

Versuch mit transgenem Stinkbrand resistentem Weizen in der Vegetationshalle der FAL-Reckenholz

Versuchsbericht 2001

Autorinnen und Autoren

FAL Reckenholz: Bigler F., Bodenmann M., Romeis J., Schachermayr G., Widmer F.,
Winzeler M.

ETH: Fenner E., Mozafar A., Ruh R., Schlaich T., Sautter C.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Inhaltsverzeichnis | 2 |
| Zusammenfassung | 3 |
| 1. Einleitung | 4 |
| 2. Ziele des Versuchs | 5 |
| 3. Materialien und Methoden | 5 |
| 4. Resultate und Diskussion | 10 |
| 5. Öffentlichkeitsarbeit | 21 |
| 6. Sicherheitsmassnahmen | 22 |
| 7. Schlussfolgerungen | 24 |

Zusammenfassung

Von März bis August 2001 wurde in der Vegetationshalle der Eidgenössischen Forschungsanstalt für Agrarökologie und Landbau (FAL Reckenholz) in Zürich ein Versuch mit Sommerweizen durchgeführt, der zuvor im Gewächshaus eine erhöhte Stinkbrandresistenz aufwies. Es ging darum abzuklären, ob die transgenen Pflanzen unter den Bedingungen der Vegetationshalle diese erhöhte Resistenz gegen Stinkbrand auch zeigen und welchen Einfluss sie auf Bodenmikroorganismen und auf Arthropoden haben.

Der ganze Versuch umfasste 20 Container mit je 10 transgenen Weizenpflanzen sowie 20 Container mit je 10 nicht-transgenen Pflanzen (Wildtyp). In jedem Container waren die Versuchspflanzen von einer Mantelsaat mit nicht-transgenen Weizenpflanzen umgeben. Die Hälfte der transgenen und Wildtyp-Pflanzen in den Containern wurden mit Stinkbrand infiziert. Es wurden transgene und nicht-transgene Pflanzen der zwei Sorten Greina und Golin getestet.

Mit morphologischen und phänologischen Parametern wurde das Pflanzenwachstum und die Ertragsbildung charakterisiert und der Stinkbrandbefall wurde bonitiert. Durch wiederholte Entnahme von Bodenproben, aus denen die DNA extrahiert wurde, konnten verschiedene mikrobielle Populationen charakterisiert werden. Daneben wurde die Populationsentwicklung der Collembolen (Springschwänze) und der Blattläuse bestimmt sowie der Befall der Blätter durch das Getreidehähnchen erfasst.

Hinsichtlich der Keimgeschwindigkeit, der Pflanzenlänge sowie der Anzahl ausgebildeter Ähren gab es keine Unterschiede zwischen transgenen und nicht-transgenen Pflanzen. Allerdings wiesen die transgenen Pflanzen ein um 6% höheres Tausendkorngewicht als die nicht-transgenen Pflanzen auf. Der Stinkbrand-Befall war an den inokulierten Pflanzen generell hoch. Bei beiden Sorten waren die transgenen Pflanzen stärker befallen als die nicht-transgenen Pflanzen, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Da die Pflanzen die KP4- mRNA generell gut exprimiert haben und die Pilzabwehr der Pflanzen ein komplexer Vorgang ist, lässt sich dieses Ergebnis nicht einfach erklären. Bei den Mikroorganismen-Populationen des Bodens zeigten die DNA-Analysen keine Unterschiede zwischen transgenen Pflanzen und den Wildtypen. Dagegen konnten gesicherte Unterschiede zwischen den Sorten und den Zeitpunkten der Probenahmen gefunden werden. Bei der Entwicklung der Populationen der Blattläuse, der Collembolen und dem Befall durch das Getreidehähnchen ergaben sich keine Unterschiede zwischen den transgenen und den nicht-transgenen Pflanzen.

Der Versuch war gemäss Einschliessungsverordnung des Bundesamtes für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL) in die Klasse 1 eingestuft. Es wurde ein generelles Sicherheits- und Notfallkonzept erstellt sowie eine strenge Zutrittsregelung erlassen. Ein Informationskonzept stellte sicher, dass die interessierten Kreise stets über den Verlauf des Versuchs informiert waren. Als gebäudetechnische Sicherheitsmassnahme wurde der Zugang zur Vegetationshalle gesichert. Als versuchstechnische Sicherheitsmassnahmen wurden die Ähren während der Blüte eingebeutel und das Giesswasser aufgefangen. Am Ende des Versuchs wurden die transgenen Pflanzen vernichtet.

Für die Öffentlichkeitsarbeit wurde viel Zeit aufgewendet. Bei internen Veranstaltungen wurden die MitarbeiterInnen der FAL Reckenholz über den Versuch orientiert. Mit einer Medienmitteilung wurde die Bevölkerung der Schweiz informiert. Während der ganzen Versuchsdauer wurden verschiedene Medien laufend oder bei Anfrage mit Informationen beliefert. Ein Merkblatt diente sowohl der internen wie der externen Information. Das Echo der Öffentlichkeit war fast durchwegs positiv.

1. Einleitung

Im Rahmen des Schwerpunktprogramms Biotechnologie des Schweizerischen Nationalfonds wurden an der ETH (Bereich Biotechnologie der Pflanzen) transgene Weizenpflanzen hergestellt, die im Gewächshaus eine verbesserte Resistenz gegen Stinkbrand (*Tilletia tritici*) aufweisen. Stinkbrand ist eine der wichtigsten samenbürtigen Krankheiten und wird heute in der konventionellen und integrierten Produktion mit Saatgutbeizung mittels synthetischer Fungizide bekämpft. Eine gute Resistenz gegen Stinkbrand ist eine wichtige Voraussetzung für die Reduktion chemischer Beizmittel und dadurch für eine umweltschonendere Produktion von Nahrungs- und Futtermitteln.

Da die Expression der Resistenz von verschiedenen Umweltfaktoren beeinflusst werden kann, müssen die Pflanzen unter möglichst natürlichen Bedingungen geprüft werden. Im Sinne eines schrittweisen Vorgehens wurden deshalb am transgenen Weizen Untersuchungen in der Vegetationshalle der FAL Reckenholz durchgeführt, in der die Umweltbedingungen dem Feld einen grossen Schritt näher kommen. Versuche in der Vegetationshalle können Freilandversuche jedoch nicht ersetzen und sind deshalb nur als ein weiterer Schritt vom Labor- zum Feldexperiment zu verstehen.

Im Jahr 2000 wurden die transgenen Weizenpflanzen von zwei Sorten in einem Topfversuch in der Vegetationshalle der FAL Reckenholz mit nicht-transgenen Pflanzen der gleichen Sorten auf agronomische Eigenschaften, Resistenz gegen den Stinkbrand und Auswirkungen auf Makro- und Mikroorganismen untersucht. Die Erfahrungen des ersten Versuchsjahres zeigten, dass die Töpfe für die Abklärung von Fragen der biologischen Sicherheit nicht geeignet sind, da der Boden sich im Sommer zu stark erwärmt und zu schnell austrocknet. Dadurch werden Struktur und Entwicklung der natürlichen Populationen von Mikro- und Makroorganismen im Boden so stark beeinträchtigt, dass andere Faktoren überlagert werden. Aus diesem Grund wurden für die Versuche 2001 grosse Container mit rund einem m³ Inhalt angeschafft. Bezüglich Bodentemperatur und Wasserhaushalt sollte damit eine natürliche Situation geschaffen werden.

Der Versuch 2001 in der Vegetationshalle der FAL Reckenholz wurde in enger Zusammenarbeit mit der ETH durchgeführt, die das Saatgut zur Verfügung stellte, die Expression des KP-Gens ermittelte und die Arbeiten mit den Mykorrhizen durchführte. Die FAL Reckenholz stellte die Vegetationshalle mit entsprechenden Materialien zur Verfügung, war für die Anlage und Pflege des Versuchs verantwortlich, führte alle Erhebungen und Bonituren an den Pflanzen und im Boden durch und verantwortete das Sicherheitskonzept.

2. Ziele des Versuchs

Die FAL Reckenholz hat folgende Versuchsfragen abgeklärt:

- Wie ist die phänologische Entwicklung der transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp?
- Haben die transgenen Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegen Stinkbrand?
- Welchen Einfluss haben die transgenen Pflanzen auf die Entwicklung und die Struktur der Mikroorganismen-Populationen (Bakterien, Eukaryonten, Pilze) im Boden?
- Welchen Einfluss haben die transgenen Pflanzen auf Arthropoden (Blattläuse, Getreidehähnchen und Collembolen)?
- Findet im Verdauungstrakt des Getreidehähnchens ein horizontaler Transfer des Ampizillinresistenzgens des KP4-Weizens statt?
- Eignet sich die Versuchsanlage mit grossen Containern in der Vegetationshalle für solche Abklärungen?

Die ETH hat folgende Versuchsfragen abgeklärt:

- Wie hoch ist das Expressionsniveau des *KP4*-Gens?
- Welchen Einfluss haben die transgenen Pflanzen auf die Entwicklung von Mykorrhizen?

3. Materialien und Methoden

Vegetationshalle der FAL Reckenholz

Die Vegetationshalle der FAL-Reckenholz entspricht der Konstruktion eines grossen Gewächshauses (15 x 25 m Grundfläche), dessen Dach automatisch geöffnet oder geschlossen wird. Eine Stirnseite bleibt dabei jedoch immer geöffnet. Die Steuerung erfolgt über Licht-, Wind- und Feuchtesensoren, d.h. bei schönem und trockenem Wetter mit wenig Wind schiebt sich das Dach über einen angebauten Gebäudetrakt zurück, bei stark bewölktem Himmel, Regen und/oder starkem Wind schliesst sich das Dach. Das Dach besteht aus einer Stahl/Glaskonstruktion, so dass auch bei geschlossenem Zustand genügend Licht für ein normales Pflanzenwachstum einfällt. Der Boden ist im Bereich des Versuchs betoniert. Auf drei Seiten ist die Grundfläche mit einer 1m hohen Betonmauer und einem zirka 3m hohen Gitterzaun abgeschlossen. Auf der vierten Seite grenzt sie an den angebauten Gebäudetrakt, durch den sie auch begehbar ist.

Versuchsanlage

Weil sich die Versuchsanlage mit Töpfen im Jahr 2000 für unsere Fragen als ungeeignet erwies, wurden für den Versuch 2001 20 Container (0.8m Breite x 1.2m Länge x 0.8m Höhe) angeschafft. Jeder Container wurde in der Mitte der Längsseite durch eine dichte Trennwand unterteilt, so dass für den Versuch 40 Einheitsbehälter (Versuchspartellen) von je 0.4m³ Volumen zur Verfügung standen. Im Zentrum jeder Einheit wurde ein doppelwandiger Zylinder (0.33m Durchmesser x 0.7m Höhe) platziert, in dem 10 Pflanzen heranwuchsen. Der äussere Teil der Versuchseinheit wurde in der gleichen Dichte wie der Zylinder mit nicht transgenen Pflanzen der jeweils gleichen Sorte wie im Zylinder bepflanzt (Mantelsaat). Die Saat erfolgte am 12. März und die Ernte am 11. August 2001. Die Düngung mit N, P, und K entsprach der Praxisüblichkeit und die Bewässerung richtete sich nach dem Bedarf der Pflanzen. Es wurden keine Behandlungen mit Pestiziden durchgeführt.

Verfahren

Der Versuch wurde als randomisierte Blockanlage mit 8 Verfahren und 5 Wiederholungen angelegt (Tab. 1).

Tabelle 1: Verfahren des Versuchs 2001

| Verfahren | Pflanzen | | Behandlung mit <i>Tilletia tritici</i> | Anzahl Pflanzen pro Zylinder | Anzahl Wiederholungen |
|-----------|----------|----------|--|------------------------------|-----------------------|
| 1 | Golin | transgen | infiziert | 10 | 5 |
| 2 | Golin | transgen | nicht infiziert | 10 | 5 |
| 3 | Golin | Wildtyp | infiziert | 10 | 5 |
| 4 | Golin | Wildtyp | nicht infiziert | 10 | 5 |
| 5 | Greina | transgen | infiziert | 10 | 5 |
| 6 | Greina | transgen | nicht infiziert | 10 | 5 |
| 7 | Greina | Wildtyp | infiziert | 10 | 5 |
| 8 | Greina | Wildtyp | nicht infiziert | 10 | 5 |

1) Wildtyp = nicht transgen

Bodentemperatur

In je 5 Container wurden vor der Aussaat Temperaturmesser (Hotdog DT1, Elpro-Buchs AG, Buchs) im Aussenbereich (Mantelsaat) und im Zylinder (Versuchspflanzen) in 10 cm Tiefe vergraben, um die Bodentemperatur über die Vegetationsperiode hinweg aufzuzeichnen. Die Container 7, 10, 21, 28 und 38 waren mit den Temperaturmessern versehen. Die Temperaturen wurden mit denen der Wetterstation verglichen.

Phänologische Erhebungen an den Pflanzen

Alle im Folgenden beschriebenen Erhebungen wurden nur an den Versuchspflanzen im Zylinder einer jeden Parzelle durchgeführt.

Auflaufgeschwindigkeit. Dieser Parameter wurde für jedes Korn einzeln bestimmt. Ab dem 23. 3. 01 wurden die Container täglich auf die Anzahl der ausgekeimten Samenkörner hin bonitiert. Die Bonitur wurde beendet, sobald über einen Zeitraum von drei Tagen kein neues Korn ausgekeimt war (6. 4. 01).

Pflanzenlänge. Die Länge der Pflanzen (Bodenoberfläche bis Ährenspitze) wurde vor der Ernte (18. 7. 01) erhoben.

Anzahl Ähren. Zum Zeitpunkt der Ernte (11. 8. 01) wurde die Anzahl der Ähren pro Pflanze bestimmt.

Tausendkorngewicht (TKG). Das TKG wurde für jede Pflanze separat erhoben. Bei der Ernte wurden die Ähren abgeschnitten und in offenen Papiertüten zuerst einige Tage bei Raumtemperatur zum vollständigen Trocknen und anschliessend bis zum Dreschen (2. 10. 01) bei 4°C aufbewahrt.

Infektion mit *Tilletia tritici* und Bonitur des Befalls

Infektion: 1 mg *Tilletia tritici* Sporen pro Samenkorn. Dies entspricht der 30-fachen Menge, die bei der Sortenprüfung im Feld eingesetzt wird (1 g Sporen/kg Saatgut). Die Weizenkörner

wurden mit den *T. tritici* Sporen in einem Versuchsgefäß von Hand so gemischt, dass eine möglichst gleichmässige Verteilung der Sporen auf den Körnern erreicht wurde.

Von jeder Pflanze wurde die Anzahl der gesunden und befallenen Ähren im Stadium der Teigreife (DC 65, 6.7.2001) und im voll ausgereiften Zustand nach der Ernte bestimmt. Zwischen Teilbefall (einzelne Körner teilweise oder vollständig als Brandbutten ausgebildet) und vollständig befallenen Ähren (alle Körner als Brandbutten) wurde nicht unterschieden. Für die statistische Auswertung wurde der Befall in Prozent befallene Ähren pro Verfahren bzw. Zylinder (Mittelwert aus 10 Einzelpflanzen) dargestellt.

Zur Kontrolle wurden auch die Ähren der nicht infizierten Pflanzen auf Befall mit Stinkbrand untersucht.

Expression des KP4-Gens

Das KP4-Gen wird in den transgenen Linien Golin 5 und Greina 16 vom Ubiquitinpromoter aus Mais kontrolliert. Dieser Promoter ist zwar konstitutiv, wird aber durch Stress aktiviert, z.B. durch Hitze, vielleicht auch durch Pilzbefall. Es lag daher nahe, die Expression des KP4 in den transgenen Pflanzen mit **Real-Time Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)** quantitativ zu erfassen und mit den Daten zum Stinkbrandbefall bzw. zur Mykorrhiza auf dem Niveau der Einzelpflanzen zu vergleichen.

Etwa 100 mg Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Aus diesem Pulver wurde die RNA mit dem Reagenz Plant Mini Kit (Quiagen) isoliert. Eine Behandlung mit RNase-freier DNase (Quiagen) beseitigte den Hintergrund durch genomische DNA. Die Konzentration der isolierten RNA (ca. 80-85% rRNA, 1-5% mRNA) wurde spektrophotometrisch gemessen (Ultraspec 3000, Pharmacia Biotech). Ein Mikrogramm dieser RNA wurde der reversen Transkriptase ausgesetzt. Dazu wurde der Advantage-RT-for-PCR kit (Clontech) verwendet. Die cDNA wurde dann in einem Light cycler-Real-time PCR-Apparat (Roche Diagnostics) mithilfe der SYBR Green I-Technik amplifiziert. Als Standard für die Grundexpression und die Aufreinigung ist β -Tubulin gemessen worden. Als Vergleichswerte für die Expression der Einzelpflanze ist das Verhältnis KP4: β -Tubulin als Mittelwert aus drei Messungen angegeben, deren Messgenauigkeit besser als 10% war. Falls die Präparation gemäss eines Standardtests (Roche Diagnostics) eine Verunreinigung enthielt, so wurde der Messwert nicht benutzt.

Als Primer für die PCR-Reaktion wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

KP4: CACACACACAACCAGATCTCCCC und ATCCGAATTCTATCAACACGAGTTTACG.

β -Tubulin: ATCGTTCATGTTGCTCTCCG und CACTGTTCTGAGTTGACCC.

Makroorganismen

Getreidehähnchen

Der Befall (Blattfrass) wurde nur bei nicht infizierten Pflanzen erhoben. An drei Trieben jeder Pflanze wurde je das Fahnenblatt sowie das zweitoberste Blatt auf die durch Fensterfrass beschädigte Blattfläche bonitiert. Es wurde mit einem Befallschema zur Bonitur von Gelbrost gearbeitet. Der Blattfrass wurde in Befallsklassen eingeteilt (Tab. 2).

Tabelle 2: Klassen des Getreidehähnchenbefalls

| Befallsklassen | % gefressene Blattfläche | durchschnittliche Prozentzahl |
|----------------|--------------------------|-------------------------------|
| 0 | 0 | 0 |
| 1 | 1-5 | 3 |
| 2 | 5-15 | 10 |
| 3 | 15-25 | 20 |
| 4 | 25-50 | 38 |

Die Bonitur wurde am 29. 6. 01 (Greina) bzw. am 5.7.01 (Golin) durchgeführt. Im Anschluss an die Bonitur, wurden die Befallsklassen wieder in die durchschnittliche Prozentzahl Blattfrass (Tab. 2) übersetzt.

Blattläuse

Drei Mutterläuse von *Rhopalosiphum padi* wurden in Käfigen (Durchmesser: 3.4 cm) an das Fahnenblatt von transgenen bzw. nicht transgenen Pflanzen der Sorten Greina (6. 6. 01) und Golin (14. 6. 01) gesetzt. Am nächsten Tag wurden die Mutterläuse entfernt und zwei frisch abgesetzte Nymphen belassen um ihre Entwicklung zu verfolgen. Gemessen wurde (a) die Entwicklungsdauer bis zur Adulten (= erste Ablage von Nymphen), sowie (b) die Anzahl der abgelegten Nymphen in einer der Entwicklungszeit entsprechenden Zeitperiode. Aus den beiden erhaltenen Werten kann der r_m Wert errechnet werden, ein Mass für die Populationsentwicklung von Blattläusen.

Collembolen

Am 23. 3., 19. 4. und 8. 5. 01 wurden Bodenproben auf Collembolen hin untersucht. Da nur vereinzelte Tiere gefunden wurden, wurden am 15. 5. 01 alle Zylinder mit je 200 Collembolen (*Folsomia candida*) aus der Laborzucht angeimpft. Weitere Bodenproben wurden dann am 12. 6., 5. 7. und 2. 8. 01 ausgewertet. Zur Probennahme wurde mit Hilfe eines Stechbohrers (1 cm Durchmesser, ca. 10 cm Tiefe) aus jedem Zylinder 4-5 Proben entnommen und miteinander vermengt (ca. 40g Boden). Die Proben wurden in Wasser gelöst und die an der Oberfläche treibenden Collembolen abgesammelt. Das Trockengewicht des Bodens wurde bestimmt and die Anzahl gefundener Collembolen auf 100 g Boden (Trockengewicht) bezogen.

Ampizillin resistente Keimzahlen im Kot von Getreidehähnchen

Getreidehähnchen-Larven wurden am 15. 6. 01 mit einem kleinen sterilisierten Spatel von der Blattoberfläche von transgenem und nicht transgenem Weizen der Sorte Greina genommen und einzeln in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß mit 100 µl Verdünnungslösung (NaCl, 8.5 g/l, steril) gegeben. Mittels Vortexen wurde die den Larven anhaftende Kotschicht suspendiert. Eine 10-fache Verdünnungsreihe (10^{-2} bis 10^{-6}) der Suspension wurde in Verdünnungslösung hergestellt und je 100 µl auf PC-Agar (Difco) ausplattiert, die entweder 50 µg/ml Ampizillin

und 100 µg/ml Cycloheximid oder nur Cycloheximid enthielten. Die Platten wurden für 6 Tage bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Keimzahl bestimmt wurde.

Mikroorganismen im Boden

Die *Bodenproben* wurden als Kerne (0.7 x 10 cm) aus den Zylindern gewonnen. Bei jeder Probenahme wurden pro Zylinder ca. 10 Kerne gestochen und in kleinen Plasticksäckchen vereinigt. Die Proben wurden gut gemischt und für die Trockengewichtsbestimmung, die DNA-Extraktion und die Analysen der Collembolen verwendet.

Zur *Trockengewichtsbestimmung* wurden 5 g Boden in Aluminiumschalen eingewogen und über Nacht bei 105°C getrocknet. Der Wassergehalt wurde graphimetrisch bestimmt.

Für die *DNA Isolation* wurden 0.5 g Boden in 2 ml Eppendorfgefäße eingewogen, in die vorher 0.75 g Glycerperlen (Durchmesser 0.1 mm) gegeben worden waren. Nach Zugabe von 1.3 ml Extraktionspuffer wurden die Proben in einer Kugelmühle (FastPrep, Bio101) gespannt und für 40 s auf Stufe 5.5 homogenisiert. Das so erhaltene Homogenat wurde in einer Tischzentrifuge bei 14000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde gewonnen und das Sediment zwei weitere Male mit je 1 ml Extraktionspuffer auf die gleiche Weise extrahiert. Die so gewonnenen Fraktionen wurden vereinigt, mit Chloroform extrahiert und die DNA durch Zugabe von 1 Volumen Präzipitationslösung (40 % PEG, 2.5 M NaCl) selektiv gefällt. Die DNA wurde in TE-Puffer (10 mM TrisCl, 1 mM EDTA, pH 8) gelöst. Die DNA wurde mittels Picogreen fluorometrisch quantifiziert.

Als *Markergen* für verschiedene mikrobielle Gruppen, wurde das Gen für die rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit verwendet. Mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden Genfragmente spezifisch und getrennt für Bakterien, Eukaryonten und Pilze aus den DNA-Extrakten isoliert. Um die Populationsstrukturen der jeweiligen Mikroorganismen zu vergleichen wurden an den PCR-Produkten Restriktionsanalysen (genetisches Fingerprinting) durchgeführt.

Die *Restriktionsanalyse* beruht auf der Bestimmung von Längenpolymorphismen von Restriktionsfragmenten (engl. Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), welche mittels enzymatischem Verdau aus den Markergenen gewonnen werden. Bei der hier angewendeten T-RFLP Analyse wird bei der Isolation des Markergens mittels PCR, eines oder beide Enden des PCR-Produktes mit einem fluoreszenten Farbstoff markiert. Bei der enzymatischen Fragmentierung entstehen so terminale Fragmente, die markiert sind, was der Methode die Bezeichnung terminale (T)-RFLP-Analyse eingebracht hat. Diese Art von Fragmenten kann mit Hilfe einer automatisierten Fragmentanalyse auf einem Kapillarsequenzierer (ABI 310, Applied Biosystems) aufgetrennt werden. Dabei werden die markierten Fragmente mittels LASER-Technologie detektiert und gleichzeitig deren Länge und Menge bestimmt.

Auf diese Weise wurden in der vorliegenden Studie die Fingerabdrücke automatisch als numerische Datensätze erfasst (Genotyper Software, Applied Biosystems). Für die weiteren Analysen wurden die Daten in eine Matrizenform überführt, in der Fragmentlängen die Spalten und die einzelnen Proben (genetischen Fingerprints) die Zeilen bilden. Diese Darstellung mehrerer Fingerabdrücke in Form einer Datenmatrize erlaubte deren Umwandlung in eine Distanzmatrize (Euklidische Distanzen) und die Berechnung von Ähnlichkeitsdendrogrammen mittels Clusteranalyse (Ward-Dendrogramme, Statistica Software). Für Varianzanalysen der multivariaten Datensätze wurde 3-Weg MANOVA (engl. multivariate analysis of variance) angewendet. Dazu wurden die abhängigen Variablen jeder Organismengruppe auf Normalverteilung getestet und nur je die 14 Variablen mit der besten Normalverteilung ($\chi^2 > 0.05$) verwendet. Durch Iteration der unabhängigen Variablen Sorte, Transformation und Infektion wurden alle drei Kombinationen zusammen mit der vierten unabhängigen Variablen Zeit getestet. Für jede der drei Organismengruppen wurden also drei 3-Weg MANOVA durchgeführt. Als Resultat wurden die unabhängigen Variablen (Sorte, Transformation, Inokulation, und Zeit), welche signifikant ($P < 0.05$) zur Varianz der je 14 abhängigen Variablen beitragen, erfasst.

Mykorrhizen

Unmittelbar nach der Ernte der Pflanzen wurden Mitte August 2001 aus allen Töpfen mit dem Spatel Bodenproben entnommen. Daraus wurden diejenigen Wurzeln isoliert, die noch Kontakt zur Mutterpflanze hatten, um Kontamination mit Wurzeln auszuschliessen, die nicht vom Weizen stammen. Die Wurzeln wurden gewaschen und in ca. 2 cm lange Abschnitte unterteilt und in 50% Ethanol von der Vegetationshalle ins Labor der ETH nach Eschikon transportiert. Dort wurden die Wurzelabschnitte ca. 1 Std. in 10% KOH gekocht, gewässert und danach während ca. 1 Std. in 1% Salzsäure inkubiert. Die Pilzstrukturen wurden mit einer Mischung aus Milchsäure, Glycol und Wasser (1:1:1, vol.), welche 0,5% Methylblau und 0,5% Trypanblau enthielt, gefärbt. Der Farbüberschuss wurde ausgewaschen und anschliessend wurden 14 Wurzelabschnitte pro Probe auf Pilzstrukturen im Mikroskop bonitiert. Die Strukturen wurden nach Mykorrhiza- (Vesikel, Arbuskeln) und Nicht-Mykorrhizastrukturen) unterschieden. Wenn ein Abschnitt die entsprechenden Pilzstrukturen aufwies, wurde er als positiv registriert unabhängig von der Anzahl der Strukturen. Daraus wurde über die 14 Wurzelabschnitte ein prozentualer Wert "Kolonisation pro Wurzellänge" ermittelt und mit statistischen Routineverfahren auf Signifikanz geprüft.

4. Resultate und Diskussion

Bodentemperatur

Die gemessenen Bodentemperaturen zeigen, dass der Boden mit den Versuchspflanzen in den Zylindern gut gegen die äusseren Einflüsse abgepuffert war (Tab. 3). Obwohl die Temperatur im Zylinder kurz vor der Ernte auf etwas über 26 °C Anstieg, blieben die Temperaturen dennoch weit unter den Bodentemperaturen, die im Topfversuch im Jahr 2000 gemessen worden waren. Die Temperaturwerte lagen nur leicht über denen, die an der Wetterstation im Freiland gemessen wurden.

Tabelle 3: Bodentemperatur (10 cm Tiefe) gemessen von Saat bis Ernte in den Zylindern (n = 5) mit den Versuchspflanzen, im äusseren Bereich der Container (n = 5) mit der Mantel Saat (AUSSEN) sowie im Freiland (Wetterstation).

| | März | April | Mai | Juni | Juli | August |
|-----------------|------|-------|------|------|------|--------|
| AUSSEN | | | | | | |
| Max. | 17.1 | 16.9 | 22.6 | 23.8 | 25.8 | 27.4 |
| Min. | 6.8 | 4.1 | 12.2 | 11.8 | 15.8 | 17.9 |
| ZYLINDER | | | | | | |
| Max. | 16.9 | 16.7 | 21.9 | 22.1 | 25.0 | 26.4 |
| Min. | 7.0 | 4.4 | 12.6 | 12.2 | 16.2 | 18.3 |
| FREILAND | | | | | | |
| Max. | 10.3 | 13.0 | 20.4 | 22.4 | 23.3 | 23.8 |
| Min. | 6.1 | 5.6 | 10.7 | 13.2 | 16.7 | 18.1 |

Phänologische Erhebungen an den Pflanzen

Auflaufgeschwindigkeit

Die Varianzanalyse ergab einen signifikanten Effekt durch die Sorte ($F = 10.0$, $P = 0.002$), die Transformation ($F = 36.0$, $P < 0.0001$), die Infektion ($F = 13.0$, $P = 0.0003$) und eine signifikante Sorte-Transformation Wechselwirkung ($F = 6.5$, $P = 0.01$) (Tab. 4).

Tabelle 4: Anzahl ausgekeimter Körner und Auflaufgeschwindigkeit in Tagen

| Behandlung | Anzahl ausgekeimter Körner (von 100) | Tage \pm SE |
|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------|
| Golin, transgen, infiziert | 97 | 13.3 \pm 0.20 |
| Golin, transgen, nicht-infiziert | 98 | 13.4 \pm 0.15 |
| Golin, Wildtyp, infiziert | 83 | 14.2 \pm 0.26 |
| Golin, Wildtyp, nicht-infiziert | 78 | 14.6 \pm 0.25 |
| Greina, transgen, infiziert | 97 | 12.7 \pm 0.14 |
| Greina, transgen, nicht-infiziert | 99 | 13.8 \pm 0.19 |
| Greina, Wildtyp, infiziert | 97 | 13.6 \pm 0.15 |
| Greina, Wildtyp, nicht-infiziert | 97 | 13.8 \pm 0.13 |

Pflanzenlänge

Golin ist signifikant länger verglichen mit Greina (ANOVA; $F = 457.5$, $P < 0.0001$). Die Infektion mit dem Brandpilz reduzierte die Pflanzenlänge bei Golin um 3.2 % und bei Greina um 2.8 % ($F = 17.7$, $P < 0.0001$). Der Effekt durch die Transformation war nicht signifikant ($F = 1.3$, $P = 0.26$) (Tab. 5).

Tabelle 5: Pflanzenlänge (cm) von der Bodenoberfläche bis zur Ährenspitze ($n = 50$).

| Behandlung | Länge \pm SE |
|-----------------------------------|-----------------|
| Golin, transgen, infiziert | 88.6 \pm 0.91 |
| Golin, transgen, nicht-infiziert | 93.5 \pm 0.79 |
| Golin, Wildtyp, infiziert | 89.9 \pm 0.93 |
| Golin, Wildtyp, nicht-infiziert | 90.9 \pm 1.07 |
| Greina, transgen, infiziert | 77.0 \pm 0.73 |
| Greina, transgen, nicht-infiziert | 79.3 \pm 0.66 |
| Greina, Wildtyp, infiziert | 76.4 \pm 0.81 |
| Greina, Wildtyp, nicht-infiziert | 78.5 \pm 0.87 |

Anzahl Ähren

Unabhängig von der Transformation bzw. der Infektion mit Stinkbrand bildete Golin durchschnittlich 5.05 Ähren pro Pflanze aus während Greina nur 3.85 Ähren pro Pflanze entwickelte (ANOVA; $F = 90.5$, $P < 0.0001$) (Tab. 6). Infektion ($F = 0.06$, $P = 0.81$) und Transformation ($F = 1.9$, $P = 0.17$) hatten keinen Effekt auf die Anzahl der ausgebildeten Ähren.

Tabelle 6: Anzahl Ähren pro Pflanze (n = 50).

| Behandlung | Anzahl \pm SE |
|-----------------------------------|-----------------|
| Golin, transgen, infiziert | 5.2 \pm 0.03 |
| Golin, transgen, nicht-infiziert | 5.1 \pm 0.02 |
| Golin, Wildtyp, infiziert | 4.9 \pm 0.03 |
| Golin, Wildtyp, nicht-infiziert | 5.0 \pm 0.03 |
| Greina, transgen, infiziert | 4.0 \pm 0.03 |
| Greina, transgen, nicht-infiziert | 3.9 \pm 0.02 |
| Greina, Wildtyp, infiziert | 3.6 \pm 0.02 |
| Greina, Wildtyp, nicht-infiziert | 3.9 \pm 0.02 |

Tausendkorngewicht (TKG)

Das TKG von Greina war 23% niedriger als das von Golin (ANOVA; $F = 81.9$, $P < 0.0001$) (Abb. 1). Darüber hinaus gibt es auch einen signifikanten Effekt durch die Transformation. Unabhängig von der Sorte wiesen die transgenen Pflanzen ein 6% höheres TKG auf als die nicht-transformierten Pflanzen ($F = 4.3$, $P = 0.04$).

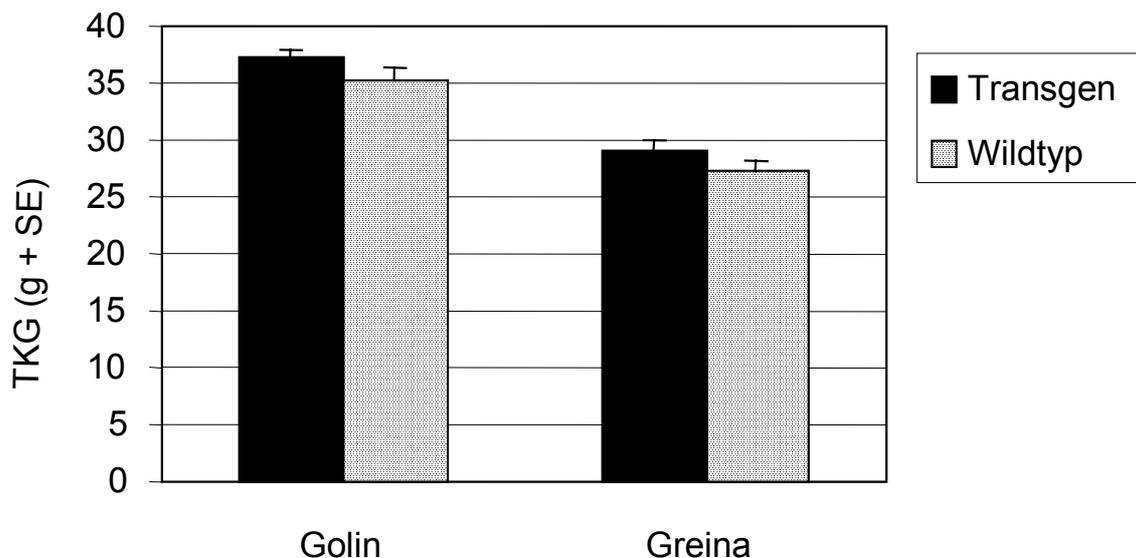


Abbildung 1: Tausendkorngewicht (g) von nicht-infizierten Pflanzen (n = 50).

Befall mit *Tilletia tritici*

Tabelle 7: Befall mit *Tilletia tritici* (Anzahl befallene Ähren in%)

| Behandlung | befallene Ähren in % \pm SD |
|-----------------------------|-------------------------------|
| Golin, transgen, infiziert | 62.7 \pm 13.6 |
| Golin, Wildtyp, infiziert | 43.2 \pm 16.1 |
| Greina, transgen, infiziert | 76.4 \pm 10.1 |
| Greina, Wildtyp, infiziert | 61.1 \pm 20.8 |

Der Befall mit *Tilletia tritici* war bei Greina Wildtyp um 17.9% höher als bei Golin Wildtyp (ANOVA; $F=3.79$, $p=0.04$). Ein ähnlicher Befallsunterschied für die beiden Sorten wurde auch in einem Feldversuch im Rahmen der Sortenprüfung festgestellt (Winter et al. 1995). Die Transformation bewirkte in diesem Versuch keine Befallsverminderung. Golin transgen hatte im Vergleich zu Golin Wildtyp einen um 19.5% höheren Befall (ANOVA; $F=3.84$, $p=0.12$). Der Befall von Greina transgen war 15.3% höher als bei Greina Wildtyp (ANOVA; $F=1.7$, $p=0.26$). Die Unterschiede zwischen den Verfahren Wildtyp und transgen waren für beide Sorten statistisch nicht signifikant. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu einem früheren Versuch in der Klimakammer, in dem ein um 31% reduzierter Befall bei KP4-Pflanzen der Sorte Greina gemessen wurde (Clausen et al. 2000). Die widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich nicht durch einen unterschiedlichen Befallsdruck erklären. Der Befall im Klimakammerversuch (Greina Wildtyp 74%) war vergleichbar mit dem in diesem Versuch festgestellten Befall. Eine Erklärung für eine mögliche umweltabhängige Wirkung des KP4-Gens auf die Wirt-Parasit Interaktion kann im Moment nicht gegeben werden.

KP4-Gen Expression

Alle KP4-Pflanzen, die getestet wurden, zeigten KP4-Expression, die jedoch zum Teil sehr stark von einander abwich (Abb. 2). Zwischen der Gruppe der mit Stinkbrand infizierten und der Gruppe der nicht infizierten Pflanzen gab es keine signifikanten Unterschiede (nicht gezeigt). Die Messwerte der nicht transgenen Pflanzen waren immer Null.

Vergleicht man die beiden Sorten Golin und Greina, so hat die transgene Sorte Golin insgesamt einen geringeren relativen Gehalt an KP4-mRNA (Abb. 2, rot) als die transgene Sorte Greina (Abb. 2, blau). Innerhalb der Gruppen sind die KP4-Expressionsdaten der Einzelpflanzen nach der Intensität des bonitierten Stinkbrand-Befalls angeordnet (Abb. 2, grüne Punkte).

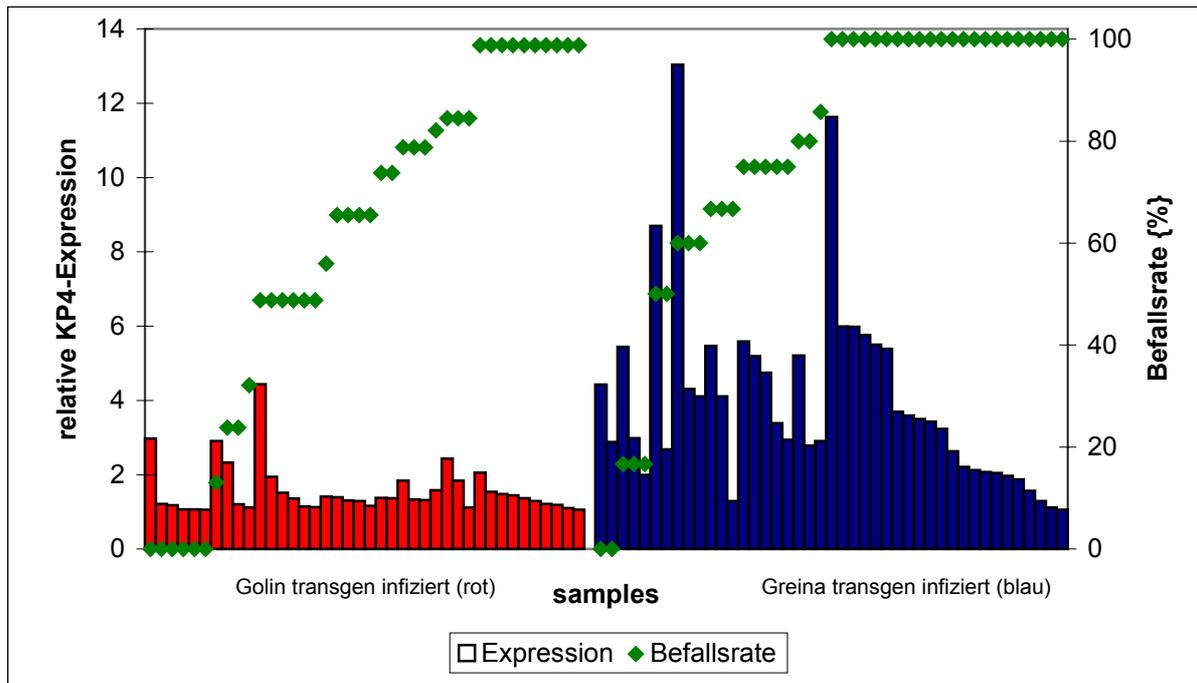


Abbildung 2: Die Expressionsrate nach realtime-RT-PCR

Die Expressionsrate nach realtime-RT-PCR ist für jede einzelne transgene Pflanze bestimmt worden. Die Expressionswerte sind in Clustern angeordnet nach genetischem Hintergrund der Sorten und nach der Behandlung (mit Stinkbrand infiziert oder nicht). Innerhalb der Cluster sind die Messwerte nach der Befallsrate (grün) angeordnet.

Die Expression, die wir messen konnten und die in Abb. 2 dargestellt ist, gibt relative Werte (KP4/Tubulin) von Einzelpflanzen wieder. Dabei haben wir die Tubulin-Expression als Standard benützt (Abb. 3a). Das führt zu sehr unterschiedlichen KP4-Expressionswerten für die Einzelpflanzen. Um einen Eindruck von der Variabilität der Expressionswerte über die ganze Population zu geben, haben wir in Abb. 3 die Streuung der KP4-Messwerte (Abb. 3b) und der Tubulin-Messwerte (Abb. 3a) getrennt dargestellt. Daraus ergibt sich eine deutlich kleinere Streuung der relativen Tubulin-Expression im Vergleich zur relativen KP4-Expression. Das rechtfertigt die Verwendung von Tubulin als Standard.

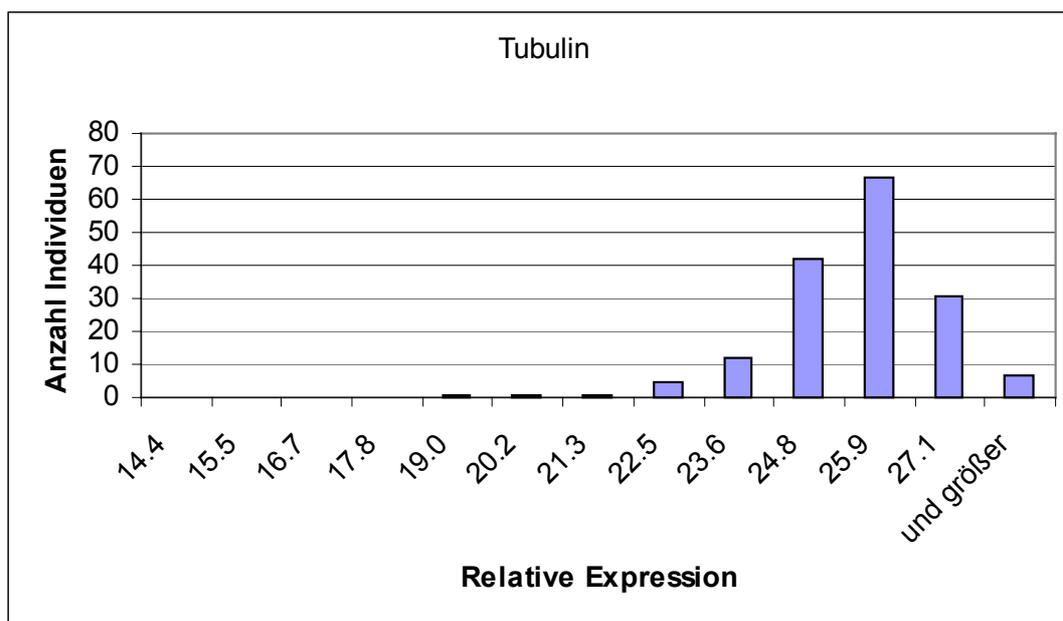


Abbildung 3a: Relative Streuung der Tubulin-Expression

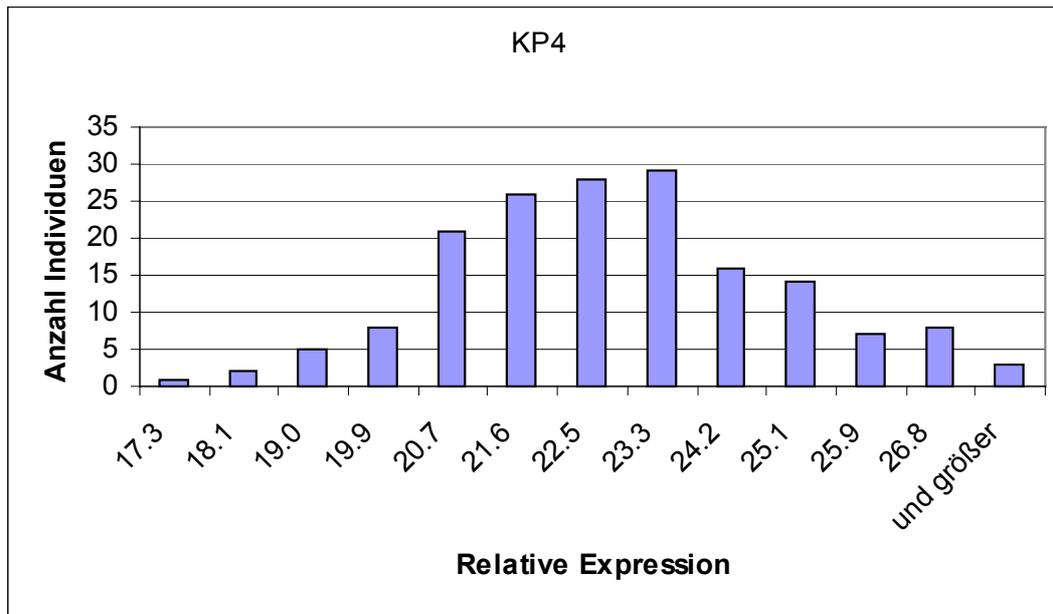


Abbildung 3b: Relative Streuung der KP4-Expression

Der Stinkbrandbefall der transgenen Pflanzen im geschlossenen Gewächshaus lag gegenüber nicht transgenen Pflanzen signifikant tiefer (Clausen et al. 2000, Sautter et al. 2000). Die Befallsrate und die KP4-Expression waren nicht korreliert und die Infektionsrate der transgenen Pflanzen waren etwas höher. Über die Ursachen dieser Ergebnisse lässt sich momentan nur spekulieren.

Die mRNA musste aus den Blättern isoliert werden. Der Pilz wächst aber im Stängel, den wir jedoch nicht untersuchen konnten, weil wir von den Pflanzen sonst keine Ähren erhalten hätten. Aus den RT-PCR-Daten können wir nur auf den Gehalt an mRNA schliessen. Also erhalten wir nur begrenzte Information über die Transkription, bzw. den Umsatz an mRNA. Ob die Pflanzen auch KP4-Protein enthalten, konnten wir nicht prüfen, da noch keine Antikörper gegen das KP4-Protein zur Verfügung standen. Auch serologische Methoden geben keine vollständige Information, da sie auch inaktives Protein und Proteinfragmente aufspüren. So könnte zum Beispiel kein Protein da gewesen sein, obgleich mRNA nachweisbar war oder das Protein könnte inaktiv sein als Folge von proteolytischem Abbau, Konformationsänderung durch chemische oder physikalische Einflüsse oder eine andere Art von Inaktivierung.

Die Ergebnisse aus der Vegetationshalle zeigen erneut, dass Resultate aus Klimakammern keine Schlüsse zulassen über das Verhalten der Pflanzen ausserhalb der geschützten Atmosphäre von Klimakammern. Ob jedoch die Ergebnisse in der Vegetationshalle einen Rückschluss auf das Verhalten der Pflanzen im Feld zulassen, ist ebenfalls ungewiss. Dazu sind die pflanzenphysiologischen Verhältnisse zu komplex und mindestens teilweise nicht vorher bestimmbar. Der Vergleich von simultanen Versuchen in der Klimakammer, der Vegetationshalle und im Feld würden die einmalige Gelegenheit bieten, diese Systeme zu vergleichen und das Potential der Vegetationshalle für mögliche Aussagen über das Verhalten der Pflanzen im Feld zu testen.

Makroorganismen

Getreidehähnchen

Im Gegensatz zum Vegi-Versuch 2000 hat sich kein Unterschied hinsichtlich des Blattfrasses zwischen den beiden Weizensorten ergeben (ANOVA; $F = 2.5$, $P = 0.12$) (Abb. 4). In Übereinstimmung mit dem letztjährigen Versuch gab es wiederum keinen Unterschied zwischen transgenen und nicht-transgenen Pflanzen ($F = 0.3$, $P = 0.62$).

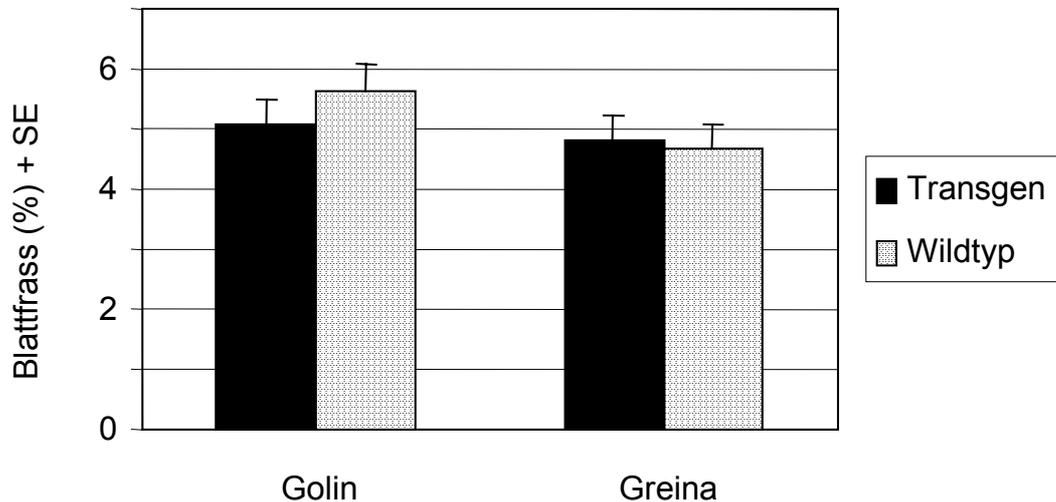


Abbildung 4: Anteil der geschädigten Blattfläche durch Getreidehähnchen.

Blattläuse

Die Entwicklungszeit bzw. die Populationsentwicklung der Blattlaus *R. padi* war nicht signifikant unterschiedlich zwischen transgenen und nicht-transgenen Pflanzen der Sorten Greina und Golin (t-test; $P > 0.05$) (Tab. 8).

Tabelle 8: Entwicklungszeit und Populationsentwicklung (r_m) von *Rhopalosiphon padi* auf transgenen und nicht-transgenen Weizenpflanzen der Sorten Greina und Golin.

| Sorte | Transformation (n) | Entwicklung (Tage \pm SE) | $r_m \pm$ SE |
|--------|--------------------|-----------------------------|------------------|
| Greina | Wildtyp (24) | 9.79 \pm 0.170 | 0.28 \pm 0.006 |
| | Transgen (23) | 9.96 \pm 0.172 | 0.28 \pm 0.006 |
| Golin | Wildtyp (23) | 8.87 \pm 0.130 | 0.33 \pm 0.008 |
| | Transgen (19) | 9.11 \pm 0.105 | 0.32 \pm 0.008 |

Collembolen

Nachdem die Zylinder mit Collembolen angeimpft worden waren, hat sich eine Population aufgebaut. Es gab keine Unterschiede in der Collembolen-Population zwischen Bodenproben aus Zylindern mit transgenen bzw. Wildtyp Pflanzen (ANOVA mit Messwiederholung; $F = 0.007$, $P = 0.93$). Auch zwischen Bodenproben von Zylindern die mit Golin oder Greina Pflanzen besetzt waren, gab es keinen Unterschied ($F = 0.4$, $P = 0.53$) (Abb. 5)

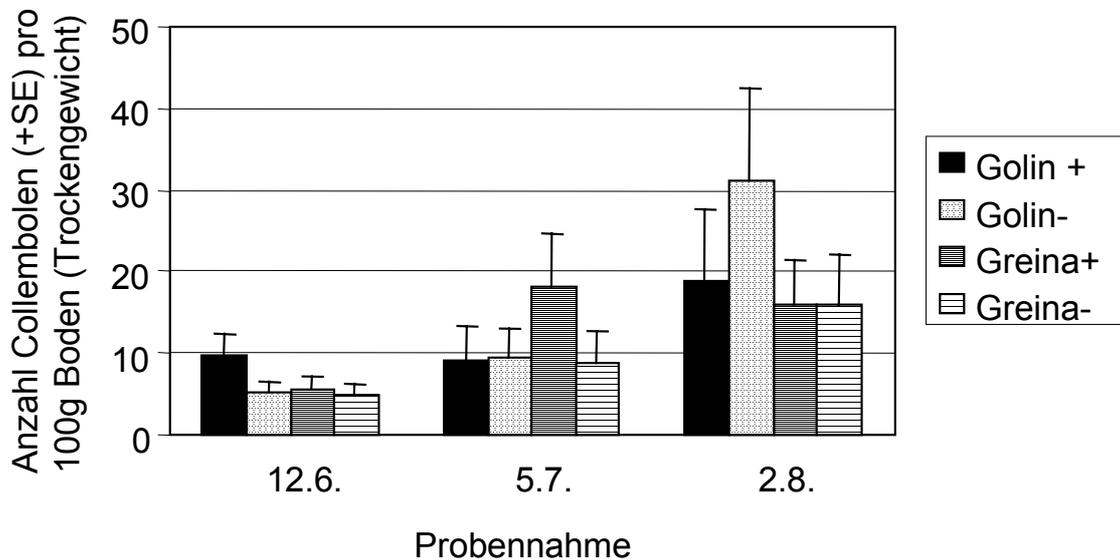


Abbildung 5: Anzahl Collembolen pro Bodenprobe von Zylindern in denen transgene (+) oder nicht-transgene (-) Pflanzen von Greina oder Golin wuchsen.

Ampizillin resistente Keimzahlen im Kot von Getreidehähnchen

Die transgenen Weizenpflanzen enthalten ein Ampizillin-Resistenzgen. Es stellte sich deshalb die Frage, ob man im Kot der Getreidehähnchenlarven, welche natürlicherweise in der Vegetationshalle auftraten und sowohl auf transgenen als auch auf nicht transgenen Weizenpflanzen gefunden wurden, Ampizillin-resistente Keime überhaupt nachweisen kann, und ob allenfalls unterschiedliche Keimzahlen zwischen Larven von transgenen und wildtyp Pflanzen auftreten. Im Sinne einer Vorstudie wurde dafür ein Versuch durchgeführt, um die relative Anzahl an Ampizillin-resistenten Keimen im Kot von Getreidehähnchenlarven festzustellen. Die Mobilität dieser Larven ist relativ gering, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass sich jedes Individuum vorwiegend auf den Pflanzen einer Verfahrenspartelle aufgehalten hat. Kotproben wurden suspendiert und auf selektivem und nicht selektivem PC-Agar ausplattiert. Das Wachstum der Keime war äusserst heterogen, was sowohl die Morphologie der Keimkolonien, als auch deren Wachstumsverhalten betraf. Viele der Platten konnten aufgrund sich schnell ausbreitender einzelner Keimkolonien nicht quantitativ analysiert werden. Die Datenerhebung beschränkte sich deshalb auf nur 30% der untersuchten Individuen ($N=3$, je für transgene und wildtyp Pflanzen). Für Proben, welche von nicht transgenem Weizen stammten, schwankte der Anteil an Ampizillin-resistenten Keimen zwischen 0.4% und 1.9% (Durchschnitt 0.95%). Für Proben, welche von transgenen Pflanzen isoliert wurden, schwankte der Anteil an Ampizillin-resistenten Keimen zwischen 0.6% und 1.0% (Durchschnitt 0.74%). Im Kot von Getreidehähnchen konnten also, unabhängig von deren Ursprung, Ampizillin-resistente Keime nachgewiesen werden. Die Anzahl der Proben, welche ausgewertet werden konnte, erlaubt zur Zeit noch keine stichhaltige Interpretation allfälliger Unterschiede zwischen Keimzahlen von transgenen und nicht transgenen Pflanzen.

Mikroorganismen im Boden

Die 40 Parzellen in der Vegetationshalle wurden am 7. Mai 2001, am 8. Juni 2001, am 4. Juli 2001 und am 2. August 2001 beprobt. Im Gegensatz zu der Studie im Jahr 2000 wurden im Jahr 2001 Bakterien, Eukaryonten und Pilze untersucht (Tab. 9). Auch wurde auf RFLP-Analysen verzichtet und nur die sensitivere T-RFLP Analyse angewendet.

Tabelle 9: PCR-Primer zur Detektion von Bakterien, Eukaryoten und Pilzen

| Organismengruppe | PCR Primer 1 | PCR Primer 2 |
|------------------|--------------|--------------|
| Bakterien | 27F(FAM) | 1378R |
| Eukaryonten | EUK1F(FAM) | uni-b-rev |
| Pilze | NS1(FAM) | FR1(TET) |

Um ein möglichst effizientes Screening der 8 verschiedenen Behandlungen zu ermöglichen, wurden Teile der extrahierten DNA Proben aus jeweiligen Wiederholungen vereinigt. Dieser Ansatz, der bereits in der Vorjahresstudie angewendet wurde, erlaubt es, stabile Veränderungen, die in allen Töpfen der gleichen Behandlung auftreten gegenüber allfälligem Rauschen zu verstärken. Alle 8 Verfahren über die vier Probenahmezeitpunkte wurden in die Analyse aufgenommen. Dies ergab 32 Proben welche für die drei Organismengruppen analysiert wurden.

Wie im Vorjahr wurde auch dieses Jahr versucht, mit Clusteranalysen Ähnlichkeiten und Unterschiede in den genetischen Fingerabdrücken darzustellen. Im Gegensatz zum letztjährigen Versuch, konnte dieses Jahr keine so klare Gruppierung der Verfahren mehr nachgewiesen werden. Um dies zu veranschaulichen, wurden zwei entsprechende Datensätze der Jahre 2000 und 2001 mit Daten von zwei Zeitpunkten, der Sorte Greina und Golin je als transgene und wildtyp Varianten verglichen (Abb. 6).

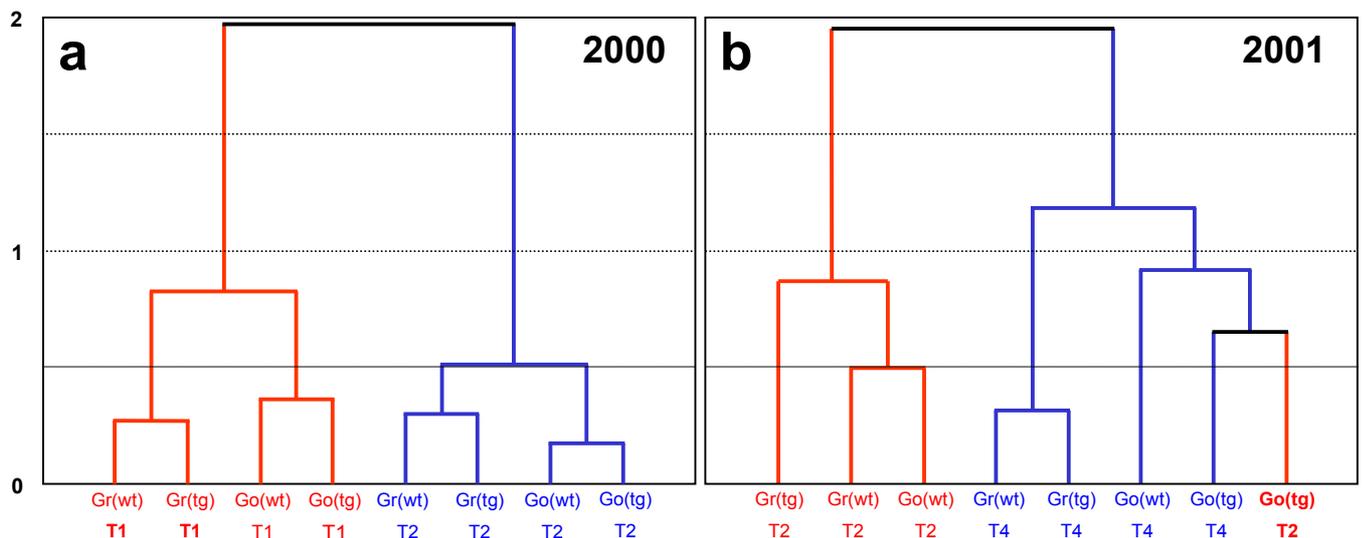


Abbildung 6: Clusteranalysen von vergleichbaren bakteriellen T-RFLP Daten aus den Versuchsjahren 2000 (a) und 2001 (b). Die Daten aus dem Jahr 2000 stammen aus Proben vom 29. Mai (T1) und 24. Juli (T2). Jene aus dem Jahr 2001 datieren vom 8. Juni (T2) und 2. August (T4). Es wurden nur die Verfahren Sorte [Greina (Gr) und Golin (Go)] und Transformation [wildtyp (wt) und transgen (tg)] in diese Analyse aufgenommen, die auf euklidischen Distanzen und einer Clusteranalyse nach Ward beruhte.

Daraus wurde klar, dass die Gruppierung der Daten aus dem Jahr 2001 weniger deutlich war. Dies weist darauf hin, dass die Unterschiede zwischen den Verfahren kleiner waren als im vorjährigen Topfversuch.

Der gesamte Datensatz für das Jahr 2001 wurde deshalb mittels multivariater Statistik genauer analysiert. Aufgrund der vier unabhängigen Variablen (Sorte, Transformation, Inokulation und Zeit) konnten 14 abhängige Variablen in die Analyse eingeschlossen werden. Es wurden jeweils die vierzehn Variablen mit der besten Normalverteilung für jede Organismengruppe ausgewählt. Die Resultate dieser Auswertungen sind in Tab. 10 dargestellt.

Tabelle 10: Statistische Auswertung (MANOVA) der genetischen 'Fingerabdrücke' der Boden-Mikroorganismen

| a) Bakterien | 1 | 2 | 3 | Note |
|---|---|---|---|------|
| Sorte | - | X | | 1/2 |
| Transformation | - | | - | - |
| Inokulation | | - | - | - |
| Zeit | X | X | X | 3/3 |
| Sorte x Transformation ^a | - | | | - |
| Sorte x Inokulation ^a | | - | | - |
| Transformation x Inokulation ^a | | | - | - |

| b) Eukaryonten | 1 | 2 | 3 | Note |
|---|---|---|---|------|
| Sorte | X | X | | 2/2 |
| Transformation | - | | - | - |
| Inokulation | | X | - | 1/2 |
| Zeit | X | X | - | 2/3 |
| Sorte x Transformation ^a | - | | | - |
| Sorte x Inokulation ^a | | X | | - |
| Transformation x Inokulation ^a | | | - | - |

| c) Pilze | 1 | 2 | 3 | Note |
|---|---|---|---|------|
| Sorte | X | - | | 1/2 |
| Transformation | - | | - | - |
| Inokulation | | - | - | - |
| Zeit | X | X | X | 3/3 |
| Sorte x Transformation ^a | - | | | - |
| Sorte x Inokulation ^a | | - | | - |
| Transformation x Inokulation ^a | | | - | - |

- 1) 3-Faktoren MANOVA : Sorte, Transformation, Zeit
 - 2) 3-Faktoren MANOVA : Sorte, Inokulation, Zeit
 - 3) 3-Faktoren MANOVA : Transformation, Inokulation, Zeit
- X) Varianz signifikant (P<0.05)
-) Varianz nicht signifikant

Die Analysen wurden in drei unterschiedlichen Kombinationen (1, 2, 3) der Variablen (Sorte, Transformation, Inokulation und Zeit) durchgeführt, wobei die Variable Zeit in allen Kombinationen enthalten war (Tabelle 10). Diese Analysen zeigten, dass sich die Bodenmikroorganismen-Populationen am stärksten im zeitlichen Verlauf des Experimentes verändert haben,

da die Zeit fast immer als signifikanter Faktor für die beobachtete Varianz auftritt. Signifikante Effekte der unterschiedlichen Weizensorten (Greina und Golin) wurden ebenfalls in allen untersuchten Gruppen (Bakterien, Eukaryonten und Pilzen) gefunden, jedoch nicht in allen Kombinationen. Nur bei den Eukaryonten konnte in einer variablen Kombination ein signifikanter Effekt der Inokulation mit Stinkbrand gefunden werden. Hingegen trat in keinem Fall ein signifikanter Effekt des gentechnisch veränderten Charakters (Transformation) der Pflanzen auf. Es konnten auch keine Interaktionen von Sorte, Transformation und Inokulation nachgewiesen werden. Die Noten, welche in Tabelle 10 aufgelistet sind, verdeutlichen, in wie vielen Kombinationen eine bestimmte Variable einen signifikanten Effekt hatte.

Mykorrhizen

Die Kolonisation der Wurzeln mit allgemeinen Pilzhyphen war nur zwischen den beiden Sorten bei nicht-transgenen und mit Stinkbrand infizierten Pflanzen signifikant unterschiedlich (Abb. 7, Ziffer 3). Dieser Unterschied ist auch bei den Arbuskelstrukturen der Mykorrhiza deutlich und signifikant (Abb. 8, Ziffer 3). Auffällig ist der relativ hohe Mykorrhiza-Besatz beim transgenen Greina im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 8).

Die Unterschiede zwischen den Sorten Golin und Greina lassen sich als Hinweis deuten, dass die Methode empfindlich genug ist, um Unterschiede der Mykorrhiza-Besiedlung im Wurzelbereich zu messen.

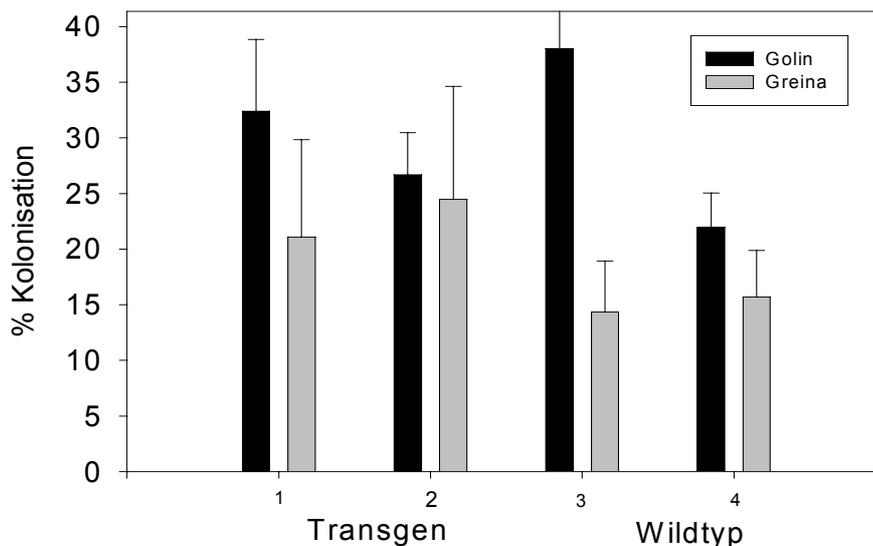


Abbildung 7: Kolonisation der Wurzeln durch allgemeine Pilzhyphen angegeben in Prozent. 1 und 2: Transgene Pflanzen; 3 und 4: Wildtyp-Pflanzen; 1 und 3: Stinkbrand inokkuliert; 2 und 4: nicht mit Stinkbrand inokkulierte Kontrolle.

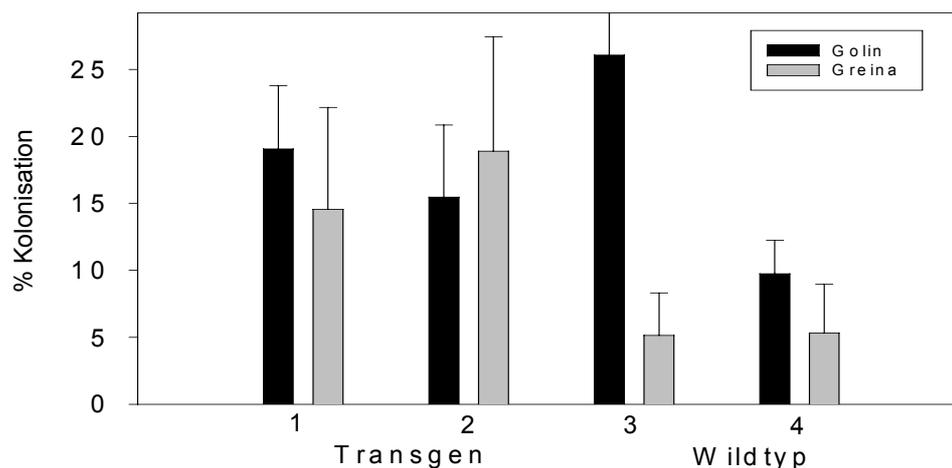


Abbildung 8: Kolonisation der Wurzeln durch Mykorrhiza-Arbuskeln angegeben in Prozent. 1 und 2: Transgene Pflanzen; 3 und 4: Wildtyp-Pflanzen; 1 und 3: Stinkbrand inokkuliert; 2 und 4: nicht mit Stinkbrand inokkulierte Kontrolle.

5. Öffentlichkeitsarbeit

Interne Information

An der Versuchsbesichtigung vom 14. Mai 2001 wurde der Versuch mit transgenem Weizen dem FAL Reckenholz Personal vorgestellt. Wir verfassten wiederum ein Merkblatt, das sowohl der internen wie der externen Information diene.

Externe Information

Mit der Medieninformation vom 21. März 2001 wurde der Versuch einer breiten Öffentlichkeit vorgestellt. Gemäss den Rückmeldungen des Argus der Presse ist in 37 Zeitungen ein Beitrag erschienen, wobei in der Westschweiz nur das Agri darüber berichtete.

Im Weiteren verfasste Erika Bucheli für die Zeitschrift Horizonte des Schweizerischen Nationalfonds einen Artikel und Bernadette Oehen vom WWF für Pro Vita. In Zusammenarbeit mit der ETH Zürich wurde vom Ernährungsmuseum in Vevey „Alimentarium“ ein Film über den Stinkbrand produziert, in dem ein Teil dem Versuch in der Vegetationshalle gewidmet ist. Häufig wurde der Versuch im Zusammenhang mit dem Antrag für einen Freisetzungsvorhaben der ETH Zürich in Lindau zitiert.

Versuchsbesichtigungen

Der Versuch in der Vegetationshalle wurde von folgenden Besuchergruppen oder Personen besucht:

- Technische Begleitgruppe des Versuchs mit transgenem Weizen
- Forschungsbereich Öko-Controlling der FAL Reckenholz
- Beratertagung Landwirtschaftliche Beratungszentrale Lindau/FAL Reckenholz
- Jacques Morel, Bundesamt für Landwirtschaft
- Studierende Universität Zürich, Mittelbaukurs
- CABI Bioscience Center Switzerland in Delémont
- Center for Xenobiotic and Environmental Risk Research (XERR) Zürich

- Institut für terrestrische Ökologie der ETH Zürich
- Consommatrices romandes

6. Sicherheitsmassnahmen

Wie bereits im Jahr 2000, wurde zur Verhinderung eines Entweichens von gentechnisch verändertem Material eine Reihe von Sicherheitsmassnahmen getroffen. Aufgrund des Versuchsaufbaus und der technischen Ausrüstung der Vegetationshalle der FAL Reckenholz wurde die gesamte Versuchsanordnung vom BUWAL als geschlossenes System betrachtet.

Organisatorische Massnahmen

- Es wurde ein Kommunikationskonzept ausgearbeitet.
- Der Versuch wurde von einer Expertengruppe fachlich begleitet.
- Für den Versuch wurde ein Sicherheitskonzept ausgearbeitet.
- Nur berechtigtes Personal hatte Zutritt zu der Vegetationshalle.
- Für die Dauer des Experimentes war ein Pikettdienst organisiert. Für die Wochenenden war der jeweilige Gewächshaus-Sonntagsdienst über allfällig zu treffende Massnahmen informiert.

Technische Massnahmen

- Die Vegetationshalle der FAL Reckenholz ist mit einer Umrandung und Maschendraht gesichert.
- Die Vegetationshalle kann bei Bedarf innert weniger Minuten in ein gedecktes Gewächshaus umgewandelt werden.
- Die Weizenpflanzen wuchsen in Containern, die vor Nagetieren geschützt waren.
- Die Pflanzen waren durch Netze vor Vögeln geschützt.
- Der Pollenflug wurde durch Einbeuteln der Ähren verhindert.
- Überschüssiges Giesswasser wurde aufgefangen und wiederverwendet.
- Die oberirdischen Pflanzenteile (ausser Samen) wurden nach Versuchsende vernichtet.

Schätzung des organisatorischen und technischen Aufwandes

Da bereits im Jahr 2000 KP4-Pflanzen in der Vegetationshalle der FAL Reckenholz angebaut wurden, haben wir die Erfahrungen nutzen können, so dass der Aufwand in diesem Jahr für besondere Massnahmen bezüglich Sicherheit und Information geringer ausfiel. Bei der Schätzung des Aufwandes sind wir davon ausgegangen, dass in einem gleichen Versuch ohne transgene Pflanzen keine besonderen Sicherheitsmassnahmen und Informationen erforderlich gewesen wären. Wir haben deshalb den zusätzlichen Aufwand gegenüber einem „normalen“ Versuch mit gleichem Umfang in der Vegetationshalle geschätzt. Diese Schätzung bezieht sich nur auf die FAL Reckenholz.

Tabelle 11: Geschätzter Aufwand für die organisatorischen und technischen Sicherheitsmassnahmen und die spezifischen Informationen im KP-Weizenversuch in der Vegetationshalle der FAL Reckenholz im 2001

| Massnahmen | Arbeiten | Aufwand |
|------------------|---|---------|
| Organisatorisch/ | Gesuch nach ESV erstellen | 1 |
| Administrativ | Sicherheitskonzept erstellen und kommunizieren (FAL Reckenholz intern) | 3 |
| | Notfallkonzept erstellen | 1 |
| | Zutrittsregelung erstellen | 1 |
| | Informationskonzept erstellen | 1 |
| | Informationsmaterialien erstellen | 3 |
| | Information vermitteln FAL intern | 5 |
| | Information vermitteln FAL extern | 5 |
| | Besprechungen mit Expertengruppe | 10 |
| | Diverse Sitzungen | 10 |
| Technisch | | |
| Am Gebäude | Türschlösser auswechseln | 1 |
| | Fenster sichern | 1 |
| | Vogelnetze montieren/demontieren | 2 |
| Am Versuch | Einbeuteln der Ähren | 20 |
| | Transgene Pflanzen vernichten | 1 |
| Total | | 65 |

Tabelle 11 zeigt, dass im Vergleich mit einem Versuch ähnlichen Umfangs ohne transgene Pflanzen in der Vegetationshalle immer noch mit einem zusätzlichen Aufwand von mindestens 65 Arbeitstagen zu rechnen ist. Dies entspricht rund einer Drittel Arbeitskraft während eines Jahres. Im Vergleich zum Vorjahr konnte der Aufwand für Sicherheitsmassnahmen um 40 Tage (38%) vermindert werden. Es wird auch klar, dass rund 60% des Aufwandes im organisatorischen und administrativen Bereich lag und etwa 40% den technischen Sicherheitsmassnahmen zuzuordnen sind. In zukünftigen Versuchen muss es ein Ziel sein, den organisatorischen und administrativen Aufwand so weit als möglich zu reduzieren.

7. Schlussfolgerungen

Das Experiment in der Vegetationshalle hat eine Reihe neuer Erkenntnisse und Erfahrungen geliefert. Soweit Fragen der ökologischen Auswirkungen untersucht werden konnten, hat sich der methodische Ansatz bewährt. Vor allem die Verwendung der grossen Container hat gegenüber den Töpfen, die im Jahre 2000 verwendet wurden, eine wesentliche Verbesserung gebracht. Das System war sehr viel besser gegen äussere Klimaeinflüsse abgepuffert. Die Bodentemperaturen sind nicht stark angestiegen, so dass die Versuchspflanzen erfolgreich mit Stinkbrand infiziert werden konnten.

Die transgenen Pflanzen wiesen einen höheren Stinkbrandbefall auf als die nicht-transgenen Pflanzen. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Eine Erklärung für diesen Befund gibt es bisher nicht. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die transgenen Pflanzen das eingefügte KP4-Gen exprimiert haben. Der einjährige Versuch in der Vegetationshalle erlaubt noch keine allgemein gültige Aussage über den Befall unter anderen Umweltbedingungen.

Wie bereits im letzten Jahr konnten keine negativen Auswirkungen der transgenen Pflanzen auf das Modell-Ökosystem nachgewiesen werden. Dagegen wurden bei einigen Parametern wiederum Sortenunterschiede sichtbar.

Die Massnahmen zur Einschliessung konnten ohne Schwierigkeiten eingehalten werden. Während der ganzen Versuchsdauer sind keine sicherheitsrelevanten Probleme aufgetreten.

Sowohl die strenge Sicherheits- als auch transparente Öffentlichkeitsarbeit haben sich bei diesem Versuch bewährt. Insbesondere hat die Begleitgruppe einen sehr wertvollen Beitrag zur Vertrauensbildung geleistet.

Verdankungen

Der Versuch wurde von einer Expertengruppe begleitet. Die Mitglieder waren: D. Fischer, Koordinationsstelle für Störfallvorsorge des Kt. Zürich, 8090 Zürich; A. Raps, Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft, BUWAL, 3003 Bern; O. Käppeli, Biosicherheitsforschung und Abschätzung von Technikfolgen des Schwerpunktprogramms Biotechnologie des Schweizerischen Nationalfonds, BATS; H. Müller-Schärer, Universität Freiburg; M. Hardegger, Bundesamt für Landwirtschaft, BLW, 3003 Bern.

Literatur

Clausen M, Kräuter R, Schachermayr G, Potrykus I, Sautter C (2000) Antifungal activity of a virally encoded gene in transgenic wheat. *Nature-Biotechnology* **18**, 446-449.

Sautter C, Kräuter R, Schachermayr G (2000). Projekt, um den Weizenstinkbrand mit GMO zu bekämpfen. *Agrarforschung* **7**, 545-547.

Winter W, Krebs H, Bänziger I (1995) Brandpilze und Streifenkrankheit: Sortenanfälligkeit. *Agrarforschung* **2**, 325-328.