** 305-308.

Logusch, E. W., Walker, D. M., McDonald, J. F. and Franz, J. E. (1991) Inhibition of plant glutamine synthetases by substituted phosphinothricins. *Plant Physiol.* **95,** 1057-1062.

Lohman, K. N., Gan, S., John, M. C. and Amasino, R. M. (1994) Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana. Physiol. Plant.* **92,** 322-328.

Lorenz, M. G., and Wackernagel, W. (1987) Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **53,** 2948-2952.

Lorenz, M. G., Aaredema, B. W. and Wackernagel, W. (1988) High efficient genetic transformation of *Bacillus subtilis* attached to sand grains. *J. Gen. Microbiol.* **134,** 107-112.

Lorenz, M. G. and Wackernagel, W. (1990) Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* by sand-adsorbed DNA. *Arch. Microbiol.* **154,** 380-385.

Lorenz, M. G., Reipschläger, K. and Wackernagel, W. (1992) Plasmid transformation of naturally competent *Acintobacter calcoaceticus* in non-steril soil extract and groundwater. *Arch. Microbiol.* **157,** 355-360.

Lorenz, M. G. and Wackernagel, W. (1992) Stimulation of natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* in extracts of various soils by nitrogen or phosphorus limitation and influence of temperature and pH. *Microbial Releases* **1,** 173-176.

Lorenz, M. G. and Wackernagel, W. (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* **58,** 563-602.

Mazodier, P. and Davies, J. (1991) Gene transfer between distantly related bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **25,** 147-171.

McNally, S. F., Hirel, B., Gadal, P., Mann, A. F. and Stewart, G. R. (1983) Glutamine synthetase on higher plants. Evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within the leaf. *Plant Physiol.* **72,** 22-25.

Meulewaeter, F., Soetaert, P. and Emmelo van, J. (1989) Structural analysis of the coat protein gene in different BNYVVisolates. Medelingen Faculteit Landbouwwetenschap Riijksuniversiteit Gent, 54, 465-468.

Meyer, P., Linn, F., Heidmann, I., Meyer, H., Niedenhof, I. and Saedler, H. (1992) Endogenous and environmental factors influence 35S promotor methylation of a maize A1 gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype. *Mol. Gen. Genet.* **231,** 345-352.

Miller, R. V. (1998) Bacterial gene swapping in nature. *Sci. Am.* 47-51.

Morris, W. F., Kareiva, P. M. and Raymer, P. L. (1994) Do barren zones and pollen traps reduce gene escape from transgenic crops ? *Ecol. Appl.* **4,** 157-165.

Miller, J. D., Arteca, R. N. and Pell, E. J. (1999) Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **120,** 1015-1023.

Nam, H. G. (1997) The molecular genetic analysis of the leaf senescence. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8,** 200-207.

Näsholm, T. and Ericsson, A. (1990) Seasonal changes in amino acids, protein and total nitrogen in needles of fertilized Scots pine trees. *Tree Physiol.* **6,** 267-281.

Nevers, P. (1991) Pflanzenzüchtung aus der Nähe gesehen. Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln.

Nielsen, M. K., Gebhard, F., Smalla, K., Bones, A. M. and Van Elsas, J. D. (1997a) Evaluation of possible horizontal gene transfer from transgenic plants to the soil bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* BD413*. Theor. Appl. Genet.* **95,** 815-821.

Nielsen, K. M., Bones, A. M., Van Elsas, J. D. (1997b) Induced natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **63,** 3972-3977.

Nielsen, K. M., Van Weerelt, D. M., Berg, T. N., Bones, A. M., Hageler, A. N. and Van Elsas, J. D. (1997c) Natural transformation and availability of transforming chromosomal DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **63,** 1945-1952.

Nielsen, M. K., Bones, A. M., Smalla, K. and Van Elsas, J. D. (1998) Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria- a rare event ? *FEMS Microbiol. Rev*. **22,** 79-103.

Nielsen, K. M., Smalla, K. and Van Elsas, J. D. (2000a) Natural transformation of *Acinetobacter* sp. Strain BD413 with cell lysates of *Acinetobacter* sp. *Pseudomonas fluorescens,* and *Burkholderia cepacia* in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66,** 206-212.

Nielsen, K. M., Van Elsas, J. D. and Smalla, K. (2000b) Transformation of *Acinetobacter* sp. Strain BD413(pFG4Δ*nptII*) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Appl. Environ. Microbiol.* **66,** 1237-1242.

Noodén, L. D. and Leopold, A. C. (1988) Senescence and aging in plants. Academic Press, San Diego.

Noodén, L. D. and Guiamet, J. J. (1996) Genetic control of senescence and aging plants. In: Handbook of the biology of aging, 4th ed., Schneider E. L., Rowe, J. W., Academic Press, San Diego, 94-118.

Ochs, G., Schock, G. and Wild, A. (1995) Purification and characterization of Glutamine synthetase isoenzymes from leaves and roots of *Brassica napus* (L.). *J. Plant Physiol*. **147,** 1-8.

Oehmichen, J. (1983) Pflanzenproduktion, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.

Oh, A. S., Lee, S. Y., Chung, I. K., Lee, C. - H. and Nam, H. G. (1996) A senescence-associated gene of *Arabidopsis thaliana* is distinctiveley regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *Plant Mol. Biol.* **30,** 739-754.

Old, R. W. and Primrose, S. B. (1992) Gentechnologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

O'Neill, S., Nadeau, J. A., Zhang, X. S., Bui, A. Q. and Halevey, A. H. (1993) Interorgan regulation of ethylene biosynthetic genes by pollination. *Plant Cell* **5,** 419-432.

Paget, E., Jocteur Monrozier, L. and Simonet, P. (1992) Adsorption of DNA on clay minerals: protection against DNase I and influence on gene transfer. *FEMS Microbiol. Lett.* **97,** 31-40.

Paget, E. and Simonet, P. (1994) On the track of natural transformation in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15,** 109-118.

Paget, E. and Simonet, P. (1997) Development of engineered genomic DNA to monitor the natural transformation of *Pseudomonas stutzeri* in soil-like microcosms. *Can. J. Microbiol.* **43,** 78-84.

Pell, E. J. and Pearson, N. S. (1983) Ozone-induced reduction in quantity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in alfalfa foliage, *Plant Physiol.* **73,** 185-187.

Petermann, T. K. and Goodmann, H. M. (1991) The glutamine synthetase gene family of *Arabidopsis thaliana*: light-regulation and differential expression in leaves, roots and seeds. *Mol. Gen. Genet.* **230,** 145-154.

Pogson, B. J., Downs, C. G., Davies, K. M., Morris, S. C. and Buchanan-Wollaston,

V. (1995) Nucleotide sequence of a cDNA clone from broccoli with high identity with the PSST subunit of NADH ubiquinone oxidoreductase. *Plant Physiol.* **108,** 859-860.

Pohl-Orf, M., Brand, U., Schuphan, I. and Bartsch, D. (1998) Untersuchungen zur Verbreitung von Fremdgenen in gentechnisch veränderten Pflanzen der Art *Beta vulgaris* L.-Monitoring in Agrar- und Küstenökosystemen. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie* **28,** 327-336.

Quirino, B. F., Noh, Y. - S., Himelblau, E., Amasino, R. M. (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci.* **5,** 278-282.

Ramos, J. L., Duque, E. and Ramos-Gonzalez, M. I. (1991) Survival in soils of an herbicide-resistant *Pseudomonas putida* strain bearing a recombinant TOL plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* **57,** 260-266.

Reske, J. (1994) Untersuchungen zum *pat*-Gen während der Seneszenz transgener Mais-Pflanzen (*Zea mays* L.). Diplomarbeit, Ludwigs-Maximilians-Universität München.

Ridley, S. M. and McNally, S. F. (1985) Effects of Phosphinopthricin on the isoenzymes of glutamine syntethase ec-6.3.1.2 isolated from plants species with exhibit varying degrees of susceptibility to the herbicide. *Plant Sci.* **39,** 31-36.

Rissler, J. and Mellon, M. (1996) Anonymous. What's coming to market? The gene exchange. *Union of concerned scientists* **7,** 4-5.

Romanowski, G., Lorenz, M. G. and Wackernagel, W. (1991) Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNAase I. *Appl. Environ. Microbiol.* **57,** 1057-1061.

Romanowski, G., Lorenz, M. G., Sayler, G. and Wackernagel, W. (1992) Persistence of free plasmid DNA in soil monitored by various methods, including a transformation assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **58,** 3012-3019.

Romanowski, G., Lorenz, M. G. and Wackernagel, W. (1993) Plasmid DNA in groundwater aquifer microcosm-adsorption, DNase resistance and natural genetic transformation of *Bacillus subtilis. Mol. Eco.* **2,** 171-181.

Rueppel, M. L., Brightwell, B. B., Schaefer, J. and Marvel, J. T. (1977) Metabolism and degardation of Glufosinate in soil and water. *J. Agr. Food Chem.* **25,** 517-528.

Sambrock, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning a laboratory manual, 2nd ed.; C. Nolan, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schäfer, A., Kalinowski, J. and Pühler, A. (1994a) Increased fertility of *Corynebacterium glutamicum* recipients in intergeneric matings with *Escheria coli* after stress induction. *Appl. Environ. Microbiol.* **60,** 756-759.

Schäfer, A., Kalinowski, J. and Pühler, A. (1994b) Analysis of the major restriction system of *Corynebacterium glutamicum* by conjugation with *E. coli.* In: Horizontal gene transfer-mechanisms and implications. Workshop. July 25-27, Bielefeld .

Schäfer, A. (1996) Horizontaler Gentransfer-Mechanismen und biologische Sicherheit, Biospektrum 2, 23-38.

Schlüter, K., Fütterer, J. and Potrykus, I. (1995) „Horizontal“ gene transfer from transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs- if at all- at an extremly low frequency. *Biotech.* **13,** 1094-1098.

Schulte, E. and Käppeli, O. (1996) Gentechnisch veränderte krankheits- und schädlingsresistente Nutzpflanzen - Eine Option für die Landwirtschaft? Schwerpunktprogramm Biotechnologie des Schweizerischen Nationalfonds, Bern.

Schulz, A., Krüper, A. and Amrhein, N. (1985) Differential sensitivy of bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate. *FEMS*

Microbiol. Lett. **28,** 297-301.

Seidler, R. J. and Levin, M. (1994) Potential ecological and nontarget effects of transgenic plant gene products on agriculture, silviculture, and natural ecosystems: general introduction. *Mol. Eco.* **3,** 1-3.

Selbitschka, W., Keller, M. and Pühler, A. (1997) Vorbereitung eines Freilandexperiments. *Biologie in unserer Zeit* **27,** 277-285.

Shade, R. E., Schroeder, H. E., Pueyo, J. J., Murdock, L. L., Higgins, T. J. V. and Chrispeels, M. J. (1994) Transgenic pea seeds expressing the alpha-amylase inhibitor of the common bean are resistant to Bruchid Beetles. *Biotech.* **12,** 793-796.

Shannon, J. C. and Gorwood, D. L. (1994) In: Chemistry and Technology. Whistler, R. L., Bemiller, J. N., Paschall, E. F., eds. Strach, Acad. Press ,Orlando, FL, 25-86.

Shen, L., Foster, J. G. and Orcutt, D. M. (1989) Compostion and distribution of free amino acids in flatpea (*Lathyrus sylvestris* L.) as influenced by water deficit and plant age. *J. Exp. Bot.* **40,** 71-79.

Shen, P. and Huang, H. V. (1986) Homologous recombination in *Escheria coli*: dependence on substrate length and homology. *Genetics* **112,** 441-457.

Shimada, A., Nagai, T., Seto, H. and Kimura, Y. (1993) Effects of bialaphos on sterility, Glutamine synthetase and free amino acids of rice. *Phytochemistry* **32,** 813-816.

Siebert, P. D. (1993) Quantitative RT-PCR, Methods and Applications. Clontech Laboratories, Inc., USA.

Sikorski, J., Graupner, S., Lorenz, M. G. and Wackernagel, W. (1998) Natural transformation of *Pseudomonas stutzeri* in a non-sterile soil. *Microbiol.* **144,** 569-576.

Smalla, K. and Gebhard, F. (1995) In: FORBIOSICH, ed, FORBIOSICH-Meeting on Biosafety Research, 19-20.

Smart, C. M. (1994) Transley Reviews No. 64, Gene expression during leaf senescence. *New Phytol.* **126,** 419-448.

Smith, C. J. S., Watson, C. F., Ray, J., Bird, C. R., Morris, P. C., Schuch, W. and Grierson, D. (1988) Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature* **334,** 724-726.

Smith, A. E. and Belyk, M. (1989) Field persistance studies with the herbicide glufosinate-ammonium in Saskatchewan soils. *J. Environ. Qual.* **18,** 475.

Smith, C. J. S., Watson, C. F., Bird, C. R., Ray, J., Schuch, W. and Grierson, D. (1990a) Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.* **224,** 477-481.

Smith, C. J. S., Watson, C. F., Morris, P. C., Bird, C. R., Seymour, G. B., Gray, J. E., Arnold, C., Tucker, G. A., Schuch, W., Harding, S. and Grierson, D. (1990b) Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Mol. Biol.* **14,** 369-379.

Stafford, H. A. (1990) Flavonoid metabolism. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.

Staskawicz, B. J., Ausubel, F. M., Baker, B. J., Ellis, J. G. and Jones, J. D. G. (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268,** 661-667.

Stocchi, V., Piccoli, G., Magnani, M., Palma, F., Biagiarelli, B. and Cucchiarini, L. (1989) Reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of Dimethyl-aminoazobenzene sulfonyl- and dimethylaminoazobenzene Thiohydantoin-amino acid derivates for amino acid analysis and microsequencing studies at the

picomole level. *Anal. Biochem.* **178,** 107-117.

Syvanen, M. (1994) Horizontal gene transfer: Evidence and possible consequences. *Annu. Rev. Genet.* **28,** 237-261.

Tebbe, C. (1988) Abbau des Herbizids Phosphinothricin (Glufosinate) im Boden und in Reinkulturen von Mikroorganismen. Dissertation, Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

Tebbe, C. C. and Reber, H. H. (1991) Degardation of [^{14}C]phosphinothricin (glufosinate) in soil under laboratory conditions: Effects of concentration and soil amendments on $^{14}CO_2$ production. *Biol. Fertil Soils* **11,** 62-67.

Thomas, H. and De Villiers, L. (1996) Gene expression in leaves of *Arabidopsis thaliana* induced to senescence by nutrient deprivation. *J. Exp. Bot.* **47,** 1845-1852.

Thomas, H. and Stoddart, J. L. (1980) Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31,** 83-111.

Thompson, C. J., Movva, R. N., Tizard, R., Crameri, R., Davies, J. E., Lauwereys, M. and Bottermann, J. (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus. EMBO J.* **9,** 2519-2523.

Thimann, K. V. (1980) The senescence in leaves. In: Senescence in Plants. Eds. Thimann, K. V., Adelmann, R. C., Roth, G. S. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 85-116.

Tiedje, J. M., Colwell, R. K., Grossman, Y. L., Hodson, R. E., Lenski, R. E., Mack, R. N. and Regal, P. J. (1989) The planned introduction of genetically engineered organisms: Ecological considerations and recommendations. *Ecol.* **70,** 298-315.

Toriyama, K., Arimotor, Y., Uchiyima, H. and Hinata, K. (1988) Transgenic rice plants

after direct gene transfer into protoplasts. *Biotech.* **6,** 1072-1074.

Vahala, J., Schlagnhaufer, C. D. and Pell, E. J. (1998) Induction of an ACC synthase cDNA by ozone in light-grown *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiol. Plant.* **103,** 45-50.

Van Etten, H. D., Matthews, D. E. and Matthews, P. S. (1989) Phytoalexin detoxification: Importance for pathogenicity and practical implications. *Annu. Rev. Phytopathol.* **27,** 143-164.

Van Gysel, A., Van Montagu, M. and Inze, D. (1993) A negatively light-regulated gene from *Arabidopsis thaliana* encodes a protein showing high similarity to blue copper-binding proteins. *Gene* **136,** 79-85.

vdbiol-Forum-München (1998) Eigenverlag Verband Deutscher Biologen, München.

Volkenandt, M., Dicker, A. P., Fanin, R., Banerjee, D., Albino, A. and Bertino, J. R. (1993) Polymerase Chain Reaction of DNA from Paraffin-Embedded Tissue. In: Methods in Molecular Biology. White, B. A., Humana Press Inc; Totowa, New York, 81-88.

Waiblinger, H. U., Wurz, A., Freyer, R. and Pietsch, K. (1999) Spezifischer Nachweis von gentechnisch verändertem Raps in Honig. *Deut. Lebensm.-Rundsch.* **95,** 44-48.

Weaver, L. M., Himelblau, E. and Amasino, R. M. (1997) Leaf senescence: gene expression and regulation. In: Genetic Engineering. Setlow, J. K. eds, Plenum Press, New York, 215-234.

Weaver, L. M., Gan, S., Quirino, B. and Amasino, R. M. (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol. Biol.* **37,** 455-469.

Weaver, L. M., Himelblau, E. and Amasino, R. M. Leaf senescence: gene expression

and regulation. In: Genetic engineering, V19: Principles and Methods, New York, in press.

Weber, P., Nußbaum, S., Fuhrer, J., Gfeller, H., Schlunegger, U. P., Brunold, C. and Rennenberg, H. (1995) Uptake of atmospheric $^{15}NO_2$ and its incorporation into free amino acids in wheat (*Triticum aestivum). Physiol. Plant.* **94,** 71-77.

Wendler, C. and Wild, A. (1990) Effect of phosphinothricin on photosynthesis and photorespiration. *Z. Naturforsch.* **45,** 535-537.

Widmer F., Seidler, R. J. and Watrud, L. S. (1996) Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms. *Mol. Ecol.* **5,** 603-613.

Widmer, F., Seidler, R. J., Donegan, K. K. and Reed, G. L. (1997) Quantification of transgenic plant marker gene persistence in the field. *Mol. Ecol*. **6,** 1-7.

Willmitzer, C. and Brennicke, A. (1993) Freilandversuche mit transgenen Pflanzen-Nachholbedarf in Deutschland. *Spektrum der Wissenschaft* 110-111.

Wilson, B. J. (1997) An evolutionary perspective on the ‚death hormone' hypothesis in plants. *Physiol. Plant.* **99,** 511-516.

Wohlhouse, H. W. (1984) The biochemistry and regulation of senescence in chloroplasts. *Can. J. Bot.* **62,** 2934-2942.

Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E. and Pühler, A. (1988) Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum. Gene* **70,** 25-37.

Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of

their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2143-2150.

Zambryski, P., Tempe, J. and Schell, J. (1989) Transfer and function of T-DNA genes from Agrobacterium Ti- and Ri-plasmids in plants. *Cell* **56,** 193-201.

Zhou, J. and Goldsbrough, P. B. (1994) Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis. Plant Cell* **6,** 875-884.

Lebenslauf

Name:	Hilkea Rosenbrock
Geburtstag	02.10.64
Geburtsort	Walsrode
Schulbildung	1972-1976 Grundschule Walsrode 1977-1978 Orientierungsstufe Walsrode 1979-1982 Realschule Walsrode 1982-1985 Gymnasium Rotenburg/Wümme Allg. Hochschulreife
Ausbildung	1985-1986 Krankenpflegeausbildung, Kreiskrankenhaus Walsrode
Studium	1987-1994 Technische Universität Braunschweig, 4 Semester Pharmazie, 11 Semester Diplom Chemie, Abschluss Diplom- Chemikerin
Sonstige berufliche Tätigkeiten	1991-1994 Mitarbeit bei verschiedenen Forschungs- projekten im Wilhelm-Klauditz-Institut für Holzforschung, Fraunhofer Arbeitsgruppe, Braunschweig

Promotion	Beginn 1995 am Institut für Biochemische Pflanzenpathologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, München-Neuherberg
Beruflicher Werdegang	1998 Projektleitungsassistentin, Verum Staticon, München
	Seit 1999 Wissenschaftliche Assistentin, Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München

DANKE !

Herrn Prof. Dr. H. Sandermann, für das Interesse an meiner Arbeit und die konstruktiven Vorschläge, die die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichten.

Herrn PD Dr. D. Ernst, für die Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit sowie die stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn PD Dr. A. Hartmann und Frau Dr. Gudrun Kirchhof (Institut für Bodenökologie der GSF-München, Neuherberg), für die Kooperation.

Den Mitarbeitern der molekularbiologischen Arbeitsgruppe für das gute Miteinander im Labor.
Sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemische Pflanzenpathologie des Forschungszentrums.

Besonders Nuria Gonzalez, Elke Mattes, Dr. Werner Heller, Petra und Dr. Jan Rothenburger, Evi Kiefer, Bärbel Groß und Dr. Ingrid Liegl für die über diese Arbeit hinausgehende Verbundenheit