

BMBF-Förderprogramm „Innovative Regionale Wachstumskerne“

BioOK – Entwicklung von Zulassungs- und Überwachungsverfahren für  
transgene Nutzpflanzen

Verbundprojekt 4:

Analyse und Bewertung der Umweltrisiken transgener Nutzpflanzen

Teilprojekt 4A:

Entwicklung eines schnellen *in vivo* Verfahrens zur Detektion geringer Einflüsse Transgen-kodierter Proteine auf Mikroorganismen und Stoffflüsse im Boden: Produktion transgener Wurzeln, TP4A

## **SCHLUSSBERICHT**

Antragsteller: Universität Rostock  
Ausführende Stelle: Universität Rostock  
Förderkennzeichen: 03WKS04A  
Förderzeitraum: 01.07.2005 - 31.06.2008  
Projektleiter: Prof. Dr. rer. nat Inge Broer  
Bearbeiter: Patricia Horn  
Verfasser: Prof. Dr. rer. nat. Inge Broer  
Patricia Horn

Rostock, 23.12.2008

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 03WKS04A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>I Kurzdarstellung</b>	<b>7</b>
<b>1 Aufgabenstellung</b>	<b>7</b>
<b>2 Voraussetzungen unter denen das Projekt durchgeführt wurde</b>	<b>8</b>
<b>3 Planung und Ablauf des Vorhabens</b>	<b>9</b>
<b>4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde</b>	<b>12</b>
<b>5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen</b>	<b>16</b>
<b>II Eingehende Darstellung</b>	<b>17</b>
<b>1 Erzielte Ergebnisse und Gegenüberstellung mit Zielstellung</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Etablierung eines Klonierungssystems zur schnellen Integration unterschiedlicher Zielgene in einen Vektor mit hoher Expression des Zielgens</b>	<b>17</b>
<b>1.2 Molekulare Analysen</b>	<b>20</b>
1.2.1 <i>Vicia hirsuta</i>	20
1.2.2 Kartoffel	24
<b>1.3 Herstellung kombinierter Pflanzen und Analyse der Repräsentativität</b>	<b>25</b>
1.3.1 Optimierung des <i>Vicia hirsuta</i> -Systems und Analyse der Repräsentativität	25
1.3.2 Übertragung des Systems der kombinierten Wicke auf Kartoffel ( <i>Solanum tuberosum</i> )	28
<b>1.4 Übertragung kombinierter Pflanzen auf nicht sterile Testböden</b>	<b>30</b>
1.4.1 <i>Vicia hirsuta</i>	30
1.4.2 Kartoffel	33
<b>1.5 Auswirkung des transgen kodierten Proteins auf die Nodulation der Wickenpflanzen als Teil der symbiontischen Rhizosphären-Mikroorganismen-Interaktion</b>	<b>35</b>
<b>2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises</b>	<b>44</b>
<b>3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeiten</b>	<b>44</b>

<b>4</b>	<b>Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>Während der Durchführung bekanntgewordener technischer Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>Erfolgte und geplante Veröffentlichung der Ergebnisse</b>	<b>48</b>
<b>III</b>	<b>Kurzfassung (Berichtsblatt)</b>	<b>50</b>

## Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Für die Herstellung kombinierter Pflanzen ( <i>V.hirsuta</i> und <i>S.tuberosum</i> ) verwendete Bakterienstämme.....	18
Tabelle 2: Anteil der auf Wurzeln, bei denen auf Protein- bzw. RNA-Ebene das transgen kodierte Protein in Abhängigkeit vom Integrationsvektor nachweisbar ist. ....	22
Tabelle 3: Optimierung der Kanamycin (Km) Konzentration für die Selektion haariger Wurzeln an kombinierten Kartoffeln .....	25
Tabelle 4: Häufigkeit der Induktion transgener Wurzeln an den 4 verschiedenen Kartoffelsorten Albatros, Desirée, Saturna und Sabina.....	30
Tabelle 5: Übertragung kombinierter Wicken in Erde .....	32
Tabelle 6: Zusammenfassung der Hemmhofstests.....	41

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vektorkarte des optimierten hochexprimierenden Vektors pAFM .....	19
Abbildung 2: Vergleich der detektierbaren GUS-Aktivität von Wurzeln transgener GUS-exprimierender Pflanzen mit unterschiedlichen GUS-Expressionshöhen mit und ohne Vakuuminfiltration des Reagenz. ....	21
Abbildung 3: Gehalt an transgenkodiertem Protein in den Wurzeln der CombiSart-Gefäße .....	23
Abbildung 4: Auswirkung unterschiedlicher Saatguteinwaagen auf die Keimrate (%) des Wickensaatgutes .....	26
Abbildung 5: Einfluß der Stickstoffkonzentration im Wurzelinduktionsmedium auf:.....	27
Abbildung 6: Kein wiederholbarer, signifikanter Einfluss der transgen kodierten Modellproteine (VP60, CTB, Cyanophycin) auf die Induktion transgener Wurzeln an <i>Vicia hirsuta</i> -Keimlingen: .....	28
Abbildung 7: Keine Induktion von Wurzelwachstum an Kartoffelstecklingen (a) nach Verletzung und anschließender Injektion des Bakterienanzuchtmediums YEB (links) im Vergleich zu (b) einer <i>A.rhizogenes</i> Bakteriensuspension in YEB mit (rechts). ....	29
Abbildung 8: keine Auswirkung der transgen kodierten Modellproteine (VP60, CTB und Cyanophycin) auf die Wurzelmasse von <i>V.hirsuta</i> -Pflanzen in CombiSart-Gefäßen. ....	33

Abbildung 9: schematisches Pipettierschema zur Untersuchung der Wirkung von transgenem Kartoffelextrakt auf das Rhizobienwachstum mittels Hemmhoftest. ....	37
Abbildung 10: Keine Auswirkung der transgen kodierten Modellproteine (VP60, CTB und Cyanophycin) und des Lysozyms auf die Nodulation von <i>V.hirsuta</i> Pflanzen .....	38
Abbildung 11: Keine Auswirkung der transgen kodierten (a) Modellproteine (VP60, CTB und Cyanophycin) und des (b) Lysozyms auf die Effektivität der Stickstofffixierung, gemessen anhand ganzer Pflanzen im GC. ....	40

## Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
<i>A.rhizogenes</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
ARDRA	' <i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i> '
Bt-Toxin	Toxin dessen Gen vom Bakterium <i>Bacillus thuringiensis</i> stammt
cDNA	' <i>complementary DNA</i> ', ist eine DNA, die mittels des Enzyms reverse Transkriptase aus mRNA synthetisiert wurde
cm	Zentimeter
CTB	Choleratoxin B
ctxB	Kodierbereich für Choleratoxin B
DGGE	' <i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i> '
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acids)
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
<i>et al.</i>	<i>und andere (et alii)</i>
etc.	et cetera
Fa.	Firma
GC	Gaschromatograph
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GmbH & Co. KG	Gesellschaft mit beschränkter Haftung und Kommanditgesellschaft
GUS	β-Glucuronidase
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
GVP	gentechnisch veränderte Pflanze
HEW	Hühnereiweiß
Kn	Kanamycin
KMU	Kleine und mittlere Unternehmen
l	Liter
MCS	' <i>multiple cloning site</i> '
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MS	Murashige & Skoog
N	Sickstoff
n	Probenanzahl
ng	Nanogramm
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Ammoniumnitrat
niV	nahe isogene Variante
NORIKA	Nordring- Kartoffelzucht- und Vermehrungs- GmbH Groß Lüsewitz
NPTII	Neomycinphosphotransferase II
pat	Phosphinothricin-N-Acetyltransferase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PLFA	' <i>Phospholipid fatty acids</i> '
PsbY	Transitpetid für den Import in Chloroplasten
<i>Rh.leguminosarum</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
S.tuberosum	<i>Solanum tuberosum</i> (Kartoffel)
STZ	Steinbeis-Transferzentrum

T <sub>L</sub> -DNA	Sequenz der linken Transfer-DNA
TP	Teilprojekt
uidA	kodiert für die β-Glucuronidase (GUS)
vergl.	vergleiche
<i>V.faba</i>	<i>Vicia faba</i> (Ackerbohne)
<i>V.hirsuta</i>	<i>Vicia hirsuta</i> (Rauhaarige Wicke)
VP60	virales Protein 60
YEB	Yeast Extract Broth
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent
λ	Lambda
Ω	Omega

# I Kurzdarstellung

## 1 Aufgabenstellung

Der Wachstumskern BioOK will ein möglichst vollständiges Portfolio zur Analyse von Chancen und Risiken neuer Biotechnologien anbieten. Kern der Geschäftsidee ist es, orientierende sowie von Zulassungsbehörden geforderte Untersuchungen an gentechnisch veränderten Nutzpflanzen und ihrer Auswirkungen in der Umwelt anzubieten. Die zu analysierenden Risiken sind jeweils abhängig von dem integrierten Transgen und der Kulturart; die Auswahl der notwendigen Analysen ist also für jede Pflanze unterschiedlich. Daher ist es Ziel des Wachstumskerns, ein ‚Baukastensystem‘ zur selektiven Betrachtung der spezifischen Risiken zu entwickeln. Die mögliche Beeinträchtigung des Bodens ist in den meisten Fällen eine Grundfrage, die mit den heutigen Verfahren nur unter großem Zeit- und Kostenaufwand bearbeitet werden kann.

Mit dem hier vorgestellten Projekt sollte ein **Testsystem** entwickelt werden, das als Bestandteil des Baukastensystems zur Komponente "Umweltrisikobewertung" die Messung unbeabsichtigter Beeinträchtigungen der ökologischen Bodenfunktionen beiträgt. Mit Hilfe des zu entwickelnden Testsystems sollen Veränderungen der Bodenzusammensetzung und des Bodenlebens schnell und kostengünstig analysiert werden, um mögliche Beeinträchtigungen durch Transgen-kodierte Proteine zu vermeiden. Das Testsystem setzt sich aus mehreren bereits etablierten Komponenten zusammen, die im Rahmen des Projekts ergänzt und zu einem funktionellen Ganzen zusammengefügt werden mussten.

Die in diesem Projekt erzielten Ergebnisse sollen genutzt werden, um perspektivisch ein kombiniertes molekularbiologisches (Herstellung der transgenen Pflanzen) und massenspektrometrisches (Risikoabschätzung und Begleitforschung) Labor aufzubauen, in dem die Dienstleistungen routinemäßig durchgeführt werden können.

## 2 Voraussetzungen unter denen das Projekt durchgeführt wurde

Die Arbeitsgruppe von Frau Broer beschäftigt sich seit 1984 mit der Transformation von Tabak, Karotte, Raps, Kartoffel und verschiedenen Leguminosen sowie der genetischen und biochemischen Analyse der transgenen Pflanzen.

Eine der grundlegenden Arbeiten war die Konstruktion und Übertragung des Herbizidresistenz-Gens *pat* (Phosphinothricin-N-Acetyltransferase) aus *Streptomyces viridochromogenes* auf Tabak. Es schloss sich eine umfangreiche wissenschaftliche Begleitforschung mit folgenden Schwerpunkten an:

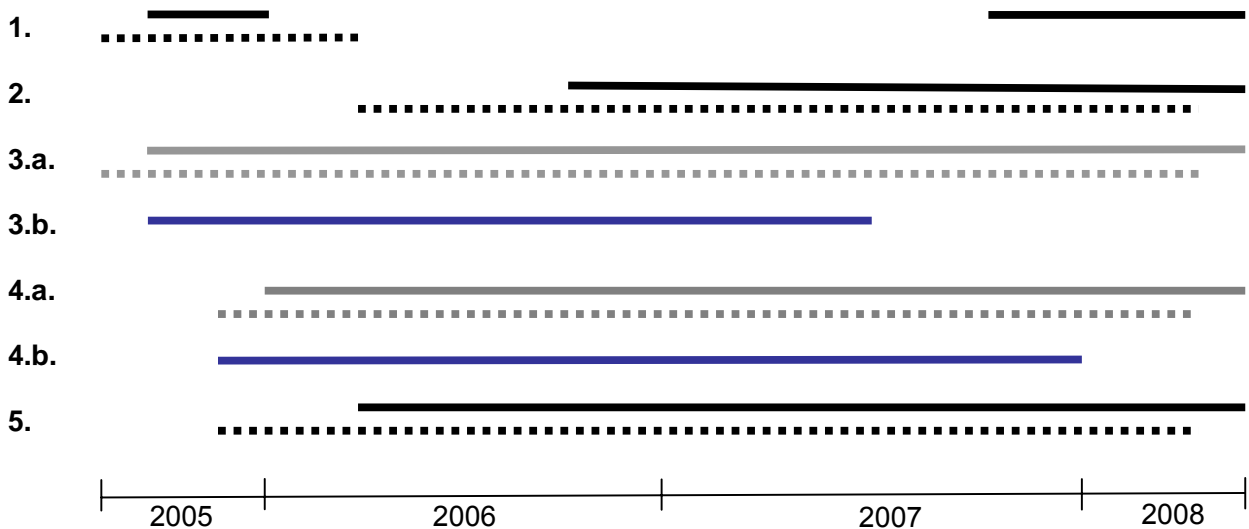
- Analyse der Phosphinothricin-N-Acetyltransferase und ihrer Wirkung auf den pflanzlichen Stoffwechsel (Dröge et al., 1992; Dröge-Laser et al., 1994; Vinnemeier et al., 1995).
- Etablierung eines sensitiven Systems zum Nachweis der Expression des *Photinus pyralis*-Luziferase-Gens in transgenen Bakterien und Pflanzen (Quandt et al., 1992).
- Produktion des biologisch abbaubarer Polymers Cyanophycin in transgenen Kartoffelknollen
- Expression von VP60 Antigen in transgenem Tabak
- Gewebespezifische Expression des  $\beta$ -Glucuronidase-Gens (*uidA*) aus *E.coli* in transgenen Wurzelknöllchen von *V.hirsuta* und *Medicago sativa* (Küster et al., 1995; Quandt.H.-J. et al., 1993; Vijn et al., 1995)
- Isolierung von Rhizobien aus Mikrokosmen (Kriete, 1992).
- Quantitative Rückgewinnung von transgenen Rhizobien aus unsterilen Böden (Kriete, 1992; Kriete et al., 1993; Kriete and Broer, 1996).
- Analyse der Auswirkungen von Hühnereiweiß (HEW)-Lysozym und T4-Lysozym auf *Rhizobium leguminosarum* (de Vries et al., 1999).
- Analyse der Auswirkungen von T4-Lysozym auf die Nodulation transgener *V.hirsuta*-Wurzeln
- Analyse der Auswirkungen von transgen-kodiertem T4-Lysozym aus Kartoffeln auf die Nodulation von *V.hirsuta*



### 3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Für das Forschungsvorhaben wurden die im Folgenden Balkenplan dargestellten Arbeitspakete definiert.

Balkenplan: Graphische Darstellung der Zeitplanung und – einhaltung, hierbei wurden die **im Antrag angegebenen Zeitvorhaben mit gestrichelter Linie** und die **durchgeführten Arbeiten bzw. Versuche mit durchgezogener Linie** dargestellt.



Farblgende: AG Broer: schwarz, Beteiligung beider Arbeitsgruppen Broer und Leinweber: grau, im Antrag nicht vorgesehene Arbeiten: blau

1. *Etablierung eines Klonierungssystems zur schnellen Integration unterschiedlicher Zielgene in einen Vektor mit hoher Expression des Zielgens (AG Broer)*

Die Klonierung eines Vektors, der eine hohe Expression des Zielgens in den Wurzeln bewirkt, wurde abgeschlossen.

2. *Molekulare Analysen (AG Broer)*

Mit der Bestimmung des Gehaltes an transgen-kodiertem Protein wurde für die Proteine CTB und VP60 an Wurzeln von jeweils 5 verschiedenen Töpfen mittels ELISA durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass es sinnvoll ist, stets 5 verschiedene Töpfe / Wiederholungen für ein

Protein zu untersuchen, um einen möglichst ausgeglichenen Proteingehalt zwischen den Proben zu erhalten.

Der Anteil transgener Wurzeln an der Gesamtwurzelzahl wurde in zwei Versuchen mit zwei verschiedenen Konstrukten bestimmt und betrug zwischen in Abhängigkeit vom verwendeten Konstrukt 63-77% bzw. 91-93%.

### 3. *Herstellung kombinierter Pflanzen und Analyse der Repräsentativität*

#### a. *Optimierung des Vicia hirsuta-Systems und Analyse der Repräsentativität (AG Broer und Leinweber)*

Das *Vicia hirsuta*-System konnte erfolgreich optimiert werden. Die Analyse der Repräsentativität, ergab bisher keine unterschiedlichen Reaktionen der Pflanzen infolge der Expression der verschiedenen Modellproteine (VP60, CTB und Cyanophycin) des Wachstumskerns.

Zusätzlich sollten diese Repräsentativitätsanalysen durch die Daten der kombinierten Kartoffel gestützt werden, die hierfür notwendigen Etablierungsarbeiten konnten erfolgreich abgeschlossen werden. Die zusätzlich zum Antrag geplanten Analysen kombinierter Kartoffeln in Combi-Sart-Gefäßen konnte jedoch auf Grund des Projektendes noch nicht durchgeführt werden.

#### b. *Übertragung des Systems der kombinierten Wicke auf Kartoffel (AG Broer)*

Das *Vicia hirsuta*-System konnte erfolgreich auf verschiedenen Kartoffelsorten übertragen werden. Die kombinierten Kartoffeln dienen als Zwischenschritt um einen Vergleich zwischen kombinierten Wicken und transgenen Kartoffeln zu ermöglichen.

### 4. *Übertragung kombinierter Pflanzen auf nicht sterile Testböden*

#### a. *Vicia hirsuta (AG Broer und Leinweber)*

Das *Vicia hirsuta*-System und die Übertragung der kombinierten *Vicia hirsuta*-Pflanzen auf nicht sterilen Boden wurden erfolgreich unter neuen Laborbedingungen etabliert. Verschiedene Parameter (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Bodenstruktur) wurden hierfür optimiert.

#### b. *Kartoffel (AG Broer)*

Die Herstellung kombinierter Kartoffelpflanzen und ihre Übertragung in Erde wurden erfolgreich etabliert.

5. *Auswirkung des transgen kodierten Proteins auf die Nodulation der Wicken als Teil der symbiontischen Rhizosphären-Mikroorganismen-Interaktion (AG Broer)*

Die Analyse kombinierter Wicken in CombiSart-Gefäßen konnte erfolgreich abgeschlossen. In den Untersuchungen konnten keine Auswirkungen der Expression der verschiedenen Modellproteine (VP60, CTB und Cyanophycin) auf die Nodulation von *V.hirsuta* detektiert werden. Dieses wurde in einem zweiten Versuch bestätigt. Erste Auswertungen der Daten zur Identifizierung der knöllchenbildenden Rhizobien mittels ERIC-PCR bestätigen, dass die Transgen-kodierten Modellproteine im verwendeten Testsystem keine Auswirkungen erkennen lassen.

## **4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde**

Transgene Pflanzen gewinnen zunehmend an wirtschaftlicher Bedeutung, weil sie neue Möglichkeiten zur Produktion von medizinischen Gütern (Impfstoffe, Antikörper, Serumalbumine) (Farran et al., 2002; Kim and Langridge, 2003; Schillberg et al., 2003; Streatfield and Howard, 2003), Vitaminen (z.B. Vitamin A im „GoldenRice“; (Potrykus, 2001) und Biopolymeren (Bohmert et al., 2002; Bohmert et al., 2000; Neumann et al., 2005) eröffnen. Weiterhin können sie zur Ertragssteigerung in der Landwirtschaft beitragen, z.B. durch die Entwicklung von Pflanzen, die resistent gegen Schädlinge und Krankheiten sind (Carlini and Grossi-de-Sa, 2002; Hammond-Kosack and Parker, 2003; Wisniewski et al., 2002) oder eine längere Haltbarkeit haben (z.B. die Anti-Matsch-Tomate (Flavr Savr; Fa. Calgene, seit 1994 in den USA zugelassen)). Die mit dem Begriff "Grüne Gentechnik" bezeichneten neuen Verfahren ermöglichen es, Gene aus beliebigen Organismen in der Pflanze zur Expression zu bringen. Die Folge sind neue Proteine und neue Eigenschaften, die auch ein verändertes Umweltverhalten der Pflanzen verursachen können. Ein wichtiger Aspekt des Umweltverhaltens von Pflanzen ist ihre Wechselwirkung mit den Böden auf denen sie wachsen. Theoretisch besteht die Möglichkeit, dass Proteine aus transgenen Pflanzen durch eine Beeinflussung von Mikroorganismenpopulationen oder durch die Anreicherung von Fremdstoffen die ökologischen Bodenfunktionen beeinträchtigen könnten.

### *Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Bodenmikroorganismen*

Das Wachstum von Pflanzen wird entscheidend von den sie umgebenden Mikroorganismen beeinflusst. Neben den pathogenen Mikroorganismen, deren negative Wirkung leicht erkennbar ist, finden sich im Boden eine Vielzahl nützlicher Bakterien, deren Anwesenheit für die Pflanzengesundheit notwendig ist (Fischbeck, 1994; Johri et al., 2003; Lynch, 1990). Nützliche Rhizobakterien und Pflanzen stehen im Stoffaustausch zum beiderseitigen Vorteil. Die Zusammensetzung der Mikroorganismen-Populationen in der Rhizosphäre wird u.a. von der chemischen Zusammensetzung der Wurzelexsudate der Pflanze beeinflusst. Außerdem wird die Zusammensetzung der Rhizosphäre-Populationen auch von der Bodenfeuchte, -azidität und -struktur (Lynch, 1990) sowie vom Entwicklungsstadium der Pflanze beeinflusst (Miller et al., 1990).

Durch ihre direkte Beziehung zum pflanzlichen Stoffwechsel sind Rhizosphären-Mikroorganismen sensitive Indikatororganismen für Umwelteinflüsse. Damit sind sie auch geeignet, Einflüsse transgener Pflanzen auf den Boden zu detektieren. Generell werden zurzeit zwei unterschiedliche Wege zur Detektion von Umwelteinflüssen besprochen. Zum einen werden sehr sensitive bzw. für das Pflanzenwachstum besonders wichtige Bakterien als Indikatororganismen

ausgewählt, zum anderen werden ganze Bakterienpopulationen über ihre DNA-Muster im Boden betrachtet.

Die Analyse von Indikatororganismen hat den wesentlichen Vorteil, Beeinträchtigungen in der Funktion oder Veränderungen in den Eigenschaften (z.B. Resistenzen gegen das transgen kodierte Protein) feststellen zu können. Dies trifft ganz besonders für Rhizobien zu, die eine Symbiose mit Leguminosen eingehen. Diese Symbiose stellt eine der wichtigsten Quellen für organischen Stickstoff in der Natur dar und ist außerordentlich spezifisch. Bestimmte Rhizobien-Spezies gehen immer nur mit dem zu ihnen passenden Wirt eine Symbiose ein. Die freilebenden Rhizobien bewirken an den Wurzelspitzen der Leguminosen eine Wurzelhaarkrümmung. Sie induzieren ein frühes Meristem, das die Grundlage für das spätere Knöllchen bildet, und die Ausbildung eines Infektionsschlauchs, durch den sie in das pflanzliche Gewebe eindringen. Von der Peribakteroidmembran umgeben, werden die Rhizobien in einzelne Zellen entlassen, wo sie zu Bakteroiden ausdifferenzieren, die nicht mehr rekultivierbar sind. Als Bakterioide sind Rhizobien nun in der Lage, mit Hilfe des Enzyms Nitrogenase atmosphärischen Stickstoff in einem sehr energieaufwendigen Prozess zu Ammonium zu reduzieren. Die Effektivität dieses Prozesses kann im Gaschromatographen über die Reduktion von Acetylen zu Ethylen quantifiziert werden (zur Übersicht siehe Rolfe and Gresshoff, 1988). Eine Assoziation von Rhizobien an Kartoffelgewebe konnte von Spencer et al. (1994) nachgewiesen werden.

Auf Basis dieser Grundlagenerkenntnisse wurde ein Rhizobien-Leguminosen-Testsystem entwickelt, das bereits zur Detektion der Beeinträchtigung von Bodenmikroorganismen durch das Herbizid Phosphinothricin eingesetzt wurde (siehe eigene Vorarbeiten AG Broer). Dabei hat sich gezeigt, dass das allgemein als nicht schädlich für Bakterien angesehene Herbizid im Labor sowohl das Wachstum als auch die Nodulierfähigkeit der Rhizobien hemmt. Das Rhizobien-Leguminosen-System hat sich somit als besonders sensibles System erwiesen (Kriete, 1992; Kriete et al., 1993). In einem umfangreichen Verbundprojekt des bmb+f wurde der Einfluss von transgen kodiertem T4-Lysozym analysiert (de Vries et al., 1999). Auch hier haben sich Rhizobien als besonders geeignet erwiesen, die Beeinträchtigung des Wachstums und der Funktionsfähigkeit zu messen. Besonders hilfreich ist es, dass sich nicht zu Bakteroiden ausdifferenzierte Rhizobien problemlos als Reinkultur aus den Knöllchen isolieren lassen und damit eine Selektion auf bestimmte, gegen die transgen abhängige Veränderung resistente Stämme leicht feststellbar wird.

Pflanzen der Gattung *Vicia spp.* bilden Symbiosen sowohl mit Rhizobien als auch mit Endomykorrhizapilzen aus. Dabei beruht die Ausbildung von Wurzelknöllchen und Mykorrhizierung bei Leguminosen auf der Expression der gleichen Gene (Hirsch et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass eine Inokulation mit *Rh.leguminosarum* und Mykorrhizapilzen die N- und P-Aufnahme und

den Ertrag von *V.faba* erhöhte (Ishac et al., 1994). Aufgrund der unmittelbaren Wechselwirkung mit bakteriellen und pilzlichen Symbionten sind Pflanzen der Gattung *Vicia spp.* besonders geeignet zur Entwicklung von neuen Testsystemen, mit denen Auswirkungen transgen kodierter Proteine auf ein erweitertes Spektrum nützlicher Bodenorganismen und die mikrobielle Biomasse in der Rhizosphäre insgesamt untersucht werden können.

Der aktuelle Stand der Wissenschaft in der Thematik „**Einflüsse transgener Pflanzen auf das Ökosystemkompartiment Boden**“ zu Projektbeginn wurde auf einem 2002 in Wien gehaltenen Symposium "The Impact of GMO's: Soil Microbiology and Nutrient Dynamics" dokumentiert. In Übersichtsbeiträgen (z.B. Bruinsma et al., 2002; Bruinsma et al., 2003a; Sayre and Seidler, 2002; Stotzky, 2002) und mehreren Einzelstudien wurden Einflüsse transgener Pflanzen auf Bodenorganismen nachgewiesen und bewertet (z.B. Biro et al., 2002; Hopkins et al., 2002; Kiezebrink et al., 2002; O'Callaghan et al., 2002; Schloter et al., 2002). Als generelle Aussage ergab sich, dass Unterschiede zwischen Böden mit und ohne transgene Pflanzen nachweisbar waren, jedoch die Einflüsse der Bodenheterogenität, des Wachstumsstadiums der Pflanzen und agronomischer Maßnahmen auf die Bodenorganismen größer sind, als spezifische Einflüsse transgen kodierter Proteine (siehe Anlage 1). Diese generelle Aussage wurde auch in nachfolgenden Publikationen bestätigt. Sessitsch et al. (2005) untersuchten die Populationszusammensetzung und Aktivität von Rhizosphären-Mikroorganismen in nicht transgenem und transgenem, glufosinat-resistentem Raps mit und ohne Herbizideinsatz in verschiedenen Wuchsstadien bis zur Reife. Diese sehr umfassende und methodisch anspruchsvolle Studie ergab, dass die Zusammensetzung und Aktivität der Mikroorganismen-Populationen durch die genetische Modifikation und den Herbizideinsatz beeinflusst wurden, diese Einflüsse jedoch klein waren im Vergleich zum Einfluss des Wachstumsstadiums der Rapspflanzen. Die Autoren vermuteten, dass Veränderungen der Rhizodeposition die beobachteten Effekte hervorgerufen haben könnten und betonen, dass insbesondere unbeabsichtigte Effekte der Gentransformation, z.B. Modifikationen der Wurzelexsudation, weiter erforscht werden müssen (Sessitsch et al., 2005).

Viele der bisherigen Untersuchungen zur Risikoabschätzung gentechnisch veränderter Pflanzen basierten auf langjährigen Freilandexperimenten, die eine sichere Feststellung Transgenbedingter Veränderungen aufgrund starker umweltinduzierter Variabilität (Witterung, Wachstumsbedingungen, räumliche Heterogenität der Bodendecke u.a.) sehr erschwert haben. Für die Masse der in Zukunft zu analysierenden Pflanzen ist ein solcher Untersuchungsansatz nicht geeignet, weil er zu langwierig und zu kostenintensiv ist. Folglich müssen Labor-Testsysteme entwickelt werden (z.B. Turrini et al., 2005). Zu deren methodischem Ansatz schlagen Bruinsma

et al. (2003a) in einem umfassenden Übersichtsartikel über Strategien zur Risikoabschätzung gentechnisch veränderter Pflanzen vor, (a) mycorrhizierende Pilze und N-fixierende Bakterien u.a. besonders empfindliche Indikatororganismen zu untersuchen oder auch (b) weniger spezifische bodenbiologische Analysen wie DGGE, PFLA, allgemeine Aktivitätsparameter oder die Umsetzbarkeit schwer zersetzbarer Rückstände einzubeziehen, um nicht erwartete Auswirkungen auf Bodenorganismen zu erfassen. Das vorgestellte Forschungsprojekt ist an diesen ökonomischen Rahmenbedingungen, Empfehlungen aus der "Scientific Community" und den spezifischen Kenntnissen, Arbeitserfahrungen und gerätetechnischen Spezialisierungen der Antragsteller ausgerichtet.

Die Auswertung des Wissensstandes führte zu folgenden Schlussfolgerungen:

(1) Die Literatur zeigte deutlich, dass zur Bewertung möglicher Einflüsse transgener Pflanzen auf Böden folgende wesentliche Eintragspfade berücksichtigt werden mussten: (a) Exsudate/Rhizodeposite → Rhizosphäre → Rhizosphären-Mikroorganismen und (b) partikuläre oberirdische und unterirdische Pflanzenrückstände → Bodenorganismen.

(2) Möglichst schnelle, kostengünstige und sensitive Methoden mussten zur Erfassung und Beschreibung beider Eintragspfade entwickelt werden, die es erlauben, Einflüsse der Bodenheterogenität, des Wachstumsstadiums der Pflanzen und agronomischer Maßnahmen festzustellen und die für entsprechend große Probendurchsätze geeignet sind.

(3) Zu entwickelnde **Testsysteme** sollten hinsichtlich der zu untersuchenden Transgenkonstrukte und Böden sowie der klimatischen und Witterungsbedingungen universell einsetzbar sein.

(4) **Kernelemente** eines solchen Testsystems können Exsudate/Rhizodeposite, Rhizobien und Endomykorrhizapilze als Symbiosepartner, die strukturelle und funktionelle Diversität der Rhizosphären-Mikroorganismen sowie die Umsetzbarkeit der Pflanzenrückstände sein. Diese Untersuchungen sollten in ihrer Gesamtheit ein ausreichend detailliertes Bild über mögliche Transgen bedingten Veränderungen im Boden liefern.

## 5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Innerhalb des BioOK - Bündnis erfolgte eine enge Zusammenarbeit aller Partner, die fünf Unternehmen der Region, das Steinbeis-Transfer-Zentrum sowie die Universität Rostock mit vier Forschungsbereichen (BioMath GmbH Rostock, biovativ GmbH Groß Lüsewitz, BioTest Labor GmbH Sagerheide, BIOSERV GmbH Rostock, Primacyt GmbH Schwerin, Steinbeis-Transferzentrum Soil Biotechnology Rostock, Universität Rostock Prof. Leinweber, Prof. Broer, Prof. Zeyner / Prof. Mohr sowie Prof. Kragl). Mittels monatlicher Treffen des BioOK Bündnis sowie spezifischer Zusammenarbeiten einzelner Bündnispartner wurde eine komplexe interdisziplinäre Zusammenarbeit und Kooperation möglich.

Im Rahmen des Verbundes 4 „Entwicklung eines schnellen in vivo Verfahrens zur Detektion geringer Einflüsse transgenkodierter Proteine auf Mikroorganismen und Stoffflüsse im Boden“ erfolgte neben regelmäßigen Gesprächen und Treffen zwischen dem Steinbeis-Transfer-Zentrum und der Universität Rostock (Arbeitsgruppen von Prof. Dr. agr. habil. Peter Leinweber und Prof. Dr. rer. nat. Inge Broer) eine enge Kooperation mit der Universität Trier (Fachbereich Geographie/Geowissenschaften, Bodenkunde: Prof. Dr. agr. habil. Sören Thiele-Bruhn, Dipl. Agrarbiologin Ute Hammesfahr). Im Rahmen weiterer Projekte der AG Broer, ergaben sich auch enge Zusammenarbeiten mit Prof. Jari P.T. Valkonen von der Universität Helsinki, mit Steen L. Nielsen vom dänischen Research Centre Flakkebjerg, mit der Prof. Wolfgang Wohlleben von der Universität Tübingen sowie mit dem Kartoffelzucht- und -vermehrungsunternehmen NORIKA.



## II Eingehende Darstellung

### 1 Erzielte Ergebnisse und Gegenüberstellung mit Zielstellung

#### 1.1 Etablierung eines Klonierungssystems zur schnellen Integration unterschiedlicher Zielgene in einen Vektor mit hoher Expression des Zielgens

##### Aufgaben- und Zielstellung:

Bisher existieren binäre Vektoren, die genutzt werden, um Transgene mit Hilfe von *A.rhizogenes* in wurzelbildende Zellen von *V.hirsuta* einzuschleusen. Diese Vektoren sind groß und unhandlich, die Integration von Fremdgenen ist sehr aufwendig. Daher sollten in die vorhandenen Vektoren Andockstellen aus Bacteriophagengenomen ( $\lambda$ -Attachment sites) eingefügt werden, die es erlauben, beliebige über PCR amplifizierte Kodierbereiche mit einer einzigen Reaktion zu integrieren, ohne auf Restriktionsschnittstellen angewiesen zu sein. Das System hatte sich im Labor von Frau Broer bereits bewährt und sollte nun auch auf die Transfervektoren übertragen werden.

Im weiteren Verlauf des Projektes stellte sich jedoch heraus, dass für das System der kombinierten Wicke vor allem ein hoher Gehalt an transgen kodiertem Protein im Boden wichtig ist; Voraussetzung hierfür ist eine möglichst hohe Expression des entsprechenden Zielgens. Daher sollte ein binärer Vektor kloniert werden, der neben einer guten ‚multiple cloning site‘ auch eine hohe Expression des Zielgens in der Wurzel bewirkt. Diese hohe Expression sollte durch einen Enhancer und zwei Omega-Fragmenten ( $\Omega$ - Fragmenten) hervorgerufen werden. Ferner ist die Verwendung verbesserter binärer Vektoren, in die man über klassische Restriktionsenzyme das gewünschte Zielgen hineinbringt, wesentlich kostengünstiger, als ein PCR Klonierungssystem mit  $\lambda$ -Attachment-Sites.

##### Durchführung:

Da dieses Projekt (03WKS04A) drei Monate später als das der Steinbeis GmbH & Co. KG für Technologietransfer für STZ Soil Biotechnology (03WKS04B) begann und Verzögerungen bei der Analyse der Exsudate vermieden werden sollten, sollten so schnell wie möglich kombinierte Pflanzen mit den entsprechenden Zielgenen hergestellt werden. Daher wurde auf die Etablierung eines besseren Klonierungssystems zunächst verzichtet. Die zu untersuchenden Zielgenen wurden in den vorhandenen binären Vektoren in den *A.rhizogenes* Stamm ARqua1 (Quandt.H.-

J. et al., 1993) und sein GUS exprimierendes Derivat AR30 (Finke, 1997) integriert (Tabelle1). Diese transformierten Stämme konnten auch für die Herstellung kombinierter Kartoffeln verwendet werden (vergl. Abschnitt 1.3.2.).

Da sich dieses System im weiteren Projektverlauf sehr gut geeignet erwies, wurde der verwendete Basisvektor optimiert. Für das System der kombinierten Wicke ist vor allem ein hoher Gehalt an transgen kodiertem Protein im Boden wichtig; Voraussetzung hierfür ist eine möglichst hohe Expression des entsprechenden Zielgens. Daher sollte ein binärer Vektor ‚ähnlich dem pLH9000 kloniert werden, der neben einer guten ‚multiple cloning site‘ auch eine hohe Expression des Zielgens in der Wurzel bewirkt.

#### Ergebnisse:

Für die Induktion der haarigen Wurzeln an *V.hirsuta* und *S.tuberosum* und damit für die Herstellung kombinierter Pflanzen wurden die in Tabelle 1 dargestellten Bakterienstämme transformiert.

**Tabelle 1: Für die Herstellung kombinierter Pflanzen (*V.hirsuta* und *S.tuberosum*) verwendete Bakterienstämme**

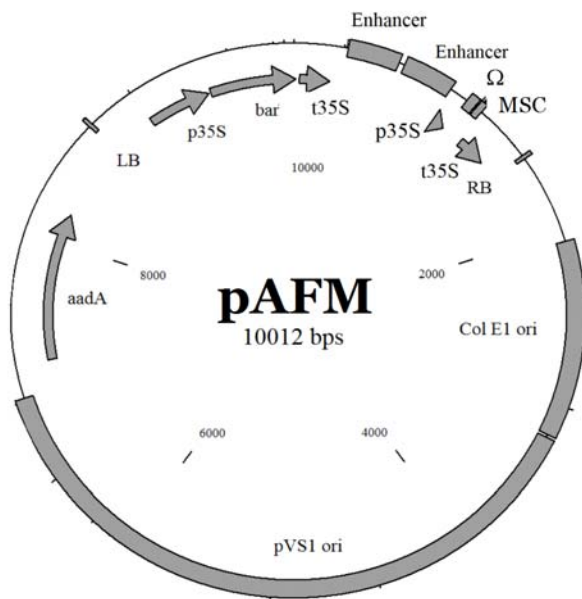
Bakterienstamm	ARqua1 Derivat	transgen kodiertes Protein	Farbcode
ARqua 1 (A1)	ARqua 1	-	
AR30	AR30	GUS, NPTII	
AR30 nptII	AR30	GUS, 2 x NPTII	
A1 nptII	ARqua 1	NPTII	
A1 VP60	ARqua 1	NPTII, VP60	
A1 ctb	ARqua 1	NPTII, CTB	
A1 PsbYcyel	ARqua 1	NPTII, Cyanophycin-Synthetase	
pGK66	ARqua 1	GUS, NPTII, Lysozym	
AR37	AR30	GUS, NPTII, Lysozym	

Für die Optimierung eines Expressionsvektors bot sich der Vektor pAF12 der AG Wohlleben an, da lediglich das *argB*-Gen durch eine großzügigen ‚multiple cloning site‘ mit sieben Restriktionsschnittstellen (AvrII; BamHI; BsrGI; Ecl136; EcoRI; NruI und SacI) ersetzt werden musste.

Im Rahmen des Projektes erfolgte die Erzeugung des optimierten Vektors pAFM (Abbildung 1), ein LH7000 Derivat, mit einem Doppelenhancer aus dem Blumenkohlmosaikvirus und einem  $\Omega$ -Fragment aus Tabakmosaikvirus. Beide Elemente bewiesen bereits in mehreren wissenschaftli-

chen Arbeiten ihre expressionsverstärkende Wirkung (Gallie and Walbot, 1992;Holtorf et al., 1995;Kay et al., 1987;Omirulleh et al., 1993).

Mit der Überprüfung der Expressionssteigerung durch den optimierten Vektor pAFM wurde im Rahmen einer Promotion begonnen.



**Abbildung 1: Vektorkarte des optimierten hochexprimierenden Vektors pAFM**

- LB : linke Border der T-DNA
- p35S: Promotor des 35S-RNA-Gens des Blumenkohlmosaikvirus
- bar : Kodierbereich des Enzyms Phosphinothricinacetyltransferase aus *Streptomyces hygroscopicus*; verleiht der transgenen Pflanze eine Resistenz gegen Glyphosate
- t35S : Terminator des 35S-RNA-Gens des Blumenkohlmosaikvirus
- Enhancer: Expressionssteigerndes Element aus dem Blumenkohlmosaikvirus
- p35S: Promotor des 35S-RNA-Gens des Blumenkohlmosaikvirus
- Ω: Omega-Fragment aus Tabakmosaikvirus
- MSC: multiple cloning site
- t35S : Terminator des 35S-RNA-Gens des Blumenkohlmosaikvirus
- RB : rechte Border der T-DNA
- Col E1 ori: Replikationsstart für die stabile Vererbung des Plasmides in *E.coli*
- pVS1 ori: Replikationsstart für die stabile Vererbung des Plasmides in Agrobakterien
- aadA: Gen für eine (Streptomycin-/Spectinomycin-Resistenz) mit einem aus dem Bakterium *E.coli*

## 1.2 Molekulare Analysen

### 1.2.1 *Vicia hirsuta*

#### Aufgaben- und Zielstellung:

Um das Ausmaß der Auswirkungen transgen kodierter Proteine auf den Boden einschätzen zu können, war es notwendig festzustellen, wie viel Transgen-kodiertes Protein von den Pflanzen produziert wird. Das *V.hirsuta*-System sollte es ermöglichen, durch die große Zahl der unabhängigen Transformanten mit unterschiedlichen Expressionsniveaus auf kleinem Raum etwa gleiche Mengen gemittelt über alle Transformanten zu produzieren. Um diese These zu überprüfen, sollten zum Einen der Gehalt an transgen kodiertem Protein in den Wurzeln und zum Anderen der Anteil transgener Wurzeln an der Gesamtwurzelnanzahl bestimmt werden.

#### Durchführung:

Die Bestimmung des Anteils transgener Wurzeln an der Gesamtwurzelnanzahl, sollte anhand des Markergens *uidA* mittels der beiden *A.rhizogenes* Stämme ARqua2 und AR30, sowie dem Stamm ARqua1 als Kontrolle (vergl. Tabelle 1) erfolgen. Die beiden *A.rhizogenes* Stämme ARqua2 und AR30 enthalten jeweils - auf der T<sub>L</sub>-DNA (AR30) bzw. auf einem binären Vektor - das Gen *uidA*, welches für eine Glucuronidase (GUS) kodiert mit einem Intron innerhalb der kodierenden Sequenz. Da Bakterien im Gegensatz zu Pflanzen nicht über einen Spleißmechanismus verfügen, kann die bakterielle GUS Expression von an den Wurzeln persistierenden Agrobakterien ausgeschlossen werden.

Da jede Wurzel eine eigenständige Transformante ist und für den Nachweis ihrer Transgenität größere Mengen an Pflanzenmaterial benötigt werden, musste eine geeignete Methode zur Vermehrung einzelner Wickenwurzeln gefunden und etabliert werden.

Um die für eine Quantifizierung des Anteils transgener Wurzeln nötige große Anzahl an Wurzeln untersuchen zu können, sollte das Markergen *uidA* genutzt werden. Somit sollte zunächst eine Analyse der Proteinexpression mittels histochemischer Blaufärbung (GUS-Test) (Jefferson et al., 1987) erfolgen. Um Zeit und Kosten zu sparen sollte daher der GUS-Test nicht wie bisher in 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäßen, sondern auf 96-Well-Platten durchgeführt. Für diese 96-Well-Platten besteht jedoch keine Möglichkeit ein Vakuum anzulegen, um so das Reagenz zuverlässig in die Wurzeln zu saugen. Aus diesem Grund wurde zuerst getestet, wie stark ein Fehlen des Vakuums die Aussage des GUS-Tests verfälscht.

Zur Bestimmung des Anteils transgener Wurzeln an der Gesamtwurzelnanzahl musste anschließend eine Extraktion von RNA aus Wickenwurzeln, die Umschreibung der RNA in cDNA sowie der Nachweis der cDNA mittels PCR, einschließlich der notwendigen Kontrollen mittels Referenzgenen zuverlässig entwickelt und etabliert werden.

Der Nachweis des Gehaltes an transgenkodiertem Protein erfolgte anhand der Modellproteine VP60 und CTB mittels ELISA (Mikschoksky, 2006) auf das lyophilisierte Wurzelmaterial.

#### Ergebnisse:

Die fehlende bakterielle GUS-Expression der beiden *A.rhizogenes* Stämme ARqua2 und AR30 auf Grund eines Introns innerhalb der kodierenden Sequenz konnte nachgewiesen werden.

Für die Vermehrung einzelner Wickenwurzel wurden zuerst drei verschiedene Nährmedien Schenk-&-Hildebrandt fest (Schenk and HILDEBRA.AC, 1972) sowie Gambourg's B5-Medium (Gamborg et al., 1968;Schenk and HILDEBRA.AC, 1972) fest und flüssig getestet. Dabei stellte sich heraus, dass die Wurzelstückchen auf dem Gambourg's B5-Medium fest und flüssig am schnellsten wuchsen. Da die Handhabung der Wurzeln im Flüssigmedium wesentlich schwerer war (Unsterilität, Platzmangel) als auf Festmedium wurden für alle weiteren Analysen die Wickenwurzeln auf Gambourg's B5- Festmedium vermehrt.

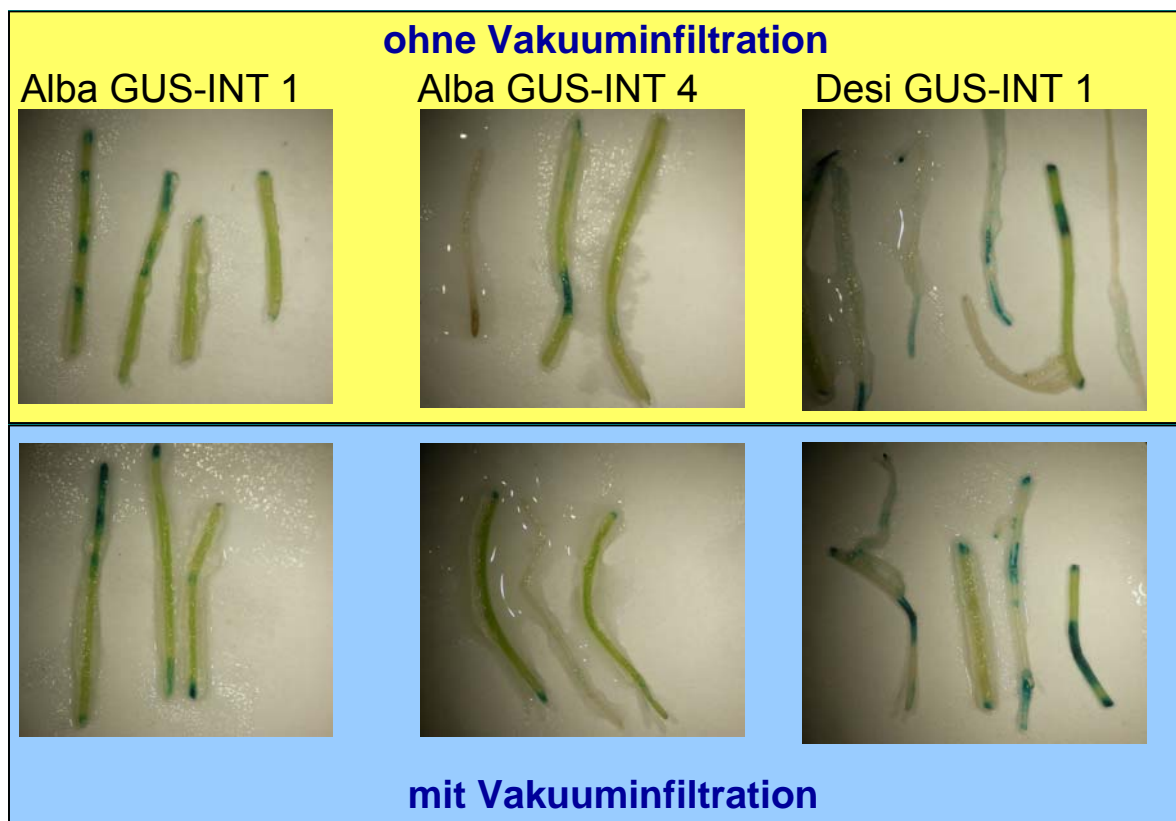


Abbildung 2: Vergleich der detektierbaren GUS-Aktivität von Wurzeln transgener GUS-exprimierender Pflanzen mit unterschiedlichen GUS-Expressionshöhen mit und ohne Vakuuminfiltration des Reagenz.

Zur Optimierung des histochemischen Nachweises der GUS-Expression auf 96-Well-Platten ohne Vakuuminfiltration wurden Wurzeln von drei verschiedenen transgenen GUS exprimierenden Kartoffelpflanzen untersucht. Wie Abbildung 2 zeigt, ist die Blaufärbung der Wurzeln ohne Vakuuminfiltration etwas geringer, als die der Wurzeln mit Vakuuminfiltration. Dieser Effekt wird vor allem bei Albatros GUS-INT event 4 deutlich. Dieses event hat von den drei getesteten Pflanzen die geringste GUS-Aktivität.

Um die Extraktion der RNA aus Wickenwurzeln zu etablieren, wurde zuerst eine für Tabak übliche kostengünstige Handisolationmethode nach Logemann (Logemann et al., 1987). Diese Methode erwies sich als nicht zuverlässig. Danach wurde ein Pflanzen-RNA-Extraktionskit der Firma Quiagen getestet, mit dem sehr gute Ergebnisse erzielt wurden. Um die einzusetzende Menge an Pflanzenmaterial von 100mg auf 10-20mg -und somit auch die Vermehrungszeit der einzelnen Wurzeln- reduzieren zu können, wurde später ein RNA-Extraktionskit für geringe Probenumfänge der Firma Machery und Nagel ausprobiert. Dieser Extraktionskit war jedoch im Vergleich zu dem Quiagenkit nicht so zuverlässig und wurde im Weiteren nur für Proben verwendet, die sich schlecht vermehren ließen. Zur Kontrolle der RNA-Extraktion und cDNA-Synthese sollte ein ständig exprimiertes Haushaltsgen als Referenzgen verwendet werden. Die Verwendung von Ubiquitin erwies sich dabei als ungeeignet, da es unmöglich war nur ein spezifisches Signal über PCR zu amplifizieren. Aktin hingegen erwies sich als zuverlässiges Referenzgen und wurde zusammen mit GUS in einer multiplex-PCR amplifiziert.

Dieser Versuch wurde zweimal durchgeführt. Insgesamt wurden 650 Wickenkeimlinge mit *A. rhizogenes* inokuliert. Zur Inokulation wurden die Stämme ARqua1, ARqua2 und AR30 verwendet.

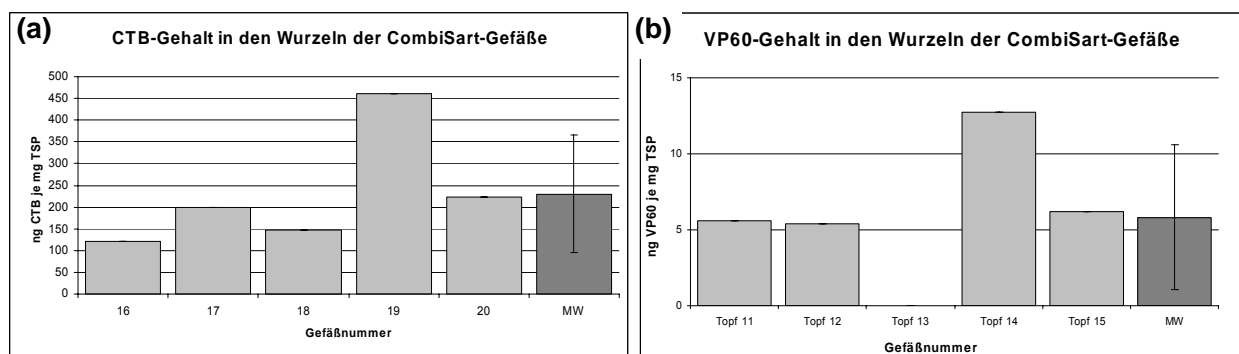
**Tabelle 2: Anteil der auf Wurzeln, bei denen auf Protein- bzw. RNA-Ebene das transgen kodierte Protein in Abhängigkeit vom Integrationsvektor nachweisbar ist.**

	Vektor	Protein nachweisbar	kein Protein nachweisbar; RNA nachweisbar	weder Protein noch RNA nachweisbar
Versuch 1	binärer Vektor (ARqua2)	55,0%	22,0%	23,0%
	single Vektor (AR30)	67,3%	25,7%	7,0%
Versuch 2	binärer Vektor (ARqua2)	43,7%	19,5%	36,8%
	single Vektor (AR30)	76,4%	14,4	9,2%

In der ersten Untersuchung wurden 523 Wurzeln auf ihre GUS-Expression getestet von den getesteten Wurzeln zeigten 55% bzw. 67% der durch ARqua2 bzw. AR30 induzierten Wurzeln eine GUS-Aktivität. Wurzeln ohne sichtbare GUS-Expression wurden anschließend auf RNA-Ebene untersucht. Bei ca. 50% bzw. 80% der durch ARqua2 bzw. AR30 induzierten Wurzeln war die RNA mittels Reverse Transkriptase PCR nachweisbar. Insgesamt waren folglich 93% der durch AR30 und 77% der ARqua2 induzierten Wurzeln für das untersuchte Gen *uidA* (kodiert für GUS) transgen (Tabelle 2). Ähnliche Ergebnisse brachte auch die Wiederholung des Versuches (Tabelle2; Versuch2).

Folglich ist es von Vorteil, das Gen des zu untersuchenden Proteins direkt auf die T<sub>L</sub>-DNA von *A.rhizogenes* zu klonieren. Diese Klonierungsarbeiten sind jedoch äußerst schwierig und zeit- und kostenintensiv, und demnach nicht zur schnellen und kostengünstigen Untersuchung vieler verschiedener Proteine, wie es im Rahmen des BioOK-Verbundes angestrebt wird, geeignet. Demzufolge ist der Ansatz zur Erhöhung der Proteinexpression in den Wurzeln kombinierter Pflanzen (vergl. Abschnitt II.1.1.) der für den Verbund bessere.

Der Nachweis der Expression des transgen kodierten Proteins erfolgte an der Wurzeln der in den CombiSart-Gefäßen angezogenen kombinierten Wicken anhand der Modellproteine VP60 und CTB (Abbildung 3). Für das Protein CTB konnte in allen 5 Gefäßen (Wiederholungen) CTB mittels ELISA nachgewiesen werden. Die Gehalte lagen im Mittel bei 230 ng CTB je mg löslichem Gesamtprotein (TSP). Die CTB-Expression zwischen den 5 Wiederholungen ist abgesehen von einem Ausreißer (Gefäß 19) sehr gleichmäßig. Die Werte liegen zwischen 150-220 ng CTB je mg TSP (Abbildung 3a). Die biologische Aktivität konnte über einen Funktionalitätstest nachgewiesen werden. Das Protein VP60 konnte in 4 der 5 Gefäße nachgewiesen werden. Sie lag im Mittel bei 5,8 ng VP60 je mg TSP. Die Höhe der Expression war wiederum, abgesehen von den Gefäßen 13 und 14, mit Werten zwischen 5,4- 6,2 ng VP60 je mg TSP gleich hoch (Abbildung 3b).



**Abbildung 3: Gehalt an transgenkodiertem Protein in den Wurzeln der CombiSart-Gefäße**

## 1.2.2 Kartoffel

### Aufgaben- und Zielstellung:

In Anlehnung an das *V.hirsuta*-System sollte möglichst viel transgen kodiertes Protein in den Wurzeln kombinierter Pflanzen synthetisiert werden und ein möglichst hoher Anteil transgener Wurzeln an der Gesamtwurzelzahl erreicht werden.

### Durchführung:

Nachdem sich herausstellte, dass nur 70-90% der induzierten Wurzeln eine sichtbare Expression des Markergens GUS zeigen, ist es möglich, dass 10-30% der induzierten Wurzeln nicht transgen sind. Eine Selektion der induzierten Wurzeln auf das Antibiotikum Kanamycin sollte diese Rate verringern. Dabei war jedoch zu beachten, dass der Kartoffelspross nicht transgen und folglich nicht resistent gegen das Antibiotikum Kanamycin ist. Es wurden zwei verschiedene Verfahren der Selektion getestet. Das erste Verfahren beinhaltete ein Injizieren der Agrobakterien in den Spross und eine Selektion der induzierten Wurzeln, sobald diese das kanamycinhaltige Nährmedium erreichen. Im zweiten Verfahren wurde der Kartoffelspross in die Bakteriensuspension getaucht und anschließend in das kanamycinhaltige Nährmedium gesteckt.

### Ergebnisse:

Um nachzuweisen, dass die an den Kartoffelstecklingen induzierten Wurzeln wirklich transgen sind, wurde der *A.rhizogenes* Stamm AR30 (Tabelle 1), welcher das Markergen *uidA* auf seiner T<sub>L</sub>-DNA trägt, verwendet. Dieses Markergen kodiert für eine  $\beta$ -Glucuronidase und erlaubt einen schnellen histochemischen Nachweis seiner Expression (Jefferson et al., 1987).

Mit Hilfe einer Selektion der induzierten transgenen Wurzeln auf das Antibiotikum Kanamycin sollte die Rate der Wurzeln, die das Markerprotein GUS exprimieren erhöhte werden. Hierfür wurden zwei verschiedene Verfahren der Selektion ausprobiert. Das erste Verfahren beinhaltete ein Injizieren der Agrobakterien in den Spross und eine Selektion der induzierten Wurzeln, sobald diese das kanamycinhaltige Nährmedium erreichen. Dieses Verfahren hat sich als ungeeignet erwiesen. Im zweiten Verfahren wurde der Kartoffelspross in die Bakteriensuspension getaucht und anschließend in das kanamycinhaltige Nährmedium gesteckt. Da 7-13% der nicht transformierten Kontrollen auf Kanamycin-haltigem Medium Wurzeln bildeten, ist mit einer gewissen Quote an falschen Positiven zu rechnen (Tabelle 3).

Um den weiteren zeitlichen Projektverlauf nicht zu gefährden, wurde auf weitere Selektionsversuche verzichtet.



**Tabelle 3: Optimierung der Kanamycin (Km) Konzentration für die Selektion haariger Wurzeln an kombinierten Kartoffeln**

Dargestellt ist die Anzahl der Pflanzen, die 22 Tage nach der Infektion bzw. nach dem Stecken ins Medium Wurzeln aus dem Sprossende wuchsen; pro Ansatz wurden 15 Pflanzen untersucht.

Km- Konzentration [mg·l <sup>-1</sup> ]	ohne <i>A. rhizogenes</i>		AR30		AR30 + Km Resistenz	
	Saturna	Sabina	Saturna	Sabina	Saturna	Sabina
25	7%	7%	7%	13%	73%	20%
50	0%	0%	0%	0%	0%	0%
75	13%	7%	0%	7%	0%	7%

Zusammenfassend gelang es ein System zu entwickeln, bei dem an 86% der infizierten Kartoffelsprosse phänotypisch normale Wurzeln wuchsen, die zu 85% im GUS-Test positiv und folglich transgen waren.

### 1.3 Herstellung kombinierter Pflanzen und Analyse der Repräsentativität

#### 1.3.1 Optimierung des *Vicia hirsuta*-Systems und Analyse der Repräsentativität

##### Aufgaben- und Zielstellung:

Die routinemäßige Produktion kombinierter *V.hirsuta* Pflanzen nach den Vorschriften von Quandt (QUANDT.H.-J. ET AL., 1993) sollte in unserer Arbeitsgruppe ausgebaut werden. Hierzu waren keimfähiges, sterilisierbares Saatgut sowie eine hohe Ausbeute an vitalen kombinierten Pflanzen notwendig.

##### Durchführung:

Bisher wurde das *V.hirsuta* Saatgut von Chambers Ltd. (London), der einzig möglichen kommerziellen Quelle, bezogen. Leider war es der Firma 2006 nicht möglich sterilisierbares und keimfähiges *V.hirsuta* Saatgut zu liefern, daher wurde zunächst eigenes Saatgut angezogen. Anschließend wurden die Sterilisations- und Anzuchtbedingungen optimiert.

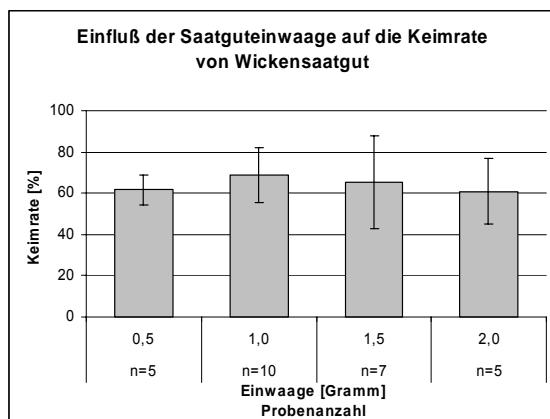
Im weiteren Verlauf des Projektes wurden *V.hirsuta* Keimlinge mit verschiedenen *A.rhizogenes* Stämmen inokuliert und die Induktion transgener Wurzeln unter dem Einfluss der verschiedenen exprimierten Gene untersucht.

##### Ergebnisse:

Zur Produktion von eigenem Saatgut wurden in 20 Töpfe *V.hirsuta* angesät. Die Gewinnung des reifen Saatgutes sollte zunächst durch Ausdreschen am Hege16 Labordrescher erfolgen. Die-

ses Dreschverfahren verletzte jedoch die Keimchale des Saatgutes, so dass die zur Saatgutsterilisation eingesetzte konzentrierte Schwefelsäure den Embryo beschädigte. Das Saatgut war, trotz Verringerung der Sterilisationszeit von 30 Minuten auf 3 Minuten, nicht mehr keimfähig. Auch eine auf Kalzium-Hypochlorid basierende Sterilisationsmethode führte nicht zum Keimen des Saatgutes. Aus diesem Grund wurden die reifen Schoten von den Pflanzen gepflückt, getrocknet, anschließend unter dem Einfluß von Wärme zum Aufspringen gebracht. Zuletzt wurden durch Sieben und Wind die Samen von den Samenschalen getrennt. Insgesamt konnte auf diese Weise ca. 75g Saatgut gewonnen werden.

Da es nach einer Sterilisation des *V.hirsuta* Saatgutes mit konzentrierter Schwefelsäure immer wieder zu Pilzwachstum kam, wurden zunächst vier neue Sterilisationsmethoden, basierend auf Kalzium-Hypochlorid und Silbernitrat, getestet. Diese Methoden störten jedoch die Keimfähigkeit des Saatguts. Nachdem die neuen Sterilisationsmethoden erfolglos blieben, sollte die Sterilisation mit konzentrierter Schwefelsäure optimiert werden. Wesentlicher Parameter war der Umfang der behandelten Probe. Daher wurden vier verschiedenen Probengrößen sterilisiert und der Einfluss der Probengröße auf die Sterilität und Keimfähigkeit der Probe ermittelt. Es zeigte sich, dass bei einer Probengröße von 1g Saatgut sowohl Sterilität als auch eine ausreichende Keimfähigkeit erreicht wurde (Abbildung 4). Des Weiteren wurden drei verschiedene Sterilisationszeiten in zwei Wiederholungen getestet. Dabei stellte sich heraus, dass Sterilisationszeiten von 15 bis 30 Minuten optimal sind.

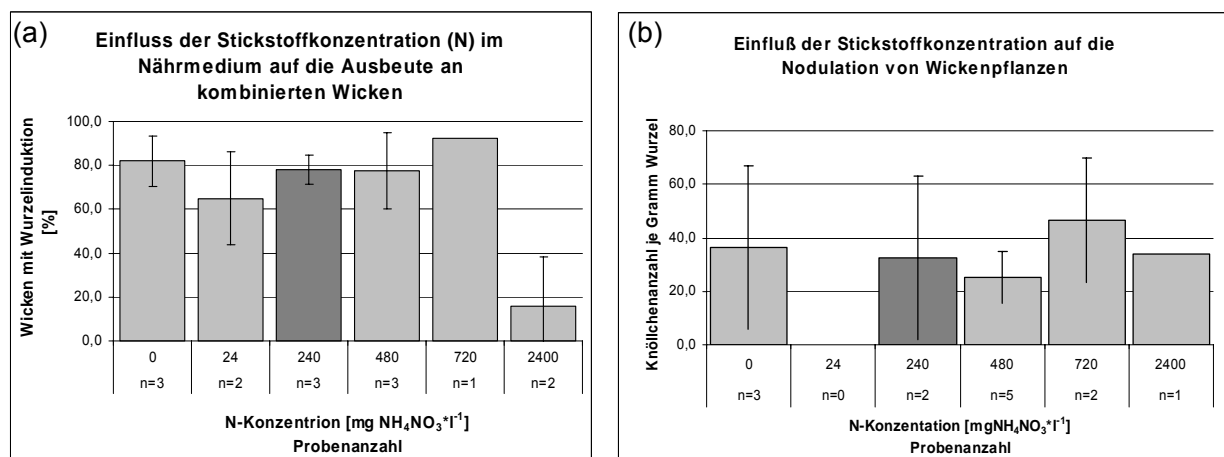


**Abbildung 4: Auswirkung unterschiedlicher Saatguteinwaagen auf die Keimrate (%) des Wickensaatgutes**

Damit das System der kombinierten Pflanze möglichst effektiv ist, musste die durch *A.rhizogenes* induzierte Bewurzelungsrate der Wicken verbessert werden. Hierzu sollte durch Zusatz von Stickstoff im Nährmedium die Vitalität der Keimlinge verbessert werden. 2006 wurden vier verschiedene Stickstoffkonzentrationen untersucht. Die Stickstoffkonzentration  $480 \text{ mg NH}_4\text{NO}_3 \cdot \text{l}^{-1}$  erschien in diesem Versuch als günstigste bezüglich der Anzahl bewurzelter Wicken,

wie auch bezüglich deren Vitalität. Die kombinierten Wicken auf  $240 \text{ mg NH}_4\text{NO}_3 \cdot \text{l}^{-1}$  zeigten leichte Stickstoffmangelsymptome (rötliche Blätter). In diesem Versuch konnte die Nodulierbarkeit dieser kombinierten Wicken in Erde nicht überprüft werden, da die Wicken schlecht anwuchsen (vergl. Abschnitt 1.4.1.). Dieser Versuch wurde 2007 zweimal wiederholt. Dabei stellte sich heraus, dass die Stickstoffkonzentration im Medium auf die Induktion transgener Wurzeln keinen Einfluss hat (Abbildung 5a). Bezüglich der Vitalität der kombinierten Wicken gibt es keine signifikanten Unterschiede.

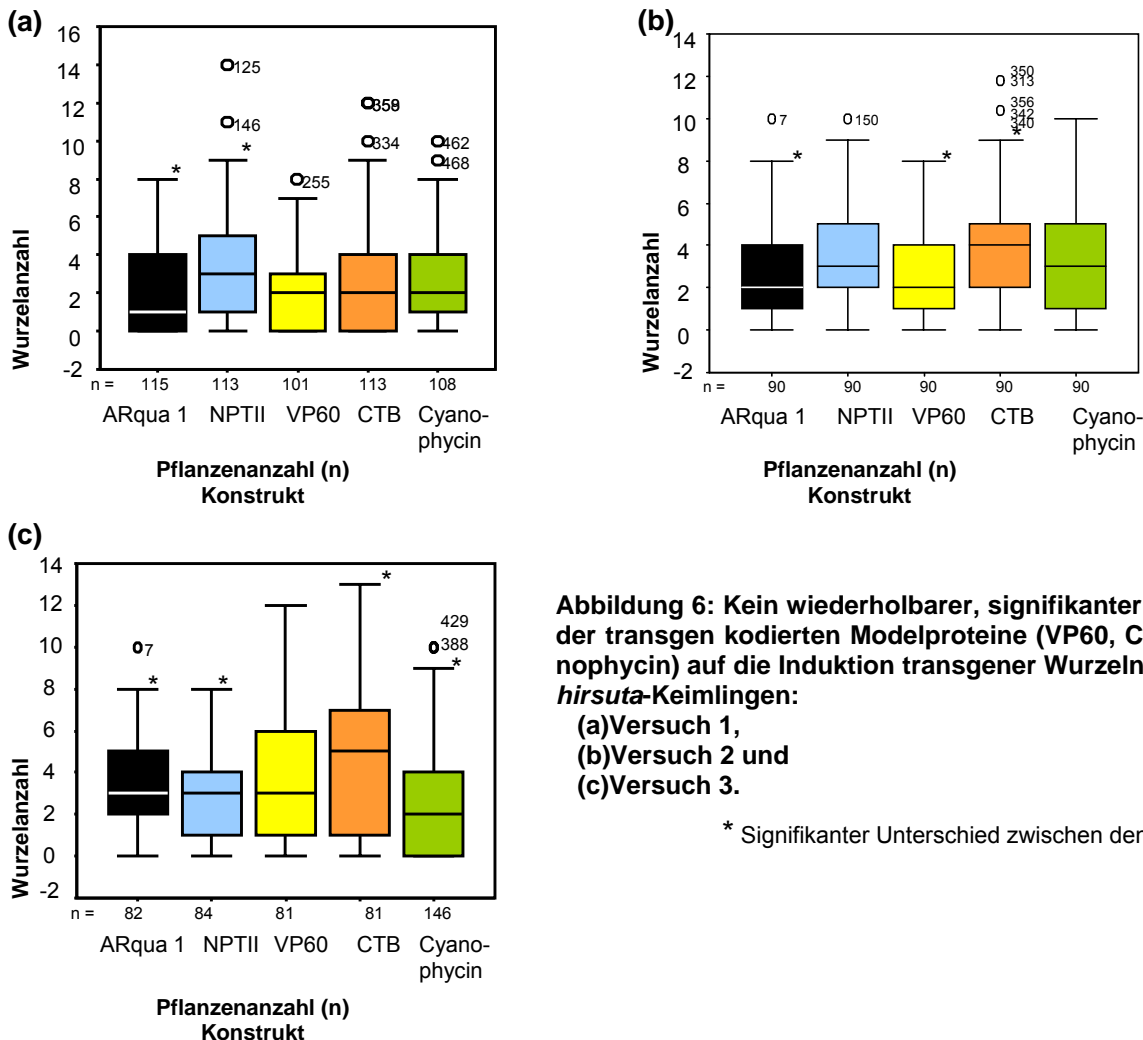
Um den Einfluss der Stickstoffversorgung der Pflanzen zum Zeitpunkt des Topfens auf die spätere Nodulation überprüfen zu können, wurden die auf den verschiedenen Stickstoffkonzentrationen angezogenen Pflanzen in Erde übertragen. In einem Versuch wurden diese kombinierten Wicken in Erde getopft und die Nodulation überprüft. Es konnten keine Auswirkungen des Stickstoffgehaltes im Nährmedium auf die Nodulation in Erde nachgewiesen werden (Abbildung 5b). Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Stickstoffzugabe im Nährmedium keine Auswirkungen auf die Induktion und Nodulation kombinierter Wicken haben.



**Abbildung 5: Einfluß der Stickstoffkonzentration im Wurzelinduktionsmedium auf:**  
 (a) die Ausbeute an kombinierten Wicken,  
 (b) die Nodulation der Wickenpflanzen in Erde

Zur Analyse der Repräsentativität wurde die Induktion transgener Wurzeln durch verschiedene genetische Konstrukte an Wickenkeimlingen analysiert. Nach dem ersten Versuch scheint es einen signifikanten Unterschied der Wurzelinduktion durch ARqua1 und der durch NPTII zu geben (siehe Abbildung 6a). In zwei weiteren Wiederholungen (siehe Abbildung 6b und c) konnte dieser Unterschied nicht bestätigt werden. In Letzteren zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Konstrukt CTB einerseits und den Konstrukten ARqua1, NPTII und Cyanophycin andererseits. Folglich sind diese Differenzen nicht wiederholbar und damit nicht aussagekräftig.

Bei größeren und v.a. wiederholbaren Differenzen könnte man von einem transgenspezifischen Effekt sprechen.



**Abbildung 6: Kein wiederholbarer, signifikanter Einfluss der transgen kodierten Modelproteine (VP60, CTB, Cyanophycin) auf die Induktion transgener Wurzeln an *Vicia hirsuta*-Keimlingen:**

- (a) Versuch 1,
- (b) Versuch 2 und
- (c) Versuch 3.

\* Signifikanter Unterschied zwischen den Proben

### 1.3.2 Übertragung des Systems der kombinierten Wicke auf Kartoffel (*Solanum tuberosum*)

#### Aufgaben und Zielstellung:

Um die Vergleichbarkeit der an kombinierten *V.hirsuta* Pflanze ermittelten Daten und der Daten von transgenen Pflanzen abschätzen zu können ist es notwendig, den Faktor 'kombinierte Pflanze' allein zu betrachten. Dies sollte am Beispiel Kartoffel (*Solanum tuberosum*) erfolgen. Daher sollte das System der kombinierten *V.hirsuta* Pflanze zusätzlich auf *S.tuberosum* übertragen werden.

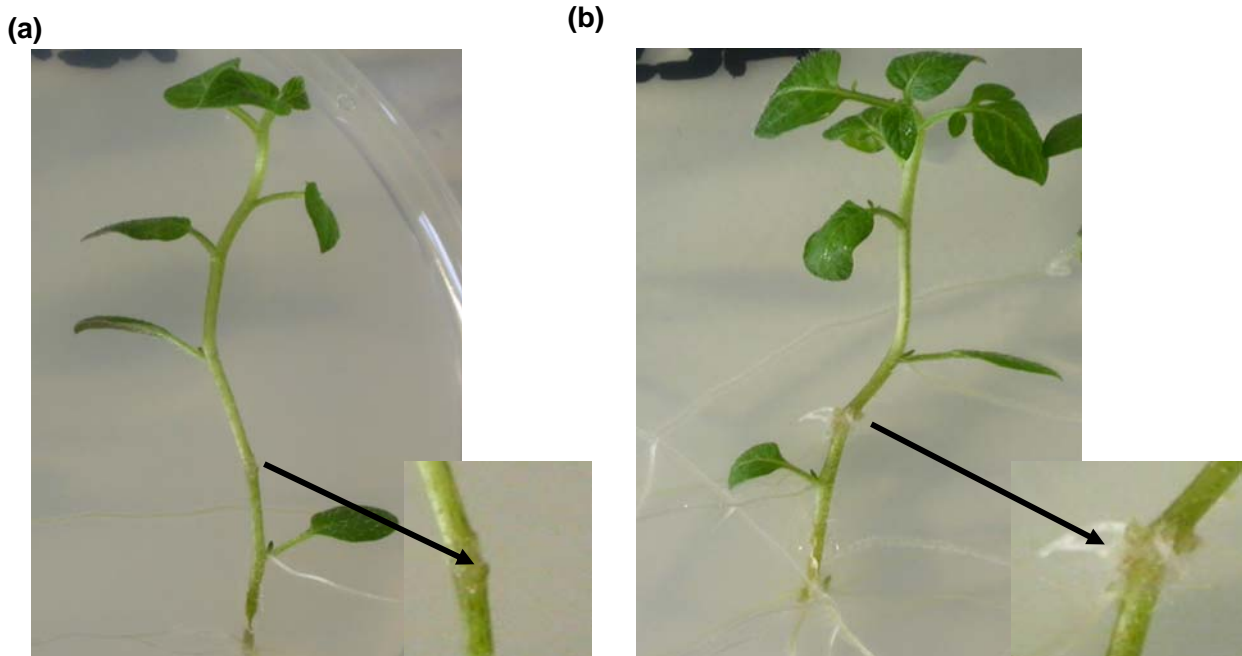
### Durchführung:

Da man bei Kartoffel - im Gegensatz zu *V.hirsuta* - mit Stecklingen aus der Gewebekultur arbeitet, wurde zunächst untersucht, ob eine Verletzung des Sprosses bereits zur Bildung von Wurzeln führt.

Des Weiteren war es wichtig phänotypisch normale und damit weitgehend hormonell homologe Wurzeln zu induzieren. Hierfür wurden mehrere *A.rhizogenes* an verschiedenen Kartoffelsorten getestet.

### Ergebnisse:

Um zu überprüfen, ob eine Verletzung des Sprosses bereits zu einer Induktion des Wurzelwachstums führt, wurden im ersten Versuch 30 Stecklinge der Kartoffelsorten Desirée, Albatros, Fasan, Saturna und Sabina oberhalb der Schnittstelle mit einer Kanüle verletzt, das Bakterien-nährmedium YEB injiziert und dann auf Schrägagarplatten inkubiert. In einem Zeitraum von vier Wochen traten an keiner Sorte Wurzeln auf (Abbildung 7a). In drei weiteren Wiederholungen wurde in Kartoffelstecklinge der Sorte Saturna das Bakteriennährmedium injiziert und die Stecklinge hinterher wieder auf Schrägagarplatten inkubiert. Bei keiner dieser Wiederholungen wuchs aus einem der insgesamt 40 Stecklinge eine Wurzel aus den Verletzungsstellen. Daher ist eine Induktion von nicht-transgenen Wurzeln durch Verletzung auszuschließen.



**Abbildung 7: Keine Induktion von Wurzelwachstum an Kartoffelstecklingen (a) nach Verletzung und anschließender Injektion des Bakterienanzuchtmediums YEB (links) im Vergleich zu (b) einer *A.rhizogenes* Bakteriensuspension in YEB mit (rechts).**

Von den 15 untersuchten *A.rhizogenes* Stämmen erwiesen sich der Stamm ARqua1 und sein Derivat AR30 für die drei Kartoffelsorten Albatros, Saturna und Sabina als geeignet, da er die Bildung phänotypisch normaler haariger Wurzeln in ausreichender Anzahl induzierte (Tabelle 4; Abbildung 7b). Da dieser *A.rhizogenes* Stamm auch für die Induktion haariger Wurzeln an *V.hirsuta* verwendet wurde, konnten die mit den entsprechenden Plasmiden (Tabelle 1) transformierten Stämme auch für Kartoffeln verwendet werden.

**Tabelle 4: Häufigkeit der Induktion transgener Wurzeln an den 4 verschiedenen Kartoffelsorten Albatros, Desirée, Saturna und Sabina**

<i>A.rhizogenes</i>	Albatros	Desirée	Sabina	Saturna
AR 15834 pRi 15834 pGP3	100%	>75%	30-50%	50-75%
AR 3297	30-50%	30-50%	50-75%	50-75%
AR 3822	0%	0%	k.A.	k.A.
AR C58C1 pRi15834 pGUS-INT	100%	100%	>75%	>75%
AR R 1024 Tn5	>75%	100%	>75%	50-75%
AR R4-T pGS Gluc1	<30%	0%	k.A.	k.A.
AR TR 101	<30%	<30%	<30%	0%
AR TR 7	<30%	30-50%	0%	0%
<b>ARqua 1 und sein Derivat AR30</b>	<b>&gt;75%</b>	k.A.	<b>100%</b>	<b>100%</b>
AR NCPPB 2655	<30%	<30%	<30%	30-50%
AR NCPPB 2656	50-75%	>75%	k.A.	k.A.
AR NCPPB 2659	0%	0%	k.A.	k.A.
AR NCPPB 8196	<30%	<30%	0%	<30%
AR R 1016 rol C-	50-75%	50-75%	30-50%	>75%
AR R 1023 rol B-	>75%	50-75%	50-75%	>75%

## 1.4 Übertragung kombinierter Pflanzen auf nicht sterile Testböden

### 1.4.1 *Vicia hirsuta*

#### Aufgaben- und Zielstellung:

Vor Projektbeginn wies die Übertragung der kombinierten Pflanzen von den semisterilen Nährböden in Petrischalen in die nicht sterilen Testböden größere Schwierigkeiten auf. Etwa 30% der Pflanzen starben in Folge des Umgebungswechsels ab. Durch eine Regulation der Boden- und Luftfeuchtigkeit sollten die Wachstumsbedingungen so optimiert werden, dass jeweils sechs Pflanzen pro Gefäß stressfrei kultiviert werden könnten. Die hohe Dichte sollte zum einen dazu

führen, dass der Boden möglichst stark durchwurzelt wird, um eine maximale Konzentration des transgen kodierten Proteins im Boden und damit auch eine maximale Veränderung zu induzieren. Zum Anderen sollte eine hohe Zahl der individuellen Transformanten pro Gefäß eine bessere statistische Absicherung der Ergebnisse mit sich bringen. Diese Arbeit erfolgte gemeinschaftlich mit der Arbeitsgruppe von Prof. Leinweber.

#### Durchführung:

Für die Übertragung kombinierter Wicken aus den semisterilen Petrischalen auf unsterile Böden, sollte zunächst die Vitalität der Pflanzen durch Zugabe von Stickstoff im Nährmedium erhöht werden (vergl. Abschnitt II.1.3.1.). Anschließend erfolgte ein erster Topfversuch im Pflanzenanzuchttraum der Universität Rostock. Auf Grund der ungünstigeren Anzuchtbedingungen (Boden, Luftfeuchte, Temperatur nicht regulierbar) wuchsen die kombinierten Wicken nur schlecht an. Daher erfolgte die weitere Anzucht und Kultivierung der kombinierten Wicken in den CombiSart-Gefäßen in einer klimatisierten Pflanzenkammer im Agrobiotechnikum Groß-Lüsewitz bei 20°C und 60% relativer Luftfeuchte. Dort wurden die bis zur Beprobung bzw. dem Versuchende kultiviert.

#### Ergebnisse:

Mit dem Zusatz von Stickstoff im Nährmedium konnte die Vitalität der kombinierten Wickenpflanzen verbessert werden. Um die Nodulierbarkeit dieser kombinierten Wicken und die Übertragbarkeit in unsterile Böden zu testen, wurden die so erzeugten kombinierten Wicken in Erde gesetzt. In diesem ersten Topfversuch wuchsen jedoch nur 10-25% der kombinierten Wicken an. Der offensichtlichste Grund war die hohe Verschlammungsneigung des verwendeten Bodens.

Aus diesem Grund wurde für die folgenden Analysen der kombinierten Wicken in den CombiSart-Gefäßen ein Boden mit mehr organischer Substanz und damit geringerer Verschlammungsneigung verwendet.

Für diese Analyse wurden 15g Saatgut sterilisiert. Daraus konnten 758 Keimlinge auf das Nährmedium mit  $240\text{mgNH}_4\text{NO}_3\cdot\text{l}^{-1}$  ausgelegt und mit den erzeugten *A.rhizogenes* Stämmen (vergl. Tabelle 1) inokuliert werden. An 69,0% der inokulierten Wickenkeimlinge wurden durch die *A. rhizogenes*-Stämme transgene Wurzeln induziert. Von den inokulierten Keimlingen waren jedoch nur 47,5% der kombinierten Pflanzen hinreichend vital für eine Übertragung in Erde. In diesem Versuch wurden insgesamt 30 CombiSart-Gefäße mit 6 verschiedenen Varianten à 5 Wiederholungen kombinierter Wicken bepflanzt (Tabelle5, Spalte 1 und 2). Jedes CombiSart-Gefäß wurde mit 6 kombinierten Wickenpflanzen bepflanzt. Von den gepflanzten Wicken wuch-

sen 0-100% an; durchschnittlich 76,7% (Tabelle 5; Spalte 4). Um eine Vergleichbarkeit der CombiSart-Gefäße untereinander zu gewährleisten, wurden Wicken nachgepflanzt (Tabelle 5; Spalte 6). Die sinkende Standartabweichung von 1,5 auf 1,1 zeigt die höhere Ausgeglichenheit der Pflanzenanzahl pro Topf an (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Übertragung kombinierter Wicken in Erde**

Topf-Nr.	Bakterienstamm	Bestand 18 Tage nach Topfen	Anteil überlebender Pflanzen [%]	Qualitätsnote vor dem Topfen	Anzahl nachgepflanzter Pflanzen	Bestand 8 Tage nach Nachtopfen	Anteil insges. überlebender Pflanzen [%]
1	2	3	4	5	6	7	8
1	ARqua1	3,0	50,0%	2,3	4	2	40,0%
2	ARqua1	5,0	83,3%	2,0	2	2	62,5%
3	ARqua1	6,0	100,0%	2,2	0	2	100,0%
4	ARqua1	5,0	83,3%	2,5	0	1	66,7%
5	ARqua1	6,0	100,0%	1,7	0	2	100,0%
6	AR30 psingle	5,0	83,3%	2,0	0	3	66,7%
7	AR30 psingle	2,0	33,3%	1,5	4	3	30,0%
8	AR30 psingle	3,0	50,0%	2,0	4	3	60,0%
9	AR30 psingle	6,0	100,0%	2,3	0	1	83,3%
10	AR30 psingle	4,0	66,7%	1,5	0	3	50,0%
11	ARqua1 VP60	5,0	83,3%	1,8	0	3	83,3%
12	ARqua1 VP60	4,0	66,7%	1,7	0	3	50,0%
13	ARqua1 VP60	4,0	66,7%	1,5	2	4	25,0%
14	ARqua1 VP60	4,0	66,7%	1,7	2	4	50,0%
15	ARqua1 VP60	0,0	0,0%	1,8	7	4	38,5%
16	ARqua1 ctb	6,0	100,0%	1,4	0	2	100,0%
17	ARqua1 ctb	5,0	83,3%	1,8	0	2	50,0%
18	ARqua1 ctb	6,0	100,0%	1,8	0	2	100,0%
19	ARqua1 ctb	6,0	100,0%	1,6	0	2	100,0%
20	ARqua1 ctb	6,0	100,0%	1,5	0	1	100,0%
21	ARqua1 psbycyel	4,0	66,7%	1,5	0	2	83,3%
22	ARqua1 psbycyel	5,0	83,3%	2,5	0	2	83,3%
23	ARqua1 psbycyel	6,0	100,0%	2,3	0	2	83,3%
24	ARqua1 psbycyel	6,0	100,0%	2,0	0	2	83,3%
25	ARqua1 psbycyel	5,0	83,3%	2,2	0	1	83,3%
26	niV	3,0	50,0%	1,2	3	1	55,6%
27	niV	4,0	66,7%	2,0	0	1	66,7%
28	niV	6,0	100,0%	1,3	0	1	100,0%
29	niV	2,0	33,3%	1,2	4	4	60,0%
30	niV	6,0	100,0%	1,5	0	2	83,3%
<b>Mittelwert</b>		<b>4,6</b>	<b>76,7%</b>	<b>1,8</b>	<b>1,1</b>	<b>2,2</b>	<b>71,3%</b>
<b>Standartabweichung</b>		<b>1,5</b>	<b>25,4%</b>	<b>0,4</b>	<b>1,9</b>	<b>1,0</b>	<b>23,0%</b>



Während der Ernte der kombinierten Wicken wurden die Pflanzenanzahl pro Topf, die Wurzelmasse und die Knöllchenanzahl bestimmt. Es befanden sich 2 bis 7 Wicken in einem CombiSart-Gefäß. Die gebildete Wurzelmasse pro Pflanze lag zwischen 6,0 und 0,4 Gramm Wurzel je Pflanze. Trotz dieser hohen Schwankung zwischen den Proben scheint es keine signifikanten Konstrukt-spezifischen Unterschiede zu geben (vergl. Abbildung 8). Auch bezüglich der Knöllchenanzahl und -morphologie konnten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Modellproteinen VP60, CTB und Cyanophycin beobachtet werden (vergl. Abschnitt 1.5; Abbildung 10a).

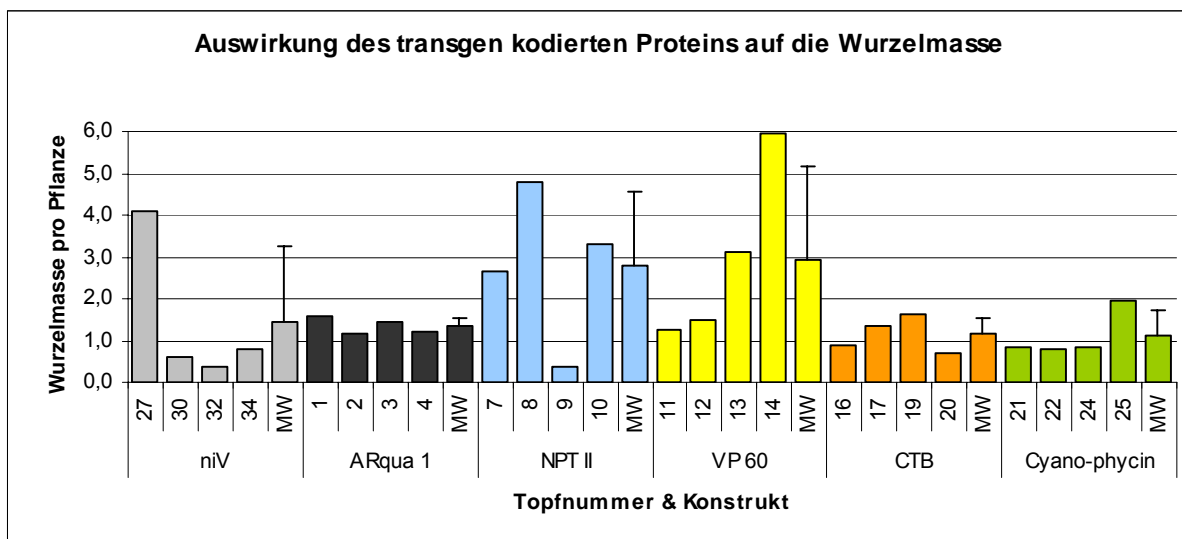


Abbildung 8: keine Auswirkung der transgen kodierten Modellproteine (VP60, CTB und Cyanophycin) auf die Wurzelmasse von *V.hirsuta*-Pflanzen in CombiSart-Gefäßen.

#### 1.4.2 Kartoffel

##### Aufgaben- und Zielstellung:

Um eine alleinige Untersuchung des Faktors „kombinierte Pflanze“ untersuchen zu können, sollte die kombinierte Kartoffel zusätzlich in das Projekt aufgenommen werden. –Für diese Analysen war erneut die Übertragung in Erde zu gewährleisten. In Anlehnung an das System der kombinierten Wicke, war es auch hier das Ziel, eine hohe Dichte der Pflanzen zu erzielen. Dies ist essentiell zur Erzielung einer maximalen Konzentration des transgen kodierten Proteins im Boden. Zusätzlich sollten die Pflanzen möglichst stressfrei kultiviert werden.

##### Durchführung:

Der erste Topfversuch kombinierter Kartoffeln erfolgte in den CombiSart-Gefäßen in der Klimakammer im Agrobiotechnikum Groß-Lüsewitz. Diese Pflanzen wuchsen jedoch leider nicht an.

Anschließend erfolgten weitere Übertragungsversuche mit Wildtyp-Stecklingen und kombinierten Kartoffeln im Pflanzenanzuchtraum der Universität Rostock. Um das Einscharren der Blattachsen und damit das Wachstum nicht transgener Wurzeln zu vermeiden, wurde im Anschluss die Induktion transgener Wurzeln in Flüssigmedium untersucht. Letztlich brachte die Induktion transgener Wurzeln auf größeren Petrischalen (Durchmesser: 150mm) und die folgende Kultivierung in Erde gute Resultate.

### Ergebnisse:

Da im ersten Topfversuch kombinierter Kartoffeln in den CombiSart-Gefäßen in Groß-Lüsewitz die Pflanzen nicht anwuchsen und die Kapazität der CombiSart-Gefäße begrenzt ist, wurden zunächst Kartoffeln in Blumentöpfe gesetzt. Dazu wurden zunächst Wildtyp-Stecklinge angezogen unter ähnlichen Bedingungen, wie die kombinierten Kartoffeln, in Erde gesetzt. Diese Kartoffeln wuchsen sehr gut. In einem weiteren Versuch wurden kombinierte Kartoffeln getopft. Diese wuchsen nur zu 33% an.

Um den kombinierten Kartoffeln die Umstellung von der semisterilen Petrischale auf Erde zu erleichtern, sollten die transgenen Wurzeln an Stecklingen, die in Flüssigmedium wachsen, induziert werden. Mit dieser Methode sollte außerdem ein Einscharren der Blattachsen vermieden werden. Dies erschien notwendig, um eventuell aus den Blattachsen wachsende „Wildtypwurzeln“ zu vermeiden. Hierfür musste zunächst das optimale Flüssignährmedium ausgemacht werden. Es wurden ein MS-basiertes Medium (Murashige and Skoog, 1962) und Hoagland Medium (Hoagland and Arnon, 1950) getestet. Dabei stellte sich heraus, dass die Kartoffeln lediglich auf Hoagland Medium wuchsen. Somit wurde die Induktion transgener Wurzeln an in Hoagland Medium wachsenden Kartoffelstecklingen durchgeführt. Dieses Verfahren erwies sich jedoch als ungeeignet. *A. rhizogenes* konnte an den entsprechenden Verletzungsstellen keine gentechnisch veränderten Wurzeln induzieren.

Anschließend erfolgte ein weiterer Versuch zur Übertragung kombinierter Kartoffeln in Erde. Hier erfolgte die Modifikation in der Nutzung größerer Petrischalen (Durchmesser: 150mm) für die Erzeugung kombinierter Kartoffeln mit längeren Internodien.

Für diesen Versuch wurden fünf Petrischalen à drei Stecklinge mit dem *A. rhizogenes* Stamm AR30 (trägt das Markergen GUS auf der T<sub>L</sub>-DNA, vergl. Tabelle 1) infiziert. Nach 19 Tagen hatten 14 der 15 infizierten Stecklinge transgene Wurzeln gebildet. Von diesen 14 Stecklingen hatten 12 ausreichend lange transgene Wurzeln (>1cm) für die Versorgung der kombinierten Pflanze in Erde. Vor dem Transfer der Pflanzen in Erde wurde von möglichst jeder Wurzel ein GUS-Test durchgeführt. In diesem Test zeigten von 78 getesteten Wurzeln 93,6% eine GUS-Aktivität. Anschließend wurden zusätzlich zu den 12 kombinierten Kartoffelpflanzen auch 3 nahe isogene

Kontrollen in Erde gebracht. Alle 15 getopften Kartoffelpflanzen wuchsen gut an und konnten nach zwei Monaten geerntet und untersucht werden. Die kombinierten Kartoffelpflänzchen waren sehr vital. Vier von 12 Pflanzen hatten bereits Stolonen gebildet und 1-3 kleine Knollen.

Von jeder Pflanze wurden 3-8 Wurzeln hinsichtlich ihrer GUS-Aktivität getestet. Insgesamt wurden 84 (potentiell) transgene Wurzeln getestet, von denen 80 (95,2%) eine GUS-Aktivität zeigten. Leider wiesen auch 33,3% der getesteten nahe isogene Kontrollen eine GUS-Aktivität auf. Die gebildeten Stolonen waren phänotypisch durch ihr dickes Erscheinungsbild von den Wurzeln zu unterscheiden. Wie erwartet, zeigten sie keine GUS-Aktivität.

Zusammenfassend zeigt dieser Versuch, dass kombinierte Kartoffeln sich sehr gut in Erde übertragen und kultivieren lassen. Da auch 33,3% der getesteten nahe isogene Kontrollen eine GUS-Aktivität aufwiesen, welche durch das Erdmedium bedingt ist, konnte nicht überprüft werden, ob und wie viele der untersuchten Wurzeln nicht-transgen waren.

## **1.5 Auswirkung des transgen kodierten Proteins auf die Nodulation der Wickenpflanzen als Teil der symbiontischen Rhizosphären-Mikroorganismen-Interaktion**

### Aufgaben- und Zielstellung:

Die Produktion des transgen kodierten Proteins kann die Fitness der Bakterien im Boden beeinträchtigen. Im Fall der Rhizobien ist eine solche Beeinträchtigung zum Einen an der Zahl der Knöllchen, aber auch an dem Grad der Stickstofffixierung zu messen. Aufgabe des Arbeitspaketes ist es, das schnellste, kostengünstigste und aussagefähigste Verfahren zur Erfassung dieser Beeinträchtigung zu ermitteln. Getestet wurden:

1. Die Nodulationshäufigkeit
2. Die Effektivität der Stickstofffixierung
3. Die Identifizierung der knöllchenbildenden Rhizobien
4. Das Rhizobienwachstum unter dem Einfluss transgenen Kartoffelextraktes

Der Vergleich der Ergebnisse dieser Verfahren in Abhängigkeit von dem eingesetzten Transgen, sollte es ermöglichen, das oder die jeweils optimalen Verfahren zu identifizieren.

### Durchführung:

Bezüglich der Bestimmung der Nodulationshäufigkeit und Effektivität der Stickstofffixierung gab es drei Versuche:

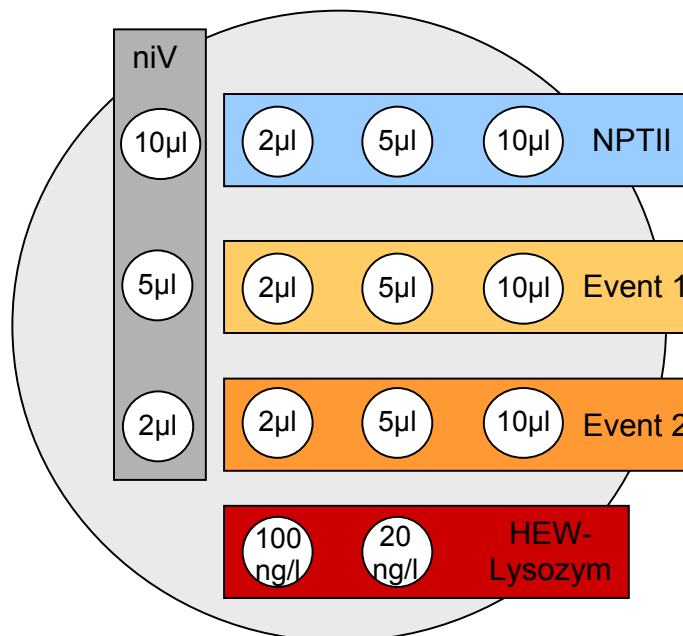
- erster Versuch: Kultivierung von bis zu vier kombinierten *V.hirsuta*-Pflanzen, welche die Modellproteine (VP60; CTB bzw. Cyanophycin) exprimieren, in den CombiSart-Gefäßen im Agrobiotechnikum Groß-Lüsewitz (vergl. II.1.3.1. und II.1.4.1.)
- zweiter Versuch: Kultivierung einzelner kombinierter *V.hirsuta*-Pflanzen, welche die Modellproteine (VP60; CTB bzw. Cyanophycin) exprimieren, in Töpfen im Pflanzenanzuchtraum der Universität Rostock (vergl. II.1.4.1.)
- dritter Versuch: Kultivierung einzelner kombinierter *V.hirsuta*-Pflanzen, welche Lysozym exprimieren, in Töpfen im Pflanzenanzuchtraum der Universität Rostock

Zur Bestimmung der Nodulationshäufigkeit wurde nach Ernte der kombinierten Wicken die Knöllchenanzahl pro Topf (erster Versuch) bzw. pro Pflanze (2. und 3. Versuch) bestimmt.

Zur Quantifizierung der Effektivität der Knöllchen Luftstickstoff zu fixieren wurde die Fähigkeit zur Bindung von Acetylen und dessen Reduktion zu Ethylen durch die Nitrogenase bestimmt im Gaschromatographen (GC) bestimmt. Im Rahmen des im Rahmen des BMBF-geförderten Projekts T4-Lysozym/Nützling FKZ: 0311299 TP1; 1996-1999) wurde diese Untersuchungsmethoden für kleine Wickenpflanzen aus dem Freiland bereits etabliert. Es wurden einzelne Knöllchen (erster Versuch) bzw. ganze Wickenpflanzen (2. und 3. Versuch) in die Testgefäße des GC's überführt, mit je 1ml Acetylen begast. Die Umwandlung von Acetylen in Ethylen durch die Nitrogenase in den Knöllchen wurde gemessen.

Um zu bestimmen, ob die Wurzeln der kombinierten Wicken von verschiedenen Rhizobienstämmen besiedelt wurden, wurden aus den Knöllchen des ersten Versuches Rhizobien isoliert. Anschließend wurde mittels ERIC-PCR ein genetischer Fingerabdruck erstellt und die gewonnenen Daten im GelCompare-Programm ausgewertet.

Des Weiteren wurde das Rhizobienwachstum unter dem Einfluss transgenen Kartoffelextraktes in Hemmhofstests untersucht. Hierfür wurden Petrischalen mit einem Basismedium und einem Rhizobien-haltigen Weichagar beschichtet. Anschließend wurden 2µl, 5µl oder 10µl des transgenen Kartoffelextraktes der beiden untersuchten Events eines Modellproteins (Tabelle 6) auf eine Petrischale pipettiert. Daneben wurden auf jede Petrischale die nahe isogene Variante und die transgene NPTII-Kontrolle nach dem gleichen Schema aufgetragen (Abbildung 9). Zur Bewertung der Stärke der Hemmung wurden des weiteren Hühnereiweiß (HEW)-Lysozym in den Konzentrationen 20ng\*l<sup>-1</sup> und 100ng\*l<sup>-1</sup> aufgetragen. Zur Untersuchung der Wirkung des transgenen Kartoffelextraktes auf das Rhizobienwachstum wurden insgesamt zwei Versuche mit sterilem Blattmaterial, zwei Versuche mit Freilandknollen aus den Jahren 2005 und 2006, sowie ein Versuch mit sterilen Mikroknollen durchgeführt. Im Rahmen dieser Versuche wurde jeweils Material von zwei Events der Kartoffeln, die eines der drei Modellproteine (VP60; CTB bzw. Cyanophycin) exprimieren, untersucht (vergl. Tabelle 6).



**Abbildung 9: schematisches Pipettierschema zur Untersuchung der Wirkung von transgenem Kartoffelextrakt auf das Rhizobienwachstum mittels Hemmhoftest.**

Ergebnisse:

**1. Auswirkung der transgen kodierte Modellproteine (VP60, CTB und Cyanophycin) sowie Lysozyms auf die Nodulation kombinierter Wicken**

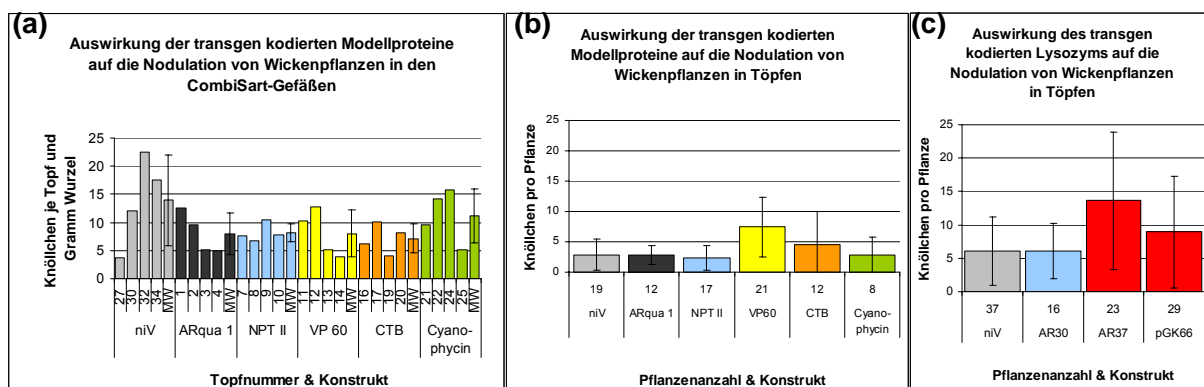
Um die Auswirkung der transgen kodierte Modellproteine NPTII, VP60, CTB und Cyanophycin auf die Interaktion zwischen *V.hirsuta* und *Rh.leguminosarum* zu untersuchen, wurde von den in den CombiSart-Gefäßen im Agrobiotechnikum angezogenen *V.hirsuta*-Pflanzen die Knöllchenanzahl pro Topf bestimmt. Sowohl bezüglich der Knöllchenanzahl, wie auch bezüglich der Knöllchenmorphologie konnten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Modellproteinen VP60, CTB und Cyanophycin beobachtet werden (Abbildung 10a).

Dieses Ergebnis wurde durch die wiederholte Kultivierung (Versuch 2) kombinierter Wicken, mit Expression der entsprechenden Modellproteine, im Pflanzenanzuchtraum der Universität Rostock bestätigt (Abbildung 10b).

Da die im Rahmen des Wachstumskerns verwendeten Modellproteine VP60, CTB, und Cyanophycin keinen Einfluss auf die Nodulation kombinierter Wickenpflanzen haben, sollte ein weiteres Protein genutzt werden, dem ein Einfluss auf die Nodulation kombinierter Wickenpflanzen

bereits nachgewiesen wurde. In Rahmen des Projektes Modellsysteme (FKZ:0311044 1994-96) wurde do bereits gezeigt, dass kombinierte Wicken mit Lysozymexpression auf Petrischalen eine um 40-50% geringere Nodulation aufwiesen. In einem weiteren BMBF-geförderten (Projekt T4-Lysozym/Nützling FKZ: 0311299 TP1; 1996-1999) konnte gezeigt werden, dass in Kartoffelknollen exprimiertes Lysozym keinen Einfluss auf die Nodulation der sich ebenfalls im Topf befindenden Wicken hat. Es wurde vermutet, dass das Lysozym an den Boden gebunden wird, und folglich nicht mehr aktiv ist. Eine Expression des Lysozyms unmittelbar in den Wurzeln kombinierter Wicken, könnte somit auch in Erde einen signifikanten Effekt auf die Nodulation dieser Wicken haben.

Daher wurden Wickenkeimlinge mit den gleichen *A.rhizogenes* Stämmen (AR30; AR37; pGK66), wie sie bereits in den beschriebenen vorangegangenen Projekten verwendet wurden, infiziert. Anschließend wurden die so erzeugten kombinierten Wicken zwei Monate in Erde im Pflanzenanzuchtraum der Universität Rostock kultiviert. Im Folgenden wurde die Knöllchenanzahl pro Pflanze und die Effektivität der Stickstofffixierung mittels Gaschromatographen (GC) bestimmt. Hinsichtlich der Zahl der Knöllchen pro Pflanze (Abbildung 10c) gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Lysozym exprimierenden Wurzeln (pGK66; AR37) und den Kontrollen (wt; AR30).



**Abbildung 10: Keine Auswirkung der transgen kodierten Modellproteine (VP60, CTB und Cyanophycin) und des Lysozims auf die Nodulation von *V.hirsuta* Pflanzen**

- (a) Nodulation der kombinierten Wicken, die die Modellproteine (VP60, CTB bzw. Cyanophycin) in ihren Wurzeln exprimieren und in den CombiSart-Gefäßen im Agrobiotechnikum in Groß-Lüsewitz kultiviert wurden.
- (b) Nodulation der kombinierten Wicken, die die Modellproteine (VP60, CTB bzw. Cyanophycin) in ihren Wurzeln exprimieren und in Töpfen in der Universität Rostock kultiviert wurden.
- (c) Nodulation der kombinierten Wicken, die Lysozym in ihren Wurzeln exprimieren und in Töpfen in der Universität Rostock kultiviert wurden.

## **2. Auswirkung der transgen kodierte Modellproteine (VP60, CTB und Cyanopycin) sowie Lysozyms auf die Effektivität der Stickstofffixierung**

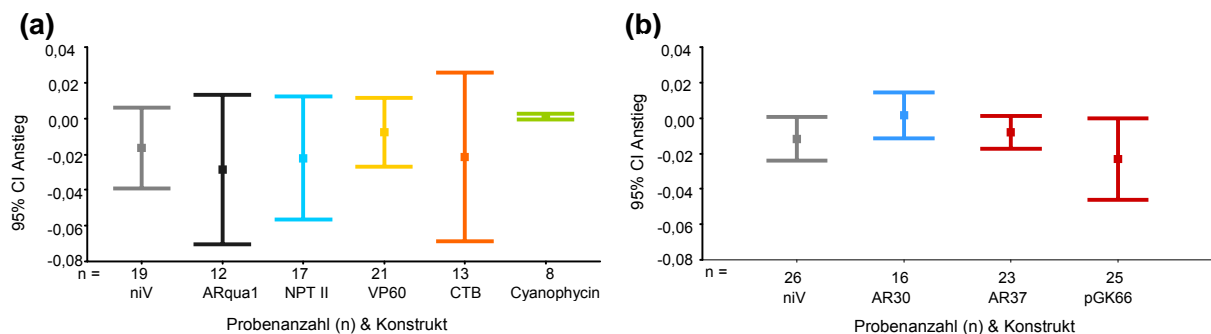
Zur Untersuchung der Knöllchen hinsichtlich ihrer Fähigkeit Luftstickstoff zu fixieren, sollte die Aktivität der Nitrogenase im Gaschromatographen (GC) bestimmt werden.

Die bereits entwickelte Untersuchungsmethoden für kleine Wickenpflanzen aus dem Freiland konnte jedoch nicht auf die kombinierten Wickenpflanze aus den CombiSart-Gefäßen übertragen werden, da diese zu groß waren, um in die Testgefäße des GC's zu passen. Daher wurden zur Messung der Nitrogenase-Aktivität der Knöllchen des ersten Versuchs nur je ein einzelnes Knöllchen in ein Testvial gebracht und untersucht.

Es wurden jeweils 11 bis 16 Testgefäße mit je einem Knöllchen (nach Schnelle and Hensley, 1990) gefüllt und anschließend jeweils mit 1ml Acetylen begast. Die Umwandlung von Acetylen in Ethylen durch die Nitrogenase in den Knöllchen wurde gemessen.

Die unphysiologische Inkubation der separierten Knöllchen, die nicht mehr von den Pflanzen versorgt wurden, führte leider zum Absterben von vielen Proben, vor allem den Proben aus der transgenen Kontrolle (NPTII). Hier überlebte nur ein Knöllchen. Daher muss der Versuch ohne die transgenen Kontrolle ausgewertet werden. Da in diesem Versuch unterschiedliche transgene Wurzeln verglichen werden, die neben den Modellproteinen (VP60, CTB und Cyanopycin) alle das *nptII* Gen tragen sollte ein *nptII* abhängiger Effekt dennoch mit Hilfe der Kontrolle hairy root (*hr*) sichtbar werden. Da sich hier kein Unterschied zwischen der hairy root Kontrolle und den transgenen Wurzel ergab ist davon auszugehen, dass die Expression von keinem der Transgene die Stickstofffixierung beeinträchtigte.

Für den zweiten Versuch zur Auswirkung der Modellproteine auf die Effektivität der Stickstofffixierung wurden die kombinierten Wicken einzeln in Töpfen im Pflanzenanzuchraum der Universität Rostock für zwei Monate kultiviert. Die so erzeugten kombinierten Pflanze waren klein genug, um als ganze Pflanzen in den Testgefäße des GC's untersucht zu werden. Mit diesem Versuch konnte das Ergebnis des ersten Versuches, dass es keinen Einfluss der transgen kodierte Modellproteine (VP60, CTB und Cyanophycin) auf die Effektivität der Stickstofffixierung gibt (Abbildung 11a), bestätigt werden.



**Abbildung 11: Keine Auswirkung der transgen kodierten (a) Modellproteine (VP60, CTB und Cyanophycin) und des (b) Lysozyms auf die Effektivität der Stickstofffixierung, gemessen anhand ganzer Pflanzen im GC.**

Auch die im Rahmen des dritten Versuchs angezogenen Lysozym exprimierenden kombinierten Wicken wurden im GC untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Knöllchen an Lysozym exprimierenden Wurzeln (pGK66; AR37) und denen der Kontrollen (niV; AR30) (Abbildung 11b).

### **3. Auswirkung der transgen kodierten Modellproteine (VP60, CTB und Cyanopycin) auf die knöllchenbildenden Rhizobien**

Da sowohl bezüglich der Knöllchenanzahl, wie auch bezüglich der Knöllchenmorphologie, keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Modellproteinen zu beobachten waren, sollte mit Hilfe eines genetischen Fingerabdrucks nochmals überprüft werden, ob die Wurzeln von verschiedenen Rhizobienstämmen besiedelt wurden.

Hierfür wurden zunächst aus dem ersten Versuch (in den CombiSart-Gefäßen) Proben genommen. Aus 19 verschiedenen CombiSart-Gefäßen, der verschiedenen Untersuchungsansätze (vergl. Tabelle 5) wurden aus 197 Knöllchen Rhizobien isoliert. Um eine Induktion bzw. Besiedlung der Knöllchen durch mehr als einen Rhizobienstamm ausschließen zu können, wurden von jedem zu isolierenden Knöllchen bis zu 5 Isolate gewonnen und untersucht, insgesamt wurden daher 624 Rhizobienisolate untersucht. Diese Isolate wurden anschließend mittels ERIC-PCR amplifiziert und die gewonnenen Daten im GelCompare Programm ausgewertet. Die Rhizobienisolate aus einem Knöllchen waren stets identisch. Bezüglich der knöllchenbildenden Rhizobien an den transgenen Wurzeln der kombinierten Wicken konnten keine Unterschiede zwischen den Modellproteinen VP60, CTB und Cyanophycin nachgewiesen werden.



#### 4. Hemmhofstest Blatt, Mikroknolle, Freilandknolle

Zur schnellen Voruntersuchung eines möglichen Einflusses der kodierten Proteine auf das Rhizobienwachstum wurden 2006 und 2007 Hemmhofstests mit Kartoffelknollen aus dem Freisetzungsvorversuch (Förderkennzeichen: 03WKS07A; 2005-2008) und sterilem Blattmaterial durchgeführt. Hierfür wurde die Kartoffelsorte Albatros mit den Events Albatros/Cyanophycin-12; Albatros/Cyanophycin-23; Albatros/CTB-204; Albatros/CTB-218 sowie die entsprechende nahe isogene (Albatros niV) und transgene (Albatros/NPTII-205) Kontrolle verwendet (Tabelle 6). Des Weiteren wurde die Sorte Desirée mit den Events Desirée/VP60-6 Desirée/VP60-17 mit der entsprechenden nahe isogene (Desirée niV) und transgene (Desirée /NPTII-6) Kontrolle in die Untersuchungen integriert (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Zusammenfassung der Hemmhofstests**

Sorte	Konstrukt	Event	Ergebnis Hemmhofstest		
			Blatt	Freilandknolle	Mikroknolle
Albatros	PsbYcyel	Albatros/Cyanophycin-12	keine Hemmung	z.T. sehr schwache Hemmung	stärkere Hemmung
	PsbYcyel	Albatros/Cyanophycin-23	keine Hemmung	z.T. sehr schwache Hemmung	stärkere Hemmung
	35SctxBSEK	Albatros/CTB-204	keine Hemmung	z.T. sehr schwache Hemmung	stärkere Hemmung
	35SctxBSEK	Albatros/CTB-218	keine Hemmung	z.T. sehr schwache Hemmung	stärkere Hemmung
	35S (nptII)	Albatros/NPTII-205	keine Hemmung	z.T. sehr schwache Hemmung	stärkere Hemmung
	-	Albatros niV	keine Hemmung	z.T. sehr schwache Hemmung	stärkere Hemmung
Desirée	35SVP60SEK	Desiree/VP60-6	keine Hemmung	z.T. sehr schwache Hemmung	stärkere Hemmung
	35SVP60SEK	Desiree/VP60-17	keine Hemmung	z.T. sehr schwache Hemmung	stärkere Hemmung
	35S (nptII)	Desiree/NPTII-6	keine Hemmung	z.T. sehr schwache Hemmung	stärkere Hemmung
	-	Desiree niV	keine Hemmung	z.T. sehr schwache Hemmung	stärkere Hemmung

Von den Kartoffelknollen aus dem Freisetzungsvorversuch 2005 zeigten die Kartoffelknollen Albatros/Cyanophycin-12 und -23; Albatros/CTB-204 und -218 eine geringe bakteriostatische Wirkung auf das Wachstum der Rhizobien. Auf Grund der Unsterilität des Knollenmaterials, war diese Hemmung des Rhizobienwachstums, durch die Kartoffelknollen anhaftende Keime, nicht auszuschließen. Daher wurden zwei Versuche mit sterilem Blattmaterial durchgeführt. In diesen Versuchen verursachte keine der oben genannten Kartoffellinien eine Hemmung des Rhizo-

bienwachstums (Tabelle 6). Die Wiederholung des Tests mit den Kartoffelknollen aus dem Freisetzungsvorversuch 2006 schlug zunächst fehl, da die gewonnenen Extrakte zu unsteril und folglich der Test nicht auswertbar waren. Schließlich konnte nachgewiesen werden, dass es teilweise zu einer geringen Hemmung des Rhizobienwachstums kam, die jedoch nie größer war, als die Hemmung durch eine der mit aufgetragenen Kontrollen der entsprechenden Konzentration (Tabelle 6).

Somit wurden von der NORIKA zusätzlich sterile Mikroknollen angezogen, um den Einfluss der Proteine in der Knolle auf das Rhizobienwachstum untersuchen zu können. Auffallend war die wesentlich stärkere Hemmung des Rhizobienwachstums durch die nahe isogene sowie die NPTII-Kontrolle im Vergleich zu den bisherigen Beobachtungen bei Freilandknollen. Ursache hierfür könnte ein höherer Lysozymgehalt in den Mikroknollen im Vergleich zu Freilandknollen sein. Zwischen den VP60-, CTB- bzw. Cyanophycin exprimierenden Linien und ihren entsprechenden Kontrollen gab es keine Unterschiede hinsichtlich einer hemmenden Wirkung auf das Rhizobienwachstum (Tabelle 6).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dem Hemmhoftest uns zwar ein sehr sensibler Test zur Verfügung steht. Er ist jedoch zu unnatürlich und täuscht möglicherweise Effekte des transgen kodierten Proteins vor, die im Boden mit dessen komplexen Wechselwirkungen keine Rolle mehr spielen. Als schneller und sensibler Nachweis, für Proben, von denen bereits Material vorliegt, kann es aber durchaus sinnvoll sein, ihn anzuwenden.

Zur Erstellung des genetischen Fingerabdrucks ist eine sehr arbeitsintensive und zeitaufwendige Isolation der Rhizobien aus den Knöllchen nötig. Daher ist dieses Verfahren im Rahmen eines schnellen und kostensparenden Testsystems nur in einzelnen Ausnahmefällen (z.B. bei morphologischen Unterschieden zwischen den Knöllchen an transgenen Wurzeln und den entsprechend mitgeführten Kontrollen) anwendbar.

Die Untersuchung der Effektivität der Stickstofffixierung mittels GC, ist ein relativ schnelles und einfaches Verfahren. Es kann gut angewendet werden, wenn ohnehin die Kultivierung einzelner Wickenpflanzen in Erde geplant ist. Allerdings gilt es zu beachten, dass auf Grund der hohen Schwankungen zwischen den Proben, ein entsprechend großer Probenumfang (mindestens 20-30 kräftige und vitale Pflanzen pro zu untersuchendes Protein) gewählt werden muss.

Die Bestimmung der Knöllchenanzahl und -morphologie ist ein sehr schnelles und kostengünstiges Verfahren, um die Wirkung transgen kodierter Proteine auf die Nodulation von *V.hirsuta*-Pflanzen zu untersuchen. Die Erhebung der Daten erfordert keine zusätzliche Herstellung von Probenmaterial, da sie mit den *V.hirsuta*-Pflanzen aus den CombiSart-Gefäßen, direkt nach Beendigung der Probenahme für die Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie (03WKS04B)

und gleichzeitig mit der Probennahme für die Bestimmung der Endomykorrhizierungsrate und der Bestimmung der Mikroorganismen-Population mittels DGGE und PLFA (03WKS04B) durchgeführt werden kann. Somit integriert sich dieses Verfahren optimal in das Gesamttestsystem zur Untersuchung der Wirkung transgen kodierter Proteine auf den Boden mit die ihn charakterisierenden Mikroorganismen und Stoffflüssen.

## **2 Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**

Für das Teilprojekt 4A, „Entwicklung eines schnellen in vivo Verfahrens zur Detektion geringer Einflüsse transgenkodierter Proteine auf Mikroorganismen und Stoffflüsse im Boden: Produktion transgener Wurzeln“ wurden vom Bundesministerium für Bildung und Forschung 270.838,00 € mit einer Förderquote von 100% bewilligt. Von diesen Mitteln sind 268.432,49€ (bewilligt-Rest laut Tabelle) ausgeschöpft worden. Den größten Anteil der Projektmittel stellten die Personalmittel mit 169.338€ (bewilligte Zahl) dar.

Im Weiteren wurden folgende Geräte für die Erfüllung des Zweckes erworben:

- Pflanzenschrank (Inventarnummer: 141091200 )
- reine Produktschutzwerkbank (Inventarnummer: 141090000 )

Diese Geräte wurden während des Projektzeitraums für den projektbezogenen Zweck verwendet und sind sorgfältig behandelt worden.

## **3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeiten**

Die Notwendigkeit der überwiegend wissenschaftlichen Arbeiten wurde aus dem Stand der Forschung sowie den wissenschaftlichen Voraussetzungen der einzelnen Arbeitsgruppen abgeleitet und für die einzelnen Arbeitspakete nach Umfang zeitlich aufgeschlüsselt. Mit Hilfe der kalkulierten Arbeitszeiten der entsprechenden Personalstellen konnte die Zielstellung des Projektes mit den einzelnen Meilensteinen im vollen Umfang erfüllt werden.

## **4 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans**

Der Fokus des Projektes passt sich vollständig in die Anforderungen der European Food Safety Authority (EFSA) ein, die in ihrer Richtlinie vom April 2004 in Absatz IIID9 eine fallspezifische Analyse von Umweltauswirkungen für die Zulassung von transgenen Pflanzen vorschreibt. Unter den drei relevanten Beobachtungsfeldern ist die Interaktion der Pflanzen vorwiegend mit nützlichen Mikroorganismen genannt. Nach den bisherigen Erfahrungen ist davon auszugehen, dass bei dem bloßen Verdacht einer möglichen Beeinträchtigung Analysen der Auswirkungen auf die ökologischen Bodenfunktionen gefordert werden. Das hier entwickelte Testsystem ist so angelegt, dass solche Analysen frühzeitig und mit geringem Kostenaufwand durchgeführt werden

können. Aufgrund der gegenüber Freilandexperimente um Faktoren von 10 bis 50 niedrigeren Kosten ist daher davon auszugehen, dass das Testsystem bereits in der Entwicklungsphase transgener Pflanzen nachgefragt wird. Wirtschaftlicher Anreiz dazu ist die Möglichkeit der Vermeidung aufwendiger Freilandexperimente in einem späteren Stadium der Zulassung transgener Pflanzen und damit ein erheblicher Kostenvorteil durch Kosteneinsparung und schnelleren Marktzugang. Es wird davon ausgegangen, dass eine Prüfung möglicher Auswirkungen auf Böden nur in Ausnahmefällen nicht notwendig sein wird. Daraus folgt eine Nachfrage für das entwickelte Testsystem, die sich zwangsläufig aus den zu erwartenden Zulassungsverfahren für transgene Pflanzen ergibt. Aufgrund der Dimensionierung des Testsystems im Labormaßstab und der Verwendbarkeit von DNA- und Bodenproben kann das Testsystem weltweit angeboten werden.

Die exklusive Vermarktung des Verfahrens erfolgt im Rahmen eines Portfolios zur Gesamtrisikobewertung zusammen mit allen anderen Komponenten (Inhaltsstoffanalyse, molekularbiologische Charakterisierung, Allergenität etc.), welche im Rahmen von BioOK I entwickelt wurden. Für den Marktauftritt hat das Bündnis 2005 die BioOK GmbH gegründet, über die die Vermarktung und Auftragsabwicklung der Dienstleistungen der Bündnispartner im Bereich GVP Bewertung und Analyse organisiert werden.

Unter Berücksichtigung der Entwicklungen auf dem Zulassungsmarkt für GVP, musste festgestellt werden, dass für angestrebte Kundenkreise, wie KMU aus dem Bereich der Züchtung, die Kosten für eine Markteinführung von GVP noch zu hoch sind, was in erster Linie dem Zulassungsverfahren geschuldet ist.

Durch technologische Innovationen im Rahmen des Wachstumskernes BioOK II sollen die Kosten so reduziert werden, dass potenziell alle Züchtungsunternehmen, die GVP auf den Markt bringen möchten, angesprochen werden.

Das hier vorgestellte Teilprojekt 4A leistet einen entscheidenden Beitrag zum wirtschaftlichen Erfolg des Wachstumskernes BioOK II, indem es, nach der Zusammenstellung eines wirtschaftlich attraktiven Testsystems durch Selektion aus der Gesamtheit der wissenschaftlich etablierten molekularchemischen, biochemischen, molekular- und populationsbiologischen und bodenökologischen Untersuchungen, eine Verknüpfung zu den anderen Modulen des „Baukastensystems“ von BioOK über ein integriertes Prüfsystem ermöglicht. Durch die zentrale Steuerung des Gesamtevaluierungsverfahrens zur Risikoabschätzung mittels eines Decision Support Systems ist es möglich, „maßgeschneiderte“ Dossiers mit optimierter Kostengestaltung auf dem Markt anzubieten.

## 5 Während der Durchführung bekanntgewordener technischer Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens

Die Wichtigkeit einer schnellen und kostengünstigen Herstellung und Analyse transgener Wurzeln wurde durch viele Publikationen bestätigt (Boisson-Dernier et al., 2001; Collier et al., 2005; Giri and Narasu, 2000; Vinardell et al., 2003). Estrada-Navarrete *et al.* (2006) betont die hervorragenden Eigenschaften kombinierter Leguminosen zur Untersuchung von Pflanzen-Mikroorganismen-Interaktionen, sowie zur Untersuchung des Wurzelstoffwechsels. An 75-95% der inokulierten *Phaseolus vulgaris* Keimlinge bildeten sich haarige Wurzeln. Alle getesteten haarigen Wurzeln, induziert durch ein binäres Vektorsystem waren transgen (GFP positiv und GUS positiv) (Estrada-Navarrete et al., 2006).

Biofilme und freie Mikroorganismen in der Rhizosphäre von Pflanzen sind für eine gesunde Entwicklung der Pflanze äußerst wichtig (Brusetti et al., 2005; Milling et al., 2005; O'Callaghan et al., 2005; Rudrappa et al., 2008a; Rudrappa et al., 2008b; Shen et al., 2006; Tepfer, 2004; Tesfaye et al., 2005). Daher ist die Erhaltung und Förderung einer gesunden Mikroorganismenpopulation in der Rhizosphäre für eine nachhaltige Landwirtschaft elementar. Diese Aussage wurde auch auf der Tagung in Göttingen März 2007 bestätigt. Demnach sind Untersuchungen zur Wirkung transgener Pflanzen auf die Mikroorganismen des Bodens, wie sie in diesem von Ihnen geförderten Projekt etabliert wurden, sehr wichtig. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Rhizobien isoliert aus mit Schwermetallen kontaminierten Böden, resistent gegenüber diesen Schwermetallen wurden. Diese Fähigkeit zur Resistenzbildung wurde auch bei der Untersuchung kombinierter Wicken berücksichtigt (Carrasco et al., 2005).

Des Weiteren zeigte Marzorati et al. (2008), dass molekulare Techniken zur Untersuchung der Bodenmikroorganismenzusammensetzung sehr gut geeignet sind. In Folge der wachsenden Bedeutung dieser Techniken in der Wissenschaft wurden Methoden zur Bearbeitung und Interpretation der gewonnen Rohdaten untersucht.

Demanèche et al. (2008) zeigte, dass es keinen Unterschied zwischen Feldern bestellt mit Mais der eine Resistenz gegen ein Antibiotikum exprimiert und der nahe isogenen Kontrolle in Bezug auf Antibiotika-resistente Bakterien gibt. Wei et al (2006) hingegen fand signifikante Unterschiede bezüglich der Anzahl koloniebildender Bakterien, Aktinomyzeten und Pilze und Enzymaktivität zwischen Feldern bestellt mit transgenen, Kanamycin-exprimierenden Papayas im Vergleich zu Kontrollfeldern ohne transgene Papaya.

Daneben gab es zahlreiche Untersuchungen zu verschiedenen Bt-Toxin exprimierenden Pflanzen (Balachandar et al., 2008c; Castaldini et al., 2005; Ren et al., 2006b; Sarkar et al., 2008). Ren

et al (2006a) fand bezüglich der Enzymaktivität (Urease, Phosphatase, Dehydrogenase, Phenoloxidase und Protease) im Boden kleine, aber durchaus signifikante Unterschiede zwischen Feldern bestellt mit Bt-Mais im Vergleich zu Feldern, bestellt mit der nahen isogenen Variante. Hinsichtlich der mikrobiellen Artenvielfalt und funktionellen mikrobiellen Vielfalt konnte er jedoch keine signifikanten Unterschiede detektieren. Dieses Ergebnis zeigt, wie wichtig eine Betrachtung der Wirkung transgen kodierter Proteine im Boden unter möglichst naturnahen Bedingungen ist. Balachandar et al. (2008b) zeigt in seinen Untersuchungen zur Wirkung anderer förderlicher Proteobakterien, welche normalerweise in der Rhizo- und Phyllosphäre von oder als Endophyten in der Baumwolle leben, dass diese durch die Expression des Bt-Toxins in der Baumwolle nicht beeinträchtigt werden. Dies konnte mittels verschiedener Techniken zur Erstellung genetische Fingerabdrücke (z.B. ARDRA, ERIC-PCR) nachgewiesen werden (Balachandar et al., 2008c).

Auf der Basis der Fortschreibung der Informationserhebungen konnten folgende F&E-Projekte mit einer möglichen Relevanz für das aktuelle Projekt im Internet recherchiert werden:

(I) Recherche in der SIFO-Datenbank bei <http://www.biosicherheit.de/>:

(Ia) Abbau von Bt-Mais in Böden und Auswirkungen auf die Mikroorganismen (2001-2004) Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Institut für Agrarökologie; Braunschweig

(Ib) Wird Bt-Toxin aus gentechnisch verändertem Mais im Boden gebunden? Wachstumskern BioOK, Schlussbericht, Teilprojekt 4B, FK 03WKS04B 48 (2001-2004) Universität Göttingen, Institut für angewandte Biotechnologie Universität Trier, Abt. Bodenkunde/Bodenchemie

(Ic) Transgene Fruktan-Kartoffel - Phänotypische Merkmale und Anfälligkeit gegenüber wichtigen Schadern im Vergleich zum Wildtyp und konventionellen Kartoffelsorten. (2001-2004) Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA), Institut für Integrierten Pflanzenschutz, Kleinmachnow

(Id) Untersuchung Pflanzen-assoziiertes mikrobieller Lebensgemeinschaften (2001-2005) Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie, Abteilung Angewandte Mikrobiologie und Biosafety, Schmallenberg

(II) Recherche bei <http://cordis.europa.eu.int>:

(IIa) Sustainable introduction of GMO's into European Agriculture (SIGMEA) (2004-2007) FP 6. Co-ordinator Environmental Research Group, NIAB, Cambridge

(III) Weitere Internetdatenbanken:

(IIIa) <http://bokudok.boku.ac.at/>: Umwelteinfluss von genetisch modifizierten Organismen (GMOs): Bodenmikrobiologie und Nährstoffdynamik (2001-2002). Durch eine Literaturliteraturaufarbeitung und ergänzende Analysen in Randbereichen sollten vorliegende Daten bezüglich des Einflusses genetisch modifizierter

Feldfrüchte in Kooperation zwischen der International Bodenkundlichen Union, der Internationalen Union für Mikrobiologische Gesellschaften und dem ICSU Komitee "Wissenschaften für die Ernährungssicherung" ausgewertet werden. Projektleiter: Blum, W. E.H.

(IIIb) <http://www.bio5.rwth-aachen.de/>: Biosafety Research of transgenic Diabrotica resistant Bt-maize: Development and Evaluation of Monitoring Methods. Ein BMBF-Verbundprojekt unter der Koordination von Prof. Dr. Ingolf Schuphan und Dr. Sabine Eber (Rheinisch-Westfälische technische Hochschule Aachen).

(IIIc) [http://www.gmo-safety.eu/en/safety\\_science/155.docu.html/](http://www.gmo-safety.eu/en/safety_science/155.docu.html/): Effect of zeaxanthin potato on soil life and soil quality (2005-2008) Technical University of Munich (TUM), Chair of Soil Ecology, Oberschleissheim.

(IIId) [http://www.uni-hohenheim.de/www330/projekte/mueller\\_projekte.html](http://www.uni-hohenheim.de/www330/projekte/mueller_projekte.html): Rhizodeposition und Umsatz von C und N im Boden in Abhängigkeit vom Abstand zur Wurzeloberfläche (2005-2006). Förderkennzeichen DFG MU 1711/4-1, Universität Hohenheim.

## 6 Erfolgte und geplante Veröffentlichung der Ergebnisse

Horn, P und Broer, I (2006): Fast and easy testing of many candidate genes in combined plants. Second AB-RMS Symposium and Postgraduate Course: Root soil microbe interaction, Hamburg (Poster).

Horn P, Schlichting A, Leinweber P, Broer I. (2006): Substitution of long-term field trials by faster *in vivo* studies under controlled environmental conditions. 1st BioOK Seminar: Risk Assessment of Genetically Modified Plants and Derived Food & Feed, Rostock (Poster).

Horn, P. (2007): Strategies to obtain 100% transgenic roots on wild type potatoes shoots. Enhanced control of Potato mop-top virus in the Nordic and Baltic Sea region: The third annual meeting of the project consortium, Warschau (Vortrag).

Horn P, Schlichting A, Leinweber P, Broer I. (2007): Substitution of long-term field trial by faster *in vivo* studies under controlled environmental conditions. Signal exchange between roots and microorganisms, DFG funded FOR546, Göttingen(Poster).

Horn P, Schlichting A, Leinweber P, Broer I. (2007): Substitution of long-term field trial by faster *in vivo* studies under controlled environmental conditions. BioOK, 2nd Seminar, Assessment of the Environmental Risks of Genetically Modified Plants, Rostock (Poster).

Horn P, Schlichting A, Leinweber P, Broer I. (2008): Development of a fast and nature orientated method for detection of influences of transgene encoded proteins on soil microorganisms and composition. 1st Global Conference on GMO Analysis, European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, Como, Italien (Poster).



Mikschofsky H, Hühns M, Horn P, Schlichting A, Leinweber P, Schmidtke J, Schmidt K, Broer I. (2008): Agronomic performance and risk assessment of transgenic potato with pharmaceutical and technical value. 10<sup>th</sup> International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms (ISBGMO) -Biosafety Research: Past Achievements and Future Challenges-, International Society for Biosafety Research, Wellington, Neuseeland (Poster).

Außerdem ist mindestens zwei weitere Publikationen in einer internationalen Zeitschriften (peer-review) geplant, die 2009 eingereicht werden sollen:

Horn P, Broer I, Schlichting A, Leinweber P, Baum C, Thiele Bruhn S, Hammesfahr U. 2008. Substitution of long-term field trails to test soil effects on transgenic plants by fast *in vivo* studies under controlled environmental conditions.

Schlichting A, Leinweber P, Horn P, Broer I. 2008. Identification of potential effects of genetically modified potatoes on soil organisms by pyrolysis-field ionization mass spectrometry of rhizodeposits.

### **III Kurzfassung (Berichtsblatt)**

Siehe Berichtsblatt und Document Control Sheet

## Literaturverzeichnis

- Balachandar, D., P.Raja, K.Nirmala, T.Rithyl, and S.P.Sundaram. 2008c. Impact of transgenic Bt-cotton on the diversity of pink-pigmented facultative methylophs. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:2087-2095.
- Balachandar, D., P.Raja, K.Nirmala, T.Rithyl, and S.P.Sundaram. 2008b. Impact of transgenic Bt-cotton on the diversity of pink-pigmented facultative methylophs. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:2087-2095.
- Balachandar, D., P.Raja, K.Nirmala, T.Rithyl, and S.P.Sundaram. 2008a. Impact of transgenic Bt-cotton on the diversity of pink-pigmented facultative methylophs. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:2087-2095.
- Biro, B., I.Villany, Z.Naar, G.Bakonyi, E.Magyar, and E.Tombacz. Soil and rhizobiological tools for the risk assessment of Bt corn. Symposium on the Impact of GMO's: Soil Microbiology and Nutrient Dynamics. Book of Abstracts , 9. 2002. Vienna. Ref Type: Conference Proceeding
- Bohmert, K., I.Balbo, J.Kopka, V.Mittendorf, C.Nawrath, Y.Poirier, G.Tischendorf, R.N.Trethewey, and L.Willmitzer. 2000. Transgenic Arabidopsis plants can accumulate polyhydroxybutyrate to up to 4% of their fresh weight. *Planta* 211:841-845.
- Bohmert, K., I.Balbo, A.Steinbuchel, G.Tischendorf, and L.Willmitzer. 2002. Constitutive expression of the beta-ketothiolase gene in transgenic plants. A major obstacle for obtaining polyhydroxybutyrate-producing plants. *Plant Physiol* 128:1282-1290.
- Boisson-Dernier, A., M.Chabaud, F.Garcia, G.Becard, C.Rosenberg, and D.G.Barker. 2001. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:695-700.
- Bruinsma, M., G.A.Kowalchuk, and J.A.van Veen. Effects of genetically modified plants on soil ecosystems. In: Book of Abstracts.Symposium on the Impact of GMO's: Soil Microbiology and Nutrient Dynamics. 11. 2002. Vienna. Ref Type: Conference Proceeding
- Bruinsma, M., G.A.Kowalchuk, and J.A.van Veen. 2003b. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. *Biology and Fertility of Soils* 37:329-337.
- Bruinsma, M., G.A.Kowalchuk, and J.A.van Veen. 2003a. Effects of genetically modified plants on microbial communities and processes in soil. *Biology and Fertility of Soils* 37:329-337.
- Bruseti, L., P.Francia, C.Bertolini, A.Pagliuca, S.Borin, C.Sorlini, A.Abruzzese, G.Sacchi, C.Viti, L.Giovannetti, E.Giuntini, M.Bazzicalupo, and D.Daffonchio. 2005. Bacterial communities associated with the rhizosphere of transgenic Bt 176 maize (*Zea mays*) and its non transgenic counterpart. *Plant and Soil* 266:11-21.
- Carlini, C.R. and M.F.Grossi-de-Sa. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40:1515-1539.

- Carrasco, J.A., P.Armario, E.Pajuelo, A.Burgos, M.A.Caviedes, R.Lopez, M.A.Chamber, and A.J.Palomares. 2005. Isolation and characterisation of symbiotically effective *Rhizobium* resistant to arsenic and heavy metals after the toxic spill at the Aznalcollar pyrite mine. *Soil Biology & Biochemistry* 37:1131-1140.
- Castaldini, M., A.Turrini, C.Sbrana, A.Benedetti, M.Marchionni, S.Mocali, A.Fabiani, S.Landi, F.Santomassimo, B.Pietrangeli, M.P.Nuti, N.Miclaus, and M.Giovannetti. 2005. Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6719-6729.
- Collier, R., B.Fuchs, N.Walter, W.Kevin Lutke, and C.G.Taylor. 2005. Ex vitro composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. *Plant Journal* 43:449-457.
- de Vries, J., K.Harms, I.Broer, G.Kriete, A.Mahn, K.Düring, and W.Wackernagel. 1999. The bacteriolytic activity in transgenic potatoes expressing a chimeric T4 lysozyme gene and the effect of T4 lysozyme on soil- and phytopathogenic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 22:280-286.
- Demanèche, S., H.Sanguin, J.Poté, E.Navarro, D.Bernillon, P.Mavingui, W.Wildi, T.M.Vogel, and P.Simonet. 2008. Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105:3957-3962.
- Dröge, W., I.Broer, and A.Pühler. 1992. Transgenic plants containing the phosphinothricin-*N*-acetyltransferase gene metabolize the herbicide phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta* 187 187:142-151.
- Dröge-Laser, W., U.Siemeling, A.Pühler, and I.Broer. 1994. The Metabolites of the Herbicide L-Phosphinothricin (Glufosinate) (Identification, Stability, and Mobility in Transgenic, Herbicide-Resistant, and Untransformed Plants). *Plant Physiol* 105:159-166.
- Estrada-Navarrete, G., X.Alvarado-Affantranger, J.E.Olivares, C.Díaz-Camino, O.Santana, E.Murillo, G.Guillén, N.Sánchez-Guevara, J.Acosta, C.Quinto, D.Li, P.M.Gresshoff, and F.Sánchez. 2006b. *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the Phaseolus spp.: a tool for functional genomics. *Mol Plant Microbe Interact.* 19:1385-1393.
- Estrada-Navarrete, G., X.Alvarado-Affantranger, J.E.Olivares, C.Díaz-Camino, O.Santana, E.Murillo, G.Guillén, N.Sánchez-Guevara, J.Acosta, C.Quinto, D.Li, P.M.Gresshoff, and F.Sánchez. 2006a. *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the Phaseolus spp.: a tool for functional genomics. *Mol Plant Microbe Interact.* 19:1385-1393.
- Farran, I., J.J.Sanchez-Serrano, J.F.Medina, J.Prieto, and A.M.Mingo-Castel. 2002. Targeted expression of human serum albumin to potato tubers. *Transgenic Res.* 11:337-346.
- Finke, G. Einfluss der Expression von T4-Lysozym-Konstrukten oder VhND28/32 „antiense“-Konstrukten auf die Ausbildung und Funktion transgener *V.hirsuta* Knöllchen. 1997. Diplomarbeit, Universität Bielefeld.

Ref Type: Thesis/Dissertation

- Fischbeck, G. 1994. Biotechnologische Ansätze für die Züchtung gesunder Pflanzen und ihre Bedeutung für die Entwicklung umweltschonender Anbauverfahren. In *Biotechnologie-Gentechnik*. T.Von Schell and H.Mohr, editors. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 181-200.

- Gallie, D.R. and V.Walbot. 1992. Identification of the motifs within the tobacco mosaic virus 5'-leader responsible for enhancing translation. *Nucleic Acids Research* 20:4631-4638.
- Gamborg, O.L., R.A.Miller, and K.Ojima. 1968. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Experimental Cell Research* 50:151-&.
- Giri, A. and M.L.Narasu. 2000. Transgenic hairy roots: Recent trends and applications. *Biotechnol. Adv.* 18:1-22.
- Hammond-Kosack, K.E. and J.E.Parker. 2003. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14:177-193.
- Hoagland, D.R. and D.I.Arnon. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station* 347:1-32.
- Holtorf, S., K.Apel, and H.Bohlmann. 1995. Specific and different expression patterns of 2 members of the leaf thionin multigene family of barley in transgenic tobacco. *Plant Science* 111:27-37.
- Hopkins,D.W., D.W.Marinari, E.A.Webster, E.L.Tilston, and C.Halpin. Decomposition in soil of residues from plants with genetic modification to lignin biosynthesis. Symposium on the Impact of GMO's: Soil Microbiology and Nutrient Dynamics. Book of Abstracts , 23. 2002. Vienna.  
Ref Type: Conference Proceeding
- Ishac, Y.Z., J.S.Angle, M.A.El-Borollosy, M.E.El-Demerdash, M.I.Mostafa, and C.N.Fares. 1994. Soil moisture, inoculum and soil effects on growth and nodulation of *Vicia faba* and *Lens esculenta*. *Annals of Agricultural Science* 39:581-593.
- Jefferson, R.A., T.A.Kavanagh, and M.W.Bevan. 1987.  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) as a sensitive and versatile gene fusion marker in plants. *Journal of Cellular Biochemistry*57.
- Johri, B.N., A.Sharma, and J.S.Virdi. 2003. Rhizobacterial diversity in India and its influence on soil and plant health. *Adv. Biochem. Eng Biotechnol.* 84:49-89.
- Kay, R., A.Chan, M.Daly, and J.Mcpherson. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236:1299-1302.
- Kiezebrink,D., R.Bardgett, S.Cowgill, and H.Atkinson. Transgenic potatoes expressing a proteinase inhibitor: effects on soil microbial communities and their functioning. Symposium on the Impact of GMO's: Soil Microbiology and Nutrient Dynamics. Book of Abstracts , 26. 2002. Vienna.  
Ref Type: Conference Proceeding
- Kim, T.G. and W.H.Langridge. 2003. Assembly of cholera toxin B subunit full-length rotavirus NSP4 fusion protein oligomers in transgenic potato. *Plant Cell Rep.* 21:884-890.
- Kriete,G. Untersuchungen der Wirkung des Totalherbizids Phosphinothricin auf Bodenmikroorganismen am Beispiel von *Rhizobium meliloti*. 1992. Diplomarbeit Universität Bielefeld.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Kriete, G. and I.Broer. 1996. Influence of the herbicide phosphinothricin on growth and nodulation capacity of *Rhizobium meliloti*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 46:580-586.

- Kriete, G., I.Broer, and A.Pühler. 1993. Anwendung eines neuen Systems zum Nachweis der Beeinträchtigung von Mikroorganismen durch Herbizide: Der Einfluß von Phosphinothricin auf *Rhizobium meliloti*. *Überwachungsmethoden der Gentechnik: Nachweisverfahren für Mikroorganismen, Viren und Genen in der Umwelt. Umweltbundesamt 3*. 93.
- Küster, H., H.J.Quandt, I.Broer, A.M.Perlick, and A.Pühler. 1995. The promoter of the *Vicia faba* L. VfENOD-GRP3 gene encoding a glycine-rich early nodulin mediates a predominant gene expression in the interzone II-III region of transgenic *Vicia hirsuta* root nodules. *Plant Mol. Biol.* 29:759-772.
- Logemann, J., J.Schell, and L.Willmitzer. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry* 163:16-20.
- Lynch, J.M. 1990. Some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. *In The Rhizosphere*. J.M.Lynch, editor. Wiley & Sons, Chichester, England. 1-10.
- Marzorati, M., L.Wittebolle, N.Boon, D.Daffonchio, and W.Verstraete. 2008. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environ. Microbiol.* 10:1571-1581.
- Mikschoksky, H. Charakterisierung des Produktionssystems Pflanze für die rekombinante Impfstoffherstellung. 2006. Dissertation, Universität Rostock. Ref Type: Thesis/Dissertation
- Miller, H.-J., E.Liljeroth, M.J.E.I.M.Willemsen-de Klein, and Van Veen. 1990. The dynamics of actinomycetes and fluorescent pseudomonads in wheat rhizoplane and rhizosphere. *Symbiosis* 9:389-391.
- Milling, A., K.Smalla, F.Maidl, M.Schlöter, and J.Munch. 2005. Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. *Plant and Soil* 266:23-39.
- Murashige, T. and F.Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-&.
- Neumann, K., D.P.Stephan, K.Ziegler, M.Huhns, I.Broer, W.Lockau, and E.K.Pistorius. 2005. Production of cyanophycin, a suitable source for the biodegradable polymer polyaspartate, in transgenic plants. *Plant Biotechnol. J.* 3:249-258.
- O'Callaghan, M., E.Gerard, N.Waipara, S.Young, T.Glare, P.Barrell, and A.Conner. 2005. Microbial communities of *Solanum tuberosum* and magainin-producing transgenic lines. *Plant and Soil* 266:47-56.
- O'Callaghan, M., E.M.Gerard, N.W.Waipara, T.R.Glare, J.K.Reader, and A.J.Conner. Microbial communities of *Solanum tuberosum* and magainin-producing transgenic lines. Symposium on the Impact of GMO's: Soil Microbiology and Nutrient Dynamics. Book of Abstracts , 32. 2002. Vienna. Ref Type: Conference Proceeding
- Omirulleh, S., M.Abraham, M.Golovkin, I.Stefanov, M.K.Karabaev, L.Mustardy, S.Morocz, and D.Dudits. 1993. Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV 35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize. *Plant Molecular Biology* 21:415-428.

- Potrykus, I. 2001. Golden rice and beyond. *Plant Physiol* 125:1157-1161.
- Quandt, H.J., I.Broer, and A.Pühler. 1992. Tissue-specific activity and light dependent regulation of a soybean rbcS promoter in transgenic tobacco plants monitored with the firefly luciferase gene. *Plant Science* 82:59-70.
- Quandt.H.-J., A.Pühler, and I.Broer. 1993. Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6:699-706.
- Ren, F.S., C.Hong, and H.G.Wan. 2006a. Transgenic Bt cotton has no apparent effect on enzymatic activities or functional diversity of microbial communities in rhizosphere soil. *Plant and Soil* 285:149-159.
- Ren, F.S., C.Hong, and H.G.Wan. 2006b. Transgenic Bt cotton has no apparent effect on enzymatic activities or functional diversity of microbial communities in rhizosphere soil. *Plant and Soil* 285:149-159.
- Rolfe, B.G. and P.M.Gresshoff. 1988. Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39:297-319.
- Rudrappa, T., M.L.Biedrzycki, and H.P.Bais. 2008a. Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64:153-166.
- Rudrappa, T., R.E.Splaine, M.L.Biedrzycki, and H.P.Bais. 2008b. Cyanogenic pseudomonads influence multitrophic interactions in the rhizosphere. *PLoS. ONE.* 3:e2073.
- Sarkar, B., A.K.Patra, T.J.Purakayastha, and M.Megharaj. 2008. Assessment of biological and biochemical indicators in soil under transgenic Bt and non-Bt cotton crop in a sub-tropical environment. *Environ. Monit. Assess.*
- Sayre,P. and R.Seidler. Application of genetically engineered microorganisms in the USA, and issues related to soil systems. Symposium on the Impact of GMO's: Soil Microbiology and Nutrient Dynamics. Book of Abstracts , 35. 2002. Vienna. Ref Type: Conference Proceeding
- Schenk, R.U. and HILDEBRA.AC. 1972. Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant-Cell Cultures. *Canadian Journal of Botany* 50:199-&.
- Schillberg, S., R.Fischer, and N.Emans. 2003. Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60:433-445.
- Schlöter,M., A.Schönewälder, J.-C.Munch, and K.Smalla. Effects of transgenic potatoes with a modified starch composition on the diversity of soil and rhizosphere. Symposium on the Impact of GMO's: Soil Microbiology and Nutrient Dynamics. Book of Abstracts , 36. 2002. Vienna. Ref Type: Conference Proceeding
- Schnelle, M.A. and D.L.Hensley. 1990. Effects of Pesticides upon Nitrogen Fixation and Nodulation by Dry Bean. *Pesticide Science* 28:83-88.

- Sessitsch, A., S.Gyamfi, D.Tscherko, M.Gerzabek, and E.Kandeler. 2005a. Activity of microorganisms in the rhizosphere of herbicide treated and untreated transgenic glufosinate-tolerant and wildtype oilseed rape grown in containment. *Plant and Soil* 266:105-116.
- Sessitsch, A., S.Gyamfi, D.Tscherko, M.Gerzabek, and E.Kandeler. 2005b. Activity of microorganisms in the rhizosphere of herbicide treated and untreated transgenic glufosinate-tolerant and wildtype oilseed rape grown in containment. *Plant and Soil* 266:105-116.
- Shen, R.F., H.Cai, and W.H.Gong. 2006. Transgenic Bt cotton has no apparent effect on enzymatic activities or functional diversity of microbial communities in rhizosphere soil. *Plant and Soil* 285:149-159.
- Spencer, D., E.K.James, G.J.Ellis, J.E.Shaw, and J.I.Sprent. 1994. Interaction between rhizobia and potato tissues<sup>10</sup>. *J. Exp. Bot.* 45:1475-1482.
- Stotzky,G. Release, persistence, and biological safety of larvicidal proteins from *Bacillus thuringiensis* in soil. Symposium on the Impact of GMO's: Soil Microbiology and Nutrient Dynamics. Book of Abstracts , 41. 2002. Vienna.  
Ref Type: Conference Proceeding
- Streatfield, S.J. and J.A.Howard. 2003. Plant-based vaccines. *International Journal for Parasitology* 33:479-493.
- Tepfer,D. Root Ecology: Hans de Kroon, Eric J.W. Visser (Eds.). *Plant Science* 167[3], 669. 2004.  
Ref Type: Magazine Article
- Tesfaye, M., M.D.Denton, D.A.Samac, and C.P.Vance. 2005. Transgenic alfalfa secretes a fungal endochitinase protein to the rhizosphere. *Plant and Soil* 269:233-243.
- Turrini, A., C.Sbrana, M.Nuti, B.Pietrangeli, and M.Giovannetti. 2005. Development of a model system to assess the impact of genetically modified corn and aubergine plants on arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 266:69-75.
- Vijn, I., H.Christiansen, P.Lauridsen, I.Kardailsky, H.J.Quandt, I.Broer, J.Drenth, J.E.Ostergaard, K.A.van, and T.Bisseling. 1995. A 200 bp region of the pea ENOD12 promoter is sufficient for nodule-specific and nod factor induced expression. *Plant Mol. Biol.* 28:1103-1110.
- Vinardell, J.M., E.Fedorova, A.Cebolla, Z.Kevei, G.Horvath, Z.Kelemen, S.Tarayre, F.Roudier, P.Mergaert, A.Kondorosi, and E.Kondorosi. 2003. Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell* 15:2093-2105.
- Vinnemeier, J., W.Dröge-Laser, E.Pistorius, and I.Broer. 1995. Purification and partial characterization of the *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 phosphinothricin-N-acetyltransferase mediating herbicide resistance to transgenic plants. *Zeitschrift für Naturforschung* 50c:796-805.
- Wei, X.D., H.L.Zou, L.M.Chu, B.Liao, C.M.Ye, and C.Y.Lan. 2006. Field released transgenic papaya effect on soil microbial communities and enzyme activities. *J. Environ. Sci. (China)* 18:734-740.



Wisniewski, J.-P., N.Fragne, A.Massonneau, and C.Dumas. 2002. Between myth and reality: genetically modified maize, an example of a sizeable scientific controversy. *Biochimie* 84:1095-1103.