

Justus-Liebig Universität Gießen
Aus dem Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I

**Untersuchungen zu phänologischen und phytomedizinisch relevanten
Effekten einer gentechnischen Modifikation des
Kohlenhydratmetabolismus in der Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.).**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Agrarwissenschaften (Dr. agr.)
des Fachbereiches Agrarwissenschaften, Ökotropologie und Umweltmanagement der
Justus-Liebig Universität Gießen

vorgelegt von
Dipl.-Ing. agr. Pia Roppel

geboren am 14.03.1972 in Elmshorn

Gießen 2007

Prüfungskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. E.-A. Nuppenau

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Honermeier

2. Gutachter: Prof. Dr. H. E. Hummel

Prüfer: Prof. Dr. Dr. W. Friedt, Prof. Dr. G. Leithold, Prof. Dr. T.
Trenczek

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abkürzungen	V
Verzeichnis der Abbildungen	VIII
Verzeichnis der Tabellen	XII
1. Einleitung und Ziele	1
2. Material und Methoden	13
2.1 Transgene Linien/Pflanzenmaterial	13
2.2 Freisetzungsversuch	13
2.3 Ermittlung der Bestandesentwicklung	18
2.3.1 Bestimmung des Feldaufganges, des Entwicklungsstadiums und des Deckungsgrades	18
2.4 Ermittlung morphologischer Merkmale	18
2.4.1 Bestimmung der Anzahl der Augenaustriebe, Haupttrieblänge, Anzahl Seitentriebe/Haupttrieb und Anzahl Blütenknospen der Infloreszenz 1. Ordnung des Haupttriebes	18
2.4.2 Bestimmung der Blattbehaarung	19
2.5 Ermittlung der Ertragsparameter	19
2.5.1 Bestimmung des Flächenertrages und der Knollengröße	19
2.5.2 Bestimmung des Stärkegehaltes und der Morphologie der Stärkekörner	20
2.6 Bestimmung der genetischen Homogenität der Pflanzknollen durch ISSR-PCR	20
2.6.1 Extraktion der DNA	20
2.6.2 Primer	21
2.6.3 PCR-Amplifikation	22
2.6.4 Elektrophorese der PCR-Produkte	22
2.6.5 Färbung, Aufnahme und Auswertung der Gele	23
2.7 Anfälligkeit gegenüber <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary	23
2.7.1 Erhaltung von <i>P. infestans</i> und Herstellung der Inokulationslösung	23
2.7.2 Krautfäule-Biotests	25
2.7.3 Knollenfäule-Biotests	26
2.7.4 Myzelwachstum von <i>P. infestans</i> in Flüssigkultur	27
2.8 Resistenz- und Anfälligkeitsreaktion gegenüber Kartoffelkrebs <i>Synchytrium endobioticum</i> Schilb. (Perc.)	29
2.9 Kartoffelzystennematode <i>Globodera rostochiensis</i> (Woll.) Behrens	30

2.10	Wurzelgallennematode <i>Meloidogyne incognita</i> (Kofoid & White) Chitwood	32
2.11	Kartoffelkäfer <i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say	34
2.11.1	Kartoffelanzucht im Gewächshaus	34
2.11.2	Haltungsbedingungen der Dauerzucht und Subpopulationen	34
2.11.3	Larvengewichte	36
2.11.4	Reproduktion	37
2.11.5	Natürlicher Befall im Freisetzungversuch	38
2.11.6	Käfigversuche	39
2.11.7	Genotypische Variabilität (RAPD-PCR)	42
2.12	Kohlenhydratbestimmung	45
2.13	Statistische Auswertung	46
3.	Ergebnisse	47
3.1	Entwicklung und Morphologie von transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp	47
3.1.1	Entwicklung der Bestände	47
3.1.1.1	Feldaufgang	47
3.1.1.2	Knospen- und Blütenstadium	48
3.1.1.3	Deckungsgrad	51
3.1.2	Morphologie der Pflanzen (Phänotyp)	52
3.1.2.1	Pflanzknollengröße	52
3.1.2.2	Haupttrieblänge	53
3.1.2.3	Blattbehaarung	55
3.1.2.4	Anzahl der Augenaustriebe/Pflanzknolle	57
3.1.2.5	Seitentriebe 1. Ordnung des Haupttriebes	58
3.1.2.6	Einzelblüten der Infloreszenz 1. Ordnung am Haupttrieb	59
3.1.3	Ertragsparameter	60
3.1.4	Genetische Variabilität des Pflanzgutes (Genotyp)	63
3.2	Auswirkung der genetischen Veränderung auf Schadorganismen	65
3.2.1	Kraut- und Knollenfäule (<i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary)	65
3.2.1.1	Krautfäule	65
3.2.1.2	Knollenfäule	69
3.2.2	Kartoffelkrebs (<i>Synchytrium endobioticum</i> (Schilb.) Perc.)	73
3.2.3	Kartoffelzystennematode (<i>Globodera rostochiensis</i> (Woll.) Behrens)	76
3.2.4	Wurzelgallennematode (<i>Meloidogyne incognita</i> (Kofoid & White) Chitwood)	79

3.2.5	Entwicklung des Kartoffelkäfers (<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say)	82
3.2.5.1	Einfluss der Nahrungsquelle auf das Larvengewicht des Kartoffelkäfers unter Laborbedingungen	82
3.2.5.2	Einfluss der Nahrungsquelle auf das Larvengewicht unter Freilandbedingungen	84
3.2.5.3	Einfluss der Nahrungsquelle auf die Reproduktion des Kartoffelkäfers unter Laborbedingungen	87
3.2.5.4	Einfluss der Fütterung der Larven unter Freilandbedingungen auf deren spätere Reproduktion als Käfer	89
3.2.5.5	Genotypische Auswirkungen einer permanenten Fütterung des Kartoffelkäfers mit transgenem Futter	90
3.2.5.6	Natürlicher Befall mit dem Kartoffelkäfer im Freisetzungsvorversuch	92
4	Diskussion	98
4.1	Auswirkungen der Transformation auf die Phänologie, die Morphologie und den Kohlenhydratgehalt	98
4.1.1	Einfluss der Fructansynthese auf den Kohlenhydratmetabolismus der Knolle und die Knollenmorphologie	98
4.1.2	Einfluss der Fructansynthese auf den Kohlenhydratmetabolismus des Blattes	102
4.1.3	Einfluss der Fructansynthese auf die Staudenmorphologie	105
4.1.3.1	Veränderte Staudenmorphologie durch den Einfluss auf den Wasserhaushalt	105
4.1.3.2	Veränderte Staudenmorphologie durch den Einfluss auf das physiologische Alter der Pflanzknollen und dem Gibberellinsäuregehalt	108
4.1.4	Genetische Stabilität der transgenen SST- und SST/FFT-Linien	114
4.2	Auswirkungen der Transformation auf Krankheiten und Schaderreger	117
4.2.1	Die Entwicklung von <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary auf den transgenen Pflanzen und Knollen	117
4.2.2	Die Entwicklung des Kartoffelkrebses <i>Synchytrium endobioticum</i> Schilb. (Perc.) auf den transgenen Knollen	121
4.2.3	Die Entwicklung von Nematoden auf den transgenen SST- und SST/FFT-Linien	124
4.2.3.1	Die Entwicklung von <i>Globodera rostochiensis</i> (Woll.) Behrens	124
4.2.3.2	Die Entwicklung von <i>Meloidogyne incognita</i> (Kofoid & White) Chitwood	128
4.2.4	Einfluss der Nahrungsqualität auf den Kartoffelkäfer (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>) Say	132
4.2.4.1	Die Larvenentwicklung unter Labor- und Freilandbedingungen	132
4.2.4.2	Die Reproduktion unter Labor- und Freilandbedingungen	137

4.2.4.3	Langfristiger Einfluss der Nahrungsqualität auf den Genotyp	143
4.3	Risikobewertung der Fructan-bildenden transgenen SST- und SST/FFT-Linien	145
5.	Zusammenfassung	148
6.	Summary	153
7.	Literaturverzeichnis	158
8.	Anhang	173
	Präsentationen	XIII
	Danksagung	XIV
	Eidesstattliche Erklärung	XVI
	Lebenslauf	XVII

Verzeichnis der Abkürzungen

(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
A	Adenin
BAZ	Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
BN	Boniturnote
bp	Basenpaare
BS	Boniturstufe
C	Cytosin
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus
CaO	Calciumoxid
CO ₂	Kohlendioxid
cv.	Cultivar
dd	Gradtage
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F.-R.-K.	Fuchs-Rosenthal-Zählkammer
FeSO ₄	Eisensulfat
FFT	Fructan-Fructan-1-Fructosyltransferase
FG	Frischgewicht
FM	Frischmasse
G	Guanin
GA	Gibberellinsäure
GABA	γ-Aminobuttersäure
GD	Genetische Distanz
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
ha	Hektar
HCl	Salzsäure
hph	Hygromycin-Resistenz-Gen
ISSR-Marker	Inter-Simple-Sequence-Repeat-Marker
K ₂ O	Kaliumoxid
KAc	Kaliumacetat
KAS	Kalkammonsalpeter
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
kV	Kilovolt
l	Liter
lux	Maßeinheit der Lichtintensität
m	Meter
M	Mol
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgCO ₃	Magnesiumcarbonat
MgO	Magnesiumoxid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MPI	Max-Planck-Institut
mtDNA	mitochondriale DNA
MVSP	MultiVariate Statistical Package (Computerprogramm)
N	Stickstoff
n.s.	nicht signifikant
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaNO ₃	Natriumnitrat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nptII	Kanamycin-Resistenz-Gen
O	Sauerstoff
Ø	Durchmesser
OCI	Oryzacystatin I produzierende Kartoffellinie
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P ₂ O ₅	Phosphoroxid
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pers. Mitt.	persönliche Mitteilung
PG	Polymerisationsgrad
pH	Pondus hydrogenii
r	Pearsonsscher Korrelationskoeffizient
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
rel. Luftfeuchte	relative Luftfeuchte
REM	Rasterelektronenmikroskop
RKI	Robert-Koch-Institut
rLF	Relative Luftfeuchte
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
S	Schwefel, Ähnlichkeitskoeffizient
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SI	Sporulationsindex
SST	Saccharose-Saccharose-1-Fructosyltransferase
T	Thymin
TAE	Tris-acetate-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TG	Trockengewicht
TPT	Triosephosphattranslokator
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
U-Inv	Hefe-Invertase

UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VDLUFA	Verband deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
Vh	Voltstunden
WF	Wurzelfrischgewicht
WFM	Wurzelfrischmasse
WT	Wildtyp
ZEPP	Zentralstelle der Länder EDV-gestützte Entscheidungshilfen und Programme im Pflanzenschutz
zit.	zitiert

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1-1: Genotypische und phänotypische Veränderungen in Abhängigkeit ihrer Herkunft und der Umwelt.	7
Abb. 2-1: Mittlere Monatstemperatur [°C] während der Vegetationsperioden der Kartoffeln (links) und mittlere Jahrestemperatur [°C] (rechts) während der Anbaujahre 2001 bis 2003 auf dem Versuchsfeld der BBA in Dahnsdorf.	14
Abb. 2-2: Monatliche Niederschlagsmenge [mm] während der Vegetationsperioden der Kartoffeln und Jahresniederschlag [mm] während der Anbaujahre 2001 bis 2003 auf dem Versuchsfeld der BBA in Dahnsdorf.	15
Abb. 2-3: Dreifeldrige Fruchtfolge der Anbaufläche von Kartoffeln über 4 Felder und Flächenaufteilung der 12 Parzellen/Feld.	16
Abb. 2-4: Luftmyzel von <i>P. infestans</i> auf Kartoffelblattscheiben 7 Tage nach Inokulation von 150 Zoosporen/0,05 ml.	25
Abb. 2-5: Infektion- und Inkubationsaufbau sowie Schadsymptome bei der Bonitur der Resistenz- und Anfälligkeitsprüfung von <i>S. endobioticum</i> .	30
Abb. 2-6: Versuchsaufbau, Entwicklungsstadium der Pflanzen zum Boniturzeitpunkt und Schadsymptom von <i>G. rostochiensis</i> .	31
Abb. 2-7: Pflanzenstadium bei der Infektion, Schadsymptom von <i>M. incognita</i> und Aufbettung der Wurzeln zur Auswaschung der Larven von <i>M. incognita</i> .	33
Abb. 2-8: Anordnung der Großkäfige und Pflanzenwachstum im Großkäfig in der Vegetationsperiode 2002.	40
Abb. 3-1: Vorkeimung der Pflanzknollen zum Zeitpunkt der Pflanzung 2001 und 2003.	47
Abb. 3-2: Feldaufgang der transgenen Linien und des Wildtyps in den Vegetationsperioden 2001, 2002 und 2003.	48
Abb. 3-3: Anteil Pflanzen im Knospenstadium 5 Wochen nach Feldaufgang 2001 und 3 Wochen nach Feldaufgang 2002 und 2003.	49
Abb. 3-4: Anteil Pflanzen im Blütenstadium 7 Wochen bzw. 5 Wochen nach Feldaufgang 2001 bzw. 2003.	50
Abb. 3-5: Reihenschluss der transgenen Linien SST#18 und SST/FFF#22/19 sowie dem Wildtyp 6 Wochen nach Feldaufgang 2003.	51
Abb. 3-6: Deckungsgrad 6 Wochen nach Feldaufgang in den Vegetationsperioden 2001, 2002 und 2003.	51
Abb. 3-7: Pflanzknollengewichte in den Vegetationsperioden 2001, 2002 und 2003.	52
Abb. 3-8: Haupttrieblänge in den Vegetationsperioden 2001, 2002 und 2003.	53
Abb. 3-9: Haupttrieblänge der transgenen Linien und dem Wildtyp während der Resistenzprüfung auf Nematoden (<i>G. rostochiensis</i> , <i>M. incognita</i>) mit Pflanzenmaterial aus der Vegetationsperiode 2001.	55
Abb. 3-10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Blattunterseite der Linien SST#20, SST/FFT#22/19 und des Wildtyps bei einer 40-fachen Vergrößerung.	56

Abb. 3-11: Anzahl der Blatthaare blattunterseits von Fiederblättern der mittleren Blatttage in der Vegetationsperiode 2003.	56
Abb. 3-12: Anzahl der Augentriebe in den Vegetationsperioden 2001, 2002 und 2003.	57
Abb. 3-13: Einfluss des Pflanzknollengewichtes auf die Anzahl der Augenaustriebe in den Vegetationsperioden 2001, 2002 und 2003.	58
Abb. 3-14: Anzahl der Seitentriebe am Haupttrieb in den Vegetationsperioden 2001, 2002 und 2003.	59
Abb. 3-15: Anzahl der Einzelblüten der Infloreszenz 1. Ordnung 2001 und 2003.	60
Abb. 3-16: Flächenertrag der Vegetationsperioden 2001 und 2003.	61
Abb. 3-17: Knollengrößenverteilung von je 20 kg Ertragsknollen der Vegetationsperioden 2001 und 2003 in die 4 Größenklassen < 4 cm, 4-6 cm, 6-8 cm, > 8 cm.	62
Abb. 3-18: Stärkegehalt der Knollen (% Frischmasse) in den Vegetationsperioden 2002 und 2003.	62
Abb. 3-19: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Stärkekörner in den Knollen der Vegetationsperiode 2003 der Linien SST#36, SST/FFT#22/30 und dem Wildtyp bei 400-facher Vergrößerung.	63
Abb. 3-20: PCR-Produkte der Blatt-DNA der transgenen Linien und dem Wildtyp mit den ISSR-Primern UBC-834, UBC-836, UBC-841 und UBC-889 der Vegetationsperioden 2003 (a), 2002 (b) und 2001 (c). M = 100 bp Marker.	64
Abb. 3-21: Sporulationsindex von <i>P. infestans</i> auf den Blattscheiben 5, 6 und 7 Tage nach Infektion in den Vegetationsperioden 2001, 2002 und 2003.	65
Abb. 3-22: Glucose- und Fructosekonzentration im Blattmaterial zum Zeitpunkt der Krautfäuleuntersuchung und Sporulationsindex 7 Tage nach Infektion mit <i>P. infestans</i> in den Vegetationsperioden 2001 und 2003.	67
Abb. 3-23: Saccharose- und Fructankonzentration im Blattmaterial zum Zeitpunkt der Krautfäuleuntersuchung und Sporulationsindex 7 Tage nach Infektion mit <i>P. infestans</i> in den Vegetationsperioden 2001 und 2003.	68
Abb. 3-24: Summe der Boniturwerte (Tagessumme) für den Deckungsgrad des Myzels von <i>P. infestans</i> auf 20 Knollenscheiben (6, 7, 8 und 9 Tage nach der Infektion) in den Jahren 2001 bis 2003.	70
Abb. 3-25: Über 7 Tage kumulierte Boniturnote des Deckungsgrades des Myzels von <i>P. infestans</i> auf 20 Knollenscheiben (Wochensumme) der Jahre 2001 bis 2003.	71
Abb. 3-26: Zusammenhang zwischen der Glucose-, Fructose-, Saccharose- und Fructankonzentration in den Knollen der transgenen Linien und dem Wildtyp zum Zeitpunkt der Knollenfäuletestung und der Wochensumme der Myzelbonitur auf den Knollenscheiben 2001.	72
Abb. 3-27: Einfluss des Inulingehaltes auf das Myzelwachstum von <i>P. infestans</i> nach 12 Tagen Flüssigkultur.	73

- Abb. 3-28: Anteil der Augenplatten der Bonitur 1 und 2 durch den Pathotyp 1 (avirulent) und der Bonitur 4 und 5 durch den Pathotyp 18 (virulent) von *S. endobioticum*. 74
- Abb. 3-29: Anzahl und Gewicht der Krebswucherung/Augenplatte nach Infektion mit *S. endobioticum* Pathotyp 18. 75
- Abb. 3-30: Zusammenhang zwischen der Glucose-, Fructose-, Saccharose- und Fructankonzentration der Knollen der transgenen Linien und dem Wildtyp und der Masse der Krebswucherung durch *S. endobioticum* Pathotyp 18 der Vegetationsperiode 2001. 76
- Abb. 3-31: Anzahl der Zysten/Pflanze 6 bis 8 Wochen nach Infektion mit *G. rostochiensis* Pathotyp 5 der transgenen Linien und dem Wildtyp. 77
- Abb. 3-32: Anzahl der Eier und Larven/Zyste von *G. rostochiensis* an den transgenen Linien und dem Wildtyp aus der 1. und 2. Serie 2001. 78
- Abb. 3-33: Wurzelfrischmasse der 3 Serien der Resistenzprüfung auf *M. incognita*. Das Pflanzenmaterial der Serie 1 und 2 stammt aus der Vegetationsperiode 2001, Serie 3 aus dem Jahr 2002. 79
- Abb. 3-34: Summe der Larven in den Wurzelgallen/g Wurzelfrischgewicht nach Infektion mit *M. incognita*. Das Pflanzenmaterial der Serie 1 und 2 stammt aus der Vegetationsperiode 2001, Serie 3 aus dem Jahr 2002. 80
- Abb. 3-35: Zusammenhang zwischen der Glucose-, Fructose-, Saccharose- und Fructankonzentration der Wurzeln der transgenen Linien und dem Wildtyp und der Anzahl Larven von *M. incognita* in der 1. Versuchsserie. 82
- Abb. 3-36: Mittleres Einzellarvengewicht von *L. decemlineata* durch die Fütterung mit Laub der transgenen Linien und dem Wildtyp in der 1., 7. und 14. Generation. 83
- Abb. 3-37: Mittleres Einzellarvengewicht von *L. decemlineata* durch Fraß am Laub der transgenen Linien und dem Wildtyp im Freisetzungsversuch 2003. 85
- Abb. 3-38: Glucose-, Fructose-, Saccharose- und Fructankonzentration im Laub der Futterpflanzen während des Larvenfütterungsversuchs der 1. Generation von *L. decemlineata* unter Labor- und Freilandbedingungen (2001 bzw. 2003). 86
- Abb. 3-39: Reproduktion von *L. decemlineata* durch Fütterung mit Laub der transgenen Linien und dem Wildtyp in der 1., 11. und 14. Generation. 88
- Abb. 3-40: Schlupfrate der Larven von *L. decemlineata* aus den Eiern der Reproduktionsversuche nach der 1., 11. und 14. Generation. 89
- Abb. 3-41: Anzahl der Eier/Weibchen und Larvenschlupfrate von *L. decemlineata* nach Fütterung der Larven mit Laub der transgenen Linien und dem Wildtyp aus dem Freilandversuch 2003 und Fütterung der Käfer mit Désirée. 90
- Abb. 3-42: Nei & Li-Koeffizienten der Subpopulationen von *L. decemlineata* nach der 1., 6., 9. und 13. Generation der Käfer auf den transgenen Linien und dem Wildtyp aus 11 RAPD-Primern. 91
- Abb. 3-43: Anzahl der polymorphen Banden durch 11 RAPD-Primer in der 1., 6., 9. und 13. Generation von *L. decemlineata* auf dem Laub der transgenen Linien und dem Wildtyp. 92

Abb. 3-44: Kartoffelkäferbefall in den Vegetationsperioden 2001 und 2003.	92
Abb. 3-45: Einfluss der Ausbringungsform und Linien auf die Anzahl Eigelege/Pflanze und Weibchen von <i>L. decemlineata</i> der Detailuntersuchung in den Käfigen der Vegetationsperiode 2002.	94
Abb. 3-46: Einfluss des Entwicklungsstadiums der Pflanzen (A: 1.6.-25.6.2003 Knospen- bis Blütenstadium, B: 1.7.-28.7.2003 Blüten- bis Beerenstadium) auf die Anzahl Eigelege/Pflanze und Weibchen von <i>L. decemlineata</i> in Detailuntersuchung in den Käfigen der Vegetationsperiode 2003.	95
Abb. 3-47: Glucose-, Fructose-, Saccharose- und Fructankonzentration im Blatt während der 1. (16.6.03) und 2. Ausbringung (14.7.03) von <i>L. decemlineata</i> in den Großkäfigen der Vegetationsperiode 2003.	96
Abb. 8-1: Blockanlage des Freisetzungversuches in der Vegetationsperiode 2001.	173
Abb. 8-2: Blockanlage des Freisetzungversuches in der Vegetationsperiode 2002.	173
Abb. 8-3: Blockanlage des Freisetzungversuches in der Vegetationsperiode 2003.	174
Abb. 8-4: Anordnung und Verteilung der Ausbringung sowie Detailplan der Bepflanzung der Großkäfige in der Vegetationsperiode 2002.	174
Abb. 8-5: Anlagepläne der Großkäfige in der Vegetationsperiode 2002.	175
Abb. 8-6: Anlagepläne der Großkäfige in der Vegetationsperiode 2003.	175
Abb. 8-7: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer OPA-07 (5' GAA ACG GGT G '3).	176
Abb. 8-8: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer OPB-01 (5' GTT TCG CTC C '3).	176
Abb. 8-9: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer OPB-08 (5' GTC CAC ACG G '3).	177
Abb. 8-10: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer OPC-15 (5' GAC GGA TCA G '3).	177
Abb. 8-11: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer Roth A-11 (5'-CAA TCG CCG T-'3).	178
Abb. 8-12: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer Roth A-16 (5'-AGC CAG CGA A-'3).	178
Abb. 8-13: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer Roth A 18 (5'-AGG TGA CCG T-'3).	179
Abb. 8-14: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer Roth A-19 (5'-CAA ACG TCG G-'3).	179
Abb. 8-15: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer Roth A-20 (5'-GTT GCG ATC C-'3).	180
Abb. 8-16: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer MWG180-08 (5'-CGC CCT CAG C-'3).	180
Abb. 8-17: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer MWG280-08 (5'-GGC CAC AGC G-'3).	181

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1-1: Arbeitsgruppen und Arbeitsthemen des BMBF-Verbundprojektes (0312632) zur relativen Performance und ökologischen Interaktion von Fructan-bildenden Kartoffeln (<i>S. tuberosum</i>).	8
Tab. 1-2: Behandlungsindex für die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln in Deutschland zwischen 1999 und 2000 (ROßBERG ET AL., 2002).	11
Tab. 2-1: Pflanzenschutzmaßnahmen im Kartoffelfreisetzungsversuch der Vegetationsperioden 2001 bis 2003 in Dahnsdorf (Brandenburg).	17
Tab. 2-2: Basensequenz der 4 verwendeten ISSR-Primer zur Ermittlung der genetischen Homogenität des Pflanzenmaterials im Freisetzungsversuch.	22
Tab. 2-3: Thermocycler-Programm für die ISSR-PCR der Kartoffelblätter auf einem PTC-200 (Biozym) mit einer Heizdeckeltemperatur von 105 °C.	22
Tab. 2-4: Boniturstufen (BS) der Blattscheiben bei der Krautfäuleanfälligkeitsuntersuchung mit <i>P. infestans</i> .	26
Tab. 2-5: Boniturstufen (BS) der Knollenscheiben bei der Knollenfäuleanfälligkeitsuntersuchung mit <i>P. infestans</i> .	27
Tab. 2-6: Stammlösung des Nährmediums der Flüssigkultur von <i>P. infestans</i> .	28
Tab. 2-7: Zuckerlösungen des Nährmediums der Flüssigkultur von <i>P. infestans</i> .	28
Tab. 2-8: Zeitliche Abfolge der Kartoffelkäferanzucht im Gewächshaus für die Detailuntersuchungen in den Großkäfigen in den Vegetationsperioden 2002 und 2003.	41
Tab. 2-9: Bezeichnung und Basensequenz der 11 RAPD-Primer zur Differenzierung des genetischen Musters des Kartoffelkäfers.	42
Tab. 2-10: Thermocycler-Programm für die RAPD-PCR der Kartoffelkäfererier auf einem PTC-200 (Biozym) mit einer Heizdeckeltemperatur von 105 °C.	43
Tab. 2-11: Auflistung der Biotests mit Probennahme zur Kohlenhydratbestimmung und des Probenumfangs.	45
Tab. 4-1: Zusammenfassung der Veränderungen der ermittelten Merkmale an den SST- und SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp. = keine Veränderung; ↑ Anstieg, ↓ Reduktion.	146

1. Einleitung und Ziele

Mit einer weltweiten Produktion von mehr als 323 Millionen Tonnen im Jahr 2005 gehört die Kartoffel nach Mais, Weizen und Reis zu der wichtigsten Nahrungspflanze in der Welt (FAO, 2006). Durch ihren globalen Anbau und Nährwert (Stärke, biologisch wertvolle Proteine, Vitamin C) trägt sie insbesondere in Entwicklungsländern zur Nahrungssicherung bei (FRANKE, 1992; FAO, 2006). Im Gegensatz zur Weltkartoffel-Produktion ist seit 1985 in Europa ein Rückgang der Anbaufläche um 25 % auf 1,18 Mio. ha im Jahr 2005 zu verzeichnen (BAYRISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT, 2005). Auch in Deutschland ging die Anbaufläche der Kartoffel von 960.000 ha im Jahr 1960 auf 293.000 ha im Jahr 2004 stark zurück. Zusammen mit Getreide, Mais, Raps und Zuckerrüben gehört die Kartoffel jedoch noch zu den wichtigsten Ackerkulturen in Deutschland (BMELV, 2005). Durch den hohen Flächenertrag der Kartoffeln, der in Abhängigkeit von der Witterung zwischen 350-450 dt/ha liegen kann, belegte sie 2004 in der erzielten Erntemenge nach Getreide und Zuckerrüben den dritten Platz (BMELV, 2005).

Weltweit dient der überwiegende Teil der geernteten Kartoffeln der direkten Versorgung der Bevölkerung. In Deutschland dominiert dagegen mit fast 50 % der Erntemenge die industrielle Verarbeitung und die Veredlung (zu Pommes frites und Chips). Etwa 1/5 der Produktion gehen in die Speisekartoffelvermarktung. Exportiert werden rund 10 % und für die Produktion von Pflanzgut werden 5 % der jährlichen Erntemenge verwendet. Der Rest der Produktion (etwa 15 %) geht in die Fütterung oder wird als Verlust ausgewiesen (BAYRISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT, 2005).

In Deutschland sind aktuell 197 Kartoffelsorten zugelassen, die sich im Reifegrad, Verwendungszweck, Kochtyp und der Anfälligkeit gegenüber Schaderregern und Krankheiten unterscheiden (BSA, 2006). Gentechnisch veränderte (transgene) Sorten sind nicht darunter.

Neben konventionellen Verfahren kommt in der Pflanzenzüchtung zunehmend die (gentechnische) Transformation zum Einsatz. Die Bedeutung der Gentechnik in der Pflanzenzüchtung kommt auch darin zum Ausdruck, dass weltweit der Anbau von transgenen Pflanzen von 50 Millionen ha im Jahr 2001 auf 90 Millionen ha im Jahr 2005 angestiegen ist. Der kommerzielle Anbau von transgenen Pflanzen begann 1996 und erfolgt heute in über 20 Ländern der Erde. In Europa findet ein nennenswerter Anbau von transgenen Pflanzen nur in Spanien und Rumänien statt. Im Wesentlichen beschränkt sich der Anbau auf die Vereinigten Staaten (49,8 Mio. ha), Argentinien (17,1 Mio. ha),

Brasilien (9,4 Mio. ha) und Kanada (5,5 Mio. ha). Die dominierenden Pflanzenarten mit gentechnischer Veränderung zu kommerziellen Zwecken sind Sojabohne, Mais, Baumwolle und Raps (JAMES, 2005). Hierbei handelt es sich um so genannte transgene Pflanzen der „1. Generation“, deren gentechnische Veränderung am agronomischen Bedarf orientiert ist und sich insbesondere auf die Erzeugung von Herbizid- und Insektenresistenzen beschränkt (BÖRNKE ET AL., 2002). Auch bei der Kartoffel wurden in den USA gentechnische Sorten mit Insekten- und Virusresistenz unter dem Label NewLeaf© zur Marktreife geführt, die sich allerdings bei den Landwirten (und Verbrauchern) gegenüber konventionellen Sorten nicht durchgesetzt haben (THORNTON, 2003).

Transgene Kartoffeln spielen aber vor allem im Bereich der 2. und 3. Generation transgener Pflanzen eine große Rolle. Hier befinden sich eine Reihe von Linien in der Entwicklung bis kurz vor der Zulassung oder noch im ganz frühen Forschungs- und Entwicklungsstadium (SAUTER & HÜSING, 2005). Nach Mais, Raps und Zuckerrübe lag die Kartoffel mit 257 Freisetzungsanträgen bis 2006 in der Europäischen Union an vierter Stelle (BBA, 2006). Die meisten Freisetzungversuche der Kartoffel fanden bis 2006 in Deutschland (66), den Niederlanden (58) und Großbritannien (37) statt. Linien mit metabolischen Veränderungen dominierten die Freisetzungen in der EU mit 64 %, gefolgt von Herbizid-, Insekten-, Pilz-, Bakterien- und Virusresistenz (BBA, 2006). Die metabolischen Veränderungen zählen zu den so genannten nutzungsveränderten Merkmalen (SAUTER & HÜSING, 2005). Nach SAUTER & HÜSING (2005) lassen sich die nutzungsveränderten gentechnisch veränderten Pflanzen in 6 Gruppen einteilen:

1. verbesserte Inhaltsstoffe in Nahrungsmittel liefernden Pflanzen (*functional food*);
2. verbesserte Inhaltsstoffe in Futtermittel liefernden Pflanzen (*functional feed*);
3. optimierte bzw. veränderte Nutzpflanzen für die industrielle Stoffproduktion (*plant made industrials* (PMI));
4. Nutzpflanzen zur Produktion pharmazeutischer Substanzen für die Human- und Tiermedizin (*plant made pharmaceuticals* (PMP));
5. Verbesserung der Eigenschaften von Pflanzen für die sog. Phytosanierung bzw. Phytoremediation;
6. Modifizierung der Eigenschaften von Zierblumen und Zierpflanzen.

Die metabolischen Veränderungen in der Kartoffel zählen überwiegend zur Gruppe PMI. Aber auch bei den PMP und „functional food/feed“ spielt die Kartoffel eine Rolle. In Deutschland wurden in der Vegetationsperiode 2006 in 17 Freisetzungsanträgen an 57 Orten transgene Kartoffeln mit gentechnisch veränderter Stärkezusammensetzung (Gruppe PMI) angebaut (BVL, 2006). Bei dem überwiegenden Teil der transgenen Linien wurde die Amylosesynthese unterdrückt, wodurch sich Vorteile in der industriellen Verwendung ergeben. Die aus Kartoffeln (Weizen und Mais) gewonnene Stärke wird als nachwachsender Rohstoff in der Herstellung von Papier, Baustoffen, Textilien, Klebstoffen und Bio-Kunststoffen eingesetzt (HEYER, 2000), wobei die etwa 20 % Amylose in der konventionellen Kartoffelstärke bei zahlreichen chemisch-technischen Prozessen stört. In Europa wird für die von BASF Plant Science über Antisense-Technik entwickelte transgene Kartoffel Amflora (*S. tuberosum* cv. Prevalent) mit reiner Amylopektinstärke mit einer Zulassung für das Inverkehrbringen im Jahr 2007 gerechnet (TRANSGEN, 2006). Nach der Europäischen Lebensmittelbehörde EFSA besteht kein verändertes Risiko für die Gesundheit von Mensch und Tier oder die Umwelt im Vergleich zu konventionellen Kartoffelsorten (EFSA, 2006).

Weiterhin werden in Deutschland transgene Kartoffellinien freigesetzt, in denen die Integration kartoffelfremder Gene deren industrielle Verwendung erweitern soll. Zum Beispiel wurden zur Biokunststoffproduktion transgene Linien mit Polyaspartatsynthese aus Cyanobakterien an der Universität Rostock entwickelt (BROER, 2006). Die Produktion von Spinnfaser-Proteinen in transgenen Kartoffeln am Institut für Pflanzenzüchtung und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben soll die Anwendung in der Medizin ermöglichen (SAUTER & HÜSING, 2005). Als Produktionsstätte neuartiger Kohlenhydrate wurden vom IPK Gatersleben transgene Linien mit Expression des Genes der Saccharoseisomerase aus *Erwinia rhapontici* unter Kontrolle des Knollen-spezifischen Patatin B33-Promotors hergestellt, wodurch Saccharose in Palatinose umgewandelt wird (BÖRNEKE ET AL., 2001; BÖRNEKE ET AL., 2002). Palatinose wird in diätetischen Lebensmitteln ersatzweise für Saccharose eingesetzt und verhindert die Bildung von Karies und Plaque an den Zähnen.

In der Gruppe der PMP sind transgene Kartoffeln insbesondere im Bereich der oralen Impfstoffe zu finden (DANIELL ET AL., 2001; BIEMELT ET AL., 2003; SAUTER & HÜSING, 2005). Weltweit befinden sich die Linien zwar noch nicht in der Freisetzung, jedoch bereits in klinischen Studien.

Nach SAUTER & HÜSING (2005) betrug der Anteil von Freisetzungsanträgen zur Herstellung von funktionellen Lebensmitteln weltweit 14 % bis Ende 2003. Dabei lag die Kartoffel mit 11 % nach Mais, Raps und Soja auf dem 4. Platz. Lässt man die metabolischen Veränderungen im Bereich der Stärkesynthese zur industriellen Verwendung und Grundlagenforschung außer Acht, so spielten in Deutschland bisher transgene Kartoffeln als funktionelles Nahrungsmittel eine eher untergeordnete Rolle. In den seit 1991 beantragten Freisetzungsanträgen transgener Kartoffeln in Deutschland (66) enthielten nur 4 Anträge metabolische Veränderungen im Bereich von funktionellen Nahrungsmitteln. Bei den von der TU München freigesetzten transgenen Kartoffellinien der Sorte Baltica handelt es sich um Zeaxanthin (Carotinoid) angereicherte Kartoffeln, die vor Altersblindheit sowie Herz-Kreislauf- und Krebserkrankungen schützen sollen (UNI KARLSRUHE, 2003). In den übrigen 3 Freisetzungsversuchen wurden vom Max-Planck-Institut (MPI) für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm und dem Institut für integrierten Pflanzenschutz der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) in Kleinmachnow die von HELLWEGE ET AL. (2000) entwickelten transgenen Kartoffellinien mit Inulinbildung angebaut, die **Gegenstand der vorliegenden Arbeit** sind.

Inulin ist ein aus Fructosemolekülen bestehendes lösliches Kohlenhydratpolymer, das zu den Fructanen zählt. Durch die enzymatische Spaltung von Saccharose werden in der Pflanze die Fructosemonomere zur Inulinsynthese gewonnen. Über verschiedene Enzyme können Pflanzen die Fructane Levan-Neoserien, Levan, Inulin-Neoserien, Inulin und gemischte Formen von Inulin und Levan bilden, die sich in ihrer Struktur und Kettenlänge unterscheiden (VIJN & SMEEKENS, 1999). Für die Inulinsynthese sind nach EDELMAN & JEFFORD (1968) die Fructosyltransferasen 1-SST und 1-FFT notwendig. Die Gene beider Fructosyltransferasen wurden für die in dieser Arbeit berücksichtigten transgenen Kartoffellinien aus der Artischocke (*Cynara scolymus*) gewonnen (HELLWEGE ET AL., 2000).

Fructane gelten als gesundheitsfördernde lösliche Ballaststoffe. Im Dünndarm werden Fructane nicht von menschlichen Verdauungsenzymen abgebaut, sondern im Dickdarm von der bakteriellen Mikroflora fermentiert, wodurch das Wachstum der Lactobacillus-Bakterien und Bifido-Bakterien steigt, und sie daher als prebiotische Lebensmittel gelten (VIJN & SMEEKENS, 1999; HEYER, 2000; RITSEMA & SMEEKENS, 2003; HABER, 2003). Gleichzeitig steigern Fructane die Calciumaufnahme (Osteoporoseprävention) und senken Cholesterin, Triglyceride und Phospholipide im Blut (RITSEMA & SMEEKENS, 2003;

SAUTER & HÜSING, 2005), wodurch ihnen eine mögliche Wirkung zur Prävention von Herz-Kreislaufkrankungen und Krebsarten zugesprochen wird. Der langfristige Effekt auf den Knochenaufbau, die Reduktion von Lipiden und der positive Einfluss auf bestimmte Krebsarten ist noch nicht hinreichend gesichert (HABER, 2003).

In Fructan-bildenden Pflanzen haben Fructane die Funktion eines Speicherkohlenhydrats und führen zur verbesserten Anpassung gegenüber Trockenheit und Kälte (VIJN & SMEEKENS, 1999; RITSEMA & SMEEKENS, 2003). Bei der verbesserten Anpassung wird vermutet, dass Fructane die Funktion der Zellmembranen aufrechterhalten, da sowohl Inulin als auch Levan mit den Phospholipiden der Zellmembranen interagieren (RITSEMA & SMEEKENS, 2003).

Fructane werden von 15 % der heute lebenden Pflanzen gebildet, jedoch ursprünglich nicht von der Kartoffel (*S. tuberosum*). Auch in Bakterien und Pilzen findet die Fructansynthese statt (VIJN & SMEEKENS, 1999; RITSEMA & SMEEKENS, 2003). Inulin stellt das am häufigsten vorhandene Fructan bei Fructan-bildenden Dikotyledonen dar. In den letzten Jahren haben immer mehr mit Fructanen angereicherte Produkte durch ihre prebiotische Eigenschaft an Marktpräsenz gewonnen. Zurzeit ist nur der Fructantyp Inulin als Bestandteil funktioneller Lebensmittel kommerziell bedeutsam. Die drei in der EU tätigen Inulinhersteller Sensus, Orafiti und Cosucra gewinnen Inulin aus den Wurzeln von *Cichorium intybus* var. *sativum* (Wurzel- oder Kaffeezichorie). Außerhalb der EU dienen auch Topinambur und Dahlienknollen der Inulingewinnung (SAUTER & HÜSING, 2005).

Über die tägliche Ernährung können Fructane durch Weizen, Zwiebel, Porree, Spargel, Schwarzwurzeln, Artischocken und Topinambur aufgenommen werden (HABER, 2003). Der Markt der funktionellen Lebensmittel und Prebiotika entwickelt sich günstig, wodurch mit dem Ansatz von gentechnisch veränderten Pflanzen zu rechnen ist, um den Bedarf an Fructanen zu decken und die Produktionskosten zu senken.

Für gentechnische Veränderungen mit dem Ziel der Fructansynthese eignen sich insbesondere Kartoffeln und Zuckerrüben. Beiden Pflanzenarten fehlen die Fructan-abbauenden Enzyme Exohydrolasen. Außerdem weisen beide Kulturpflanzen hohe Saccharosekonzentrationen in den Zellen auf, dem Monomer der Fructansynthese (RITSEMA & SMEEKENS, 2003; SAUTER & HÜSING, 2005)

Der Anbau von transgenen Pflanzen kann neben den Vorteilen auch Risiken nach sich ziehen. Über die Risikobewertung und das Risikomanagement werden diese möglichen Auswirkungen auf Mensch, Tier und Umwelt abgeschätzt. Daher muss die Freisetzung und

das Inverkehrbringen von gentechnisch veränderten Pflanzen in der EU ein Zulassungsverfahren durchlaufen. Wichtigste Grundlage hierfür ist die Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlamentes und des Rates von 2001. Zur Abschätzung möglicher Risiken muss vor der Freisetzung und dem Inverkehrbringen eines gentechnisch veränderten Organismus (GVO) eine Umweltverträglichkeitsprüfung des GVOs vorgenommen werden (Anhang II der Richtlinie 2001/18), die die direkten oder indirekten sowie die sofortigen und späteren Risiken für die menschliche Gesundheit und die Umwelt aufzeigt. Gleichzeitig soll dadurch festgestellt werden, ob bei dem betreffenden GVO ein Risikomanagement notwendig ist und, wenn ja, mit welchen Methoden. Dazu müssen alle Merkmale aufgenommen werden, die mit der gentechnischen Veränderung in Verbindung stehen und schädliche Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit oder die Umwelt haben können. Auch etwaige schädliche Auswirkungen, deren Auftreten unwahrscheinlich ist, zählen dazu.

Bei metabolisch veränderten transgenen Kartoffeln, insbesondere im Kohlenhydratstoffwechsel modifizierte, stellen etwaige Auswirkungen unter anderem den Einfluss des GVOs auf die Populationsdynamik von Arten im Aufnahmemilieu, die **veränderte Empfänglichkeit für Pathogene und die Gefährdung der Prophylaxe und Therapie** in den Bereichen Medizin, Tiermedizin und Pflanzenschutz dar. Schädliche Auswirkungen können direkt oder indirekt auftreten durch Wechselwirkungen mit anderen Organismen und Veränderungen der Bewirtschaftung, gegebenenfalls auch landwirtschaftlichen Praktiken und der phänotypischen und genotypischen Instabilität. Neben der substantiellen Äquivalenz im Bereich der Trockensubstanz, dem Gehalt von Glykoalkaloiden, Vitamin C, Proteinen und Zuckern, dabei insbesondere den reduzierten Zuckern, sind dies auch Forderungen von der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) bei der Zulassung von neuen transgenen Kartoffellinien (OECD, 2002).

Die Wechselwirkungen von Genotyp und Phänotyp sowie der Umwelt sind in der Abb. 1-1 dargestellt. Es wird deutlich, dass Veränderungen im Phänotyp bei transgenen Kartoffeln nicht ausschließlich das Ergebnis des gentechnischen Eingriffs sind, sondern auch als Folge von natürlichen Mutationen (somaklonale Variation) auftreten können. Deshalb wurden in den dargestellten Untersuchungen mehrere Linien berücksichtigt, um gerade diese Effekte besser abschätzen zu können.

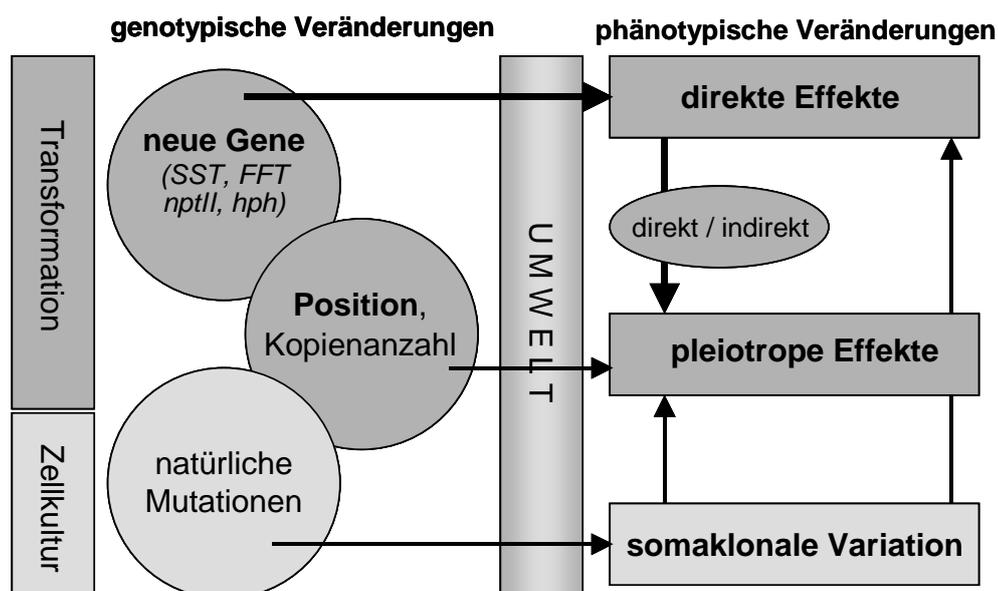


Abb. 1-1: Genotypische und phänotypische Veränderungen in Abhängigkeit ihrer Herkunft und der Umwelt.

Im Rahmen eines BMBF geförderten Verbundprojekts (0312632) im Programm „Sicherheitsbewertung und anbaubegleitendes Monitoring“ von 2001 bis 2004 wurde mehrjährig die relative Performance und ökologische Interaktion von transgenen Fructan-bildenden Kartoffeln (*S. tuberosum* cv. Désirée) im Freisetzungversuch untersucht. Innerhalb des Verbundes, bestehend aus 6 Verbundpartnern, wurden die in Tabelle 1-1 aufgeführten Bereiche untersucht. Das Hauptziel des Projektes bestand in der Erfassung möglicher Risiken und Auswirkungen der Fructan-bildenden Kartoffeln auf die Umwelt und den Anbau, um daraus einerseits eine erste robuste Risikobewertung vornehmen und andererseits Indikatoren und/oder Parameter für das anbaubegleitende Monitoring (Überwachungsplan nach der Richtlinie 2001/18) entwickeln zu können. In dem Teilprojekt des Instituts für integrierten Pflanzenschutz, das dieser Arbeit zugrunde liegt, standen insbesondere die Auswirkung der Kohlenhydratmodifikation auf die Pflanzengesundheit, mit Ausnahme der Virose, und den Pflanzenschutz im Mittelpunkt.

Tab. 1-1: Arbeitsgruppen und Arbeitsthemen des BMBF-Verbundprojektes (0312632) zur relativen Performance und ökologischen Interaktion von Fructan-bildenden Kartoffeln (*S. tuberosum*).

Verbundpartner	Thema
Universität Gießen, <u>Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung</u> Prof. Honermeier	Untersuchungen zur Stresstoleranz und Überdauerungsfähigkeit der Fructan-bildenden Kartoffeln
Universität Gießen, <u>Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie</u> Prof. Trenczek	Einfluss der Nahrungsqualität von Kartoffelpflanzen auf die Fitness des Frassschädlings <i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say (Kartoffelkäfer) gemessen anhand seiner Immunabwehr und Reproduktion
Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Kleinmachnow <u>Institut für integrierten Pflanzenschutz</u> Dr. Hommel	Auswirkungen einer transgenen Fructan-Bildung in Kartoffeln auf phänotypische und pflanzenschutzrelevante Eigenschaften im Vergleich mit dem Wildtyp und weiteren konventionellen Sorten
Max-Planck-Institut für <u>Molekulare Pflanzenphysiologie</u> , Golm Dr. Köhl	Untersuchungen zur Expression des Transgens unter Freilandbedingungen und zum Einfluss von Trockenstress auf die relative Fitness der transgenen Kartoffeln
Zentrum f. Agrarlandschafts- und Landnutzungsforschung, Müncheberg <u>Institut für Primärproduktion und Mikrobielle Ökologie</u> Dr. Ulrich	Untersuchung der Auswirkungen transgener Kartoffellinien mit verändertem Kohlenhydratmetabolismus auf die Mikroflora und Etablierung von einfachen Verfahren zur Identifizierung transgener Kartoffellinien
Universität Hannover, <u>Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz</u> Prof. Maiss	Sicherheitsbewertung von Rekombinationsereignissen bei Kartoffelviren in nicht transgenen und transgenen Pflanzen

Die Kartoffel wird in allen Entwicklungsstadien von Schaderregern befallen (insbesondere von Viren, Bakterien, Pilzen, Nematoden und Insekten) und durch Unkräuter beeinträchtigt. Die **Virus**übertragung erfolgt mechanisch oder durch Vektoren. Nach OERKE & STEINER (1996) haben bei den Viren das durch die Blattlaus *Myzus persicae* persistent übertragene PLRV (*potato leafroll virus*) sowie die ebenfalls durch Blattläuse nicht-persistent übertragenen Mosaikviren PVA und PVY (in Europa PVY^N-Stamm) die größte Bedeutung erlangt. Eine Pflanze, die aus einer PLRV-infizierten Mutterknolle entstanden ist, kann Ertragseinbußen von 40-80 % erleiden. Die PVA-Infektion führt weltweit zu Verlusten bis 40 %. Bei Mischinfektionen mit PVA und PVY treten Ertragsminderungen zwischen 40-80 % ein (HÄNI ET AL., 1992). Viren können nicht direkt mit Pflanzenschutzmitteln bekämpft werden, sondern nur indirekt über die Blattlausreduktion und selektive Vernichtung befallener Pflanzen aus dem Bestand oder

den Anbau virusresistenter Sorten. Insbesondere Durchwuchskartoffeln können als Virusreservoir in Anbaugebieten in Betracht gezogen werden. Daher wurde an der Universität Gießen (Prof. Honermeier) u.a. die Überdauerungsfähigkeit der Fructan-Kartoffel untersucht.

Ebenso ist eine direkte Bekämpfung der nach OERKE & STEINER (1996) wichtigsten **Bakteriosen** im Kartoffelanbau *Erwinia carotovora*, *Clavibacter michiganense* var. *sepedonicum*, *Streptomyces scabiens* nicht möglich. Vorbeugende Maßnahmen durch gesundes Pflanzgut, selektive Vernichtung befallener Pflanzen im Bestand, geringe Ernteschädigung und trockene Einlagerung führen zur Reduktion des Lagerausfalls durch Bakteriosen (HEITEFUSS ET AL., 1993). Bei *Clavibacter michiganense* var. *sepedonicum* (Bakterienringfäule) handelt es sich um einen meldepflichtigen Quarantäneschaderreger der EU, wodurch die Schäden in Deutschland gering gehalten werden.

Wichtigste **Mykosen** weltweit sind *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*, *Synchytrium endobioticum*. Dabei ist *P. infestans* die mit Abstand wichtigste Krankheit in niederschlagsreichen Gebieten der gemäßigten Zone. Die epidemische Ausbreitung kann innerhalb von wenigen Tagen zum Zusammenbruch des ganzen Bestandes führen. Durch den Krautbefall treten Assimilatverluste auf und der Knollenbefall führt zu Lagerverlusten. Die Bekämpfung von Mykosen ist durch Fungizide möglich. Die Einführung der Negativprognose bei *P. infestans* hat zur deutlichen Reduktion der Präventionsbehandlungen geführt. Trotzdem sind nach HEITEFUSS ET AL. (1993) bei anfälligen Sorten und regenreichen Sommermonaten Ertragsminderungen von bis zu 30 % durch kleine Knollen keine Seltenheit und nach SCHÖBER-BUTIN (2001) kann ein frühes und starkes Auftreten zu einem 100 %-igen Ertragsausfall führen. Durch *Rhizoctonia solani* treten bis zu 20 % Ertragsausfälle im Bestand auf, und können durch Qualitätsverluste auf bis zu 60 % steigen (SCHÖBER-BUTIN ET AL., 1999). Eine direkte Bekämpfung ist durch die Saatgutbeizung mit Fungiziden möglich, die jedoch beim bodenbürtigen Befall keinen Erfolg hat (HÄNI ET AL., 1992). Die Ertragsverluste in Deutschland durch den Kartoffelkrebs *S. endobioticum* sind heute gering, da es sich auf Grund seiner Überlebensdauer von bis zu 30 Jahren im Boden um einen meldepflichtigen Quarantäneschaderreger handelt und resistente Sorten verfügbar sind (STACHEWICZ & LANGERFELD, 1998).

Bei den **Nematoden** haben *Globodera rostochiensis* und *G. pallida* eine weltweite Bedeutung. Bei *G. rostochiensis* und *G. pallida* handelt es sich auf Grund ihrer

Überlebensdauer von bis zu 12 Jahren im Boden und nicht direkten Bekämpfungsmöglichkeit um meldepflichtige Schädlinge. Bei *G. rostochiensis* gibt es resistente Sorten, die bei *G. pallida* fehlen. Bei starkem Befall können bis zu 80 % Ertragsverluste auftreten (HÄNI ET AL., 1992; HEITEFUSS ET AL., 1993).

Unter den **Insekten** kommt dem Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*) eine wichtige Rolle als Schädling zu. Seine direkte Bekämpfung ist über Insektizide, bevorzugt unter Benutzung eines Befallsprognosemodells, in Deutschland gut möglich. Trotzdem kann ein früher Kahlfrass an Pflanzen zum Ertragsausfall von 30-50 % führen (HÄNI ET AL., 1992). Blattläuse spielen vor allem bei der virusfreien Pflanzguterzeugung als Schädling eine große Rolle. Im Gegensatz zu dem Schaden als Virusvektor ist der direkte Schaden eher untergeordnet. Zur Prävention vor Virosen erfolgt häufig eine Insektizidbehandlung gegen Blattläuse. Dies ist allerdings dann kritisch, wenn auf Grund der starken Honigtauproduktion Honigbienen (und andere Insektenarten) die Bestände anfliegen.

Neben der direkten Beeinträchtigung von Kartoffelbeständen durch **Unkräuter** auf die Ertragsbildung begünstigen sie durch Veränderung des Mikroklimas die Entwicklung der Krautfäule (*P. infestans*) und können als Virusreservoir dienen (PUTZ, 1986; OERKE & STEINER, 1996).

Die Pflanzenschutzmaßnahmen im Kartoffelanbau sind in Deutschland während der Vegetationsperiode nach PUTZ (1986) vorwiegend auf die Unkrautbekämpfung, die Verhinderung der Ausbreitung von Kraut- und Knollenfäule sowie die Bekämpfung von Blattläusen und Kartoffelkäfern ausgerichtet. Die Kartoffel zählt in Deutschland zu den anfälligsten und damit pflanzenschutzintensivsten Kulturen überhaupt. Dies zeigt sich sehr eindringlich im mittleren Behandlungsindex von chemischen Pflanzenschutzmaßnahmen für das Jahr 2000 (Tab. 1-2). Der Behandlungsindex berücksichtigt die Summe aller Pflanzenschutzmittel und ist normiert auf die volle Aufwandmenge und die gesamte Kartoffelanbaufläche. Ausschlaggebend hierfür ist der hohe Fungizideinsatz zur Kontrolle von *P. infestans*. Aber auch der Herbizideinsatz ist im Vergleich zu Winterweizen, Wintergerste und Raps erhöht, was sich durch den häufigen Einsatz von Herbiziden zur Krautabtötung am Ende der Vegetationsperiode begründet.

Weltweit hingegen wurden in der Vegetationsperiode 1991 auf Grund der großen Anzahl der Schaderreger und Schädlinge zu gleichen Teilen Herbizide, Fungizide und Insektizide eingesetzt (OERKE & STEINER, 1996). Der Herbizidverbrauch konzentrierte sich dabei jedoch auf die Vereinigten Staaten und Europa, und der Fungizidverbrauch konzentrierte sich nur auf Europa.

Tab. 1-2: Behandlungsindex für die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln in Deutschland zwischen 1999 und 2000 (ROBBERG ET AL., 2002).

Kultur	Alle Maßnahmen	Herbizide	Fungizide	Insektizide	Anzahl der Referenzbetriebe
Rüben	2,9	2,59	0,15	0,19	382
Mais	1,2	0	0,03	1,2	489
Raps	3,4	1,18	0,68	1,44	644
Kartoffeln	8,6	1,55	6,08	0,94	130
Wintergerste	2,8	1,07	1,10	0,1	724
Winterweizen	3,8	1,37	1,39	0,36	790

Nach Schätzungen über 3 Vegetationsperioden (1991-1993) könnten theoretisch in Mittel- und Westeuropa ohne Pflanzenschutz nur 23 % des erreichbaren Ertrages erzielt werden. Der potentielle Ertragsverlust konnte zu 23 % den Krankheiten, zu 30 % den Tieren und zu 23 % den Unkräutern zugesprochen werden. Der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln führte zur Steigerung des Ertrages auf 73 % des erreichbaren Ertrages (OERKE & STEINER, 1996). Aus der Sicht von Pflanzengesundheit und Pflanzenschutz, insbesondere des notwendigen Maßes bei der Anwendung von chemischen Pflanzenschutzmitteln, sollten (dürfen) neue Kartoffelsorten, die gentechnisch hergestellten eingeschlossen, zu keiner stärkeren Anfälligkeit und damit zu keiner höheren Intensität im Pflanzenschutz als bisher üblich führen.

Bei der Prüfung neuer Kartoffelsorten in Deutschland nach den Richtlinien des Bundessortenamtes (BSA, 2000) werden die Anfälligkeit für Virose (PVY und PLRV), Bakteriosen (*E. carotovora* und *S. scabies*) und Mykosen (*S. endobioticum*, *R. solani* und *P. infestans*) und für die Nematoden *G. rostochiensis* und *G. pallida* geprüft.

Im Rahmen des BMBF-Verbundvorhabens „Relative Performance der Fructan-Kartoffel“ war die Kandidatin verantwortlich für die 3-jährige Freisetzung auf dem Versuchsfeld der BBA in Dahnsdorf und für die anbau- und pflanzenschutzrelevanten Untersuchungen im Feld, Gewächshaus und der Klimakammer. Hierbei standen folgende Versuchsfragen im Mittelpunkt:

1. Zeigen die Fructan-Kartoffeln im Vergleich zur unveränderten Ausgangssorte veränderte phänotypische Merkmale? Wenn ja, mit welcher pflanzenbaulichen Relevanz?

2. Führen die Veränderungen in der Kohlenhydratzusammensetzung in den Blättern, Wurzeln und Knollen im Vergleich zur unveränderten Ausgangssorte zu einer veränderten Anfälligkeit gegenüber den bedeutenden Schaderregern *Synchytrium endobioticum*, *Phytophthora infestans*, *Globodera rostochiensis*, *Meloidogyne incognita* und *Leptinotarsa decemlineata*?
3. Welche relevanten Schlussfolgerungen können aus den Ergebnissen für die Risikobewertung und für ein mögliches Risikomanagement fallspezifisch für die Fructan-Kartoffel abgeleitet werden?

2. Material und Methoden

2.1 Transgene Linien/Pflanzenmaterial

Bei dem verwendeten Pflanzenmaterial handelte es sich um transgene Kartoffellinien der Sorte Désirée (*Solanum tuberosum* L., Solanaceae). Die genutzten transgenen Linien wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Heyer am Max-Planck-Institut (MPI) für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm (Brandenburg) in ihrem Kohlenhydratmetabolismus gentechnisch verändert, vermehrt und der BBA zur Verfügung gestellt. Von herkömmlichen Kartoffelsorten unterscheiden sich die transgenen Linien durch die Bildung von Fructanen des Inulintyps. Die Integration des Enzyms Saccharose-Saccharose-Fructosyltransferase (SST) aus der Artischocke *Cynara scolymus* (Asteraceae/Compositae) mittels Transfer durch das ubiquitäre Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* in das Kartoffelgenom führt zur Bildung von niedermolekularen Fructanen wie Kestose und Nystose (HELLWEGE ET AL., 1997). Durch die Einbringung eines zweiten Gens aus der Artischocke (*Cynara scolymus*), dem des Enzyms der Fructan-Fructan-Fructosyltransferase (FFT), in eine transgene SST-Linie erfolgt die Bildung von Oligofructanen mit Kettenlängen von 10 bis 20 Fructoseeinheiten (HELLWEGE ET AL., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden jeweils 3 transgene Linien des SST-Konstruktes (SST#18, SST#20, SST#36) und des SST/FFT-Konstruktes (SST/FFT#22/19, SST/FFT#22/30, SST/FFT#22/34) im Vergleich zur isogenen Ausgangssorte Désirée (Wildtyp) genutzt. Da es sich bei den Linien jeweils um unabhängige Transformationsereignisse handelt, können sich die Linien eines Konstruktes im Integrationsort, der Kopienanzahl und dem Expressionsniveau unterscheiden. Bei den SST-Linien 18 und 20 liegen zwei Insertionsorte des SST-Konstruktes vor, während die SST-Linie 36 als auch die SST/FFT-Linien nur eine Insertion des SST-Konstruktes aufweisen (ULRICH, pers. Mitt.). Das FFT-Konstrukt liegt in allen SST/FFT-Linien in einfacher Form vor. Aus dem Expressionsniveau auf RNA-Ebene ist eine abfallende Inulinsynthese von SST/FFT#22/19, SS/FFT#22/30 bis SST/FFT#22/34 zu erwarten (HEYER, pers. Mitt.)

2.2 Freisetzungsversuch

Der Freisetzungsversuch wurde von 2001 bis 2003 auf dem Versuchsfeld der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) in Dahnsdorf (Brandenburg) durchgeführt. Für die Vegetationsperiode 2001 erfolgte der Anbau unter dem Freisetzungsantrag RKI-Kz.: 6786-01-122 (Bescheid: 19.01.2000), in den Jahren 2002 und

2003 galt der Freisetzungsantrag RKI-Kz.: 6786-01-136 (Bescheid: 06.05.2002).

Der Standort ist charakterisiert durch einen sandigen Löß mit einem Humusanteil von 1,4 % und einem pH-Wert von 5,8. Die mittlere Bodenzahl beträgt 48. Im langjährigen Mittel weist der Standort eine mittlere Jahrestemperatur von 8,4 °C und eine Niederschlagsmenge von 536 mm auf. Eine vorhandene Wetterstation auf dem Standort ermöglichte die Ermittlung der Temperatur und der Niederschlagsmenge während der Freisetzung (Abb. 2-1, 2-2). Die mittlere Jahrestemperatur unterschied sich in den drei Anbaujahren nur geringfügig (9,2-9,5 °C). Innerhalb der Vegetationsperiode traten insbesondere im Juni größere Temperaturunterschiede zwischen den drei Anbaujahren auf (2001: 14,3 °C; 2003: 18,9 °C).

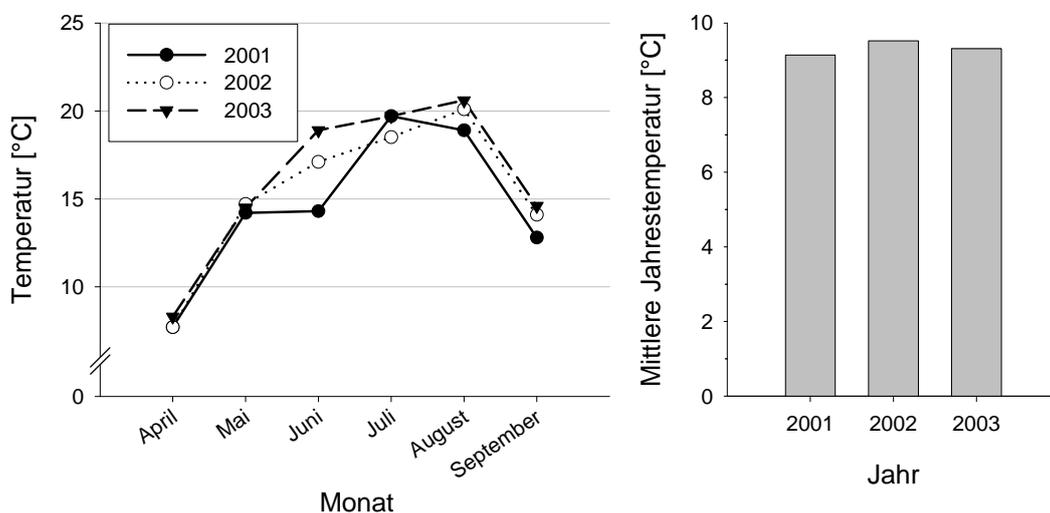


Abb. 2-1: Mittlere Monatstemperatur [°C] während der Vegetationsperioden der Kartoffeln (links) und mittlere Jahrestemperatur [°C] (rechts) während der Anbaujahre 2001 bis 2003 auf dem Versuchsfeld der BBA in Dahnsdorf.

Größere Unterschiede als bei der Temperatur traten in der Niederschlagsmenge in den drei Anbaujahren auf. In den Jahren 2001 und 2002 wurde mit Jahresniederschlägen über 650 mm das langfristige Standortmittel übertroffen, wo hingegen im Anbaujahr 2003 der Jahresniederschlag von 400 mm deutlich unter dem Standortmittel lag. Dieser Unterschied begründete sich zum einen durch eine kontinuierliche geringere Niederschlagsmenge des Anbaujahres 2003 während des vegetativen Wachstums (April - Juli), zum anderen durch das Ausbleiben von Starkniederschlägen während der Knollenreife (August - September).

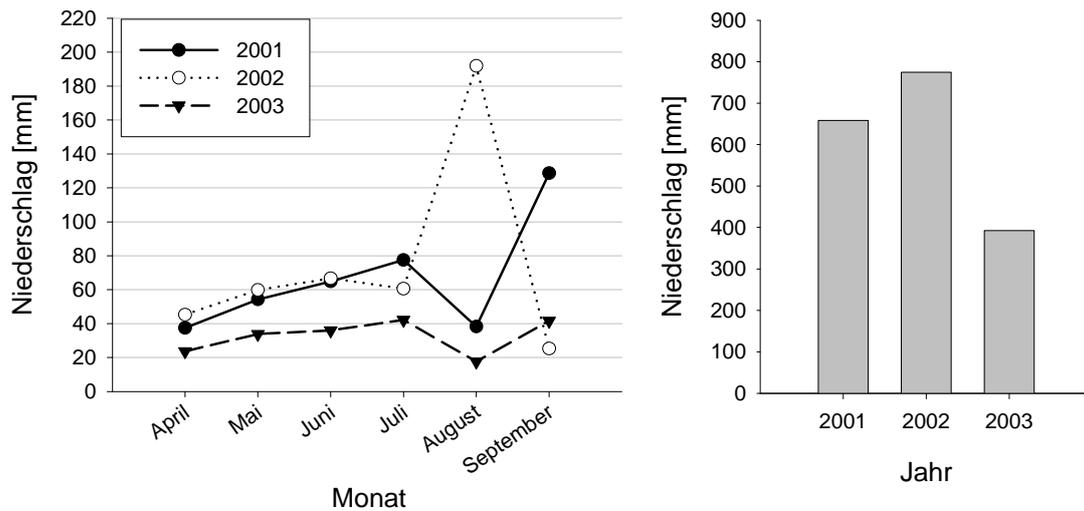


Abb. 2-2: Monatliche Niederschlagsmenge [mm] während der Vegetationsperioden der Kartoffeln (links) und Jahresniederschlag [mm] (rechts) während der Anbaujahre 2001 bis 2003 auf dem Versuchsfeld der BBA in Dahnsdorf.

Der Anbau der Kartoffeln erfolgte in einer dreifeldrigen Fruchtfolge (Abb. 2-3). Neben den 6 transgenen Kartoffellinien und dem Wildtyp wurden die 5 konventionellen Vergleichssorten Désirée, Granola, Agria, Linda und Solara angebaut, die jedoch in der Versuchsauswertung unberücksichtigt bleiben. Die Freisetzungsfläche betrug ca. 10.000 m², wovon pro Vegetationsperiode 2.880 m² der Fläche mit Kartoffeln bestellt wurden. Die Kartoffelfläche war in 4 Felder à 720 m² unterteilt. Pro Feld wurden je 96 Knollen/transgene Linie bzw. Sorte (Variante) in Parzellen gepflanzt (Abb. 2-3). Die Anlage der Parzellen in den 4 Feldern erfolgte jährlich neu vollständig randomisiert (Anlagepläne im Anhang Abb. 8-1 bis 8-3).

Die Pflanzknollen der transgenen Linien und der Ausgangssorte Désirée (Wildtyp) für den Freisetzungsversuch wurden vom MPI Golm zur Verfügung gestellt. Die Produktion erfolgte dabei aus Gewächshauspflanzen, die über Mikropropagation aus einer Sterilkultur entstanden waren. Die Pflanzknollen der Vergleichssorten wurden zugekauft (Brammer Heidsaat, Kirchlinteln) und stammten aus der Freilandvermehrung des Vermehrers.

Der differenzierte Erntezeitpunkt und die unterschiedlichen Lagerungsbedingungen der Pflanzknollen nach der Vermehrung für die Vegetationsperiode 2001 führten zu einem inhomogen vorgekeimten Zustand der Pflanzknollen zum Zeitpunkt der Pflanzung. In Folge dessen wurden ab der Vegetationsperiode 2002 die Pflanzknollen nach der Vermehrung und deren Verfügbarkeit einheitlich bei 4 °C in einer Kühlzelle (Weiss Umwelttechnik, Reiskirchen-Lindenstruth) gelagert und 4 Wochen vor Pflanzung gezielt vorgekeimt. Dafür wurden die Pflanzknollen bei Raumtemperatur (15-20 °C) für 10-12

Tage dunkel gelagert, so dass an mehreren Augen weiße Keime einer maximalen Länge von 5-10 mm entstanden. Im Anschluss erfolgte die Lagerung der Pflanzknollen in Stapelkisten bei Raumtemperatur (15-20 °C) unter natürlichem Lichteinfluss bis zur Pflanzung, wodurch das Längenwachstum der Keime gestoppt wurde und diese ergrünten. Um einen Einfluss der Pflanzknollengröße auf die Bestandesentwicklung und morphologischen Parameter auszuschließen, wurden die zur Verfügung stehenden Pflanzknollen über die Knollenlänge und das Gewicht auf eine einheitliche Größe über die 4 Wiederholungen (Felder) des Freisetzungversuches kalibriert.

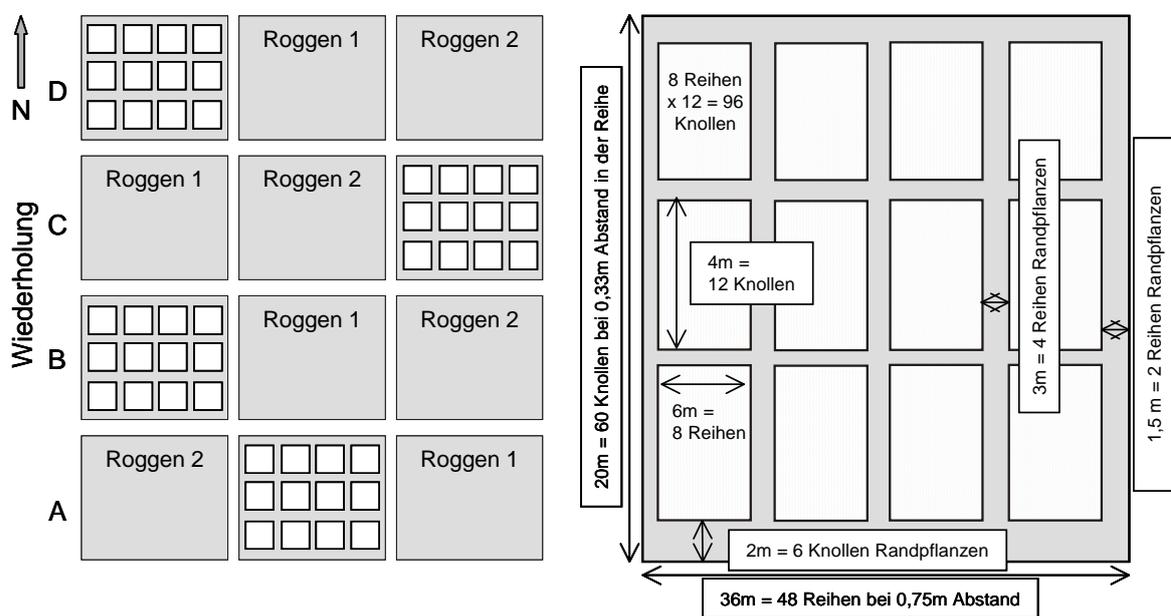


Abb. 2-3: Dreifeldrige Fruchtfolge der Anbaufläche von Kartoffeln über 4 Felder (links) und Flächenaufteilung der 12 Parzellen/Feld (rechts).

Vor Pflanzung der Kartoffeln wurden die Flächen 30 cm tief gepflügt und mittels Feingrubber abgezogen. Der Nährstoffbedarf auf den Flächen in den drei Vegetationsperioden wurde durch die Analyse von Bodenproben (30 cm) über die Firma Agrolab (Oberdorla) im Februar/März des jeweiligen Anbaujahres ermittelt. Die Düngung erfolgte generell 3-5 Tage vor der Pflanzung und bestand in der Vegetationsperiode 2001 aus 120 kg N/ha durch Kalkammonsalpeter (KAS, 27 % N, 12 % CaO; Fertiva, Mannheim). In den Vegetationsperioden 2002 und 2003 wurden jeweils 120 kg N/ha Entec avant (12 % N, 7 % P₂O₅, 16 % K₂O, 4 % MgO, 5 % S; Compo, Münster) gedüngt. Nach der Düngung wurde das Saatbett erneut mittels Feingrubber abgezogen. Unmittelbar vor der Handpflanzung der Knollen wurden die Pflanzlöcher im Abstand von 0,33 m innerhalb der Reihe und 0,75 m zwischen den Reihen mit einem 4-reihigen Lochstern maschinell

vorgestanzt. Im Anschluss an die Pflanzung erfolgte die Abdeckung der Knollen durch den Dammaufbau (ca. 30 cm) mittels 4-reihiger Dammfräse.

Für die optimale Bestandesentwicklung war die Anwendung von Pflanzenschutzmaßnahmen gegen Unkräuter, Kartoffelkäfer und Kraut- und Knollenfäule notwendig, die nach den Bekämpfungsschwellen des integrierten Pflanzenschutzes (FREIER ET AL., 1997) durchgeführt wurden. In Abhängigkeit von der Vegetationsperiode wurden die in Tabelle 2-1 dargestellten Pflanzenschutzmaßnahmen durchgeführt.

Tab. 2-1: Pflanzenschutzmaßnahmen im Kartoffelfreisetzungsversuch der Vegetationsperioden 2001 bis 2003 in Dahnsdorf (Brandenburg).

	2001		2002		2003	
	Datum	Präparat	Datum	Präparat	Datum	Präparat
Herbizid	11.05	0,3 kg/ha Sencor	17.05	0,5 kg/ha Sencor	13.05	0,5 kg/ha Sencor + 2 l/ha Fusilade Max
Insektizid	11.06	5 l/ha Novodor	17.06	Feldzerstörung	26.06	5 l/ha Novodor
	29.06	1,2 l/ha Tameron			18.07	0,3 l/ha Bulldock
	11.07	0,3 l/ha Ripcord 10				
Fungizid	15.06	1,5 kg/ha Maneb			26.06	1,5 kg/ha Maneb
	29.06	1,5 kg/ha Maneb			11.07	1,8kg/ha Maneb
	11.07	1,8 kg/ha Maneb				
Sikkation	22.08	2,5 l/ha Basta			07.08.	2,5 l/ha Basta

Auf Grund der Verfügbarkeit von Daten über Niederschlagsmengen und Temperatur des Versuchsfeldes Dahnsdorf durch die Wetterstation erfolgte die Terminierung der Fungizidanwendungen gegen *Phytophthora infestans* mit Hilfe des Simulationsprogramms SYMPHYT I und III (Paso 2005.1 für Windows, © Zentralstelle der Länder für EDV-gestützte Entscheidungshilfen und Programme im Pflanzenschutz (ZEPP)). Durch die spätere Untersuchung der Anfälligkeit der Ernteknollen gegenüber der Knollenfäule wurde die Anwendung der Fungizide jedoch auf Kontaktfungizide beschränkt. Um eine homogene Schalenfestigkeit bei den insgesamt 12 angebauten Varianten zu erzielen, erfolgte eine chemische Krautabtötung (Sikkation) aller Varianten mit Beginn der Seneszenz der frühesten Variante.

Die Ernte der Knollen erfolgte 3 bis 4 Wochen nach der chemischen Sikkation maschinell mittels eines Kartoffelrodgers (Combine). Nach Bestimmung der Ertragsparameter erfolgte die Einlagerung von ca. 50-100 kg Ernteknollen/Variante bei 4 °C in der Kühlzelle (Weiss Umwelttechnik, Reiskirchen-Lindenstruth).

2.3 Ermittlung der Bestandesentwicklung

2.3.1 Bestimmung des Feldaufganges, des Entwicklungsstadiums und des Deckungsgrades

Der Feldaufgang wurde durch die Zählung der aufgelaufenen Pflanzen ab 2 Wochen nach Pflanzung ermittelt und im regelmäßigen Abstand von 3 bis 4 Tagen bis zum 100 %-igen Feldaufgang aller gelegten Pflanzknollen wiederholt. Der mittlere Feldaufgang pro Variante ergab sich aus den 4 Wiederholungen.

Das Entwicklungsstadium der Kartoffelpflanzen wurde nach Einteilung der BBCH-Stadien von HACK ET AL. (1993) im 7- bis 10-tägigen Abstand nach dem Feldaufgang ermittelt. Dabei wurde die Bestandesentwicklung in jeder Parzelle von 36 Pflanzen der 96 gelegten Knollen bestimmt und gemittelt. Um einen Randeffekt auszuschließen, gingen in die Bonitur nur die 2., 4., 6., 8., 10. und 11. Pflanze der 2., 3., 4., 5., 6. und 7. Reihe einer Parzelle ein. Aus der mittleren Bestandesentwicklung pro Wiederholung erfolgte die Berechnung der mittleren Bestandesentwicklung einer Variante.

Durch Abschätzung des relativen Anteils [%] der Pflanzen zweier benachbarter Reihen, die sich berührten und damit die Bodenoberfläche bedeckten, wurde der Deckungsgrad der Varianten geschätzt.

2.4 Ermittlung morphologischer Merkmale

2.4.1 Bestimmung der Anzahl der Augenaustriebe, Haupttrieblänge, Anzahl Seitentriebe/Haupttrieb und Anzahl Blütenknospen der Infloreszenz

1. Ordnung des Haupttriebes

Die Ermittlung der morphologischen Staudenmerkmale erfolgte in jeder Parzelle an 36 Pflanzen. In die Bonitur gingen die 2., 4., 6., 8., 10. und 11. Pflanze der 2., 3., 4., 5., 6. und 7. Reihe pro Parzelle ein. Direkt an den Kartoffelstauden erfolgte die Erhebung der Anzahl der Augenaustriebe, der Haupttrieblänge und der Seitentriebe des Haupttriebes eine Woche vor der Krautabtötung.

Für die Anzahl der Augenaustriebe wurden alle bei einer Staude aus dem Damm gewachsenen Triebe gezählt.

Als Haupttrieb einer Kartoffelstaude galt der Augenaustrieb, der den stärksten Stängeldurchmesser und den längsten Stängel aufwies. Die Haupttrieblänge wurde von der Dammoberfläche bis zum Vegetationspunkt des Triebes in cm gemessen.

In die Ermittlung der Anzahl Seitentriebe/Haupttrieb gingen alle Seitenverzweigungen von der Dammoberfläche bis zum Vegetationspunkt des Haupttriebes ein, die eine Länge von über 4 cm aufwiesen.

Die Bestimmung der Einzelblüten der Infloreszenz 1. Ordnung des Haupttriebes erfolgte über die Zählung der Blütenstiele der Einzelblüten, da zum Zeitpunkt der Zählung, ca. 3 Wochen vor der Krautabtötung, die meisten Blütenknospen und Beeren durch Trockenheit oder Wind abgeschlagen waren. Dabei wurde die Gesamtanzahl der Blütenstiele/Infloreszenz bestimmt, unabhängig von der Anzahl der Wickel/Infloreszenz.

2.4.2 Bestimmung der Blattbehaarung

Die Blattbehaarung wurde nur in der Vegetationsperiode 2003 vor der Sikkation an der Blattunterseite der seitlichen Fiedern eines Fiederblattes bestimmt. Das Fiederblatt stammte aus dem mittleren Drittel der Kartoffelstaude. Nach Abtrennung der Fiederblätter wurden diese zur Konservierung stufenweise im 4 Stunden-Rhythmus durch die Einlagerung in Lösungen mit einem Ethanolgradienten (30 %, 50 %, 70 % und 100 %) entwässert. An Blattscheiben von 4 mm Durchmesser ($12,6 \text{ mm}^2$) erfolgte unter dem Binokular Stemi SV 11 (Zeiss, Oberkochen) bei 5-facher Vergrößerung die Bestimmung der Anzahl der einfachen Blatthaare an vier seitlichen Fiedern der Fiederblätter.

Die Ermittlung der morphologischen Struktur der Blatthaare erfolgte mittels rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen (Philips XL 30 ESEM) bei Dr. Ehrig am Institut für Resistenzforschung und Pathogendiagnostik der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ) in Aschersleben. Dazu wurde die Blattunterseite einer ca. 10 mm^2 großen Blattfläche aus den mittleren Fiedern unter Vakuum (4 Torr) mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ bei einer 40-fachen Vergrößerung betrachtet.

2.5 Ermittlung der Ertragsparameter

2.5.1 Bestimmung des Flächenertrages und der Knollengröße

Nach der maschinellen Ernte der Pflanzen/Parzelle und Variante erfolgte die Wägung der geernteten Knollen. Über das Gewicht der Knollen einer Parzelle [$\text{kg}/24 \text{ m}^2$] wurde der Flächenertrag in dt/ha berechnet.

$$\text{Flächenertrag [dt/ha]} = \frac{\text{Parzellenertrag [kg]} * 10000 \text{ m}^2}{24 \text{ m}^2 * 100}$$

Für die Bestimmung der Knollengröße wurden von jeder Variante pro Wiederholung jeweils 20 kg entnommen. Im Anschluss wurden die Knollen mittels rechteckiger Schablonen von 4, 6 und 8 cm-Skalierung in die 4 Größenklassen <4 cm, 4-6 cm, 6-8 cm und >8 cm fraktioniert. Die Zugehörigkeit der Knollen in die jeweilige Größenklasse wurde dabei an der längsten Knollenseite bestimmt. Beim Durchfallen der Knollen durch die jeweilige Schablone erfolgte die Zuordnung in die nächst kleinere Klasse.

2.5.2 Bestimmung des Stärkegehaltes und der Morphologie der Stärkekörner

Die Stärkegehalte der Knollen wurden bei der VDLUFA Potsdam mittels einer Kartoffelstärkewaage nach Dr. Eckert ermittelt. Das Prinzip der Waage basiert darauf, dass in Abhängigkeit vom Stärkegehalt sich der Auftrieb unter Wasser ändert. Von jeder Variante wurden pro Wiederholung 5 kg gewaschene Knollen der Größenkalibrierung 4-6 cm zur Stärkebestimmung verwendet.

Die Morphologie der Stärkekörner wurde ebenfalls bei Dr. Ehrig am Institut für Resistenzforschung und Pathogendiagnostik der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ) in Aschersleben am Rasterelektronenmikroskop (Philips XL 30 ESEM) bestimmt. Dazu wurden Schnittflächen von ca. 10 mm² aus der Mitte der Knolle unter Vakuum (4 Torr) mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV bei 4 °C bei einer 400-fachen Vergrößerung betrachtet.

2.6 Bestimmung der genetischen Homogenität der Pflanzknollen durch ISSR-PCR

2.6.1 Extraktion der DNA

Zur Ermittlung der genetischen Homogenität der Pflanzknollen aus der *in-vitro*-Kultur über die drei Anbaujahre (2001-2003) wurde von den Varianten während der Vegetationsperiode Blattmaterial von den Kartoffelstauden der Freisetzung entnommen. Aus ca. 0,2 g mittels Korkbohrer (Ø 1,5 cm) ausgestochenem Blattmaterial fand die DNA-Extraktion und Reinigung nach einer modifizierten Methode von DELLAPORTA ET AL. (1983) über zwei Tage statt. Mit der Zugabe von flüssigem Stickstoff und durch das Mörsern der Probe mit einem Pistill im 2 ml Eppendorfgefäß wurde der mechanische Aufschluss der Zellen erzielt. Durch die anschließende Zugabe von 750 µl 4 °C kaltem Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl mit pH = 8,0; 50 mM EDTA; 500 mM NaCl) und

7 µl RNase und 3 bis 5-maligem vortexen erfolgte die Lyse der Zellen und Zerstörung der RNA. Die Zugabe von 50 µl 20 %-iger SDS-Lösung zur Probe und das anschließende 25-malige vorsichtige Schwenken führte zur Protein- und Polysaccharidausfällung. Die Inkubation der Probe im 65 °C warmen Wasserbad führte zur Lösung der DNA und Inaktivierung der DNase. Nach Zugabe von 250 µl KAc-Lösung (5 M) und 25-maligen vorsichtigem Schütteln wurden die Proben für 20 Minuten auf Eis gestellt, wodurch das SDS in Form eines weißen Niederschlages ausfiel. Zur Trennung des Niederschlages erfolgte die 30-minütige Zentrifugation der Probe bei 13000 rpm und 4 °C. Der Überstand, in dem sich die gelöste DNA befand, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl -20 °C kaltem Isopropanol und anschließender Lagerung der Probe bei -20 °C im Eisfach für 30 Minuten fiel die DNA aus. Die Trennung der gefällten DNA von der flüssigen Phase erfolgte durch erneute Zentrifugation für 30 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm. Der Überstand wurde dekantiert und das DNA-Pellet an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Die Zugabe von 100 µl TRIS-EDTA-Puffer und leichtes Schütteln bzw. Klopfen der Probe löste wiederum die DNA. Für einen 2. Reinigungsschritt der DNA wurden 10 µl 4 °C kalte NaAc-Lösung (3 M) und 250 µl -20 °C kaltes 96 %-iges Ethanol zur Probe gegeben und diese über Nacht bei -20 °C im Gefrierschrank inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 4 °C und 13000 rpm die Trennung der gefällten DNA von der flüssigen Phase. Nach Dekantierung des Überstandes wurde das DNA-Pellet mit 1 ml 70 %-igem 4 °C kaltem Ethanol gewaschen. Nach Trennung des Ethanols durch Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm für 20 Minuten und anschließendem Dekantieren wurde das DNA-Pellet an der Luft getrocknet. Zum Abschluss wurde die gereinigte DNA durch die Zugabe von 100 µl TRIS-EDTA-Puffer gelöst und gelagert.

Nach der Extraktion wurde die DNA-Konzentration [ng/µl] aller Proben im Bio-Photometer (Eppendorf, 6131) ermittelt und auf eine DNA-Konzentration von 1 bis 100 ng/µl für die ISSR-PCR eingestellt.

2.6.2 Primer

In Anlehnung an PREVOST & WILKINSON (1999) sowie BORNET ET AL. (2002) wurden 4 Primer aus der Primerdatenbank (Liste 9) der University of British Columbia in Vancouver (Kanada) zur Bestimmung der genetischen Homogenität der Pflanzknollen in den 3 Vegetationsperioden ausgewählt. Die Basensequenz der 4 Primer ist in Tabelle 2-2 aufgelistet, wobei der Nukleotidcode Y die Pyrimidine C oder T repräsentiert.

Tab. 2-2: Basensequenz der 4 verwendeten ISSR-Primer zur Ermittlung der genetischen Homogenität des Pflanzenmaterials im Freisetzungsversuch.

Bezeichnung	Basensequenz	Annealing-Temperatur [°C]
UBC 834	5'-AGA GAG AGA GAG AGA GYT-3'	52,6
UBC 836	5'-AGA GAG AGA GAG AGA GYA-3'	52,6
UBC 841	5'-GAG AGA GAG AGA GAG AYC-3'	54,8
UBC 889	5'-GTG ACA CAC ACA CAC AC-3'	52,8

2.6.3 PCR-Amplifikation

Das Reaktionsgemisch für die PCR-Amplifikation wurde in 0,2 ml Eppendorfgefäßen angesetzt, die vorher 15 Minuten unter UV-Licht sterilisiert worden waren. Das Reaktionsgemisch von 25 µl enthielt folgende Komponenten: 0,3 µl Taq-Polymerase (Qiagen, 5U/µl), 2,5 µl 10xPuffer (15 mM MgCl₂), 5 µl 5xQ-Solution, 0,5 µl dNTP (10 mM), 0,25 µl Primer (100 µM) und 2 µl Template-DNA (1-100 ng/µl). Nach Mischung der Proben durch Zentrifugation von 30 sec. bei 5000 rpm fand die PCR im PTC-200-Thermocycler (Biozym) unter dem in Tabelle 2-3 aufgeführten Programm statt. Bis zur Elektrophorese fand die Lagerung des PCR-Produktes bei Bedarf bei 4 °C im Kühlschrank statt.

Tab. 2-3: Thermocycler-Programm für die ISSR-PCR der Kartoffelblätter auf einem PTC-200 (Biozym) mit einer Heizdeckeltemperatur von 105 °C.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [Min.]	Ramp [°C/s]
Initial-Denaturierung	94	4:00	
35 Zyklen			
Denaturierung	94	1:00	
Annealing	50	2:00	0,3
DNA-Amplifikation	72	0:30	
Abschluss			
Final-Extension	72	7:00	
Kühlung	4	∞	

2.6.4 Elektrophorese der PCR-Produkte

Die Elektrophorese erfolgte in 1,8 %-igem Agarosegel. Um ein blasenfreies Gel zu erhalten, wurde die Agarose (Biozym) durch 5-minütiges Aufkochen im 1x-TAE-Puffer gelöst. Nach Abkühlung des Gels auf 60 °C im Wasserbad unter permanentem Umrühren

erfolgte das Gießen im Gelträger (Biozym, ComPhor Mt Maxi). Nach mindestens 14-stündigem Aushärten des Gels bei 10 °C wurden die Geltaschen mit 10 µl des Gemischs aus 25 µl PCR-Produkt und 5 µl Gelladungspuffer beladen. Als Gelladungspuffer diente ein 6-fach Bromphenolblau-Puffer (0,25 % Bromphenolblau + 40 % Saccharose in 5xTBE-Puffer). Die Trennung des PCR-Produktes fand im 1x-TAE-Puffer bei einer Spannung von 120 V über einen Zeitraum von 3 h und 20 Min. statt, was 400 Vh entsprach (Spannungsquelle Pharmacia LKB MultiDrive XL). Während dieser Zeit erfolgte die Wasserkühlung (Pharmacia LKB MultiTemp II) des 1xTAE-Puffers auf 18 °C. Zur Identifikation der Bandengröße der PCR-Produkte erfolgte die Beladung von 2 Slots mit 10 µl eines 100 bp Markers (Pharmacia).

2.6.5 Färbung, Aufnahme und Auswertung der Gele

Die Färbung des Gels erfolgte für 10 Minuten in 500 ml Ethidiumbromidlösung (4 µg/ml). Dabei befand sich das Gel in ständiger Bewegung auf einer Wippe. Im Anschluss wurde das Gel für 15 Minuten in einer 1 mM MgSO₄-Lösung entfärbt, was zur Entfernung der Anfärbung des unspezifischen Hintergrundes durch Ethidiumbromid führte. Die Visualisierung der Banden fand unter UV-Strahlung bei 312 nm statt. Mit Hilfe des Biodoc Analysesystems (Biometra) erfolgte die Aufnahme der Gele. Die Auswertung der digitalisierten Gele erfolgte visuell (vorhandene bzw. nicht vorhandene Banden).

2.7 Anfälligkeit gegenüber *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary

2.7.1 Erhaltung von *P. infestans* und Herstellung der Inokulationslösung

Die Untersuchung der Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* erfolgte mit dem komplexen Pathotyp 1/97 (1.2.3.4.7.8.10.11) aus der BBA-Braunschweig. Der Pilz verliert auf künstlichem Nährmedium seine Pathogenität, weshalb die Haltung wöchentlich auf frischem Kartoffelmaterial stattfinden muss (SCHÖBER-BUTIN, pers. Mitt.). Die Haltung des Pathotyp 1/97 fand auf Knollenscheiben der Sorten Erstling und Grata statt. Beide Kartoffelsorten weisen keine vertikale Resistenz gegenüber *P. infestans* auf. Dazu wurden die Knollen mit Leitungswasser, Kernseife und Naturborstenhandbürste oberflächlich gut gereinigt und mit einem Messer anhaftender Befall des Pilzes *Rizoctonia solani* schonend von der Knollenschale abgekratzt. Die anschließende einstündige Spülung der Knollen unter fließendem Leitungswasser entfernte anhaftende Seifenreste. Nach Trocknung der Knollen fand die Oberflächensterilisation durch Eintauchung in 70 %-igem Alkohol und anschließender Abflämmung auf einer feuerfesten Unterlage statt. Danach wurden mit

einem in 96 %-igem Ethanol gereinigten Messer zwischen Nabel und Krone 1 cm dicke Scheiben herausgeschnitten und beidseitig durch leichtes Drücken zwischen Medicrep-Filterpapier getrocknet. Die Ablage der Knollenscheiben fand auf mit Filterpapier belegten Kunststoffgittern statt, die in mit 30 ml Leitungswasser gefüllten Kunststoffkästen (L/B/H 32/22/8 cm) lagen. Zur Ausbildung einer Wundkorkschicht der Schnittflächen erfolgte die Aufstellung der mit Parafilm verschlossenen Kästen über 24 h bei 15 °C im Dunkeln im Kühlschrank. Für die Inokulation wurde 7 Tage altes Myzel verwendet. Dieses wurde mit einer ausgeglühten Impfnadel, die in autoklaviertem destilliertem Wasser abgekühlt wurde, vorsichtig, ohne die Knollenscheibe zu berühren, abgenommen und in eine Petrischale mit autoklaviertem destilliertem Wasser abgestreift. Die Sporulation erfolgte durch die Aufstellung der Suspension im Kühlschrank bei 10 °C. Nach 3-5 h war die Sporulation abgeschlossen. Die durch ihre Geißeln schwimmenden Zoosporen waren unter dem Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) bei 100-facher Vergrößerung gut sichtbar. Leere Sporangenschalen, nicht geöffnete Sporangien und Myzelstücke sanken zu Boden oder schwammen an der Oberfläche. Die anschließende Filtration (Schleicher & Schüll, Nr. 604) der Suspension führte zur Trennung der Zoosporen von den Sporangien und Myzel. Für die Erhaltung von *P. infestans* wurden vom Filtrat einige Tropfen auf die suberinisierten Knollenscheiben mittels Pasteurpipette aufgebracht und die Kästen mit Parafilm gut verschlossen und bei 15 °C im Dunkeln aufgestellt. Nach 48 h war der Pilz in die Knollenscheiben eingedrungen und die Knollenscheiben wurden gedreht, damit der Pilz diese durchwachsen konnte. Mitübertragene Bakterien oder andere Pilze durchdrangen die Knollenscheibe nicht so schnell, so dass nach einer Woche sauberes Myzel auf der Scheibe wuchs.

Für die Herstellung einer definierten Inokulationslösung zur Untersuchung der Kraut- und Knollenfäuleanfälligkeit wurden vom Filtrat 2-3 Tropfen mit einem Tropfen einer 10 %-igen Kupfersulfatlösung gemischt, was zur Abtötung der Zoosporen führte. Durch 4-malige Zählung der abgetöteten Zoosporen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (F.-R.-K.) unter dem Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) bei 100-facher Vergrößerung erfolgte die Bestimmung der Zoosporenkonzentration im Filtrat. Die Einstellung des Filtrates auf die gewünschte Zoosporenkonzentration für die Inokulation fand nach folgender Berechnung statt:

$$\text{Zoosporen/ml} = \frac{\text{Zoosporen F. - R. - K.}}{0,0032 \text{ ml (Volumen F. - R. - K.)}}$$

$$\text{Verdünnungsquotient Filtrat (X)} = \frac{\text{Zoosporen/ml}}{\left(\frac{x \text{ (gewünschte Zoosporenanzahl)}}{0,05 \text{ ml (Volumen Inokulationstropfen)}} \right)}$$

Für die Herstellung der Inokulationslösung von x Zoosporen/0,05 ml (Inokulationstropfen) wurde 1 Teil des Filtrates mit X–1 Teilen kaltem destilliertem Wasser verdünnt.

2.7.2 Krautfäule-Biotests

Die Untersuchung der Anfälligkeit der Blätter gegenüber *P. infestans* fand nach dem Hodgson-Test (HODGSON, 1961) im Labor statt. Von den im Freisetzungsvorversuch stehenden Stauden wurden aus dem mittleren Drittel kurz vor der Blüte (BBCH 59) Fiederblätter abgeschnitten und daraus mit dem Korkbohrer Blattscheiben von 1,5 cm Durchmesser ohne Mittelrippe gestanzt. Für jede Linie und den Wildtyp wurden pro Wiederholung 5 Fiederblätter geschnitten und pro Blatt 5 Blattscheiben aus den voll ausgewachsenen seitlichen Fiederblättchen gestanzt. Daraus ergaben sich pro Variante 100 Blattscheiben. Die Auslage der Blattscheiben erfolgte auf Filterpapier, welches auf nassen Schaumstoff in Kunststoffkästen (L/B/H 32/22/8 cm) lag. Mittels Multipipette (Eppendorf, Multipette plus) fand die Inokulation der Blattscheiben mit je einem Tropfen (0,05 ml) einer Zoosporensuspension (150 Zoosporen/0,05 ml) blattoberseits statt.

Nach der Inokulation der Blattscheiben wurden die Kunststoffkästen mit Parafilm verschlossen und bei 15 °C, 16 h Beleuchtung von 5000 lux und 90 % rel. Luftfeuchte für 7 Tage in der Klimakammer (Weiss) aufgestellt. Auf den Blattscheiben entwickelte sich das Luftmyzel von *P. infestans* (Abb. 2-4).



Abb. 2-4: Luftmyzel von *P. infestans* auf Kartoffelblattscheiben 7 Tage nach Inokulation von 150 Zoosporen/0,05 ml (links Boniturstufe BS1, Mitte und rechts BS3).

Die Untersuchung der Blattanfälligkeit gegenüber *P. infestans* wurde in der Vegetationsperiode 2001 zweimal, sowie 2002 und 2003 dreimal wiederholt. Im Anbaujahr 2001 erfolgte die Bonitur des auf den Blattscheiben wachsenden Luftmyzels

nach 7 Tagen, 2002 nach 5 und 6 Tagen und 2003 nach 5, 6 und 7 Tagen. Dabei fand die Bonitur des Luftmyzels von *P. infestans* in drei Boniturstufen (BS) statt (Tabelle 2-4).

Tab. 2-4: Boniturstufen (BS) der Blattscheiben bei der Krautfäuleanfälligkeitsuntersuchung mit *P. infestans*.

Boniturstufe (BS)	Beschreibung
1	< 1/3 der Blattscheibe mit Luftmyzel bewachsen
2	1/3 – 2/3 der Blattscheibe mit Luftmyzel bewachsen
3	> 2/3 der Blattscheibe mit Luftmyzel bewachsen

Aus der Bonitur aller Blattscheiben wurde der Sporulationsindex wie folgt ermittelt:

$$\text{Sporulationsindex (SI)} = \frac{M1 * 1 + M2 * 2 + M3 * 3}{3}$$

wobei M1, M2, M3 die Anzahl der Blattscheiben der jeweiligen Boniturstufe (BS) der 100 Blattscheiben pro Wiederholung eines Versuchsansatzes darstellen. Der mittlere Sporulationsindex/Variante errechnete sich aus den Wiederholungen einer Vegetationsperiode.

2.7.3 Knollenfäule-Biotests

Die Untersuchung der Anfälligkeit der Knollen gegenüber *P. infestans* erfolgte über den nach SCHÖBER & HÖPPNER (1972) modifizierten Lapwood-Test (LAPWOOD, 1965) im Labor. Ab Ende November wurden 10 eingelagerte Knollen/Variante analog wie bei der Erhaltungszucht gereinigt und sterilisiert. Mittels einer Brotschneidemaschine wurden pro Knolle zwischen Nabel und Krone je 2 Knollenscheiben à 1 cm Stärke herausgeschnitten und beidseitig durch leichtes Drücken zwischen Medicrep - Filterpapier getrocknet. Die Knollenscheiben wurden auf mit Filterpapier belegte Kunststoffgitter in mit 30 ml Leitungswasser gefüllte Kunststoffkästen (L/B/H 32/22/8 cm) gelegt. Zur Ausbildung einer Wundkorkschicht der Schnittflächen erfolgte die Aufstellung der mit Parafilm verschlossenen Kästen über 24 h im Dunkeln bei 15 °C und 90 % rel. Luftfeuchtigkeit in der Klimakammer (Weiss). Nach 24 h fand die Inokulation der Knollenscheibe mit einem Tropfen (0,05 ml) Zoosporensuspension des Pathotyps 1/97 (50 Zoosporen/0,05 ml) mit Hilfe einer Multipipette (Eppendorf, Multipette Plus) statt. Zwei Tage nach Inokulation wurden die Knollenscheiben gedreht. Vom 4. bis 9. Tag nach der Inokulation erfolgte die

Bonitur des durchwachsenden Luftmyzels auf den Knollenscheiben nach dem in Tabelle 2-5 angegebenen Boniturstufen.

Tab. 2-5: Boniturstufen (BS) der Knollenscheiben bei der Knollenfäuleanfälligkeitsuntersuchung mit *P. infestans*.

Boniturstufe (BS)	Beschreibung
1	Knollenscheibe ohne Myzel
3	etwas Myzel
5	1/3 der Knollenscheibe mit Myzel bewachsen
7	2/3 der Knollenscheibe mit Myzel bewachsen
9	ganze Knollenscheibe mit Myzel bewachsen

Täglich bekam jede Knollenscheibe eine Boniturnote, woraus die Tagessumme der Boniturnoten der 20 Knollenscheiben einer Variante addiert wurde. Durch die Addition der Tagessummen vom 4. bis 9. Tag ergab sich die Wochensumme einer Variante. Insgesamt wurde der Versuchsansatz von 10 Knollen/Variante pro Vegetationsperiode 3 bis 4-mal wiederholt, woraus sich die mittlere Tagessumme bzw. Wochensumme einer Variante ergab.

2.7.4 Myzelwachstum von *P. infestans* in Flüssigkultur

Die Ermittlung des Einflusses von Inulin auf das Myzelwachstum erfolgte in Flüssigkultur in einem nach HENNIGER (1959) modifizierten Nährmedium. Das flüssige Nährmedium setzte sich aus den in Tabelle 2-6 aufgeführten Substanzen und verschiedenen Zuckerkonzentrationen (Tab. 2-7) zusammen. Für einen Versuchsansatz wurde zunächst eine Stammlösung angesetzt. Diese setzte sich aus der Einwaage der ersten 13 aufgelisteten Chemikalien aus Tabelle 2-6 zusammen. Nach Einwaage der Chemikalien in einer 1 l Duran-Glasflasche und anschließender Lösung in 800 ml kochendem destilliertem Wasser wurde die Stammlösung bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert (Systec GmbH, 2540 ELC). Danach erfolgte die Anhebung des pH-Wertes auf 5,0-5,2 der heißen Stammlösung durch Zugabe einiger Tropfen steriler KOH-Lösung. Die Zugabe des Aneurin, welches in 1 ml destilliertem Wasser gelöst war, fand über einen Sterilfilter (0,45 µm) nach Abkühlung der Stammlösung auf Raumtemperatur (25 °C) statt.

Tab. 2-6: Stammlösung des Nährmediums der Flüssigkultur von *P. infestans*.

	Substanz	Einwaage [g/l]
1.	KH ₂ PO ₄	0,2
2.	NaNO ₃	0,4
3.	MgCO ₃	0,1
4.	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1
5.	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,02
6.	Bernsteinsäure	0,2
7.	Asparaginsäure	0,4
8.	Glutaminsäure	0,4
9.	Arginin	0,2
10.	Alanin	0,1
11.	Leucin	0,1
12.	Glycin	0,2
13.	Cysteinhydrochlorid	0,15
14.	Aneurin	0,002

Parallel erfolgte die Einwaage der unterschiedlichen Zucker und des CaCl₂ (Tab. 2-7) in 100 ml weithalsige Erlenmeyer-Kolben. Als Bezugsgröße für die Einwaage diente ein Endvolumen von 250 ml. Nach Lösung der Substanzen in jeweils 50 ml heißem destillierten Wasser wurden die Zuckerlösungen bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert (Systec GmbH, 2540 ELC). Durch Mischung von je 200 ml Stammlösung mit den 50 ml einer Zuckerlösung in einer sterilen 250 ml Duran-Glasflasche entstanden die gebrauchsfertigen Zuckerlösungen.

Tab. 2-7: Zuckerlösungen des Nährmediums der Flüssigkultur von *P. infestans*.

Variante	Glucose [g/l]	Inulin [g/l]	CaCl₂ [g/l]
A	10	0	0,1
B	9	1	0,1
C	8	2	0,1
D	7	3	0,1
E	6	4	0,1

Das Myzelwachstum von *P. infestans* wurde jeweils in 20 ml flüssigem Nährmedium untersucht. Mit Hilfe einer sterilen Dispensette erfolgte die Aufteilung der

gebrauchsfertigen Zuckerlösungen à 20 ml in 100 ml sterile enghalsige Erlenmeyer-Kolben aus Glas mit Stopfen unter einer Sterilwerkbank (Kendro, HeraSafe). Pro Versuchsansatz wurden von den Zuckerlösungen B bis E je 10 Wiederholungen angesetzt und 20 Wiederholungen von der Zuckerlösung A. Insgesamt wurde der Versuchsansatz 5-mal wiederholt. Als Impfmateriale diente das auf Roggenagar etablierte Myzel des komplexen Pathotyps 1.2.3.4.7.8.10.11 von *P. infestans*. Aus einer vollständig mit Myzel bewachsenen Roggenagarplatte wurde mit Hilfe eines sterilen Korkbohrers (\varnothing 0,5 cm) das Impfmateriale ausgestochen. Die Überführung des Impfmateriales in die Erlenmeyer-Kolben fand mit einer sterilen Impföse über der Bunsenbrennerflamme statt. Die Inkubation erfolgte für 12 Tage bei 20 °C im Dunkeln im Brutschrank (Heraeus Instruments, Typ B 6200). Nach 12 Tagen wurde das Myzel-Pad mit Hilfe einer Pinzette aus dem Nährmedium entfernt und auf Rundfilter gebettet. Von den Rundfiltern war vorher das Gewicht nach Trocknung bei 40 °C über 24 h bestimmt worden. Das Myzel-Pad wurde für 48 h bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet. Im Anschluss wurden die auf den Rundfiltern befindlichen Myzel-Pads in einen Exsikkator überführt und nach Abkühlung auf Raumtemperatur auf einer Analysenwaage gewogen. Durch die Differenz des leeren Rundfilters zum Rundfilter mit Myzel-Pad ergab sich das Myzeltrockengewicht.

2.8 Resistenz- und Anfälligkeitsreaktion gegenüber Kartoffelkrebs *Synchytrium endobioticum* Schilb. (Perc.)

Die Überprüfung des Einflusses der Transformation auf die Krebsreaktion der transgenen Linien und des Wildtyps erfolgte mit den beiden Krebspathotypen 1 und 18 aus der Dauerzucht von Dr. Stachewicz, Institut für Pflanzenschutz im Ackerbau und Grünland der BBA in Kleinmachnow. In der amtlichen Sortenprüfung zeigte die Sorte Désirée (Wildtyp) gegenüber dem Pathotypen 1 eine Resistenz - und gegenüber dem Pathotypen 18 eine Anfälligkeitsreaktion. Die Untersuchung fand mit Knollen aus der Ernte des Freisetzungversuches 2001 unter Laborbedingungen nach der Glynne-Lemmerzahlmethode (STACHEWICZ, 1996) statt. Nach 12-wöchiger Lagerung der Knollen bei 4 °C im Dunkeln in der Klimakammer (Weiss Umwelttechnik, Reiskirchen-Lindenstruth), was zur Beendigung der Keimruhe führte, wurden die Knollen in einem anderen Raum zur Keimung für 2 Wochen bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Aus den vorgekeimten Knollen wurden im Anschluss Augenplatten (Knollenstückchen mit 2-3 cm Seitenlänge, 1,5-2,5 cm Höhe) mit einem oder mehreren 0,5-1,5 mm langen Keimen geschnitten. Um die Keime herum wurde mit heißer Vaseline ein Ring von 1-1,5 cm Durchmesser gezogen.

Nach Überführung der Augenplatten in Kunststoffbehälter (L/B/H 32/22/8 cm) mit einer 1 cm hohen Sandschicht und reichlicher Benetzung der Keime mit destilliertem Wasser erfolgte die Infektion der Keime durch Auflegung einer Krebswucherung (Abb. 2-5).

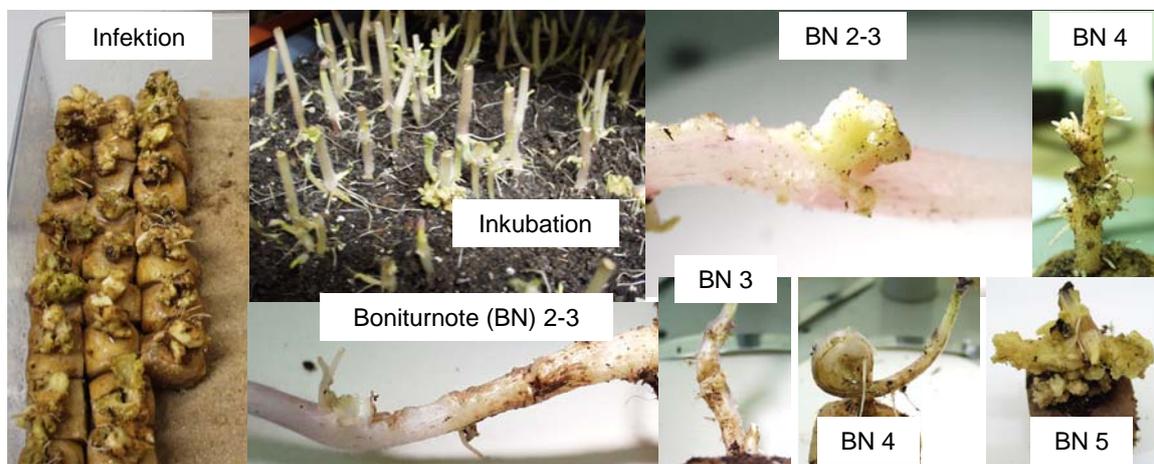


Abb. 2-5: Infektions- und Inkubationsaufbau sowie Schadsymptome bei der Bonitur der Resistenz- und Anfälligkeitsprüfung von *S. endobioticum*.

Während der Infektionszeit von 48 Stunden bei 8-10 °C im Kühlschrank fand die mehrfache Erneuerung des Wasserfilms statt. Nach der Infektionszeit wurden die Wucherungen entfernt und die Augenplatten in Kunststoffschalen mit feuchtem Torf überschichtet. Die Inkubationszeit betrug 28 Tage bei 16-18 °C im Dunkeln. Das mehrmalige Besprühen des Torfes mit destilliertem Wasser verhinderte ein Abtrocknen der Torfschicht. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die Augenplatten von anhaftenden Torfresten gereinigt und ausgewertet. Die Beurteilung der Resistenz- und Anfälligkeitsreaktion der Varianten erfolgte in 5 Boniturstufen (Abb. 2-5) nach LANGERFELD & STACHEWICZ (1992).

Im Falle einer Anfälligkeitsreaktion der Augenplatten mit Ausbildung der charakteristischen Krebswucherungen wurden die Anzahl und das Gewicht der Wucherung bestimmt, woraus die mittlere Anzahl Wucherung/Augenplatte und das mittlere Wucherungsgewicht/Augenplatte berechnet wurde. Pro Krebspathotyp erfolgte der Ansatz von 3 Wiederholungen mit je 20 Augenplatten/Variante.

2.9 Kartoffelzystenematode *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens

Die Untersuchung der Anfälligkeit gegenüber *Globodera rostochiensis* Pathotyp 5 erfolgte an Pflanzen aus geernteten Knollen der Vegetationsperiode 2001 und 2002. Das Infektionsmaterial stammte dabei aus der Dauerzucht von Dr. Große, Institut für

Nematologie und Wirbeltierkunde der BBA in Kleinmachnow. Pro Versuchsansatz wurden 8 Knollen/Variante untersucht. Die Knollen wurden nach Beendigung der Keimruhe und Vorkeimung bis zu einer Keimlänge von 1-1,5 cm (siehe 2.8) verwendet. In diesem Zustand wurde je eine Knolle mit dem Keim nach oben in durchsichtige 0,3 l Trinkplastikbecher gesetzt, die zu 2/3 mit Topferde gefüllt und am Boden gelocht waren. Nach Inokulation mit je 25 Zysten/Knolle von *G. rostochiensis* (\varnothing 200 Larven/Zyste) erfolgte die vollständige Abdeckung der Knollen mit Topferde. Im Anschluss fand die Einbettung der 8 Plastikbecher/Variante bis 1 cm unter dem oberen Rand in Balkonkästen in feuchten Torf statt (Abb. 2-6).



Abb. 2-6: Versuchsaufbau, Entwicklungsstadium der Pflanzen zum Boniturzeitpunkt und Schadsymptom von *G. rostochiensis*.

Die Pflanzenaufzucht erfolgte im Gewächshaus bei einem Tag-/Nachtrhythmus von 16 h/8 h mit einer Beleuchtung von mindestens 10.000 lux und variabler Tag-/Nachttemperatur von 22/18 °C. Die Bewässerung der Pflanzen während der Inkubationszeit von 6 bis 8 Wochen fand ein- bis zweimal täglich nach Bedarf statt. Nach 4 Wochen Inkubationszeit wurden die Pflanzen wöchentlich mit 10 ml einer 1 %-igen Kristallon-grün-Lösung (18 % N, 18 % P₂O₅, 18 % K₂O, Hydro Agri) gedüngt. Zu dem Zeitpunkt, an dem der Hauptanteil der an den Wurzeln gebildeten Zysten die Gelbfärbung erreicht hatte, erfolgte die Auswertung des Versuches. Dazu wurden die Pflanzen im Plastikbecher aus der Torfeinbettung entfernt und die Plastikbecher äußerlich gereinigt. Durch Auszählung der Zysten, die durch den Plastikbecher sichtbar waren, fand die Auswertung statt.

Für die Bestimmung der Reproduktion der Weibchen von *G. rostochiensis* über die Ei- und Larvenanzahl/Zyste wurden aus beiden Versuchsserien der Vegetation 2001 jeweils 4 Pflanzen/Variante für weitere 2 Monate zur Ausreife der Zysten bei 20 °C ohne

Bewässerung und Beleuchtung gelagert. Anschließend fand die Gewinnung der braun gefärbten Zysten vom Wurzelballen der Pflanzen unter einer Standlupe statt. Eine Größenfraktionierung von $< 0,75$ mm, $0,75-1$ mm und > 1 mm ergab sich durch die Siebung. Jeweils 10 Zysten mit einem Durchmesser von $0,75-1$ mm wurden im Plastikzentrifugenglas in 10 ml Wasser über 24 h eingeweicht und am folgenden Tag mittels Homogenisator für eine Minute aufgebrochen. Im Anschluss erfolgte die Einstellung der Suspension auf ein Volumen von 30 ml mit Wasser. In 3 Wiederholungen/Probe wurde in jeweils 1 ml der Suspension die Larvenanzahl von *G. rostochiensis* im Invertmikroskop Axiovert 35 M (Zeiss, Oberkochen) bei 200-facher Vergrößerung ausgezählt.

2.10 Wurzelgallennematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood

Die Untersuchung der Anfälligkeit gegenüber den *M. incognita* fand an Pflanzen aus Ernteknollen der Vegetationsperiode 2001 und 2002 im Gewächshaus statt. Aus der Dauerzucht von Dr. Große, Institut für Nematologie und Wirbeltierkunde der BBA in Kleinmachnow wurde *M. incognita* zur Verfügung gestellt. Nach Überwindung der Keimruhe und Austrieb der Keime zwischen 1-1,5 cm Länge (s. 2.8) wurden jeweils 8 Knollen/Variante pro Versuchsansatz in Quarzsand in 0,3 l Plastiktrinkbecher gepflanzt. Danach erfolgte die Einbettung der 8 Plastikbecher/Variante in feuchten Torf in Balkonkästen und Aufstellung zur Kultivierung bei einem Tag-/Nachtrhythmus von 16/8 h mit mindestens 10000 lux und einer variablen Tag-/Nachttemperatur von 25/21 °C. Parallel fand die Gewinnung frisch geschlüpfter Larven von *M. incognita* zur Herstellung der Infektionslösung statt. Dies geschah durch kontinuierliche Auswaschung von Wurzelgallen infizierter Kartoffelpflanzen der Sorte Désirée über eine Wassersprühanlage. Vor der Infektion wurde die Larvenkonzentration in der Lösung durch Auszählung der Larven unter dem Invertmikroskop Axiovert 35 M (Zeiss, Oberkochen) bei 200-facher Vergrößerung bestimmt und das Volumen bei Bedarf eingeengt bzw. vergrößert. Für die Einengung des Volumens musste die Lösung bei 8 °C für 12 h im Kühlschrank ruhen, was zur Absenkung der Larven auf den Gefäßboden führte. Im Anschluss wurde Wasser aus der Infektionslösung durch vorsichtiges Eintauchen eines identischen Gefäßes verdrängt. Insgesamt erfolgte die Inokulation der Knollen in Abhängigkeit der Versuchsserie mit 5.000 bis 7.500 Larven/Knolle. Diese Larvenanzahl wurde jedoch über einen Zeitraum von 7 bis 10 Tagen in mehreren Infektionsdurchgängen zu den Knollen gegeben. Die Infektion begann 5 Tage nach Pflanzung. Pro Infektionsgang wurden zwischen 1.000 bis 2.000

Larven in einem Gesamtvolumen von 10 ml/Knolle inokuliert. Dabei erfolgte die Zugabe der Infektionslösung in 3 Gaben mittels Multipipette (Eppendorf, Multipette plus), um eine Auswaschung der Larven aus dem Quarzsand zu verhindern. Während der Kultivierung erfolgte die Bewässerung der Pflanzen nach Bedarf ein- bis zweimal täglich. Drei Wochen nach der Pflanzung begann zusätzlich die Düngung der Pflanzen mit 10 ml 1 %-iger Kristallon-grün-Lösung (18 % N, 18 % P₂O₅, 18 % K₂O, Hydro Agri) in 2 gleichen Gaben. Mit Erreichen des Blütenstadium und beginnender Seneszenz, was in Abhängigkeit vom Alter der Knollen und der Jahreszeit 9 bis 12 Wochen nach Pflanzung eintrat, wurden die Larven aus den Wurzelgallen ausgewaschen. Dazu wurden die Pflanzen zunächst ausgetopft, der Wurzelballen von anhaftendem Quarzsand im Wasserbad gereinigt und im Anschluss der Spross an der Sprossbasis vom Wurzelballen getrennt. Nach oberflächlicher Trocknung des Wurzelballens mittels Krepppapier erfolgte die Ermittlung des Wurzelfrischgewichtes über Wägung. Zum Schlupf der Larven wurden die Wurzeln auf Siebe mit Untersetzern gebettet und unter einer Wassersprühanlage im Dunkeln im Gewächshaus aufgestellt (Abb. 2-7). Die Befeuchtung der Wurzeln fand alle 5 Minuten über einen Zeitraum von 5 Minuten statt. Die Temperatur in der Gewächshauskabine betrug dabei mindestens 20 °C. Der erste Ablass in den Untersetzern wurde 24 h nach Beginn der Auswaschung verworfen. Danach fand zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von 6 Wochen die Sammlung des Ablasses aus den Untersetzern statt.



Abb. 2-7: Pflanzenstadium bei der Infektion, Schadsymptom von *M. incognita* und Aufbettung der Wurzeln zur Auswaschung der Larven von *M. incognita*.

Die Bestimmung der Larvenkonzentration [Larven/ml] in den Ablasslösungen erfolgte unter dem Invertmikroskop Axiovert 35 M (Zeiss, Oberkochen) bei 200-facher Vergrößerung. Hierfür wurden nach Durchmischung der Ablasslösung auf einem Magnetrührer 5 ml mittels Variopipette (Eppendorf) in eine durchsichtige Rundschale (Ø 5 cm) überführt und die Larven nach Absetzung auf dem Schalengrund durch den Zusatz

von einem Tropfen 1 %-iger Tween-80-Lösung ausgezählt. Dies geschah in 3-maliger Wiederholung/Ablaslösung. Aus den Larvenkonzentrationen erfolgte die Berechnung der Larvenanzahl/Ablaslösung. Die Berechnung der Larven/Wurzelfrischgewicht erfolgte mittels Summierung der Larven aller Ablaslösungen einer Pflanze und anschließendem Dividieren durch das Wurzelfrischgewicht.

2.11 Kartoffelkäfer *Leptinotarsa decemlineata* Say

2.11.1 Kartoffelanzucht im Gewächshaus

Für die Laborbiotests (Larvengewicht, Reproduktion) sowie die Dauerzucht und die Zucht der Subpopulationen des Kartoffelkäfers erfolgte in der Regel die Fütterung mit unter Gewächshausbedingungen angezogenem Kartoffellaub. Dabei dienten die im Freisetzungsvorversuch geernteten Knollen als Pflanzmaterial für die Gewächshausanzucht. Nach der Ernte fand eine mindestens 12-wöchige Lagerung der Knollen bei 4 °C in der Kühlzelle (Weiss Umwelttechnik, Reiskirchen-Lindenstruth) zur Überwindung der Keimruhe statt. Im Anschluss wurden die Knollen über ein Jahr für die Laubanzucht verwendet. Zur Ausbildung mehrerer Keime wurden die Knollen vor Pflanzung 2-3 Wochen im Gewächshaus abgestellt. Die Pflanzung der vorgekeimten Knollen fand in Plastikschaalen (L/B/T 60/30/10 cm) mit Komposterde unter Kulturbedingungen von 22/18 °C und 16 h Beleuchtung von 10.000-30.000 lux statt. In Abhängigkeit von der Außenwitterung waren auch Temperaturen bis zu 30 °C und Strahlungsintensitäten über 30.000 lux zu verzeichnen. Für die Fütterung in den Biotests wurde der Erstaustrieb vegetativer Kartoffeltriebe von 15-20 cm Länge verwendet. Die Fütterung der Dauerzucht und Subpopulationen fand neben dem Erstaustrieb auch mit dem Sekundäraustrieb der Pflanzen statt.

2.11.2 Haltungsbedingungen der Dauerzucht und Subpopulationen

Die Basis für die Biotests zur Untersuchung des Einflusses eines veränderten Kohlenhydratstatus in Folge der gentechnischen Veränderung auf die Entwicklung des Kartoffelkäfers bildete eine langjährig im Labor gehaltene diapausefreie Dauerzucht des Kartoffelkäfers, überwiegend auf dem Laub der Kartoffelsorte Désirée. Die Erhaltung der Zucht fand im separierten Raum (Insektarium) statt, wo in Abhängigkeit von der Jahreszeit Temperaturbedingungen von 20-28 °C herrschten. Durch eine 16-stündige Zusatzbeleuchtung (Osram Cool White L36W/640U) von 13000-16000 lux wurde für Langtagbedingungen gesorgt. Für eine neue Generation wurden 15-20 Eigelege von seit 2

bis 3 Wochen reproduktionsfähigen Weibchen entnommen und zum Schlupf auf ein mit Filterpapier ausgelegtes Gitter gelegt. Das Gitter befand sich zwischen zwei Glasschalen, wobei die untere Glasschale mit Wasser gefüllt war. Dadurch wurde ein Vertrocknen der Eier verhindert. Nach 5-6 Tagen begann der Larvenschlupf. Die Larven wurden dann in mit Filterpapier ausgelegte Glasschalen (\varnothing 25 cm, Höhe 7-10 cm) überführt und mit frischem Kartoffellaub der Sorte Désirée aus der Gewächshausanzucht gefüttert. In jeder Glasschale befanden sich zwischen 50-60 Larven. Pro Generation wurden ca. 300 Larven bis zum L₄-Stadium angezogen. Bis zur Entwicklung der L₄-Larven wurden die Glasschalen zweimal wöchentlich gereinigt und die Larven mit frischem Laub gefüttert. Im L₄-Stadium wurden 100-150 Larven auf Schalen (L/B/T 60/30/10 cm) aufgesetzt, in denen sich 12-16 in Fruhstorfer Topferde (Typ T, Industrie-Erdenwerk Archut, Lauterbach-Wallenrod) gepflanzte Kartoffelstauden mit einer Trieb länge von 30-40 cm befanden. Im Anschluss fand die Aufstellung der Schalen in Insektenkäfige (H/B/T 100/70/55 cm) mit Langtagbedingungen statt. Bis zur Abwanderung aller Larven zur Verpuppung in die Erde wurde nach Bedarf frisches Kartoffellaub in die Insektenkäfige gegeben. Während der Verpuppung der Larven wurde die Erde feucht gehalten. Ca. 2 Wochen nach Abwanderung der ersten Larven begann der Schlupf der Adulten aus der Erde. Die Entnahme aus den Insektenkäfigen und Überführung der Käfer in mit Filterpapier ausgelegte und frischem Kartoffellaub gefüllte Glasschalen (\varnothing 25 cm, Höhe 7-10 cm) erfolgte täglich. Dabei wurden 60 Käfer/Glasschale gehalten, die zweimal wöchentlich gereinigt und frisch gefüttert wurden. Nach Abschluss des Reifungsfraßes (2-3 Wochen nach Schlupf) begann die Eiabnahme für die nächste Generation.

Um eine langfristige Auswirkung des veränderten Kohlenhydratstatus der transgenen Linien auf die Entwicklung des Kartoffelkäfers zu untersuchen, wurden ab Februar 2002 neben der Dauerzucht noch 7 diapausefreie Subpopulationen des Kartoffelkäfers auf Gewächshauslaub der 6 transgenen Linien und des Wildtyps (Désirée aus Gewebekultur) aufgebaut. Die Haltung der Subpopulationen erfolgte ebenfalls im Insektarium und fand in Anlehnung an die oben beschriebene Dauerzucht statt. Im Gegensatz zu der Dauerzucht erfolgte die Anzucht von 100 Larven/transgener Linie in mit Filterpapier ausgelegten Plastischalen (L/B/T 35/20/10 cm), die mit Vlies abgedeckt wurden. Die Verpuppung der L₄-Larven fand dabei in mit Fruhstorfer Topferde (Typ T, Industrie-Erdenwerk Archut, Lauterbach-Wallenrod) gefüllten Pflanzcontainern (\varnothing 27 cm, Höhe 20,5 cm) statt. Pro Subpopulation wurden 60 L₄-Larven in 2 Pflanzcontainer zur Metamorphose aufgesetzt. In der 5. Generation kam es zum Zusammenbruch der Subpopulationen auf den transgenen

Linien SST#36 und SST/FFT#22/30.

2.11.3 Larvengewichte

Für die Bestimmung der Larvengewichte unter **Laborbedingungen** wurden die reproduktionsfähigen Weibchen der Dauerzucht bzw. Subpopulation mit frischem Laub gefüttert und die Eigelege über einen Zeitraum von 8 h gesammelt. Zum Schlupf wurden die Eigelege auf ein mit Filterpapier ausgelegtes Gitter ausgebreitet. Um das Eintrocknen der Eier zu verhindern, befand sich das Gitter auf einer mit Wasser gefüllten Schale und wurde mit einer weiteren Glasschale abgedeckt. Der Schlupf der Larven begann nach 5 Tagen bei einer Temperatur von 22 °C und 16-stündiger Beleuchtung bei 10.000 lux im Klimaschrank. Für die Biotests wurden vitale ca. 48 h alte L₁-Larven mit einem Gewicht von 0,9-1 mg verwendet. Pro Wiederholung einer Variante wurden 20 Larven in mit Filterpapier ausgelegte Plastikschaalen (L/B/T 20/10/7 cm) eingewogen. Nach Zugabe von 3-4 ca. 15-20 cm langen abgeschnittenen Kartoffeltrieben und Verschluss der Schalen mit einem durchsichtigen und durchlöcherten Deckel erfolgte die Aufzucht der Larven bei 24 °C, 70 % relativer Luftfeuchte und 16 h Beleuchtung von 10.000 lux im Klimaschrank. Pro Variante erfolgte der Ansatz von 5-6 Schalen. Durch die tägliche Zugabe von frischen Kartoffeltrieben wurde für eine ausreichende Fütterung der Larven gesorgt, wobei die tägliche Futterzugabe mit zunehmender Larvengröße gesteigert wurde. Bis zur Entwicklung der Larven ins L₄-Stadium erfolgte die Wägung der Larven am 3.-5., 7., 9. und 11. Tag in Abhängigkeit des Versuchansatzes, wobei die Larven mittels Haarpinsel vorsichtig aus dem Laub einer Schale gesammelt und zusammen gewogen wurden. Tote Larven oder stark in der Entwicklung zurückgebliebene Larven gingen nicht mit in die Wägung ein.

Im Gegensatz zu den Biotests unter Laborbedingungen bildeten für die Bestimmung der Larvengewichte unter **Freilandbedingungen** L₂-Larven der Dauerzucht mit einem mittleren Larvengewicht von 10 mg den Ausgangspunkt. Grund hierfür war, dass in Voruntersuchungen mit L₁-Larven unter Freilandbedingungen zum Teil hohe Mortalitäten auftraten. Die Eiabnahme und Haltungsbedingungen bis zum Schlupf der Larven entsprachen denen der Laborbiotests. Die Fütterung der Larven bis zum Ansatz im Freiland erfolgte einheitlich mit Gewächshauspflanzen der Sorte Désirée. Die Haltung fand bei Temperaturen von 22 °C und 16 h Beleuchtung von 10.000 lux im Klimaschrank statt. Der Versuch begann am 11.07.2003. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Freilandpflanzen im BBCH-Stadium 60-69. Nach Einwaage von 20 Larven/Wiederholung

wurden die Larven in ein Gazesäckchen (L/B 25/10 cm) überführt und an einen Augenaustrieb einer Freilandstaude des Freisetzungsvorganges lokalisiert. Vor Verwendung eines Augenaustriebes wurde dieser auf Eigelege, Larven und Kartoffelkäfer des natürlichen Befalls untersucht und dieser bei Bedarf entfernt. Pro Variante fand der Ansatz von 4 Wiederholungen statt. Für die Wägung wurde der Augenaustrieb unterhalb des Gazesäckchens abgeschnitten und die Larven mittels Haarpinsel vorsichtig aus dem Laub gesammelt. Die Wägungen fanden am 8., 11. und 13. Tag nach dem Larvenschlupf statt. Nach der Wägung wurden die Gazesäckchen mit den Larven an einem neuen Augenaustrieb der Stauden im Freisetzungsvorgang gebunden. Die für die Untersuchung der Larvengewichte verwendeten Stauden befanden sich in einer Wiederholung des Freisetzungsvorganges und wurden während der gesamten Vegetationszeit durch die vorherige Abdeckung mit Folie frei von Pflanzenschutzmitteln gehalten.

2.11.4 Reproduktion

Zur Untersuchung des Einflusses der Nahrungsqualität auf die Reproduktion der Kartoffelkäferweibchen wurden je 60 L₄-Larven der Dauerzucht und der Subpopulationen für die Verpuppung auf 3 mit feuchter Frühstorfer Topferde (Typ T, Industrie-Erdenwerk Archut, Lauterbach-Wallenrod) gefüllte Blumentöpfe (H/B 12/12 cm) aufgeteilt, mit dem Kartoffellaub der Varianten aus dem Gewächshaus gefüttert, mit Vlies abgedeckt und in einer Klimakammer (Weiss) bei 24 °C und 16-stündiger Beleuchtung von 10.000 lux aufgestellt. Nach vollständiger Abwanderung der Larven erfolgte die Entfernung noch vorhandener Pflanzenreste von der Erde. Während der Verpuppungsphase wurde die Pflanzerde feucht gehalten. Ca. 12 Tage nach beginnender Abwanderung war der erste Schlupf der Käfer zu verzeichnen. Die Absammlung der Käfer erfolgte täglich aus den Blumentöpfen und alle Käfer einer Variante wurden in mit Filterpapier ausgelegte Plastikschaalen (H/T/B 20/35/10 cm) überführt. Die Schalen waren mit Kartoffellaub der Varianten aus dem Gewächshaus gefüllt und mit Vlies abgedeckt. Während der Reifungsphase fand die tägliche Fütterung der Käfer und die zweimal wöchentliche Reinigung der Schalen statt. Um eine höhere Ausbeute an Eigelegen und eine ungestörte Eientwicklung zu erzielen, wurde ca. 2 Wochen nach Schlupfbeginn die Anzahl der männlichen Kartoffelkäfer/Variante auf 5 reduziert. Die Auswahl erfolgte dabei visuell über die kleinere Körpergröße und fehlende Wölbung des Abdomens. Drei Wochen nach der Hauptschlupfphase der Käfer begannen die Reproduktionsversuche. Dafür wurden 10 Weibchen/Variante mit stark gefüllten Ovarien zu Beginn der Beleuchtungsphase in 10

Plastikschalen (L/B/T 11/11/6 cm) für 24 h separiert. Die Schalen waren mit Filterpapier ausgelegt und enthielten jeweils eine Triebspitze mit 3-5 ausgebildeten Blättern von frisch abgeschnittenen Gewächshauspflanzen. Abgedeckt waren die Schalen mit einer Lage von Cellophantüchern und verschlossen mit einem durchlöcherten, durchsichtigen Deckel. Die Klimabedingungen waren konstant 26 °C, 16 h Beleuchtung von 10000 lux und 80-85 % rel. Luftfeuchtigkeit. Nach 24 h wurden die Weibchen wieder in die Kunststoffschalen der Varianten überführt und die abgelegten Eier/Weibchen auf Filterpapier auf eine durchlöchernte Kunststoffplatte ausgelegt und mit einer Glasschale abgedeckt. Die Kunststoffplatte lag auf einer mit Wasser gefüllten Schale. Unter einem Binokular bei einer 2-fachen Vergrößerung erfolgte die Auszählung der Eier/Weibchen. Nach 4 bis 5 Tagen konnte von den abgelegten Eiern die Larvenschlupfrate [%] durch die Anzahl geschlüpfter Larven/Weibchen ermittelt werden. Im Abstand von 2 Tagen fand die dreimalige Wiederholung des Biotests statt.

Neben den Reproduktionsversuchen mit der Dauerzucht und den Subpopulationen wurde aus dem Larvenbiotest im Freiland (s. 2.11.3) der Einfluss der larvalen Fütterung mit den Varianten auf die Reproduktion der Weibchen im Gewächshaus untersucht. Zur Verpuppung wurden die L₄-Larven des Freilandbiotests nach der letzten Wägung auf mit Fruhstorfer Topferde (Typ T, Industrie-Erdenwerk Archut, Lauterbach-Wallenrod) gefüllte Blumentöpfe (H/B 12/12 cm) überführt und in der Klimakammer bei 24 °C, 16-stündiger Beleuchtung von 10.000 lux und 80-85 % rel. Luftfeuchtigkeit aufgestellt. Pro Variante erfolgte die Abwanderung in 4 Töpfen. Bis zur vollständigen Abwanderung fand die Fütterung der Larven mit abgeschnittenen Freilandpflanzen der Varianten nach Bedarf statt. Nach der Abwanderung wurden die Pflanzenreste der Varianten aus den Töpfen entfernt und die Käfer ab dem Schlupf bis zu den Reproduktionsversuchen einheitlich mit Gewächshauspflanzen der Kartoffelsorte Désirée gefüttert. Die Aufzucht der Käfer bis zum Reproduktionsversuch als auch der Reproduktionsversuch fand analog zur Dauerzucht und den Subpopulationen statt.

2.11.5 Natürlicher Befall im Freisetzungsversuch

In den Vegetationsperioden 2001 und 2003 erfolgte in den Parzellen des Freisetzungsversuches die Ermittlung des natürlichen Kartoffelkäferbefalls über vorhandene Eigelege an den Stauden. Die Zählung fand im Anbaujahr 2001 am 1.6. und 2003 am 7.6. statt. Dies war jeweils der Zeitpunkt, wo über das Simulationsprogramm SIMLEP (Paso 2005.1 für Windows, © Zentralstelle der Länder für EDV-gestützte

Entscheidungshilfen und Programme im Pflanzenschutz (ZEPP)) der stärkste Primärbefall des Kartoffelkäfers prognostiziert wurde. Die Freilandpflanzen befanden sich dabei überwiegend im Knospenstadium (BBCH 51-55). Die Bonitur erfolgte über die 4 Wiederholungen der Varianten. In jeder Teilparzelle wurde in der 2., 4., 6. und 8. Reihe an der 1., 4., 8. und 12. Pflanze die Anzahl der Eigelege gezählt, woraus die mittlere Anzahl Eigelege/Pflanze für jede Wiederholung ermittelt wurde.

2.11.6 Käfigversuche

Bei der Bonitur des natürlichen Kartoffelkäferbefalls der Varianten war in der Vegetationsperiode 2001 ein möglicher Einfluss der Lage der Teilparzellen in den Wiederholungen zu erkennen. Es deutete sich an, dass die Teilparzellen, die in direkter Nachbarschaft zu den Überwinterungsflächen des Kartoffelkäfers lagen (Kartoffelflächen 2000), einen stärkeren Kartoffelkäferbefall aufwiesen. Zur Abschätzung der Präferenz des Kartoffelkäfers, unabhängig von einem möglichen Randeffekt, wurden in den Vegetationsperioden 2002 und 2003 Untersuchungen in 8 Großkäfigen à 12 m² mit frisch geschlüpften Käfern der Dauerzucht durchgeführt. In der Vegetationsperiode 2002 bestand die Versuchsfrage darin, ob sich die Nahrungspräferenz der Käfer in Abhängigkeit von der Entfernung zur Futterpflanze unterscheidet. Dies wurde dadurch simuliert, dass in je 4 Käfigen die frisch geschlüpften Käfer direkt an die Pflanze oder zentriert im Käfig ausgebracht wurden. Im Anbaujahr 2003 wurde die Präferenz der Käfer in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Futterpflanzen untersucht, was durch die zweimalige Ausbringung von frisch geschlüpften Käfern der Dauerzucht an die Pflanzen in den 8 Käfigen erfolgte.

Die Großkäfige besaßen die Abmessungen von 4 m Länge und 3,5 m Breite, um die Pflanzung von 48 Knollen in 4 Reihen (à 0,75 m Abstand) à 12 Knollen zu ermöglichen (Abb. 2-8). Pro Käfig wurden je 4 Knollen der 6 transgenen Linien, dem Wildtyp und den 5 Vergleichssorten parallel zur Pflanzung des Freisetzungversuches gelegt. Die Verteilung der 4 Knollen/Variante im Käfig erfolgte so, dass pro Reihe alle Varianten vertreten waren und jede Reihe randomisiert war (Anlagepläne Abb. 8-5 und 8-6 im Anhang).

In Folge der Versuchsfrage der Vegetationsperiode 2002 war die Verteilung der Knollen über 2 Käfige identisch, während im Anbaujahr 2003 alle 8 Käfige eine differenzierte Verteilung der Knollen aufwiesen. Die Saatbettvorbereitung, die Düngung, der Dammaufbau und die Herbizidmaßnahme erfolgten analog zum Freisetzungversuch. Im Anschluss an die Herbizidmaßnahme wurden die Großkäfige über die Pflanzen aufgestellt.

Die Bespannung der Großkäfige mit Gemüseschutznetzen von 2 mm Maschenweite (Rantai K) verhinderte sowohl ein Entkommen als auch einen natürlichen Befall der Kartoffelstauden mit dem Kartoffelkäfer.



Abb. 2-8: Anordnung der Großkäfige und Pflanzenwachstum im Großkäfig in der Vegetationsperiode 2002.

Parallel zur Aufstellung der Großkäfige begann die Aufzucht der Käfer im Gewächshaus für die Freilassung. Zunächst wurden über mehrere Tage zweimal täglich die Eigelege der Kartoffelkäferdauerzucht gesammelt. Für eine gesteigerte Eiablage waren die tägliche Einfütterung der Weibchen mit frischen Kartoffeltrieben der Sorte Désirée aus der Gewächshausanzucht und die Trennung von den Männchen notwendig. Die Haltung der ca. 4000 gesammelten Eier fand bis zum Schlupf der Larven bei 24 °C und bei 16/8 h Beleuchtung von 10.000 lux im Klimaschrank zwischen zwei Glasschalen (s. 2.11.3) statt. Nach Schlupf der Larven erfolgte deren Überführung in mit Filterpapier ausgelegte Plastischalen (L/B/T 35/20/10 cm; 300 Larven/Schale) und bis zum L₄-Stadium die tägliche Fütterung nach Bedarf mit frischem Kartoffellaub der Sorte Désirée und die Reinigung der Schalen. Die Abdeckung der Schalen bestand aus lichtdurchlässigem Vlies und die Anzuchtbedingungen entsprachen dem der Eigelege. Über einen Zeitraum von mehreren Tagen fand das Aufsetzen von jeweils 900 bis 1.200 L₄-Larven zur Verpuppung auf mit Kartoffelpflanzen bewachsenen Schalen (L/B/T 60/30/10 cm; 300 Larven/Schale) im Gewächshaus statt. Die Abdeckung der Schalen erfolgte wiederum mit Vlies. Die Haltungsbedingungen betragen 24/20°C und 16 h Beleuchtung von mindestens 10.000 lux. Bis zur Abwanderung aller Larven wurde nach Bedarf abgeschnittenes Kartoffellaub in den Schalen zugefüttert. Insgesamt wurden 3.000 L₄-Larven zur Verpuppung für jede Ausbringung in die Großkäfige aufgesetzt. Mit beginnendem Käferschlupf erfolgte die täglich mehrmalige Absammlung der Käfer. Die Käfer wurden für die Ausbringung von 5 Käfern/Pflanze in den Großkäfigen in einem Verhältnis von 2 Weibchen, 2 Männchen und

einem Käfer, dessen Geschlecht nicht genau definiert werden konnte, sortiert. Die Differenzierung des Geschlechtes erfolgte über die Käfergröße, da es sich bei den größeren Käfern meist um Weibchen handelte, während die Männchen die kleineren Käfer waren. In der Vegetationsperiode 2002 wurden die Käfer für die Ausbringung direkt an die Pflanze in 48 Plastikbechern mit je 5 sortierten Käfern/Pflanze separiert. In den Großkäfigen erfolgte die Entleerung der Becher an jeder Pflanze. Für die zentrierte Ausbringung der Käfer wurden 240 Käfer im Geschlechterverhältnis 2W./2M./1 Käfer unbekanntes Geschlechts in einer Plastikschaale sortiert und in der Mitte des Großkäfigs entleert. In der Vegetationsperiode 2003 entsprach die Sortierung und Freilassung der Käfer in den Großkäfigen der zentrierten Ausbringung des Anbaujahres 2002. Der genaue zeitliche Ablauf der Anzucht der Kartoffelkäfer beider Vegetationsperioden ist Tabelle 2-8 zu entnehmen.

Tab. 2-8: Zeitliche Abfolge der Kartoffelkäferanzucht im Gewächshaus für die Detailuntersuchungen in den Großkäfigen in den Vegetationsperioden 2002 und 2003.

2002		2003			
1. Ausbringung		1. Ausbringung		2. Ausbringung	
30.5.-1.6.	Eiabnahme	13.5.-16.5.	Eiabnahme	2.6.-6.6.	Eiabnahme
Ab 6.6.	Larvenschlupf	Ab 18.5.	Larvenschlupf	Ab 8.6.	Larvenschlupf
14.6.-18.6.	L ₄ -Larven aufgesetzt	27.5.-30.5.	L ₄ -Larven aufgesetzt	18.6.-21.6.	L ₄ -Larven aufgesetzt
Ab 29.6.	Käferschlupf	Ab 7.6.	Käferschlupf	Ab 30.6.	Käferschlupf
30.6.-3.7.	Käfer in Großkäfige	11.6.-13.6.	Käfer in Großkäfige	9.7.-12.7.	Käfer in Großkäfige
23.7.-28.7.	Bonitur Eigelege/Pflanze	1.7.-8.7.	Bonitur Eigelege/Pflanze	29.7.-1.8.	Bonitur Eigelege/Pflanze

Drei bis vier Wochen nach der Ausbringung der Käfer fand die Auszählung in den Großkäfigen statt. Dabei wurden die Eigelege/Pflanze sowie alle Käfer aus den Käfigen abgesammelt und gezählt. Nach Bestimmung des Geschlechts aller Käfer eines Käfigs über die Wölbung des Abdomens wurde die Anzahl Eigelege/Pflanze durch die Anzahl der Weibchen/Käfig korrigiert. Aus den 4 Pflanzen/Variante eines Käfigs erfolgte die Ermittlung der mittleren Anzahl Eigelege/Weibchen/Variante. In der Vegetationsperiode 2003 erfolgte nach der Bonitur der 1. Ausbringung eine Behandlung der Pflanzen mit

Novodor (3 l/ha), um die Weiterentwicklung von übersehenen Larven an den Pflanzen zu verhindern.

2.11.7 Genotypische Variabilität (RAPD-PCR)

Die Abschätzung des langfristigen Effektes der Fütterung des Kartoffelkäfers mit einer veränderten Kohlenhydratquelle auf sein genetisches Muster (Selektion bestimmter Genotypen) fand über die Untersuchung der DNA aus Eigelegen der Subpopulationen mittels 11 RAPD-Primer in der PCR statt. Dazu wurden aus 5 Eigelegen jeder Generation der Subpopulation 2 Proben je 10 mg in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß eingewogen und bei -80 °C bis zur DNA-Extraktion eingefroren. Zur „DNA-Vermehrung“ in den Kartoffelkäfereiern erfolgte zunächst für 48 h die Aufstellung der Eigelege bei 20-24 °C und 16 h Beleuchtung zwischen zwei Glasschalen. Die Extraktion der DNA fand nach der unter 2.6.1 beschriebenen modifizierten Methode von DELLAPORTA ET AL. (1983) statt. Nach der Extraktion wurde die DNA-Konzentration [ng/μl] aller Proben im Bio-Photometer (Eppendorf, 6131) ermittelt und auf eine DNA-Konzentration von 1-50 ng/μl für die RAPD-PCR eingestellt.

Als Primer wurden 11 Basensequenzen gewählt, die sich auch zur Differenzierung des genetischen Musters des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis*) eignen (LIEBE, 2004) und deren Basensequenz in Tabelle 2-9 aufgelistet ist.

Tab. 2-9: Bezeichnung und Basensequenz der 11 RAPD-Primer zur Differenzierung des genetischen Musters des Kartoffelkäfers.

Bezeichnung	Basensequenz
OPA-07	5'-GAA ACG GGT G-3'
OPB-01	5'-GTT TCG CTC C-3'
OPB-08	5'-GTC CAC ACG G-3'
OPC-15	5'-GAC GGA TCA G-3'
Roth-A-11	5'-CAA TCG CCG T-3'
Roth-A-16	5'-AGC CAG CGA A-3'
Roth-A-18	5'-AGG TGA CCG T-3'
Roth-A-19	5'-CAA ACG TCG G-3'
Roth-A-20	5'-GTT GCG ATC C-3'
MWG180-08	5'-CGC CCT CAG C-3'
MWG280-08	5'-GGC CAC AGC G-3'

Nach der DNA-Isolierung erfolgte der Ansatz des Reaktionsgemisches für die PCR in 0,2 ml Eppendorfgefäße. Die Gefäße waren vorher 15 Minuten unter UV-Licht sterilisiert worden. Das Reaktionsgemisch (15 µl) enthielt folgende Komponenten: 0,3 µl *Taq*-Stoffelfragment (10U/µl, Applied Biosystems), 1,5 µl 10xStoffelpuffer (Applied Biosystems), 1,6 µl MgCl₂ (25 mM); 0,3 µl dNTP (10 mM), 0,3 µl Primer (10 µM) und 2 µl DNA Kartoffelkäfereier (1-50 ng/µl). Nach Durchmischung der Proben durch Zentrifugation von 30 sec. bei 5000 rpm fand die PCR im PTC-200-Thermocycler (Biozym) unter dem in Tabelle 2-10 aufgeführten Programm statt.

Tab. 2-10: Thermocycler-Programm für die RAPD-PCR der Kartoffelkäfereier auf einem PTC-200 (Biozym) mit einer Heizdeckeltemperatur von 105 °C.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [Min.]	Ramp [°C/s]
Initial-Denaturierung	94	2:30	
10 Zyklen			
Denaturierung	92	1:00	
Annealing	38	0:30	0,3
DNA-Amplifikation	72	1:00	
30 Zyklen			
Denaturierung	92	0:20	
Annealing	38	0:15	0,3
DNA-Amplifikation	72	1:00	
Abschluss			
Final-Extension	72	8:00	
Kühlung	4	∞	

Bis zur Elektrophorese wurde das PCR-Produkt bei Bedarf bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Elektrophorese fand in 1,5 %-igem Agarosegel mit 1xTAE-Puffer statt, deren Herstellung, wie unter 2.6.4 beschrieben, erfolgte. Nach Aushärtung des Gels im Gelträger erfolgte die Beladung der Geltaschen mit 10 µl des Gemisches aus 15 µl PCR-Produkt mit 3 µl 6-fach Gelladungspuffer. Die Trennung des PCR-Produktes fand in 1x-TAE-Puffer bei einer Spannung von 150 V über 4 h statt, woraus sich 450 Vh ergaben. In der Zeit wurde der Puffer über eine Wasserkühlung auf 10 °C gekühlt. Durch die Beladung von 2 Geltaschen mit 10 µl eines Markers (100 bp, Pharmacia) wurde die Größe der amplifizierten Banden identifiziert. Die Färbung und Aufnahme der Gele fand analog zu

2.6.5 statt. Die Auswertung der Banden erfolgte zunächst visuell (vorhanden bzw. nicht vorhanden).

Die numerische Auswertung der Bandenprofile erfolgte über die Clusteranalyse, in der die Populationen nach ihren genetischen Distanzen bzw. Ähnlichkeit gegliedert wurden. Dazu wurden die Bandenmuster aller Primer einer Subpopulation und Generation in eine 0/1-Matrix übersetzt, wobei dem Vorhandensein einer Bande eine 1 und der Abwesenheit eine 0 zugeordnet wurde. Mit Hilfe des Programms MVSP Version 3.1 (KOVACH, 1999) erfolgte die Berechnung des Ähnlichkeitskoeffizienten nach NEI & LI (1979):

$$S = \frac{2n_{xy}}{n_x + n_y}$$

n_x bzw. n_y : Anzahl der ausgeprägten Merkmale (Banden) innerhalb einer Subpopulation

n_{xy} : Anzahl der gemeinsamen Merkmale zweier Subpopulationen

Der Ähnlichkeitskoeffizient steht mit der genetischen Distanz (GD) in folgender Beziehung:

$$\text{Genetische Distanz (GD)} = 1 - \text{Ähnlichkeitskoeffizient (S)}$$

Durch den Ähnlichkeitskoeffizienten konnte die genetische Distanz einer Subpopulation im Verhältnis zu anderen Subpopulationen dargestellt werden. Genetische Distanzen verhalten sich analog zu geometrischen Distanzen. Das bedeutet, eine genetische Distanz von 0 (Ähnlichkeitskoeffizient von 1) stellt keinen genetischen Unterschied zwischen den Subpopulationen dar.

Der Ähnlichkeitskoeffizient stellte die Grundlage für die Anwendung der numerischen Clusteranalyse nach dem UPGMA-Algorithmus (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*) unter MVSP dar, deren Ergebnis im Dendrogramm graphisch dargestellt wurde. Die Überprüfung der Stabilität der Clusterung erfolgte über ein 100-maliges Bootstrapping unter Simstat Version 2.7 für Windows (Copyright 1996, Provalis Research). Dabei wurde 100-mal aus der vorhandenen Datenmatrix einer Generation eine zufällige Datenmenge ausgewählt und jeweils über den Ähnlichkeitskoeffizienten von NEI & LI (1979) geclustert. Dies führte zu 100 Pseudodendrogrammen, in denen die Häufigkeit des Auftretens der Verzweigung der ursprünglichen Datenmatrix per Hand ermittelt wurde. Eine Häufigkeit von über 60 % stellt eine gesicherte Gruppierung der

Subpopulationen dar. Bei Häufigkeiten unter 60 % ist eine eher zufällige Gruppierung nicht auszuschließen.

Des Weiteren wurde durch die 0/1-Matrix der Bandenmuster auch die Anzahl polymorpher Banden einer Generation ermittelt. Als polymorphe Banden wurden Banden gewertet, die nicht in allen Subpopulationen einer Generation auftraten.

2.12 Kohlenhydratbestimmung

Um einen Zusammenhang zwischen der veränderten Kohlenhydratzusammensetzung der transgenen Linien und der Reaktion der Schaderreger ermitteln zu können, wurden parallel zu den Ansätzen der Biotests Pflanzenproben zur Kohlenhydratbestimmung entnommen. Dabei erfolgte die Entnahme des Pflanzenmaterials jedoch nicht bei allen Biotests, sondern nur zu den in Tabelle 2-11 aufgeführten Terminen. Die Kohlenhydratgehalte der Knollen des Biotests zur Knollenfäule in der Vegetation 2001 dienten auch der Korrelation der Ergebnisse von *S. endobioticum*, da die Versuchsserien parallel angesetzt wurden.

Nach der Probenentnahme erfolgte die sofortige Schock-Gefrierung der Proben in flüssigem Stickstoff und weitere Lagerung bei -80 °C. Die Analyse der löslichen Kohlenhydrate und Fructane in den Pflanzenorganen fand durch den Verbundpartner Dr. A. Heyer am Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie der Max-Planck-Gesellschaft in Golm (Brandenburg) statt. Der Gehalt an löslichen Kohlenhydraten wurde über Anionen-Austauscherchromatographie (Dionex HPAEC-System) ermittelt, wobei auch die Fructane nach vorangegangener Oxalsäure-Hydrolyse über die freien Hexosen bestimmt wurden (HELLWEGE ET AL., 2000).

Tab. 2-11: Auflistung der Biotests mit Probennahme zur Kohlenhydratbestimmung und des Probenumfangs.

Schaderreger	Biotest	Probenumfang
<i>P. infestans</i> (Krautfäule)	1. Versuchsserie 2001	3 Pflanzen
	1. Versuchsserie 2003	3 Pflanzen
<i>P. infestans</i> (Knollenfäule)	1. Versuchsserie 2001	3 Knollen
<i>M. incognita</i>	1. Versuchsserie 2001	3 Pflanzen
<i>L. decemlineata</i> (Gewächshaus)	Larvengewichte 1. Generation (2001)	3 Mischproben à 3 Pflanzen
<i>L. decemlineata</i> (Freiland)	Freisetzungsversuch (16.6.03 und 14.7.03)	4 Mischproben à 5 Pflanzen

2.13 Statistische Auswertung

Die Konstruktion der Lagepläne des Freisetzungversuches und der Großkäfigversuche erfolgte unter dem Programmmodul Feld VA 3.6 in SAS. Für die Auswertung der Versuchsergebnisse wurden von den Daten die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen unter dem Programm Microsoft Excel Vers. 2000 berechnet. Von Untersuchungen, bei denen eine Wiederholung aus mehreren Beobachtungen (Stichprobenumfang) bestand (Freisetzungversuch, Großkäfige), ging in die Auswertung der gemittelte Wiederholungswert ein. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen SAS Vers. 6.12 und SigmaStat Vers. 3.1. Dabei wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) nach Überprüfung der Normalverteilung der Residuen angewandt. Nach Überprüfung der Varianzhomogenität mittels des Browns and Forsythe-Testes erfolgte Post hoc der Dunnett-Test bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) von 5 %. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$ (*) war. Keine Unterschiede traten auf, wenn $p > 0,05$ (n.s.) war. Bei fehlender Normalverteilung erfolgte die nichtparametrische Varianzanalyse über den Kruskal-Wallis-H-Test und die Post hoc Auswertung über den Dunn`s-Test bei unbalancierten Datensätzen und Dunnett-Test bei balancierten Datensätzen.

Inwieweit ein Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen bestand, wurde über den Pearsonschen Korrelationskoeffizienten (r) ermittelt. Lag der Wert $r < 0,5$ bestand kein Zusammenhang. Im Falle eines Zusammenhanges erfolgte die optimale Funktionsangleichung über das Programm SigmaPlot Vers. 8.0.

3. Ergebnisse

3.1 Entwicklung und Morphologie von transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp

3.1.1 Entwicklung der Bestände

3.1.1.1 Feldaufgang

Neben der Witterung nach der Pflanzung und dem physiologischen Alter der Pflanzknollen wird der Feldaufgang maßgeblich durch die Vorkeimung der Pflanzknollen beeinflusst.

In Folge zu warmer Lagerung nach der Ernte der Pflanzknollen befanden sich 2001 die Pflanzknollen ohne gezielte Vorkeimung zum Zeitpunkt der Pflanzung im vorgekeimten Zustand. Dabei wiesen die Pflanzknollen der SST-Linien und des Wildtyps wesentlich längere Keime auf als die der SST/FFT-Linien (Abb. 3-1a). Im Gegensatz dazu wurde in den Vegetationsperioden 2002 und 2003 durch optimierte Lagerung (4 °C, 90 % rLF) und gezielte Vorkeimung ein einheitlicher Zustand der Vorkeimung aller Kartoffellinien erreicht (Abb. 3-1b).

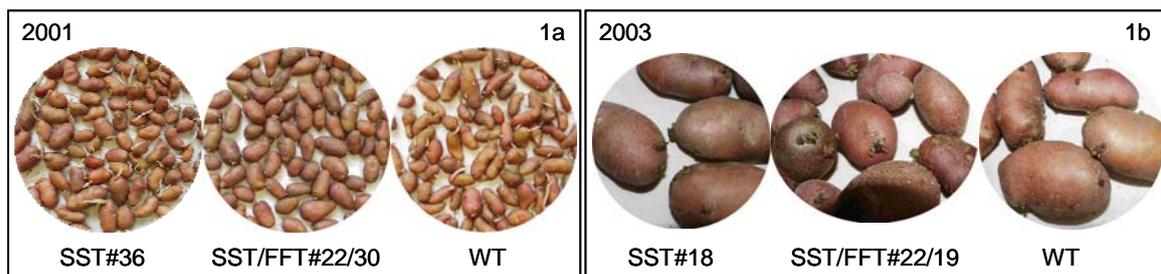


Abb. 3-1: Vorkeimung der Pflanzknollen zum Zeitpunkt der Pflanzung 2001 (links) und 2003 (rechts).

Den Feldaufgang der transgenen Linien und des Wildtyps über die drei Vegetationsperioden 2001, 2002 und 2003 zeigt Abbildung 3-2.

Mit einem relativen Feldaufgang der SST/FFT-Linien unter 5 % 22 Tage nach Pflanzung 2001 lag dieser unter dem des Wildtyps mit 16 % und der SST-Linien 20 und 36 mit 36 %. In dem Vegetationsjahr 2002 betrug der relative Feldaufgang der SST/FFT-Linien 17 Tage nach Pflanzung 5-10 %, der des Wildtyps 60 % und der der SST-Linien 55-60 % und war innerhalb eines Konstruktes relativ homogen. Der relative Feldaufgang der Vegetationsperiode 2003 lag 21 Tage nach Pflanzung bei den SST/FFT-Linien zwischen 6-21 %, dem Wildtyp bei 39 % und den SST-Linien 20 und 36 bei 49 bzw. 41 %. Im Gegensatz zum Anbaujahr 2002 war der Feldaufgang in den Jahren 2001 und 2003 innerhalb der Konstrukte nicht homogen.

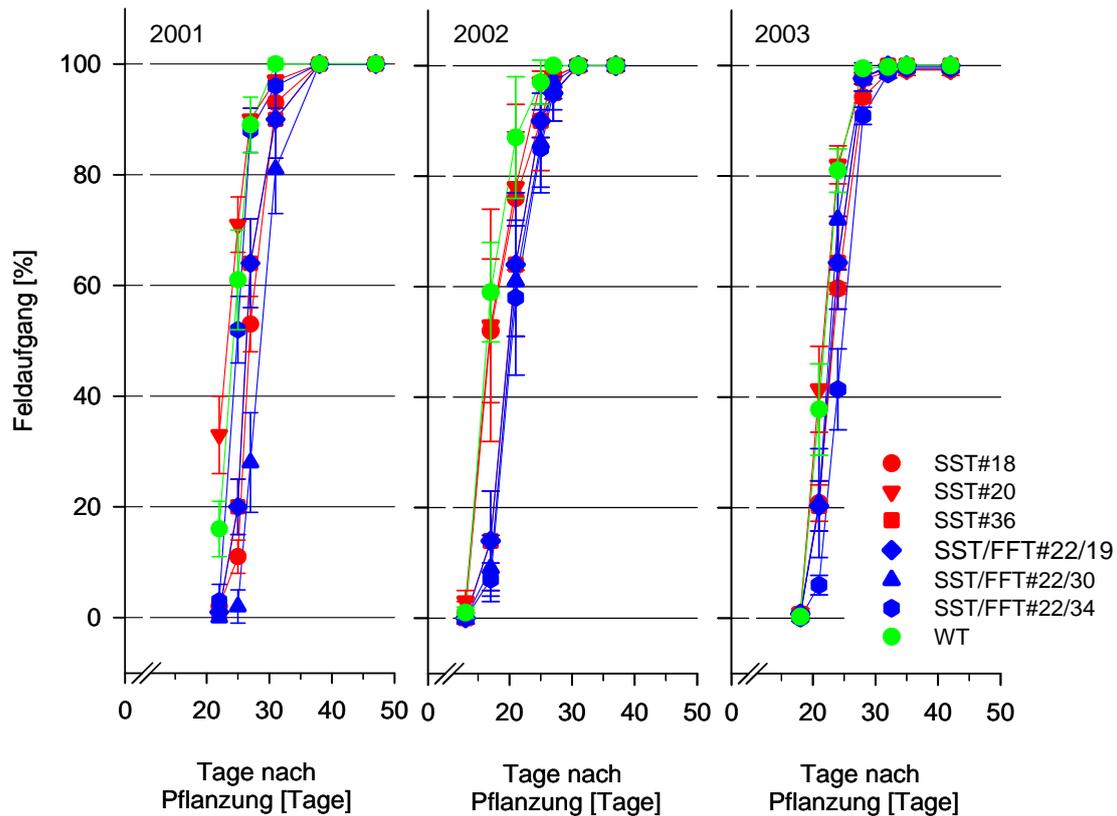


Abb. 3-2: Feldaufgang der transgenen Linien und des Wildtyps in den Vegetationsperioden 2001, 2002 und 2003. Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Wiederholungen à 96 Pflanzknollen \pm SD.

In den drei Vegetationsperioden 2001 bis 2003 unterschied sich in Folge der Witterung sowohl der Beginn des Feldaufgangs nach der Pflanzung (22 Tage, 13 Tage bzw. 18 Tage) als auch die Dauer bis zum 100 %-igen Feldaufgang, die 16 Tage, 18 Tage bzw. 14 Tage betrug. Unabhängig von der Vorkeimung der Pflanzknollen und der Witterung nach Pflanzung war der Beginn des Feldaufgangs der SST/FFT-Linien in allen drei Anbaujahren im Vergleich zum Wildtyp und einigen SST-Linien verzögert. Dieser Unterschied im frühen Feldaufgang zwischen den SST/FFT-Linien und Wildtyp wurde bis zum Ende der Feldaufgangsphase minimiert. Bei allen transgenen Linien und dem Wildtyp gab es in den drei Vegetationsperioden nur geringe Ausfälle von Pflanzknollen nach der Pflanzung.

3.1.1.2 Knospen- und Blütenstadium

Nach Abschluss der Feldaufgangsphase wurde die Entwicklung der Pflanzen durch die regelmäßige Bonitur des BBCH-Stadiums erfasst.

Fünf Wochen bzw. 3 Wochen nach beginnendem Feldaufgang 2001 bzw. 2002 und 2003 hatten die Haupttriebe der Stauden das Knospenstadium (BBCH 51-59) erreicht (Abb. 3-3), wobei sich der Anteil von Pflanzen im Knospenstadien in Abhängigkeit von

der Linie unterschied.

In der Vegetationsperiode 2001 befanden sich beim Wildtyp 5 Wochen nach Feldaufgang etwa 88 % der Pflanzen im Knospenstadium. Der Anteil der Pflanzen der SST/FFT-Linien betrug zu diesem Zeitpunkt nur 6-43 % und war gegenüber dem Anteil des Wildtyps signifikant reduziert, ebenso wie die SST-Linie 18 mit einem Anteil von 17 %. Im Gegensatz dazu unterschied sich der Anteil im Knospenstadium befindlicher Pflanzen der SST-Linien 20 und 36 mit 83 bzw. 94 % nicht vom Wildtyp.

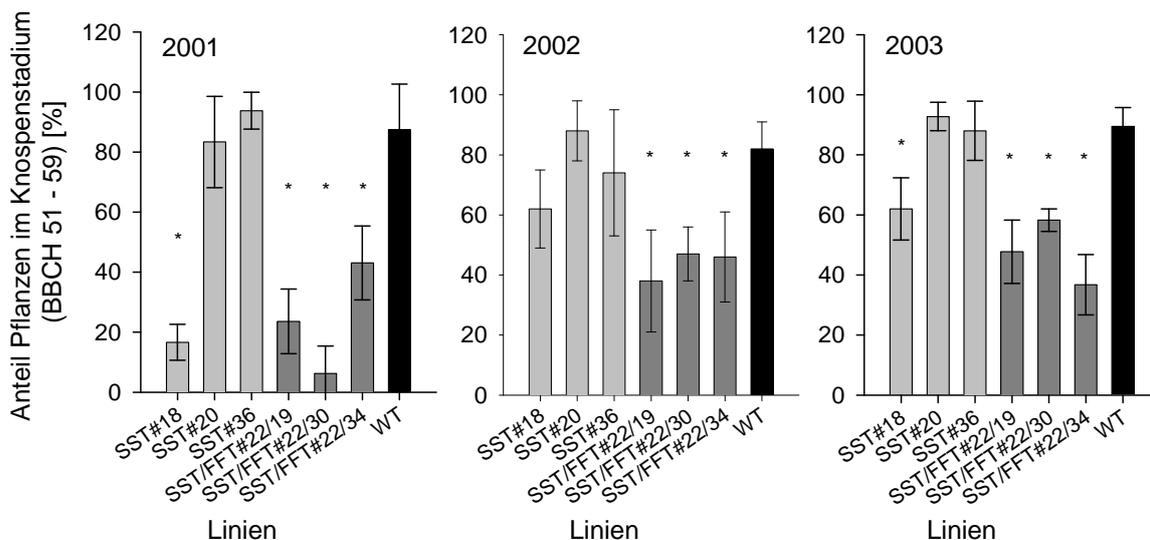


Abb. 3-3: Anteil Pflanzen im Knospenstadium 5 Wochen nach Feldaufgang 2001 und 3 Wochen nach Feldaufgang 2002 und 2003. Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Wiederholungen à 36 Pflanzen \pm SD. * symbolisieren signifikante; n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

Der Anteil von Pflanzen im Knospenstadium betrug in der Vegetationsperiode 2002 beim Wildtyp 92 %. Der Anteil der Pflanzen der SST/FFT-Linien lag zu diesem Zeitpunkt nur zwischen 38-47 % und war signifikant reduziert gegenüber dem Anteil der Wildtyppflanzen. Bei den SST-Linien betrug der Anteil im Knospenstadium befindlicher Pflanzen zwischen 62-88 % und unterschied sich nicht vom Wildtyp. Auch 2003 war der Anteil im Knospenstadium befindlicher Pflanzen der SST/FFT-Linien 3 Wochen nach Feldaufgang mit 37-58 % signifikant geringer als der der Wildtyppflanzen mit 90 %. Die SST-Linien 20 und 36, mit einem Anteil von 88 % und 93 %, unterschieden sich hingegen nicht vom Wildtyp, jedoch die SST-Linie 18 mit dem Anteil von 62 %.

Die zweiwöchige Verzögerung des Erreichens des Knospenstadiums 2001 im Vergleich zu den Vegetationsperioden 2002 und 2003 ist vermutlich auf die kühlere Vegetationsperiode 2001 zurückzuführen (s. Abb. 2-1). Die Feldaufgangsverzögerung der SST/FFT-Linien wurde nicht durch das oberirdische Staudenwachstum kompensiert. Unabhängig von der

Witterung nach dem Feldaufgang war der Anteil von Pflanzen im Knospenstadium bei den SST/FFT-Linien in allen drei Anbaujahren im Vergleich zum Wildtyp verringert.

Mit fortschreitender Vegetationsperiode erreichten die Pflanzen nach 7 Wochen im Jahr 2001 und nach 5 Wochen im Jahr 2003 das Blütenstadium (BBCH 61-69) (Abb. 3-4). In der Vegetationsperiode 2002 wurde der Freisetzungsversuch vor Erreichen des Blütenstadiums zerstört.

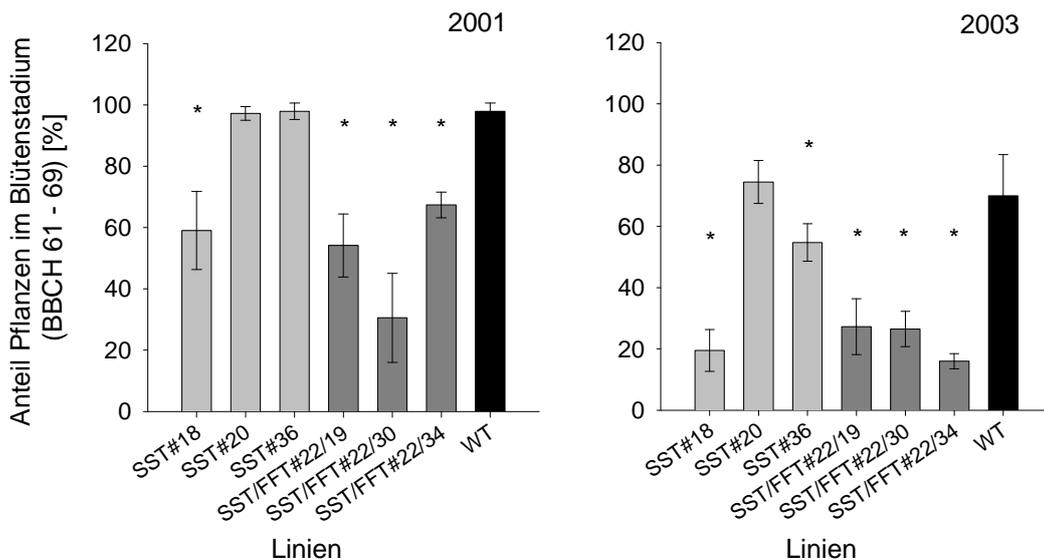


Abb. 3-4: Anteil Pflanzen im Blütenstadium 7 Wochen bzw. 5 Wochen nach Feldaufgang 2001 bzw. 2003. Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Wiederholungen à 36 Pflanzen \pm SD. * symbolisieren signifikante; n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

Der Anteil blühender Pflanzen der SST/FFT-Linien lag im Jahr 2001 zwischen 31-67 % und damit signifikant unter dem Anteil des Wildtyps mit 98 %. Die SST-Linien 20 und 36, mit je einem Anteil von 97 %, glichen dem Wildtyp, während die SST-Linie 18 mit nur 59 % blühender Pflanzen signifikant geringer war als der Wildtyp. Diese differenzierte Blütenentwicklung der Genotypen wurde auch in der Vegetationsperiode 2003 bestätigt. Der Anteil blühender Pflanzen 5 Wochen nach Feldaufgang der SST/FFT-Linien lag mit 16-27 % signifikant unter dem des Wildtyps mit 70 %, ebenso wie die SST-Linien 18 und 36 mit einem Anteil blühender Pflanzen von 20 % und 55 %. Die SST-Linie 20 unterschied sich mit dem Anteil blühender Pflanzen von 75 % nicht vom Wildtyp. Unabhängig von der Witterung und der Vorkeimung der Pflanzknollen war bei allen SST/FFT-Linien die Entwicklung bis zum Abschluss der ersten generativen Entwicklungsphase im Vergleich zum Wildtyp verzögert. Bei den SST-Linien trat hingegen keine einheitliche Entwicklung, sondern eine linienspezifische Veränderung auf.

3.1.1.3 Deckungsgrad

Neben der generativen Entwicklung war auch das vegetative Wachstum der transgenen Linien vom Wildtyp differenziert. Bereits 6 Wochen nach Feldaufgang zeigte sich der reduzierte Staudenwuchs der SST/FFT-Linien durch einen fehlenden Reihenschluss im Vergleich zum Wildtyp und den SST-Linien (Abb. 3-5), was zu einem reduzierten Anteil der Bodendeckung führte.



Abb. 3-5: Reihenschluss der transgenen Linien SST#18 und SST/FFT#22/19 sowie dem Wildtyp 6 Wochen nach Feldaufgang 2003.

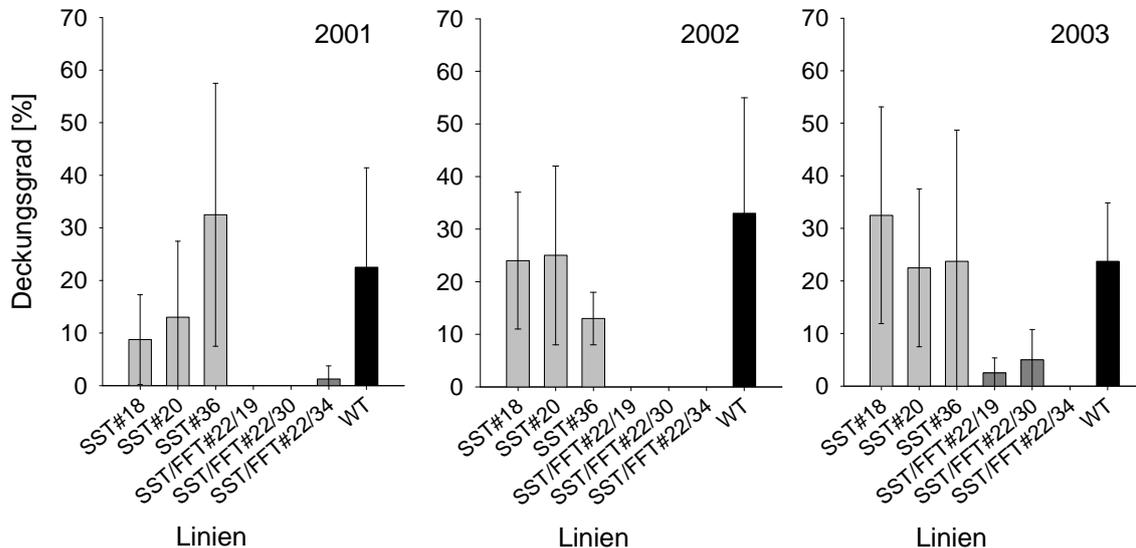


Abb. 3-6: Deckungsgrad 6 Wochen nach Feldaufgang in den Vegetationsperioden 2001, 2002 und 2003. Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Wiederholungen \pm SD.

Der Deckungsgrad (Abb. 3-6) der SST-Linien lag in Abhängigkeit von der Linie und der Vegetationsperiode 6 Wochen nach Feldaufgang zwischen 10-30 % und damit auf dem Niveau des Wildtyps, dessen Anteil der Bodendeckung in den drei Anbaujahren zwischen 25-30 % ausmachte. Im Gegensatz dazu erreichten die SST/FFT-Linien zu diesem Zeitpunkt einen Deckungsgrad, der unter 5 % lag. Die hohen Standardabweichungen des

Anteils der Bodendeckung sind vermutlich die Folge von Bodenheterogenitäten in den 4 Wiederholungen. Bis zum Abschluss der Vegetationsperiode erreichten die SST/FFT-Linien in allen drei Anbaujahren keinen Reihenschluss und 100 %-igen Deckungsgrad.

3.1.2 Morphologie der Pflanzen (Phänotyp)

3.1.2.1 Pflanzknollengröße

Morphologische Staudenmerkmale, insbesondere die Haupttrieblänge und die Anzahl Augenaustriebe, werden durch die Pflanzknollengröße beeinflusst (STRUIK & WIERSEMA, 1999). Um Effekte der Pflanzknollengröße auf morphologische Parameter ausschließen zu können, wurden in den drei Anbaujahren die zur Verfügung stehenden Pflanzknollen der Genotypen für die Pflanzung auf einheitliche Größen kalibriert (Abb. 3-7).

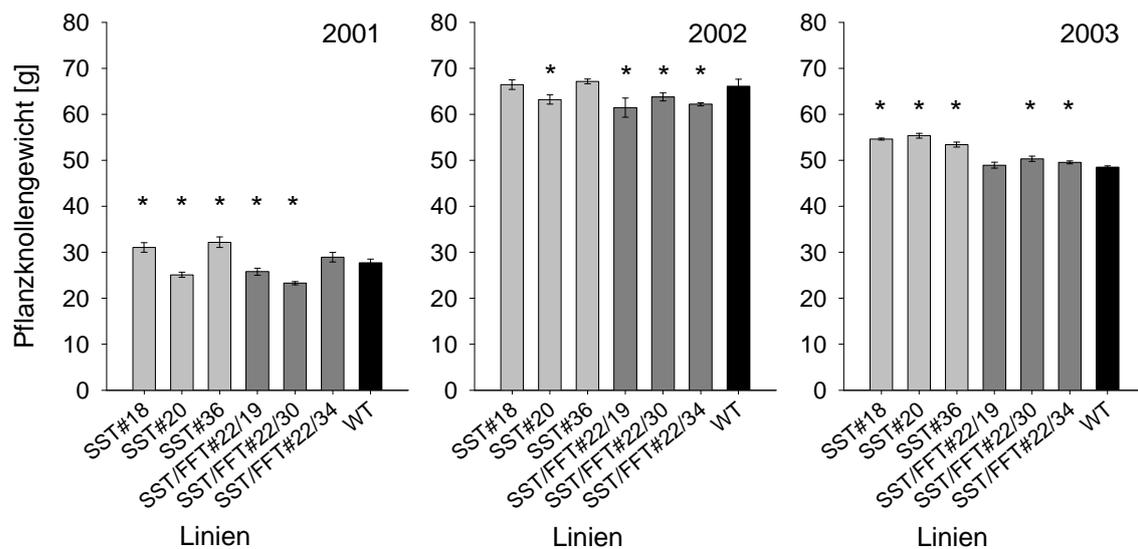


Abb. 3-7: Pflanzknollengewichte in den Vegetationsperioden 2001, 2002 und 2003. Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Wiederholungen à 96 Pflanzknollen \pm SD. * symbolisieren signifikante; n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

Das Pflanzknollengewicht der Linien betrug im Jahr 2001 zwischen $23,3 \pm 0,4$ g (SST/FFT#22/30) und $32,2 \pm 1,1$ g (SST#36). Zum Pflanzknollengewicht des Wildtyps mit $27,7 \pm 0,8$ g waren die Pflanzknollen der transgenen Linien SST#20, SST/FFT#22/19 und SST/FFT#22/30 signifikant kleiner und die Pflanzknollen der Linien SST#18 und SST#36 signifikant größer. In der Vegetationsperiode 2002 lag das Pflanzknollengewicht zwischen $61,5 \pm 2,1$ g (SST/FFT#22/19) und $67,1 \pm 0,5$ g (SST#20). Ein dem Pflanzknollengewicht des Wildtyps mit $66,1 \pm 1,5$ g signifikant geringeres Pflanzknollengewicht wiesen die

SST/FFT-Linien und die SST-Linie 20 auf. In der dritten Vegetationsperiode 2003 wiesen die Linien das Pflanzknollengewicht von $48,5 \pm 0,3$ g (Wildtyp) bis $55,4 \pm 0,5$ g (SST#20) auf. Ein vom Wildtyp signifikant erhöhtes Pflanzknollengewicht hatten die SST-Linien und die SST/FFT-Linien 22/30 und 22/34.

Trotz Sortierung war zwischen den transgenen Linien und Wildtyp im jeweiligen Anbaujahr kein homogenes Pflanzknollengewicht erreicht worden. Dabei waren die Unterschiede im Pflanzknollengewicht zwischen den transgenen Linien und Wildtyp nicht über alle Vegetationsperioden einheitlich. Die Pflanzknollen der Vegetationsperioden 2002 und 2003 waren doppelt so schwer wie die Pflanzknollen im Jahr 2001.

3.1.2.2 Haupttrieblänge

Um einen Einfluss der Pflanzknollengröße auf die Haupttrieblänge auszuschließen, wurde eine Kovarianzanalyse mit der Kovariablen Pflanzknollengewicht durchgeführt. Die Kovarianzanalyse ergab in den drei Vegetationsperioden keinen signifikanten Einfluss der Pflanzknollengröße auf die Haupttrieblänge, so dass die statistische Auswertung der Haupttrieblänge durch eine Varianzanalyse mit multiplem Vergleich nach Dunnett erfolgte.

Der schon beim Deckungsgrad (Abb. 3-5, Abb. 3-6) auffällige reduzierte Staudenwuchs der SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp wurde zusätzlich an Hand der Haupttrieblänge nach Abschluss des vegetativen Wachstums ermittelt (Abb. 3-8).

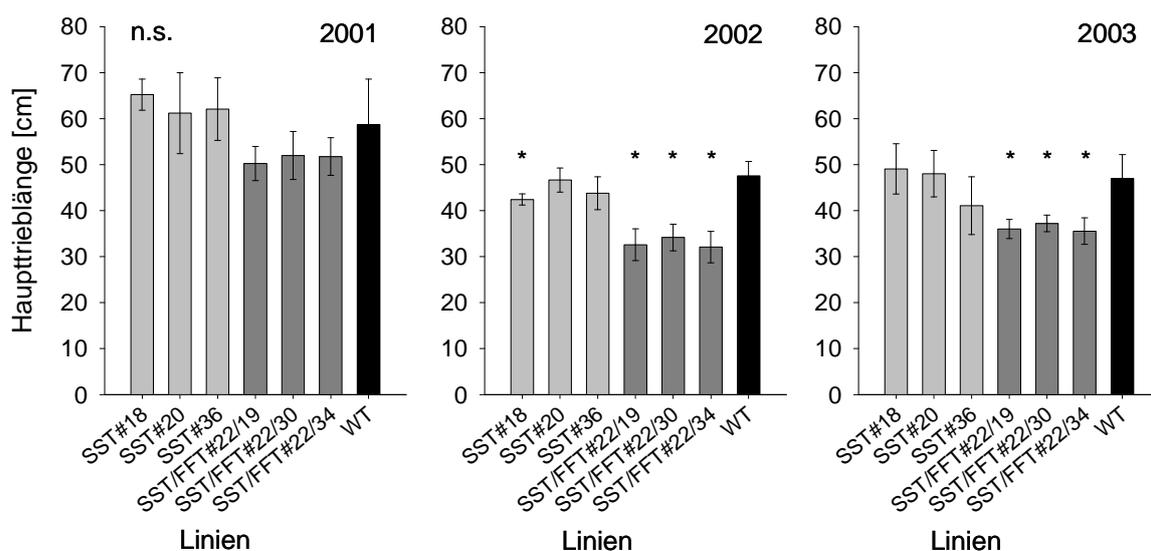


Abb. 3-8: Haupttrieblänge in den Vegetationsperioden 2001, 2002 und 2003. Werte 2001 und 2003 sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Wiederholungen à 36 Pflanzen \pm SD, Werte 2002 sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Wiederholungen à 10 Pflanzen \pm SD. * symbolisieren signifikante; n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

Im Jahr 2001 lag das Niveau der Haupttrieblänge zwischen $50,2 \pm 3,7$ cm (SST/FFT#22/19) und $65,2 \pm 3,4$ cm (SST#18). Die Haupttrieblänge der SST/FFT-Linien war gegenüber dem Wildtyp verkürzt, hingegen die Haupttrieblänge der SST-Linien verlängert, jedoch nicht signifikant. Infolge der frühzeitigen Bonitur der Haupttrieblänge in der Vegetationsperiode 2002 durch die Zerstörung des Feldversuches war die Haupttrieblänge im Jahr 2002 im Vergleich zu 2001 verkürzt. Die Haupttrieblänge befand sich zwischen $32,1 \pm 3,4$ cm (SST/FFT#22/30) und $46,7 \pm 2,6$ cm (SST#20). Zu der Vegetationsperiode 2001 bestätigte sich jedoch 2002 die signifikant verringerte Haupttrieblänge der SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp. Im Gegensatz zu 2001 war 2002 die Haupttrieblänge der SST-Linien geringer als die des Wildtyps, im Falle der SST-Linie 18 sogar signifikant.

In der Vegetationsperiode 2003 lag die Haupttrieblänge zwischen $35,6 \pm 2,9$ cm (SST/FFT#22/34) und $49,1 \pm 5,5$ cm (SST#18) und damit ebenfalls unter dem Niveau vom Jahr 2001. Wie auch schon in den vorangegangenen Vegetationsperioden war die Haupttrieblänge der SST/FFT-Linien zum Wildtyp signifikant verringert. Die Haupttrieblänge der SST-Linien 18 und 20 glich der des Wildtyps, im Gegensatz zu der SST-Linie 36, deren Haupttrieb verkürzt war.

Die insgesamt kürzeren Haupttriebe in der Vegetationsperiode 2003 im Vergleich zu 2001 sind vermutlich auf die extrem trockene Vegetationsperiode 2003 im Raum Brandenburg zurückzuführen (s. Abb. 2-2). Während 2001 über die Vegetationsperiode von April bis Juli eine Niederschlagsmenge von 234 mm fiel, betrug diese 2003 nur 136 mm. Unabhängig von dem Pflanzknollengewicht und der Witterung war in den untersuchten drei Jahren die Haupttrieblänge der SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp homogen verkürzt, während die Haupttrieblängen der SST-Linien in Abhängigkeit von der Linie und Vegetation dem Niveau des Wildtyps entsprachen oder signifikant reduziert waren.

Die Auswirkung der gentechnischen Veränderung auf die Haupttrieblänge der SST/FFT-Linien konnte auch in Gewächshausuntersuchungen bestätigt werden (Abb. 3-9). Während der Resistenzprüfung gegenüber dem Kartoffelzystennematoden (*Globodera rostochiensis*) und dem Wurzelgallennematoden (*Meloidogyne incognita*) der transgenen Linien und dem Wildtyp erfolgte auf Grund der langen Standdauer der Pflanzen bis zum Knospenstadium die Bestimmung der Haupttrieblänge. Bei den zwei dargestellten Ergebnissen handelt es sich um Pflanzen aus den Ernteknollen der Vegetationsperiode 2001 der Freisetzung. Bei der Untersuchung mit *G. rostochiensis* lag die Haupttrieblänge 6 Wochen nach Pflanzung zwischen $24,9 \pm 3,6$ cm (SST/FFT#22/34) bis $47,3 \pm 10,9$ cm (SST#18). Dabei war die

Haupttrieblänge der SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert, während die Haupttrieblänge der SST-Linien dem Wildtyp glich.

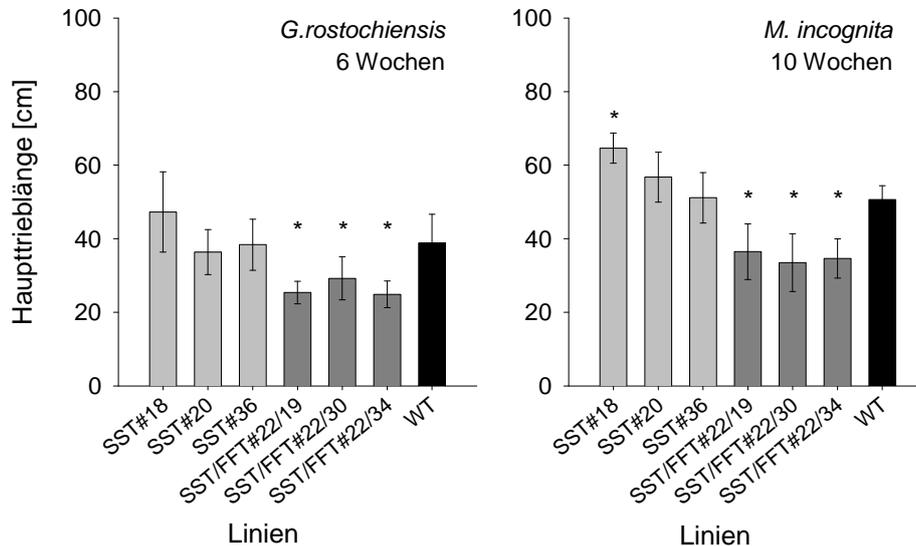


Abb. 3-9: Haupttrieblänge der transgenen Linien und dem Wildtyp während der Resistenzprüfung auf Nematoden (*G. rostochiensis*, *M. incognita*) mit Pflanzenmaterial aus der Vegetationsperiode 2001. Werte sind Mittelwerte aus 8 Pflanzen \pm SD. * symbolisieren signifikante, n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

In dem Versuch mit *M. incognita* lag die Haupttrieblänge 10 Wochen nach Pflanzung zwischen $33,5 \pm 7,9$ cm (SST/FFT#22/30) und $64,6 \pm 4,1$ cm (SST#18). Ebenso wie bei der Untersuchung mit *G. rostochiensis* wiesen die SST/FFT-Linien einen signifikant kürzeren Haupttrieb im Vergleich zum Wildtyp auf. Die SST-Linien hatten längere Haupttriebe als der Wildtyp, bei der Linie SST#18 sogar signifikant.

3.1.2.3 Blattbehaarung

Für Detailuntersuchungen der gentechnischen Veränderung im Vergleich zum Wildtyp auf den Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*) erfolgte in der Vegetationsperiode 2003 die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (REM) der Blattunterseite von Blättern der mittleren Blattetage in Kooperation mit der BAZ Ascherleben. In den Aufnahmen deutete sich eine Zunahme der Blattbehaarung durch die Transformation an (Abb. 3-10).

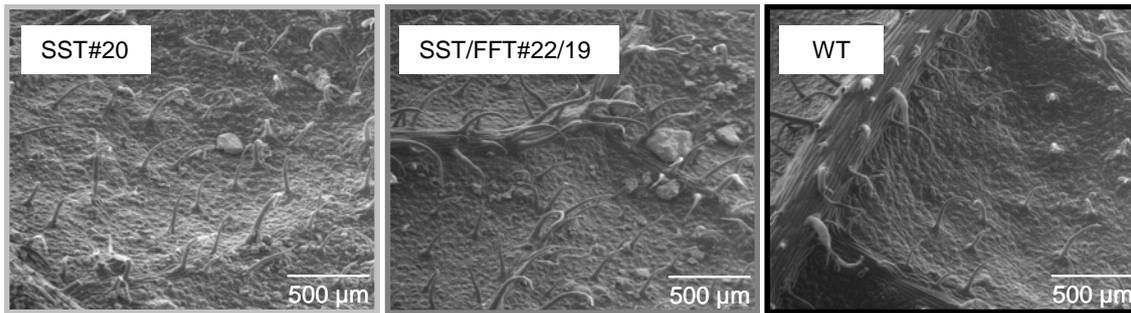


Abb. 3-10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Blattunterseite der Linien SST#20, SST/FFT#22/19 und des Wildtyps bei einer 40-fachen Vergrößerung.

Bei der mikroskopischen Zählung (Abb. 3-11) der Blattbehaarung blattunterseits betrug die Anzahl Blatthaare aller Linien $9,6 \pm 1,1$ Blatthaare/mm² Blattfläche (Wildtyp) bis $15,0 \pm 2,6$ Blatthaare/mm² Blattfläche (SST/FFT#22/19). Im Vergleich zum Wildtyp war die Blattbehaarung bei allen transgenen Linien erhöht, bei den SST/FFT-Linien 22/19 und 22/30, sowie den SST-Linien 18 und 20 sogar signifikant.

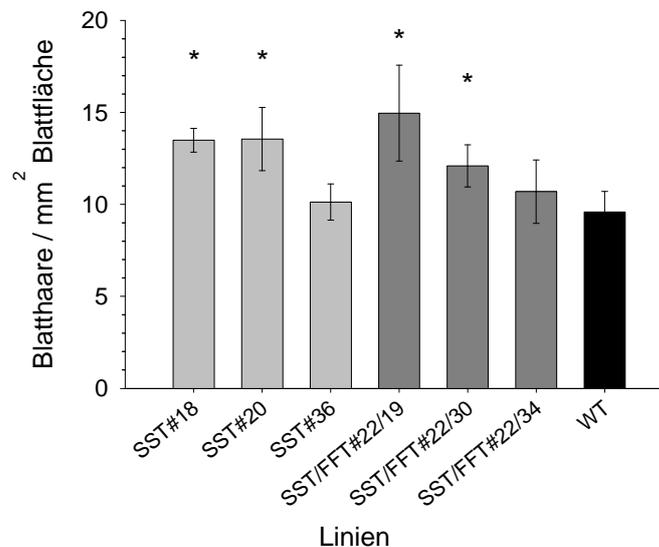


Abb. 3-11: Anzahl der Blatthaare blattunterseits von Fiederblättern der mittleren Blattetage in der Vegetationsperiode 2003. Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Zählungen \pm SD. * symbolisieren signifikante, n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

Die Blattbehaarung der SST/FFT-Linien und SST-Linien wurde durch die Transformation erhöht. Die Zunahme der Blattbehaarung innerhalb eines Konstruktes war jedoch nicht homogen, sondern unterschied sich in Abhängigkeit von der Linie.

3.1.2.4 Anzahl der Augenaustriebe/Pflanzknolle

Der Austrieb mehrerer Augentriebe neben dem Haupttrieb ist bei Kartoffelstauden sowohl vom Genotyp als auch dem Pflanzgut abhängig. Beim Pflanzgut ist sowohl die Pflanzknollengröße als auch deren Vorkeimung beeinflussend. Die Zählung der Augentriebe erfolgte zum Abschluss der Vegetationsperiode (Abb. 3-12).

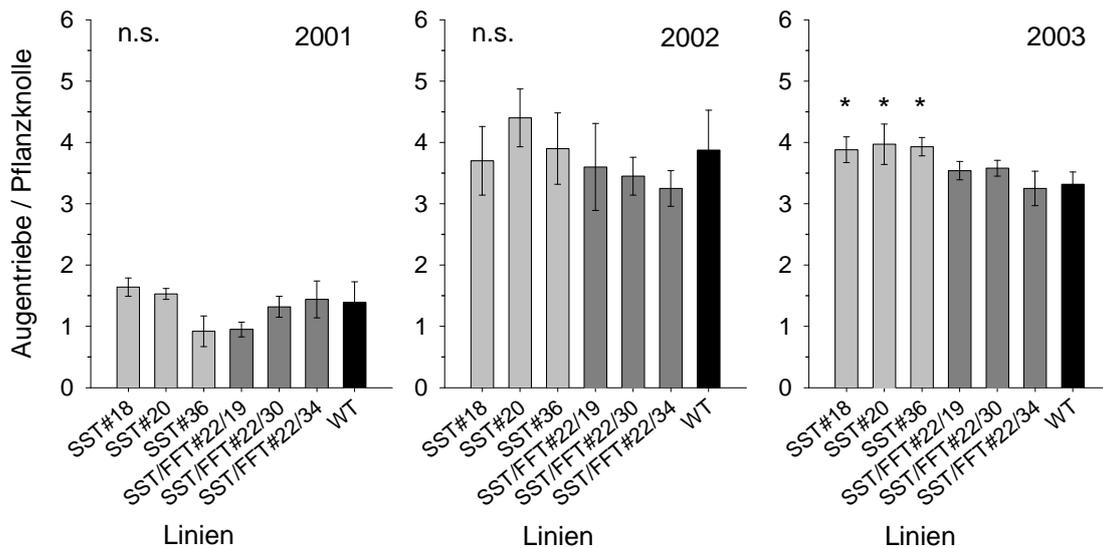


Abb. 3-12: Anzahl der Augentriebe in den Vegetationsperioden 2001, 2002 und 2003. Werte 2001 und 2003 sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Wiederholungen à 36 Pflanzen ± SD, Werte 2002 sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Wiederholungen à 10 Pflanzen ± SD. * symbolisieren signifikante; n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunn`s-Test).

In der Vegetationsperiode 2001 lag die Anzahl der Augentriebe zwischen $0,9 \pm 0,3$ (SST#36) und $1,6 \pm 0,2$ (SST#18) und es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp. Obwohl die Anzahl der Augentriebe im Jahr 2002 vor Abschluss der Vegetationsperiode erfasst wurde, stieg sie auf $3,3 \pm 0,3$ (SST/FFT#22/34) bis $4,0 \pm 0,3$ (SST#20) an. Nach Abschluss der Vegetationsperiode 2003 betrug die Anzahl der Augentriebe $3,3 \pm 0,3$ (SST/FFT#22/34) bis $4,0 \pm 0,3$ (SST#36) und lag damit auf dem Niveau der Augentriebe von 2002. Die dabei signifikante Erhöhung der Zahl der Augenaustriebe der drei SST-Linien geht dabei vermutlich auf das signifikant erhöhte Pflanzknollengewicht zurück (Abb. 3-7, Abb. 3-13).

In den drei Vegetationsperioden 2001 bis 2003 zeigte sich keine einheitliche Veränderung der genotypischen Reaktion des Wildtyps durch die Transformation bei den transgenen Linien. Dagegen konnte ein pflanzgutabhängiger Einfluss beobachtet werden (Abb. 3-13).

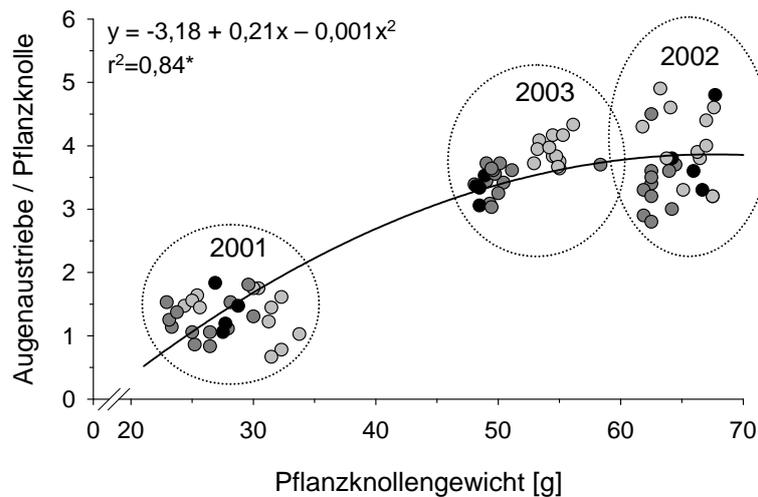


Abb. 3-13: Einfluss des Pflanzknollengewichtes auf die Anzahl der Augenaustriebe in den Vegetationsperioden 2001, 2002 und 2003.

Daraus wird deutlich, dass mit zunehmendem Pflanzknollengewicht die Anzahl der Augentriebe zunächst stieg. Ab einem Pflanzknollengewicht von 50 g nahm die Steigung jedoch ab, so dass keine nennenswerte Erhöhung der Anzahl von Augentrieben bei einem Pflanzknollengewicht von 65 g zu verzeichnen war. Vermutlich war das genotypische Maximum an Augentrieben ab einem Pflanzknollengewicht von 50-60 g erreicht. Gleichzeitig war jedoch die Vorkeimung zwischen den Vegetationsperioden 2001 und 2002 bzw. 2003 (Abb. 3-1) differenziert. Dadurch ist nicht zu klären, ob das gesteigerte Niveau der Anzahl an Augentrieben im Jahr 2002 und 2003 die Folge der optimierten Vorkeimung war oder ob das genotypische Maximum an Augentrieben ab einer Pflanzknollengröße von 50-60 g erreicht war.

3.1.2.5 Seitentriebe 1. Ordnung des Haupttriebes

Neben der Wuchshöhe wurde die Verzweigung der Haupttriebe durch die Anzahl der Seitentriebe 1. Ordnung am Haupttrieb ermittelt (Abb. 3-14).

Im Jahr 2001 lag die Anzahl der Seitentriebe des Haupttriebes zwischen $3,8 \pm 0,7$ (Wildtyp) und $8,1 \pm 1,5$ (SST/FFT#22/19). Sowohl die Verzweigung der SST-Linien als auch die der SST/FFT-Linien war im Vergleich zur Verzweigung des Wildtyps erhöht. Die Verzweigung der SST/FFT-Linien war signifikant erhöht. In der Vegetationsperiode 2002 betrug die Anzahl der Seitentriebe am Haupttrieb $2,4 \pm 0,4$ (Wildtyp) bis $4,0 \pm 1,6$ (SST/FFT#22/30). Dabei traten keine signifikanten Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp auf. Das geringere Niveau der Seitentriebbildung 2002 im Vergleich zu 2001

ist vermutlich auf den früheren Boniturtermin durch die Feldzerstörung zurückzuführen. In der Vegetationsperiode 2003 umfasste die Verzweigung zwischen $6,6 \pm 1,6$ (SST#36) und $8,4 \pm 0,7$ (SST/FFT#22/30) Seitentriebe am Haupttrieb. Ebenso wie in Jahr 2002 waren keine Unterschiede in der Verzweigung zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp vorhanden.

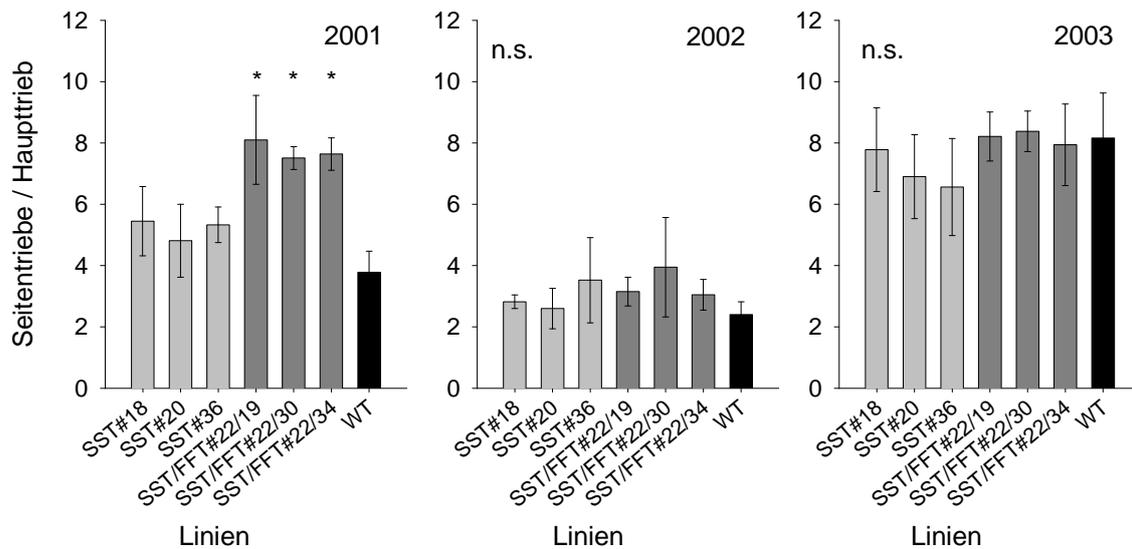


Abb. 3-14: Anzahl der Seitentriebe am Haupttrieb in den Vegetationsperioden 2001, 2002 und 2003. Werte 2001 und 2003 sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Wiederholungen à 36 Pflanzen \pm SD, Werte 2002 sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Wiederholungen à 10 Pflanzen \pm SD. * symbolisieren signifikante; n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

Unterschiede in der Verzweigung des Haupttriebes zwischen den transgenen Linien und Wildtyp traten nur in Abhängigkeit von der Vegetationsperiode auf. In den Vegetationsperioden 2001 und 2003 unterschied sich die Pflanzknollengröße um 50 %. Möglicherweise ist die verstärkte Verzweigung der transgenen Linien 2001 ein kompensatorischer Effekt, um in Folge der verringerten Augenaustriebe im Jahr 2001 eine ausreichende Assimilatfläche zu bilden. Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Anzahl an Seitentrieben und der Anzahl an Augenaustrieben über die Vegetationsperioden festgestellt werden.

3.1.2.6 Einzelblüten der Infloreszenz 1. Ordnung am Haupttrieb

Nach Entwicklung der Blütenanlage wurde die Anzahl an Einzelblüten der Infloreszenz 1. Ordnung am Haupttrieb erfasst (Abb. 3-15).

Die Blütenanzahl der Infloreszenz 1. Ordnung des Haupttriebes lag 2001 zwischen $2,7 \pm 1,4$ (SST/FFT#22/34) und $10,3 \pm 0,7$ (SST#36). Die Blütenanzahl der SST/FFT-Linien war

im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert, ebenso wie die der SST-Linien 18 und 20. Im Gegensatz zur Vegetationsperiode 2001 lag die Blütenanzahl der Infloreszenz 1. Ordnung des Haupttriebes im Anbaujahr 2003 auf einem höheren Niveau und betrug $14,7 \pm 1,0$ (SST/FFT#22/24) bis $21,1 \pm 2,0$ (Wildtyp). Parallel zu 2001 war auch 2003 die Blütenanzahl der SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp signifikant verringert. Im Gegensatz zu 2001 war die Blütenanzahl aller SST-Linien geringer als der Wildtyp.

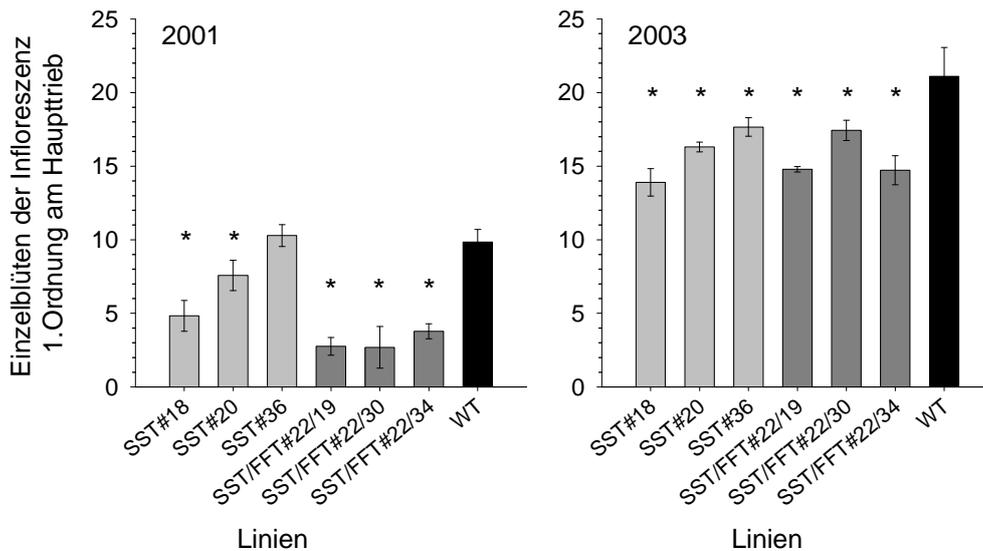


Abb. 3-15: Anzahl der Einzelblüten der Infloreszenz 1. Ordnung 2001 und 2003. Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Wiederholungen à 36 Pflanzen \pm SD. * symbolisieren signifikante; n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

Parallel zur verzögerten Blütenentwicklung war auch die Blütenanzahl der SST/FFT-Linien in beiden Vegetationen im Vergleich zum Wildtyp signifikant verringert. Dabei war die Reduktion der Blütenanzahl 2001 im Gegensatz zu 2003 unabhängig von der Linie einheitlich. Auch die SST-Linien zeigten in Abhängigkeit von der Linie und der Vegetation eine vom Wildtyp signifikant reduzierte Blütenanzahl.

3.1.3 Ertragsparameter

Neben der Auswirkung der Transformation auf den Flächenertrag (Abb. 3-16) wurde nach der Ernte auch der Effekt auf die Knollengrößenverteilung (Abb. 3-17), den Stärkegehalt (Abb. 3-18) sowie die Morphologie der Stärkekörner (Abb. 3-19) ermittelt.

In der Vegetationsperiode 2001 wurde ein Flächenertrag zwischen 400 ± 44 dt/ha (SST/FFT#22/30) und 465 ± 57 dt/ha (SST#20) erreicht. Dieser unterschied sich zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp nicht. Dies bestätigte sich auch im Jahr 2003, wo der Flächenertrag zwischen 221 ± 47 dt/ha (SST/FFT#22/34) und 290 ± 49 dt/ha (SST#20)

lag. Das hohe Ertragsniveau der Vegetationsperiode 2001 konnte 2003 auf Grund der Trockenheit nicht erreicht werden.

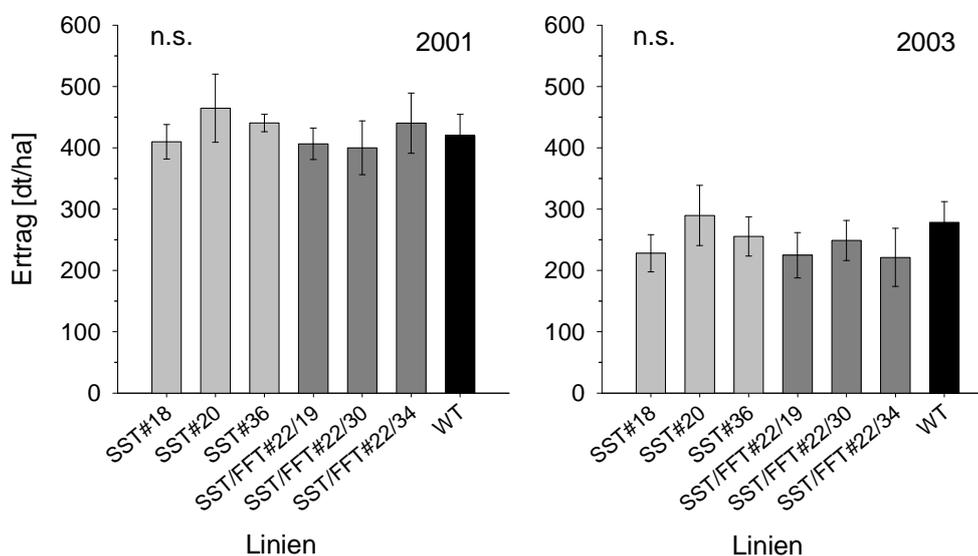


Abb. 3-16: Flächenertrag der Vegetationsperioden 2001 und 2003. Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Wiederholungen à 96 Pflanzen \pm SD. * symbolisieren signifikante; n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

Die phänologischen und morphologischen Unterschiede der transgenen Linien vom Wildtyp hatten keine Auswirkung auf den Flächenertrag.

Obwohl der Flächenertrag gleich war, zeigte sich bei der Knollengrößenverteilung durch die Transformation ein Einfluss (Abb. 3-17).

Bei der Größensortierung von 20 kg Ernteknollen pro Wiederholung zeigte sich 2001, dass die SST-Linien im Vergleich zum Wildtyp einen höheren Anteil an übergroßen Knollen (> 8 cm) gebildet hatten und einen geringeren Anteil an kleinen Knollen (< 4 cm). Der Anteil der mittleren und großen Knollen (4-6 cm, 6-8 cm) war gleich. Dies bedeutet, dass bei den SST-Linien trotz gleicher Anzahl Augenaustriebe weniger Knollen pro Augenaustrieb angelegt waren als beim Wildtyp. Die Knollengrößenverteilung der SST/FFT-Linien glich 2001 der des Wildtyps.

In der Vegetationsperiode 2003 konnte dieser Unterschied nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zu 2001 bildeten 2003 die SST/FFT-Linien einen höheren Anteil an kleinen Knollen (< 4 cm) als der Wildtyp und einen geringeren Anteil an übergroßen Knollen (> 8 cm). Somit wurden trotz gleicher Anzahl an Augenaustrieben bei den SST/FFT-Linien mehr Knollen pro Augenaustrieb gebildet als beim Wildtyp. Die Knollengrößenverteilung der SST-Linien glich 2003 der des Wildtyps.

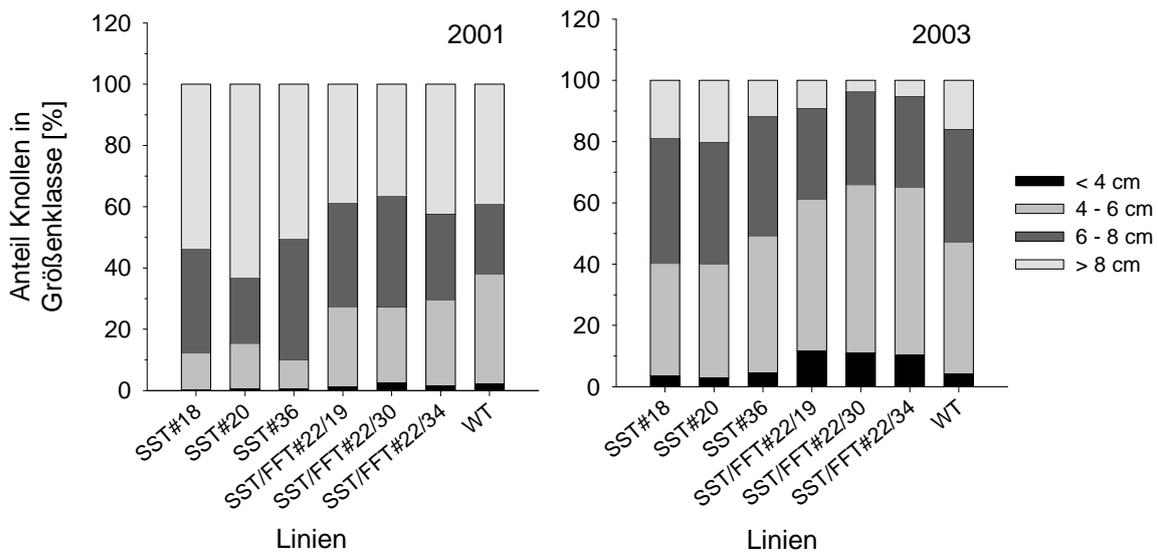


Abb. 3-17: Knollengrößenverteilung von je 20 kg Ertragsknollen der Vegetationsperioden 2001 und 2003 in die 4 Größenklassen < 4 cm, 4-6 cm, 6-8 cm, > 8 cm. Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Wiederholungen à 20 kg Knollen.

Der Stärkegehalt unterschied sich ebenfalls zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp (Abb. 3-18).

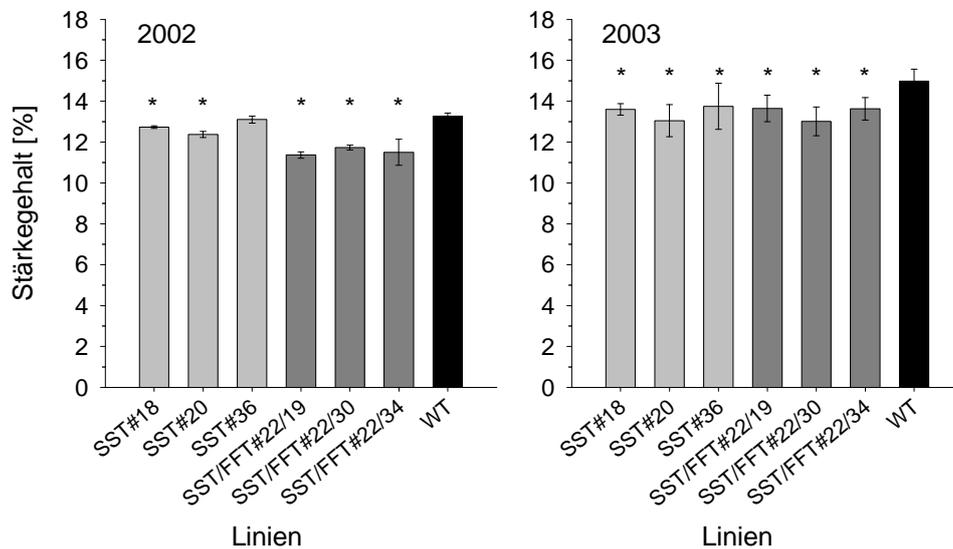


Abb. 3-18: Stärkegehalt der Knollen (% Frischmasse) in den Vegetationsperioden 2002 und 2003. Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Wiederholungen à 5 kg Knollen \pm SD. * symbolisieren signifikante; n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

In der Vegetationsperiode 2002 wurde der Stärkegehalt an Knollen eines Zusatzversuches bestimmt, der nicht zerstört worden war. Das Niveau des Stärkegehaltes differierte 2002 zwischen $11,4 \pm 0,2$ % (SST/FFT#22/19) und $13,3 \pm 0,2$ % (Wildtyp). Die SST/FFT-

Linien wiesen alle einen signifikant reduzierten Stärkegehalt zum Wildtyp auf. Auch bei den SST-Linien 18 und 20 war der Stärkegehalt signifikant geringer als der des Wildtyps. In der Vegetationsperiode 2003 lag der Stärkegehalt zwischen $13,0 \pm 0,7 \%$ (SST/FFT#22/30) und $15,0 \pm 0,6 \%$ (Wildtyp) und damit insgesamt auf einem höheren Niveau als 2002. Wie auch in der Vegetationsperiode 2002 war 2003 der Stärkegehalt der SST/FFT-Linien und aller SST-Linien signifikant geringer im Vergleich zum Wildtyp. Durch die Transformation wurde der Stärkegehalt in beiden Vegetationsperioden in den Knollen sowohl in den SST-Linien als auch SST/FFT-Linien signifikant reduziert. Bei dem insgesamt höheren Stärkegehalt der Knollen in der Vegetationsperiode 2003 handelt es sich eventuell um einen Effekt der Trockenheit und der hohen Strahlungsintensität des Anbaujahres 2003 und somit einer Aufkonzentrierung des Stärkegehaltes in den Knollen durch einen reduzierten Wassergehalt oder eine höhere photosynthetische Leistung. Während die der Stärkegehalt durch die gentechnische Veränderung beeinflusst wurde, war die Morphologie der Stärkekörner bei den transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp unverändert. (Abb. 3-19).

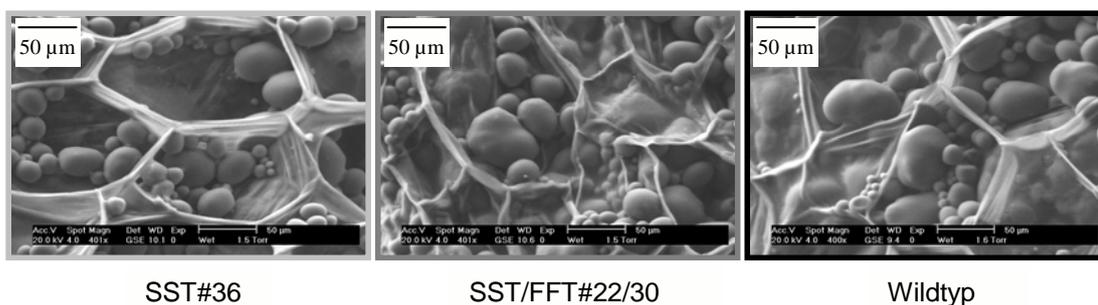


Abb. 3-19: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Stärkekörner in den Knollen der Vegetationsperiode 2003 der Linien SST#36, SST/FFT#22/30 und dem Wildtyp bei 400-facher Vergrößerung.

Aus den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Knollen der Vegetationsperiode 2003 ließen sich keine Hinweise auf Veränderungen der Oberfläche und Größe der Stärkekörner durch die Transformation erkennen. Auch die Zellgröße der Knollen war zwischen den transgenen Linien und Wildtyp identisch.

3.1.4 Genetische Variabilität des Pflanzgutes (Genotyp)

Die Pflanzknollen der drei Vegetationsperioden stammten von Gewächshauspflanzen, deren Herkunft *in-vitro* vermehrte Sprossstecklinge bildeten. Die Abschätzung der genotypischen Stabilität des Ausgangsmaterials der drei Vermehrungsjahre erfolgte über die Untersuchung von Blatt-DNA mittels 4 ISSR-Primer in der PCR (Abb. 3-20).

Pflanzen über die drei Vegetationsperioden. Ebenso waren die ISSR-Muster der Primer UBC-834, UBC-836 und UBS-889 über die 6 transgenen Linien und dem Wildtyp homogen. Im Gegensatz dazu bildete bei dem Primer UBC-841 das Fragment von ca. 650 kb im ISSR-Muster eine Ausnahme. Diese Bande war nur bei den transgenen Linien und nicht beim Wildtyp vorhanden. Da diese Bande sowohl bei den SST-Linien als auch bei den SST/FFT-Linien auftritt, ist davon auszugehen, dass diese Bande im Zusammenhang mit dem SST-Konstrukt steht.

3.2 Auswirkung der genetischen Veränderung auf Schadorganismen

3.2.1 Kraut- und Knollenfäule (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary)

3.2.1.1 Krautfäule

Die Anfälligkeit der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp gegenüber *P. infestans* wurde nicht direkt im Freiland ermittelt, sondern erfolgte in Anlehnung an die Richtlinien der Sortenprüfung neuer Kartoffelsorten des Bundessortenamtes unter Laborbedingungen an Blattscheiben von Freilandpflanzen. Der über die Bonitur des Deckungsgrades des Myzels auf den Blattscheiben ermittelte Sporulationsindex der Vegetationsperioden 2001, 2002 und 2003 ist in Abb. 3-21 dargestellt.

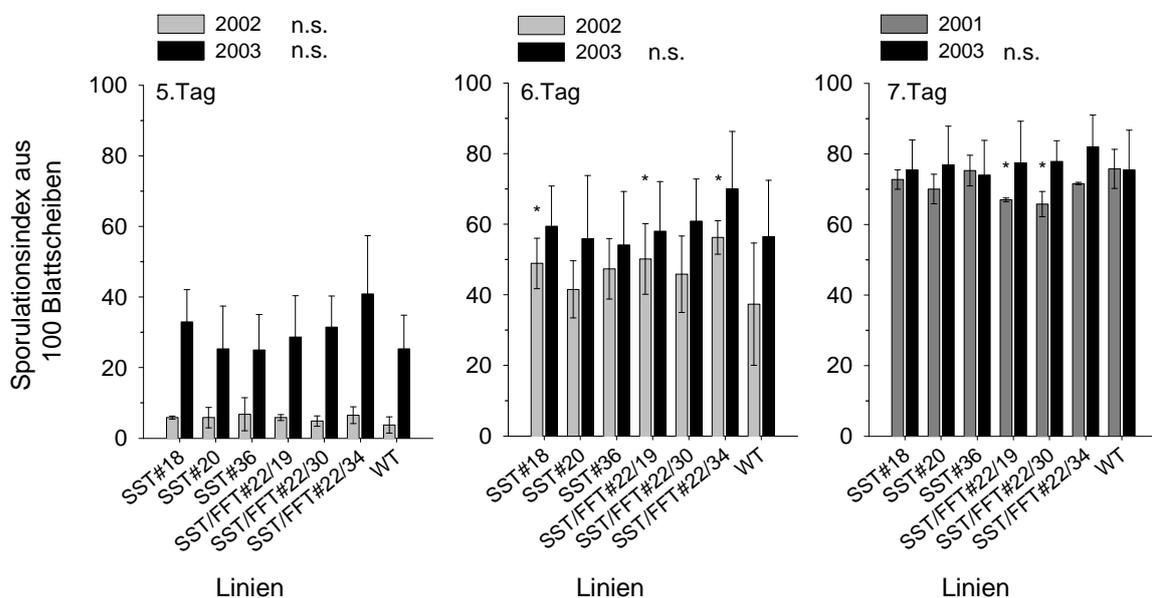


Abb. 3-21: Sporulationsindex von *P. infestans* auf Blattscheiben 5, 6 und 7 Tage nach Infektion in den Vegetationsperioden 2001, 2002 und 2003. Werte sind Mittelwerte aus 2 (2001) bzw. 3 (2002, 2003) unabhängigen Wiederholungen à 100 Blattscheiben ± SD. * symbolisieren signifikante, n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

Am 5. Tag nach Infektion betrug der Sporulationsindex in der Vegetationsperiode 2002 über alle Linien $4,9 \pm 1,5$ (SST/FFT#22/30) bis $6,8 \pm 4,8$ (SST#36). Weder der

Sporulationsindex der SST-Linien noch der der SST/FFT-Linien unterschied sich dabei vom Wildtyp. In der Vegetationsperiode 2003 lag der Sporulationsindex am 5. Tag nach der Infektion aller Linien zwischen $25,0 \pm 10,1$ (SST#36) und $40,89 \pm 16,5$ (SST/FFT#22/34). Ebenso wie in der Vegetationsperiode 2002 unterschied sich der Sporulationsindex zwischen den transgenen Linien und Wildtyp nicht. Im Gegensatz zur Vegetationsperiode 2002 war 2003 ein über alle Linien höherer Sporulationsindex zu verzeichnen, der vermutlich auf die höhere Zoosporenkonzentration der Infektionslösung 2003 zurückzuführen ist.

Am 6. Tag nach Infektion war der Sporulationsindex in der Vegetationsperiode 2002 über alle Linien um das 8-fache im Vergleich zum 5. Tag gestiegen und betrug $37,4 \pm 17,3$ (Wildtyp) bis $56,3 \pm 4,7$ (SST/FFT#22/30). Dabei war der Sporulationsindex aller transgenen Linien größer als der des Wildtyps, jedoch war er in Folge der hohen Standardabweichung nur bei den transgenen Linien SST#18, SST/FFT#22/19 und SST/FFT#22/34 signifikant erhöht. Im Gegensatz zur Vegetationsperiode 2002 stieg im Jahr 2003 der Sporulationsindex vom 5. auf den 6. Tag nach Infektion nur um das 2-fache über alle Linien und lag zwischen $55,9 \pm 17,9$ (SST#20) und $70,0 \pm 16,3$ (SST/FFT#22/34). Der Unterschied zwischen den transgenen Linien und Wildtyp in der Vegetationsperiode 2002 am 6. Tag nach Infektion konnte im Jahr 2003 nicht bestätigt werden. Der Sporulationsindex der transgenen Linien glich im Jahr 2003 dem des Wildtyps.

Am 7. Tag nach Infektion in der Vegetationsperiode 2001 lag der Sporulationsindex aller Linien zwischen $65,8 \pm 3,6$ (SST/FFT#22/30) und $75,8 \pm 5,5$ (Wildtyp). Dabei war der Sporulationsindex der SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp reduziert, bei den Linien 22/19 und 22/30 signifikant. Der Sporulationsindex der SST-Linien glich dem des Wildtyps. In der Vegetationsperiode 2003 befand sich am 7. Tag nach Infektion der Sporulationsindex über alle Linien zwischen $74,0 \pm 9,9$ (SST#36) und $82,0 \pm 9,0$ (SST/FFT#22/34). Im Gegensatz zum Jahr 2001 glich in der Vegetationsperiode 2003 der Sporulationsindex der transgenen Linien dem des Wildtyps 7 Tage nach Infektion.

In den Jahren 2001 bis 2003 konnte keine einheitliche Richtung in der Veränderung des Sporulationsindexes und somit der Krautfäuleanfälligkeit der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp ermittelt werden.

Parallel zum Ansetzen der Krautfäuletests in den Jahren 2001 und 2003 wurde zeitlich aufeinander abgestimmt Blattmaterial für die Untersuchungen der Blattkohlenhydrate

entnommen, so dass die Analysedaten den Zuckerhaushalt während des Biotests realistisch widerspiegeln. Durch den Kooperationspartner MPI Golm wurden die Glucose-, Fructose-, Saccharose- und Fructankonzentrationen (Abb. 3-22, Abb. 3-23) im Blatt bestimmt.

Die Glucosekonzentration ($\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht) über alle Linien lag 2001 und 2003 auf etwa gleichem Niveau (Abb. 3-22): von $1,75 \pm 0,48$ (SST/FFT#22/19) bis $2,63 \pm 0,76$ (SST#20) bzw. von $1,16 \pm 0,37$ (SST#18) bis $2,36 \pm 0,69$ (SST/FFT#22/34). Auch wenn sich die Glucosekonzentration des Blattes zwischen dem Wildtyp und den transgenen Linien innerhalb einer Vegetationsperiode unterschied, konnte kein Zusammenhang zwischen der Glucosekonzentration und dem Sporulationsindex 7 Tage nach Infektion mit *P. infestans* gefunden werden.

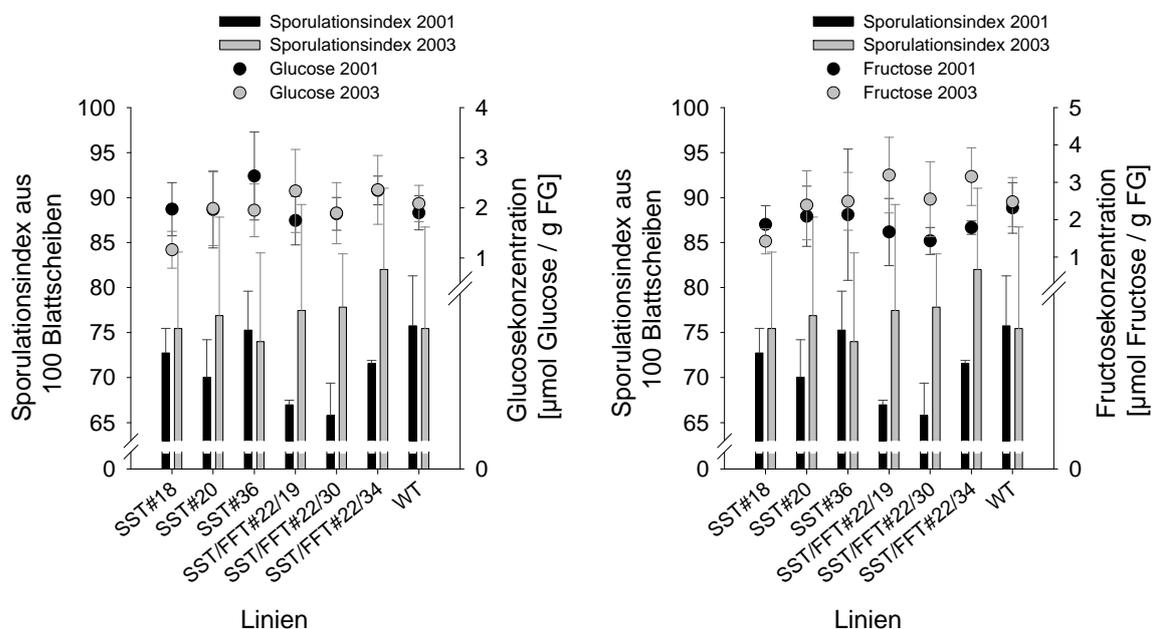


Abb. 3-22: Glucose- und Fructosekonzentration im Blattmaterial zum Zeitpunkt der Krautfäuleuntersuchung und Sporulationsindex 7 Tage nach Infektion mit *P. infestans* in den Vegetationsperioden 2001 und 2003. Werte der Zuckerkonzentrationen sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen, Werte des Sporulationsindex sind Mittelwerte aus 2 (2001) bzw. 3 (2003) unabhängigen Wiederholungen à 100 Blattscheiben.

Die Fructosekonzentration ($\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht) über alle Linien betrug im Jahr 2001 von $1,43 \pm 0,36$ (SST/FFT#22/30) bis $2,31 \pm 0,68$ (Wildtyp). Die SST/FFT-Linien enthielten dabei eine geringere Fructosekonzentration als der Wildtyp und die SST-Linien. Im Jahr 2003 lag die Fructosekonzentration über alle Linien mit $1,42 \pm 0,34$ (SST#18) und $3,15 \pm 0,77$ (SST/FFT#22/34) auf einem höheren Niveau. Diesmal wiesen die SST/FFT-Linien eine höhere Fructosekonzentration auf als der Wildtyp und die SST-Linien. Über beide Jahre konnte der Einfluss der Fructosekonzentration auf den Sporulationsindex von

P. infestans auf Blättern durch die lineare Regression $y = 59,9 + 6,3 x$ mit einem Korrelationskoeffizienten von 60 % ($p < 0,05$) signifikant gesichert werden.

Die Saccharosekonzentration ($\mu\text{mol/g}$ Frischgewicht) betrug im Jahr 2001 (Abb. 3-23) über alle Linien von $2,21 \pm 0,79$ (SST/FFT#22/19) bis $3,97 \pm 0,97$ (Wildtyp). In der Vegetationsperiode 2003 lag sie mit $7,04 \pm 0,72$ (SST#18) und $10,83 \pm 0,67$ (Wildtyp) auf höherem Niveau als im Jahr 2001. Die Saccharosekonzentration der transgenen Linien fiel in beiden Jahren geringer aus als beim Wildtyp, ohne jedoch Einfluss auf die Unterschiede im Sporulationsindex von *P. infestans* zu haben.

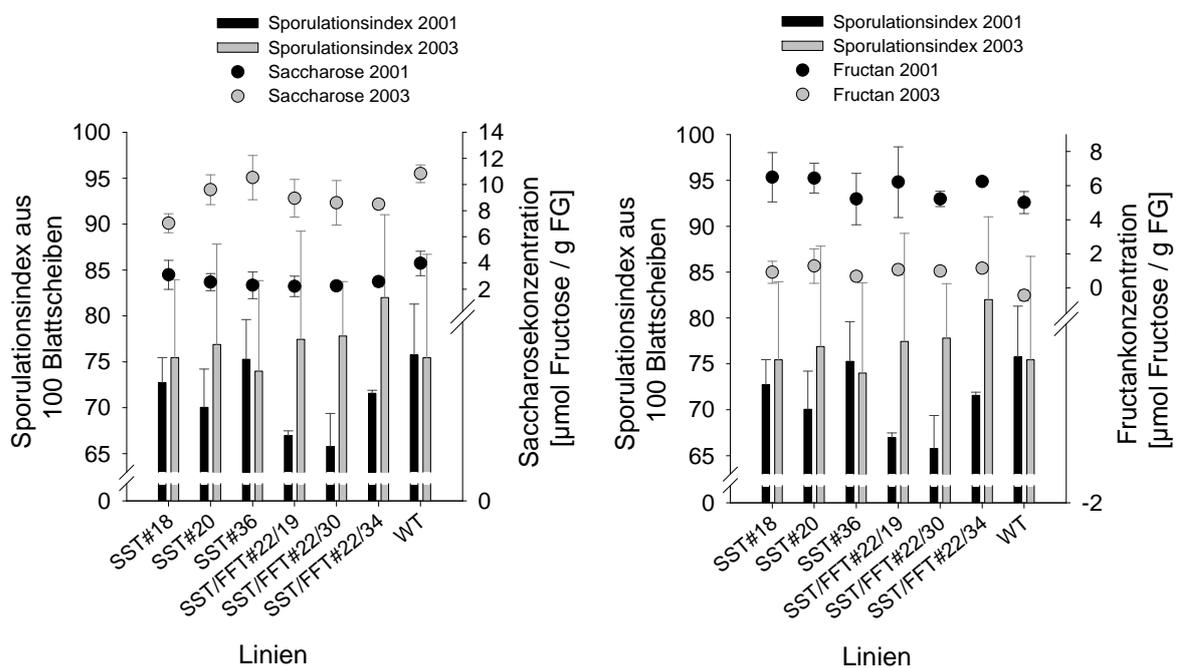


Abb. 3-23: Saccharose- und Fructankonzentration im Blattmaterial zum Zeitpunkt der Krautfäuleuntersuchung und Sporulationsindex 7 Tage nach Infektion mit *P. infestans* in den Vegetationsperioden 2001 und 2003. Werte der Zuckerkonzentrationen sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen, Werte des Sporulationsindex sind Mittelwerte aus 2 (2001) bzw. 3 (2003) unabhängigen Wiederholungen à 100 Blattscheiben.

Die Fructankonzentration (Abb. 3-23), gemessen in $\mu\text{mol Fructose/g}$ Frischgewicht, betrug 2001 über alle Linien von $5,00 \pm 0,65$ (Wildtyp) bis $6,49 \pm 1,45$ (SST#18). Die Fructankonzentration der transgenen Linien war im Vergleich zum Wildtyp gering erhöht. Die Fructankonzentration in den Blättern im Jahr 2001 ist unter Vorbehalt zu betrachten, da die Fructankonzentration in den Blättern des Wildtyps eine sehr hohe Konzentration aufwies, wo eigentlich keine Fructane enthalten sein können. Im Jahr 2003 lag die Fructankonzentration über alle Linien mit $0,44 \pm 0,33$ (Wildtyp) und $1,28 \pm 1,00$ (SST#20) deutlich unter dem Niveau von 2001, wobei die Fructankonzentration der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp erhöht war. Trotz erhöhter Fructankonzentrationen des

Blattes der transgenen Linien innerhalb einer Vegetationsperiode standen diese nicht im Zusammenhang mit dem Sporulationsindex 7 Tage nach Infektion von *P. infestans*.

Von den untersuchten Blattkohlenhydraten ließ sich nur ein Zusammenhang zwischen der Fructosekonzentration und dem Sporulationsindex von *P. infestans* des Blattes feststellen. Durch die ermittelten Glucose-, Saccharose- und Fructankonzentrationen des Blattes blieb der Sporulationsindex von *P. infestans* am 7. Tag nach Infektion unbeeinflusst.

3.2.1.2 Knollenfäule

Die Untersuchungen zur Anfälligkeit der Knollen gegenüber *P. infestans* erfolgten ebenso wie die der Krautfäule in Anlehnung an die Richtlinien des Bundessortenamtes bei der Zulassung neuer Kartoffelsorten.

Über die tägliche Bonitur des Deckungsgrades des Myzels auf den Knollenscheiben in einem Zeitraum vom 4. bis zum 9. Tag nach der Infektion wurden die Tagessumme der Boniturwerte (Abb. 3-24) und die Wochensumme der Boniturwerte (Abb. 3-25) erfasst. Dabei zeigte sich einheitlich auf den Knollenscheiben aus den Ernten der Vegetationsperioden 2001 bis 2003 ein sichtbares Myzel ab dem 6. Tag nach der Infektion. Im Vergleich zum Wildtyp wiesen alle SST/FFT-Linien stets eine geringere Tagessumme der Boniturwerte auf, während sich die SST-Linien in Abhängigkeit von der Linie auf dem Niveau des Wildtyps befanden (2002–2003) oder auch darunter blieben (2001). Der schon am 6. Tag reduzierte Deckungsgrad des Myzels der SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp wurde auch durch die anhaltende Versuchsdauer bis zum 9. Tag nicht kompensiert.

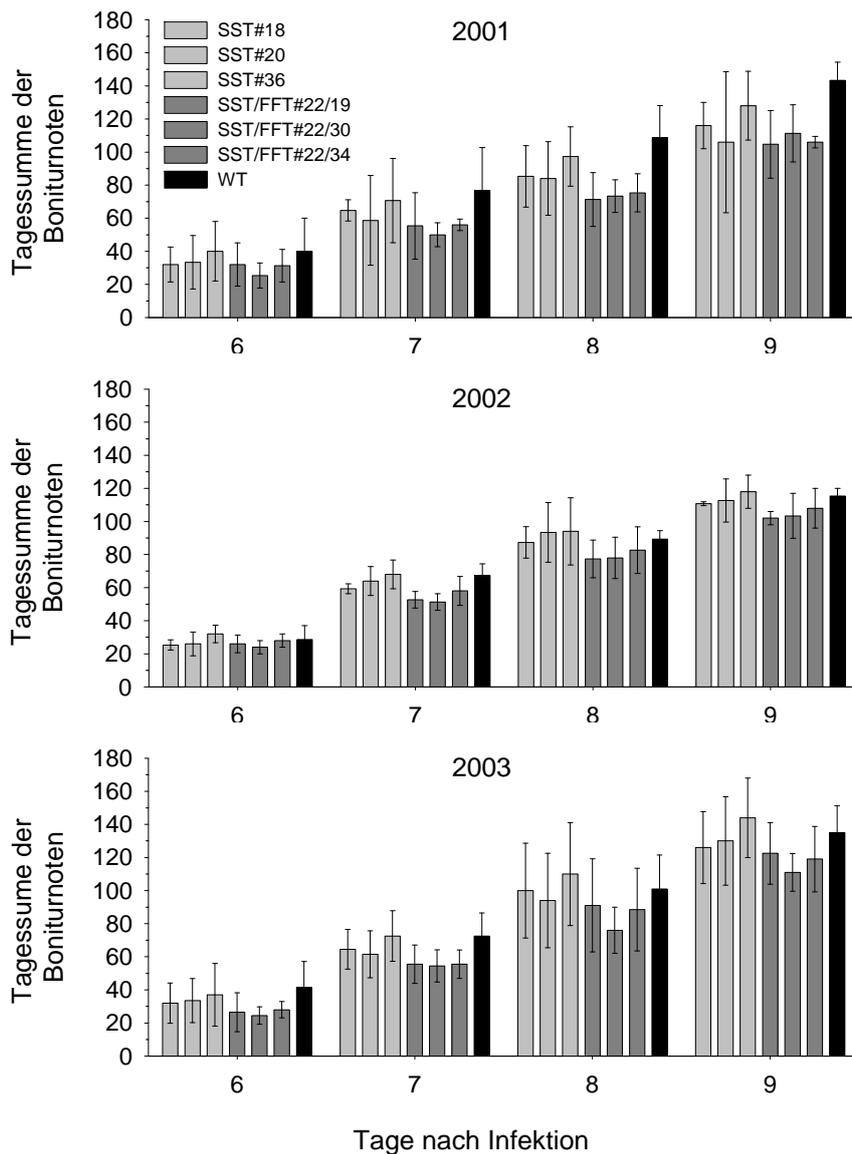


Abb. 3-24: Summe der Boniturwerte (Tagessumme) für den Deckungsgrad des Myzels von *P. infestans* auf 20 Knollenscheiben (6, 7, 8 und 9 Tage nach der Infektion) in den Jahren 2001 bis 2003. Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen à 20 Knollenscheiben \pm SD.

Die Resistenzengruppierung neuer Kartoffelsorten des Bundessortenamtes erfolgt über die Wochensumme der Boniturwerte von *P. infestans* auf den Knollenscheiben. Die Wochensumme ergibt sich aus der über 7 Tage kumulierten Boniturnote des Deckungsgrades des Myzels auf den 20 Knollenscheiben der transgenen Linien und des Wildtyps (Abb. 3-25).

Die Wochensumme der Boniturnoten aus der Vegetationsperiode 2001 lag über alle Linien zwischen $300 \pm 35,2$ (SST/FFT#22/30) und $409 \pm 75,8$ (Wildtyp). Dabei war die Wochensumme der SST/FFT-Linien geringer als die des Wildtyps, jedoch nicht signifikant. Die Wochensumme der SST-Linien glich der des Wildtyps.

Für die Untersuchungen des Knollenfäulebefalls aus der Vegetationsperiode 2002 stammte das Knollenmaterial auf Grund der Zerstörung der Freisetzungsf lächen aus einem separaten Zusatzversuch. Die Knollenscheiben aller Linien wiesen eine Wochensumme zwischen $296,7 \pm 34,0$ (SST/FFT#22/30) und $352 \pm 36,7$ (SST#36) auf. Parallel zu 2001 war die Wochensumme der Boniturwerte der SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp geringer, die der SST-Linien auf gleichem Niveau. Das Niveau der Wochensumme der Boniturnote aller Linien der Knollenscheiben aus der Vegetationsperiode 2003 lag zwischen $306,0 \pm 34,0$ (SST/FFT#22/30) und $403,5 \pm 82,1$ (SST#36). Analog zu den Knollen aus den Jahren 2001 und 2002 war die Wochensumme der Boniturwerte der SST/FFT-Linien signifikant geringer als die des Wildtyps. Die der SST-Linien war unverändert.

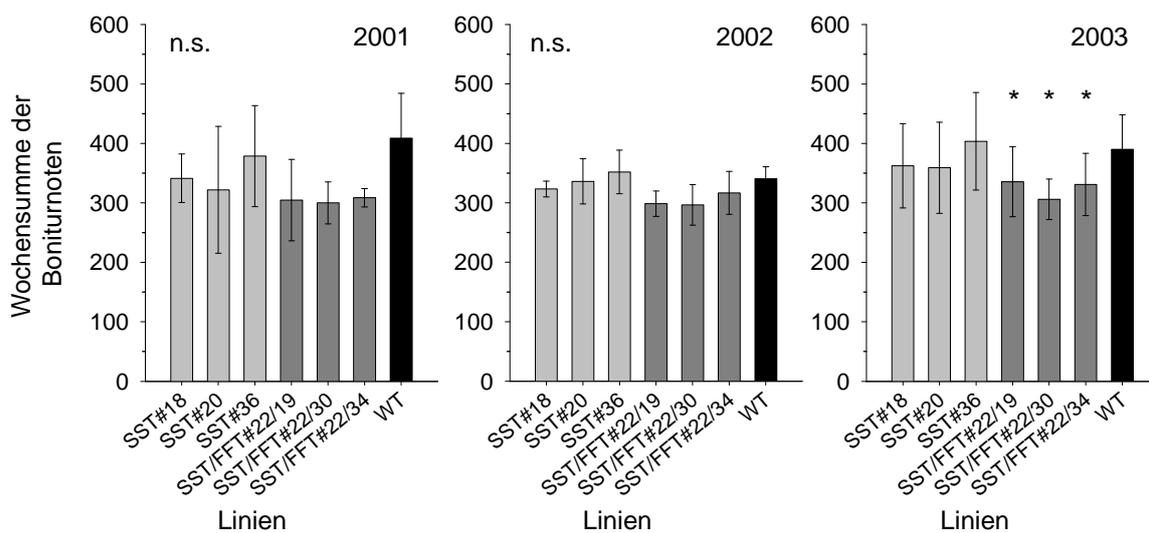


Abb. 3-25: Über 7 Tage kumulierte Boniturnote des Deckungsgrades des Myzels von *P. infestans* auf 20 Knollenscheiben (Wochensumme) der Jahre 2001 bis 2003. Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen à 20 Knollenscheiben \pm SD. * symbolisieren signifikante, n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

Durch den über drei Vegetationsperioden reduzierteren Deckungsgrad des Myzels auf den Knollenscheiben der SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp ist von einem Einfluss der Transformation auf die Anfälligkeit der Knollen für *P. infestans* auszugehen. Die Reduktion der Wochensumme der Boniturwerte der SST/FFT-Linien ist jedoch zu gering, um zu einer neuen Resistenzeingruppierung der SST/FFT-Linien im Vergleich zur Ausgangssorte Désirée nach dem Bundessortenamt zu kommen.

Parallel zum Biotest 2001 wurde Knollenmaterial für die Analytik der Kohlenhydrate entnommen und vom MPI Golm die Glucose-, Fructose-, Saccharose- und

Fructankonzentrationen bestimmt. Die Analysedaten wurden dann in Beziehung zur Anfälligkeit der Linien für *P. infestans* (Wochensumme) gestellt (Abb. 3-26).

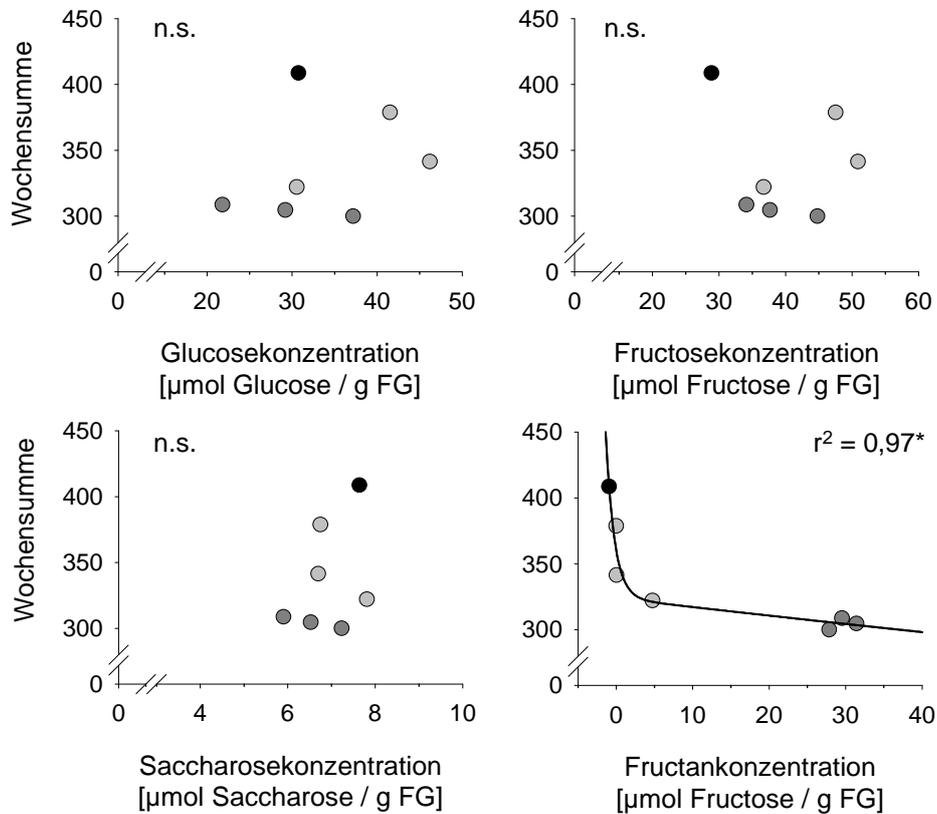


Abb. 3-26: Zusammenhang zwischen der Glucose-, Fructose-, Saccharose- und Fructankonzentration in den Knollen der transgenen Linien und dem Wildtyp zum Zeitpunkt der Knollenfäuletestung und der Wochensumme der Myzelbonitur auf den Knollenscheiben 2001. Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen.

Zwischen dem Deckungsgrad des Myzels auf den Knollenscheiben (Wochensumme) und der Glucose-, Fructose- und Saccharosekonzentration in den Knollen wurde kein Zusammenhang gefunden. Im Gegensatz dazu zeigte sich ein negativer Zusammenhang zwischen der Fructankonzentration in den Knollen und der Anfälligkeit der Knollen mit *P. infestans* ($y = 323,08 x^{-0,0158}$).

Der negative Einfluss des Fructans (Inulin) auf das Myzelwachstum von *P. infestans* konnte auch in Untersuchungen des Myzelwachstums in Flüssigkultur bestätigt werden (Abb. 3-27). Bei einer 100 %-igen Glucoseernährung (2,78 mol Glucose/l) betrug das Myzeltrockengewicht 12 Tage nach Kultur $105,0 \pm 8,7$ mg. Bereits bei einem Austausch von 10 % Glucose durch Inulin (Fructan) reduzierte sich das Myzeltrockengewicht signifikant auf $82,0 \pm 14,7$ mg. Beim weiteren Austausch der Glucose durch bis zu 30 % Inulin zeigte sich keine weitere Reduktion des Myzeltrockengewichtes. Erst ab einem

Gehalt von 40 % Inulin war eine weitere Abnahme des Myzeltrockengewichtes auf $70,8 \pm 13,2$ mg festzustellen. Verantwortlich für die Abnahme des Myzeltrockengewichtes in Flüssigkultur kann dabei sowohl die Zugabe von Inulin als auch die Abnahme des Glucosegehaltes sein. Bei der Knollenfäuleuntersuchung zeigte sich jedoch, trotz verschiedener Glucosekonzentrationen der transgenen Linien und des Wildtyps in den Knollen, ein negativer Zusammenhang zwischen der Fructankonzentration und der Wochensumme der Boniturnoten des Myzelwachstums auf den Knollenscheiben (Abb. 3-26). Daher ist davon auszugehen, dass nicht die Abnahme des Glucosegehaltes in Flüssigkultur die Reduktion des Myzeltrockengewichtes hervorgerufen hat, sondern die Zugabe des Inulins.

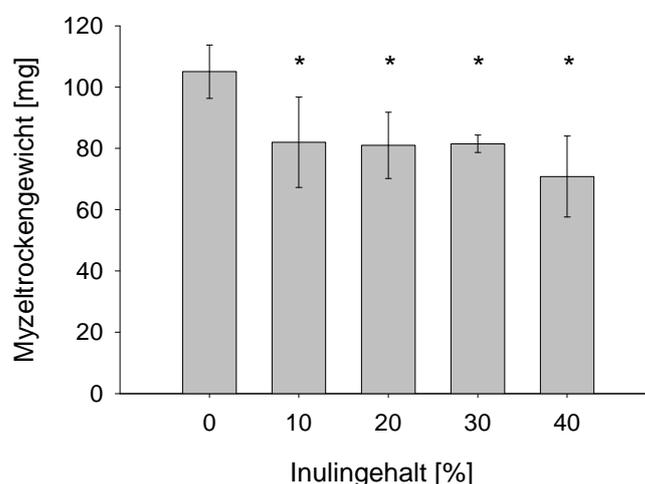


Abb. 3-27: Einfluss des Inulingehaltes auf das Myzelwachstum von *P. infestans* nach 12 Tagen Flüssigkultur. Werte sind Mittelwerte aus 7 unabhängigen Wiederholungen à 10 Kolben \pm SD. * symbolisieren signifikante, n.s. nicht signifikante Unterschiede des Inulingehaltes zur Kontrolle (0% Inulin) ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

Im Gegensatz zur Anfälligkeit des Krautes gegenüber *P. infestans* war bei der Knollenanfälligkeit ein negativer Einfluss der neuen Kohlenhydratquelle Fructan (Inulins) auf das Myzelwachstum zu beobachten. Möglicherweise sind die Fructankonzentrationen im Blatt zu niedrig gewesen, um einen eindeutigen Effekt auf den Sporulationsindex der Krautfäule erkennen zu lassen.

3.2.2 Kartoffelkrebs (*Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc.)

Die Abschätzung einer veränderten Knollenreaktion auf den Schaderreger *S. endobioticum* der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp erfolgte nach der Glynne-Lemmerzahlmethode in Anlehnung an die Resistenzprüfung neuer Kartoffelsorten des

Bundessortenamtes. Es ist bekannt, dass die Sorte Désirée in Abhängigkeit vom Krebspathotyp anfällig bzw. resistent reagiert. Um den möglichen Einfluss der Transformation auf beide Reaktionen zu erfassen, erfolgten die Krebsuntersuchungen sowohl mit dem avirulenten Pathotyp 1 als auch mit dem virulenten Pathotyp 18. Die Knollenreaktion der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp aus der Vegetationsperiode 2001 gegenüber *S. endobioticum* Pathotyp 1 und 18 ist in Abbildung 3-28 dargestellt.

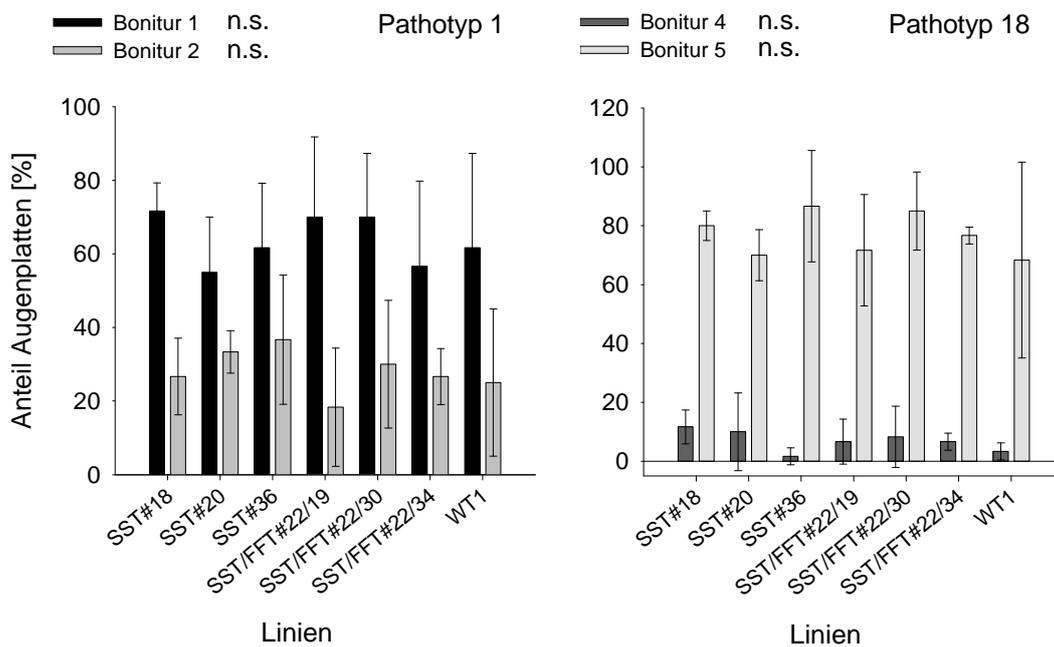


Abb. 3-28: Anteil der Augenplatten der Bonitur 1 und 2 durch den Pathotyp 1 (avirulent) und der Bonitur 4 und 5 durch den Pathotyp 18 (virulent) von *S. endobioticum*. Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen à 20 Augenplatten \pm SD. * symbolisieren signifikante, n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

Beim Pathotyp 1 lag der Anteil einer frühen Abwehrreaktion (Bonitur 1) der Augenplatten zwischen $55,0 \pm 15\%$ (SST#36) und $71,7 \pm 7,6\%$ (SST#18) und unterschied sich zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp nicht. Bei der späten Abwehrreaktion (Bonitur 2) betrug der Anteil Augenplatten von $18,3 \pm 16,1\%$ (SST/FFT#22/19) bis $36,7 \pm 17,6\%$ (SST#20), wobei ebenfalls keine Unterschiede zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp auftraten.

Im Gegensatz zum Pathotyp 1 traten beim Pathotyp 18 nur Anfälligkeitsreaktionen mit den Boniturstufen 4 und 5 auf, wobei die Boniturstufe 5 die charakteristischen Krebswucherungen enthält. Der Anteil Augenplatten der Boniturstufe 4 (zerstreuter Befall) lag zwischen $1,7 \pm 2,9\%$ (SST#20) und $11,7 \pm 5,8\%$ (SST#18). Bei der Boniturstufe 5

(dichter Befall) betrug der Anteil Augenplatten von $8,3 \pm 33,3$ % (Wildtyp) bis $86,7 \pm 18,9$ % (SST#20). Bei beiden Boniturstufen glich der Anteil befallener Augenplatten der transgenen Linien der des Wildtyps.

Die gentechnische Veränderung blieb ohne Auswirkung auf die Anfälligkeits- und Resistenzreaktion der Sorte Désirée auf *S. endobioticum*.

In weiteren Detailuntersuchungen wurde von den Augenplatten der Boniturstufe 5 des Krebspathotyps 18 (virulent) die Anzahl und das Gewicht der Wucherung/Augenplatte bestimmt (Abb. 3-29).

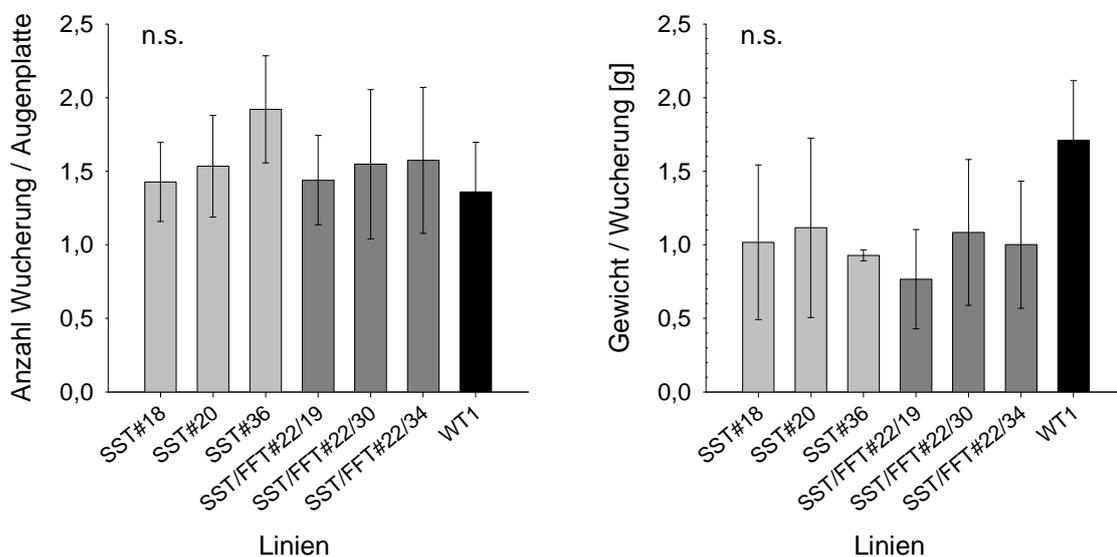


Abb. 3-29: Anzahl und Gewicht der Krebswucherung/Augenplatte nach Infektion mit *S. endobioticum* Pathotyp 18. Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen à 20 Augenplatten \pm SD. * symbolisieren signifikante, n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

Die mittlere Anzahl der Wucherungen/Augenplatte lag zwischen $1,36 \pm 0,34$ (Wildtyp) und $1,92 \pm 0,36$ (SST#36). Die Anzahl der Wucherungen / Augenplatte des Wildtyps und der transgenen Linien lag auf demselben Niveau. Das mittlere Gewicht der Wucherung/Augenplatte betrug $0,9 \pm 0,1$ g (SST#36) bis $1,7 \pm 0,4$ (Wildtyp), wobei die Masse der Wucherungen/Augenplatte aller transgenen Linien geringer war als beim Wildtyp. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Parallel zum Ansatz der Augenplatten zur Resistenzprüfung auf *S. endobioticum* erfolgte die Bestimmung der Glucose-, Fructose-, Saccharose- und Fructankonzentrationen in der Knolle durch das MPI Golm. Es wurde untersucht, ob die unterschiedlichen Gewichte der Wucherung durch den Pathotyp 18 mit Schwankungen im Kohlenhydrathaushalt in Verbindung zu bringen sind (Abb. 3-30).

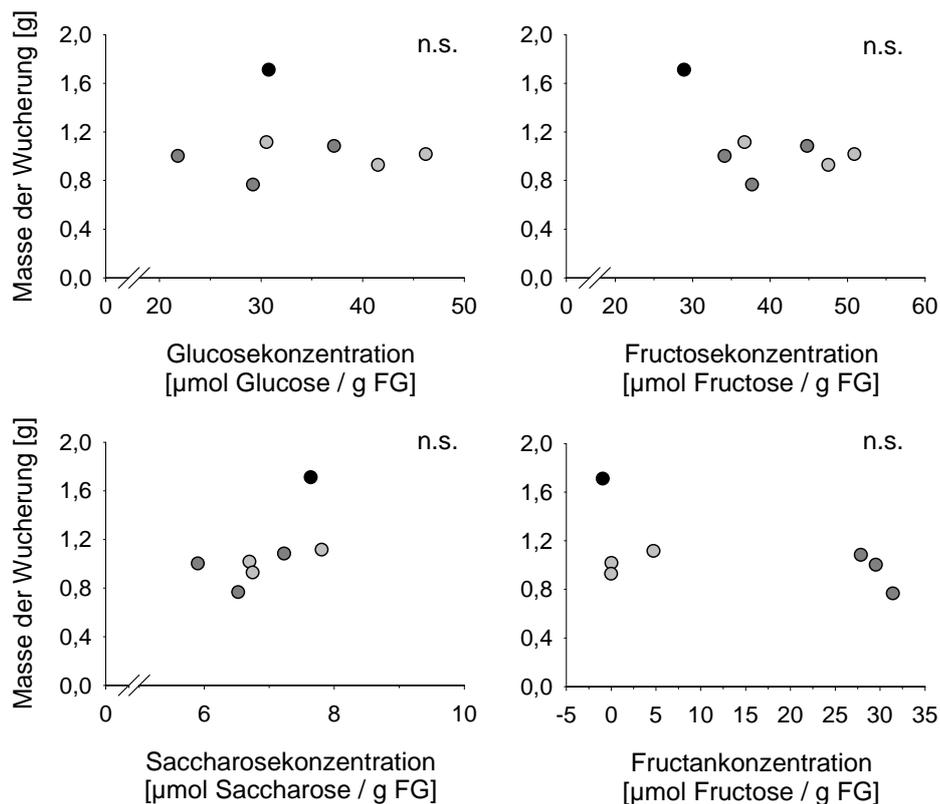


Abb. 3-30: Zusammenhang zwischen der Glucose-, Fructose-, Saccharose- und Fructankonzentration der Knollen der transgenen Linien und dem Wildtyp und der Masse der Krebswucherung durch *S. endobioticum* Pathotyp 18 der Vegetationsperiode 2001. Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen.

Die Unterschiede in der Masse der Krebswucherung zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp konnten nicht auf die unterschiedlichen Glucose-, Fructose-, Saccharose- und Fructankonzentrationen in den Knollen der transgenen Linien und des Wildtyps zurück geführt werden.

3.2.3 Kartoffelzystennematode (*Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens)

In Anlehnung an die Resistenzprüfung neuer Kartoffelsorten des Bundessortenamtes wurde die Auswirkung der gentechnischen Veränderung auf den Befall der Wurzeln mit dem Kartoffelzystennematoden *Globodera rostochiensis* Pathotyp 5 untersucht.

Die Untersuchung erfolgte in 3 Serien im Gewächshaus mit den Ernteknollen aus den Vegetationsperioden 2001 und 2002 des Freisetzungsversuchs in Dahnsdorf. Nach Infektion vorgekeimter Knollen mit Zysten und einer anschließenden Standdauer von 6-8 Wochen erfolgte die Auswertung über die Auszählung der weißen bis gelben Zysten an den Wurzeln der Pflanzen (Abb. 3-31).

Bei der 1. Serie 2001 lag die Anzahl der Zysten/Pflanze 8 Wochen nach Infektion

zwischen 142 ± 92 (SST/FFT#22/30) und 362 ± 89 (SST#20). Die Anzahl der Zysten pro Pflanze an den transgenen Linien glich der des Wildtyps. In der 2. Serie 2001 betrug die Anzahl der Zysten/Pflanze 6 Wochen nach Infektion 468 ± 128 (SST/FFT#22/19) und 576 ± 217 (SST/FFT#22/34). Wie auch in der ersten Serie 2001 war kein Unterschied zwischen der Anzahl der Zysten/Pflanze der transgenen Linien und dem Wildtyp vorhanden. In der 3. Serie, mit Knollen aus dem Zusatzversuch der Vegetationsperiode 2002, wurde 8 Wochen nach Infektion eine Anzahl von Zysten/Pflanze zwischen 283 ± 166 (SST/FFT#22/30) und 414 ± 75 (SST#36) erreicht. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Serien war die Anzahl der Zysten/Pflanze bei den SST/FFT-Linien 22/30 und 22/34 im Vergleich zum Wildtyp reduziert.

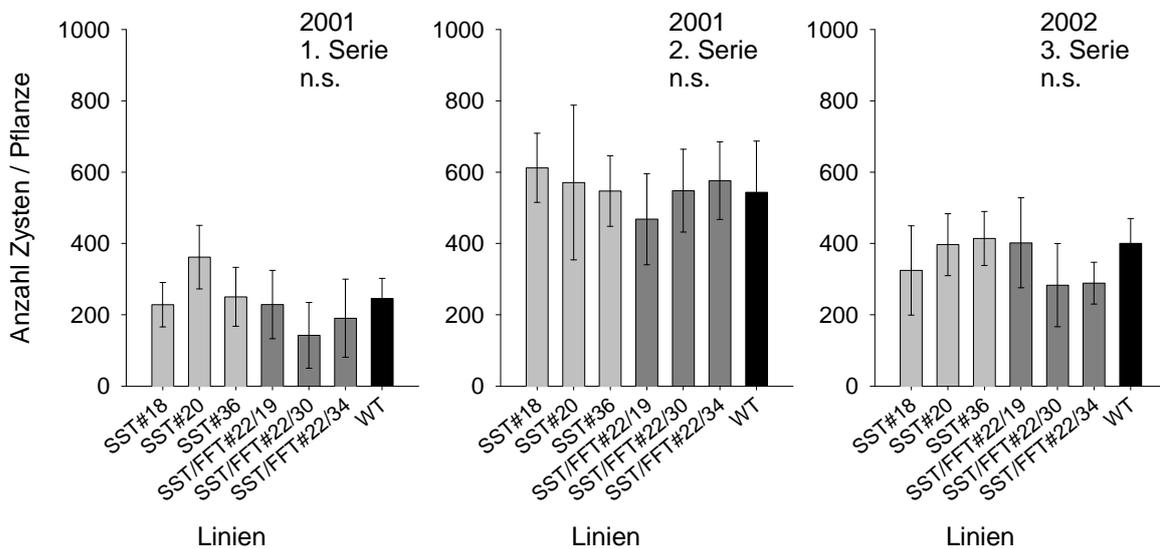


Abb. 3-31: Anzahl der Zysten/Pflanze 6 bis 8 Wochen nach Infektion mit *G. rostochiensis* Pathotyp 5 der transgenen Linien und dem Wildtyp. Werte sind Mittelwerte aus 8 Pflanzen \pm SD. * symbolisieren signifikante, n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

Der Niveauunterschied zwischen der 2. Serie sowie der 1. und 3. Serie ist vermutlich auf den Zeitraum der Versuchsdurchführung zurückzuführen. Während die 1. und 3. Serie von Januar bis März durchgeführt wurden, fand die 2. Serie von April bis Mai statt.

Neben der Auswirkung der Transformation auf den Infektionsvorgang der Larven von *G. rostochiensis* wurde auch die Auswirkung auf die Reproduktion der sedentären Weibchen untersucht. Dafür wurden von jeweils 10 Zysten der 1. und 2. Serie nach mechanische Zerkleinerung in einer wässrigen Lösung die Ei- und Larvenanzahl mikroskopisch bestimmt (Abb. 3-32).

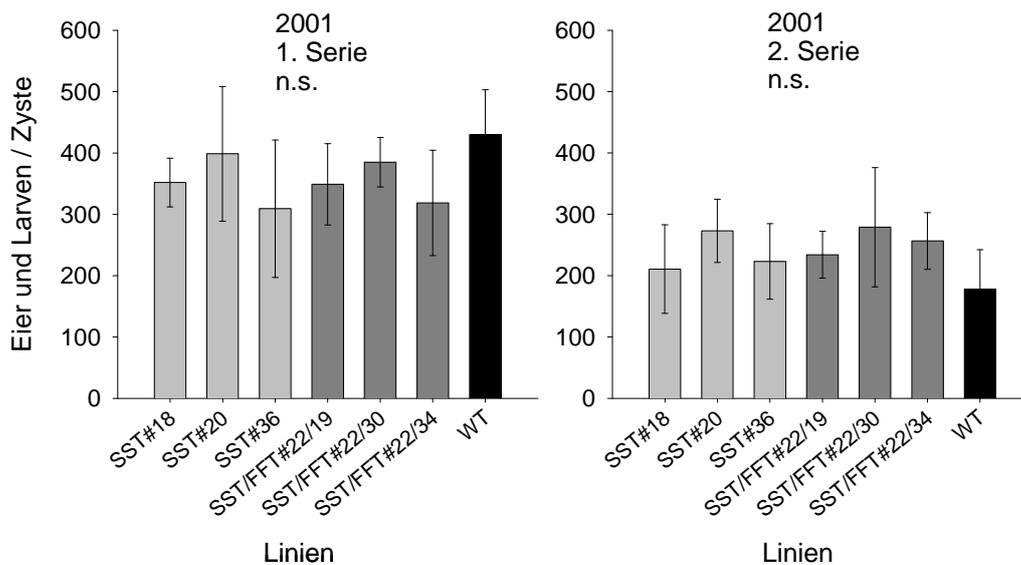


Abb. 3-32: Anzahl der Eier und Larven/Zyste von *G. rostochiensis* an den transgenen Linien und dem Wildtyp aus der 1. und 2. Serie 2001. Werte sind Mittelwerte aus 4 (1. Serie) bzw. 8 Wiederholungen (2. Serie) \pm SD. * symbolisieren signifikante, n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

In der 1. Serie 2001 betrug die Anzahl der Eier und Larven/Zyste 319 ± 86 (SST/FFT#22/34) bis 430 ± 73 (Wildtyp). Dabei war die Anzahl der Eier und Larven/Zyste sowohl bei den SST-Linien als auch den SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Bei der 2. Serie 2001 lag die Anzahl der Eier und Larven/Zyste zwischen 177 ± 65 (Wildtyp) und 279 ± 97 (SST/FFT#22/34). Im Gegensatz zur ersten Serie war die Anzahl der Eier und Larven/Zyste bei allen transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp erhöht, wobei sich die SST-Linien und SST/FFT-Linien im Niveau nicht unterschieden. Gleichzeitig unterschied sich das Niveau der Ei- und Larvenanzahl/Zyste zwischen beiden Serien deutlich. Möglicherweise besteht bei einer höheren Anzahl Zysten/Pflanze eine stärkere Konkurrenzwirkung zwischen den Zysten, die zu einer geringeren Reproduktion führt. Andererseits war die Versuchsdauer der 2. Serie um 2 Wochen kürzer, wodurch sich eventuell weniger Eier in den sedentären Weibchen (Zysten) entwickeln konnten. Unabhängig davon waren die Unterschiede in der Zystenanzahl/Pflanze und der Ei- und Larvenanzahl/Zyste zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp sehr gering, so dass von keiner Veränderung der Anfälligkeit gegenüber *G. rostochiensis* der transgenen Linien ausgegangen werden kann.

3.2.4 Wurzelgallennematode (*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood)

Neben dem Einfluss der Transformation auf die Anfälligkeit mit Kartoffelzystennematoden, wurde die Auswirkung der transgenen Linien auf den Befall der Wurzeln mit dem Wurzelgallennematoden *Meloidogyne incognita* untersucht. Die Untersuchung der transgenen Linien erfolgte in 3 Serien, wobei zwei Serien mit den Ernteknollen der Vegetationsperiode 2001 und eine Serie mit den Ernteknollen des separaten Zusatzversuchs aus 2002 erfolgte. Die Untersuchungen fanden in Anlehnung an die Resistenzprüfung neuer Kartoffelsorten des Bundessortenamtes statt. Im Gegensatz zur Resistenzprüfung galt nicht die Pflanze, sondern die Wurzelfrischmasse nach 8 bis 10-wöchiger Standdauer der Pflanzen im Gewächshaus als Bezugsgröße für die Reproduktion von *M. incognita*. Dadurch sollte der Einfluss morphologischer Unterschiede in Folge der Transformation, worauf das Wurzelfrischgewicht der 1. Serie hinwies, auf die Reproduktion minimiert werden. (Abb. 3-33).

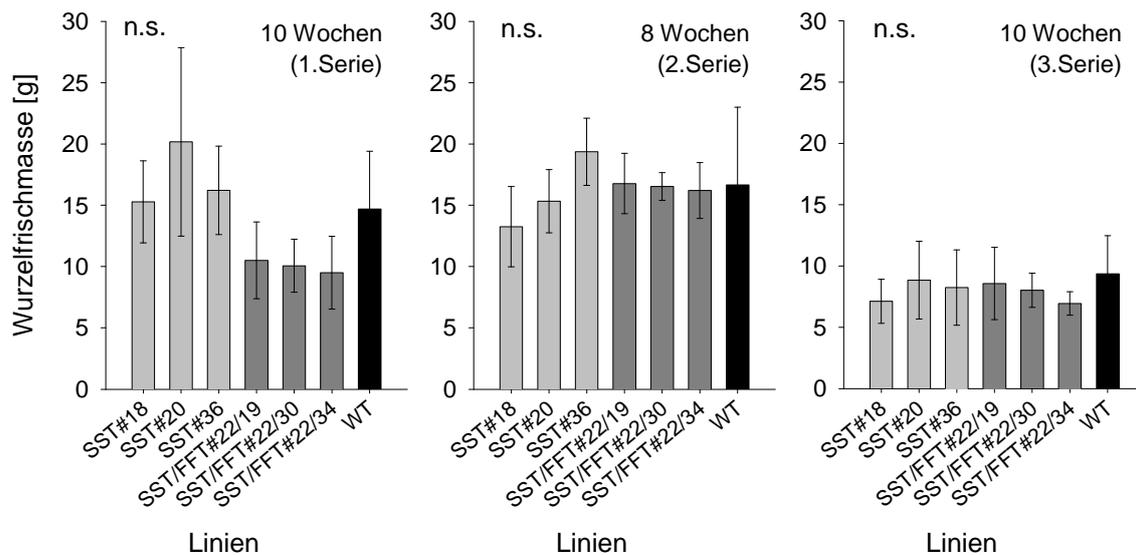


Abb. 3-33: Wurzelfrischmasse der 3 Serien der Resistenzprüfung auf *M. incognita*. Das Pflanzenmaterial der Serie 1 und 2 stammt aus der Vegetationsperiode 2001, Serie 3 aus dem Jahr 2002. Werte sind Mittelwerte aus 8 Pflanzen \pm SD. * symbolisieren signifikante, n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

In der 1. Serie von *M. incognita* betrug die Wurzelfrischmasse zwischen $9,5 \pm 3,0$ g (SST/FFT#22/34) und $20,2 \pm 7,7$ g (SST#20). Im Vergleich zum Wildtyp lag die Wurzelfrischmasse der SST-Linien 18 und 36 auf gleichem Niveau, die Wurzelfrischmasse der SST-Linie 20 war jedoch erhöht. Im Gegensatz dazu wiesen die SST/FFT-Linien eine geringere Wurzelfrischmasse zum Wildtyp auf. Durch die Kalibrierung der Knollen und eine zeitlich versetzte Pflanzung konnte in der 2. und 3. Serie der Unterschied der

Wurzelfrischmasse zwischen den SST/FFT-Linien und dem Wildtyp ausgeglichen werden. In der 2. Serie lag die Wurzelfrischmasse aller Linien zwischen $13,3 \pm 3,3$ g (SST#18) und $19,4 \pm 2,7$ g (SST#36). In der 3. Serie lag das Niveau der Wurzelfrischmasse mit $7,0 \pm 1,0$ g (SST/FFT#22/34) bis $9,4 \pm 3,1$ g (Wildtyp) deutlich unter dem der 1. und 2. Serie. Dabei unterschied sich die Wurzelfrischmasse der transgenen Linien nicht von der des Wildtyps.

Die Erfassung der Resistenz von *M. incognita* erfolgte über mikroskopische Zählung der geschlüpften Larven aus den gebildeten Gallen (sedentäre Weibchen) an den Wurzeln (Abb. 3-34).

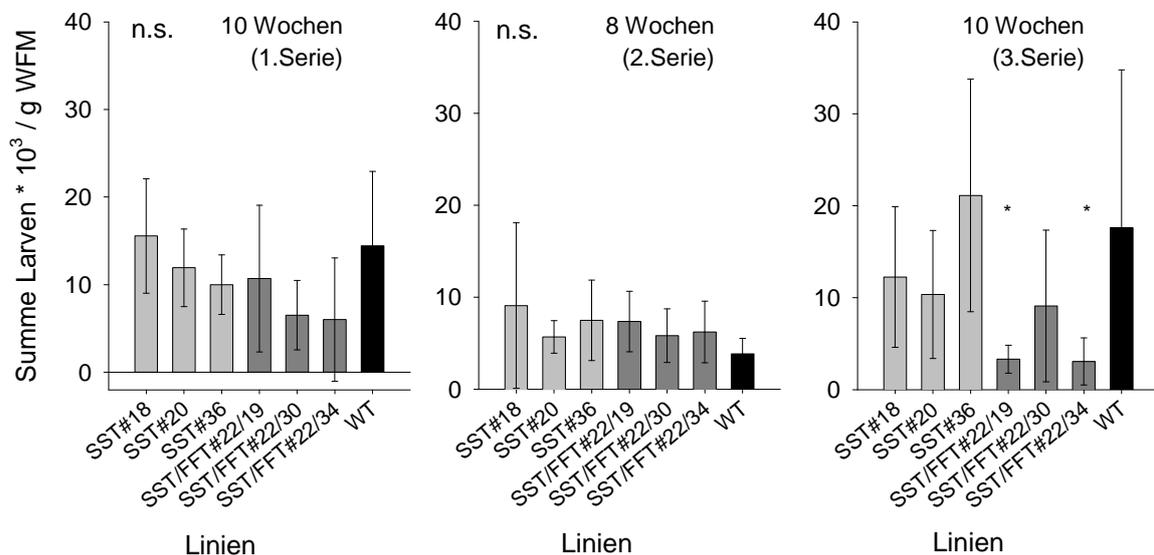


Abb. 3-34: Summe der Larven in den Wurzelgallen/g Wurzelfrischgewicht nach Infektion mit *M. incognita*. Das Pflanzenmaterial der Serie 1 und 2 stammt aus der Vegetationsperiode 2001, Serie 3 aus dem Jahr 2002. Werte sind Mittelwerte aus 8 Pflanzen \pm SD. * symbolisieren signifikante, n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunn`s-Test).

Die Anzahl der Larven in den Wurzelgallen betrug über alle Linien in der 1. Serie $6,0 \pm 7,0 * 10^3$ Larven/g Wurzel-FM (SST/FFT#22/34) bis $14,4 \pm 8,5 * 10^3$ Larven/g Wurzel-FM (Wildtyp). Zwischen den SST-Linien und dem Wildtyp bestand dabei kein Unterschied, während die SST/FFT-Linien tendenziell eine verringerte Anzahl Larven in den Wurzelgallen gebildet hatten. In der 2. Serie lag die Anzahl der Larven zwischen $3,9 \pm 1,7 * 10^3$ Larven/g Wurzel-FM (Wildtyp) und $9,1 \pm 9,0 * 10^3$ Larven/g Wurzel-FM (SST#18) und damit unabhängig von den Linien auf einem geringeren Niveau als in der 1. Serie. Es bestand kein Unterschied zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp. In der 3. Serie reichte die Anzahl der Larven von $3,3 \pm 1,5 * 10^3$ Larven/g Wurzel-FM

(STT/FFT#22/19) bis $21,1 \pm 12,6 * 10^3$ Larven/g Wurzel-FM (SST#36). In Folge der hohen Streuung unterschied sich die Anzahl der Larven in den Wurzelgallen der SST-Linien nicht vom Wildtyp. Bei den SST/FFT-Linien war die Anzahl der Larven insbesondere bei den Linien 22/19 und 22/34 im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert. Das Niveau der 3. Serie ähnelte dem Niveau der 1. Serie.

In der 1. Serie betrug die Anzahl der Infektionslarven 7.500 Larven / Pflanze, während sie in der 2. und 3. Serie bei 5.000 Larven / Pflanze lag. Die Standdauer der 2. Serie war im Vergleich zur 1. und 3. Serie um 2 Wochen verkürzt, so dass die Niveauunterschiede in der Anzahl der Larven bei den drei Serien nicht auf die Anzahl der Infektionslarven zurückzuführen sind, sondern auf die unterschiedliche Standdauer der Versuchsserien.

Durch die gentechnische Veränderung konnte in zwei von drei Serien eine tendenziell verringerte Anfälligkeit der SST/FFT-Linien gegenüber *M. incognita* ermittelt werden, während die Anfälligkeit der SST-Linien unverändert war. Mögliche Linieneffekte innerhalb des Konstruktes lassen sich auf Grund der hohen Streuung schwer deuten.

Parallel zur 1. Serie von *M. incognita* erfolgte vor Induktion des Schlupfes der Larven aus den Wurzelgallen die Bestimmung der Glucose-, Fructose-, Saccharose- und Fructankonzentrationen in den Wurzeln durch den MPI Golm (Abb. 3-35).

Zwischen der Anzahl Larven von *M. incognita* in den Wurzelgallen und der Glucose-, Fructose-, Saccharosekonzentration in den Wurzeln bestand kein Zusammenhang. Lediglich die Fructankonzentration in den Wurzeln schien tendenziell einen negativen Einfluss auf die Larvenanzahl in den Wurzelgallen zu haben und damit eventuell verantwortlich für die geringere Anzahl der Larven in den Wurzelgallen der SST/FFT-Linien zu sein. Dies war jedoch nicht statistisch gesichert ($p = 0,08$).

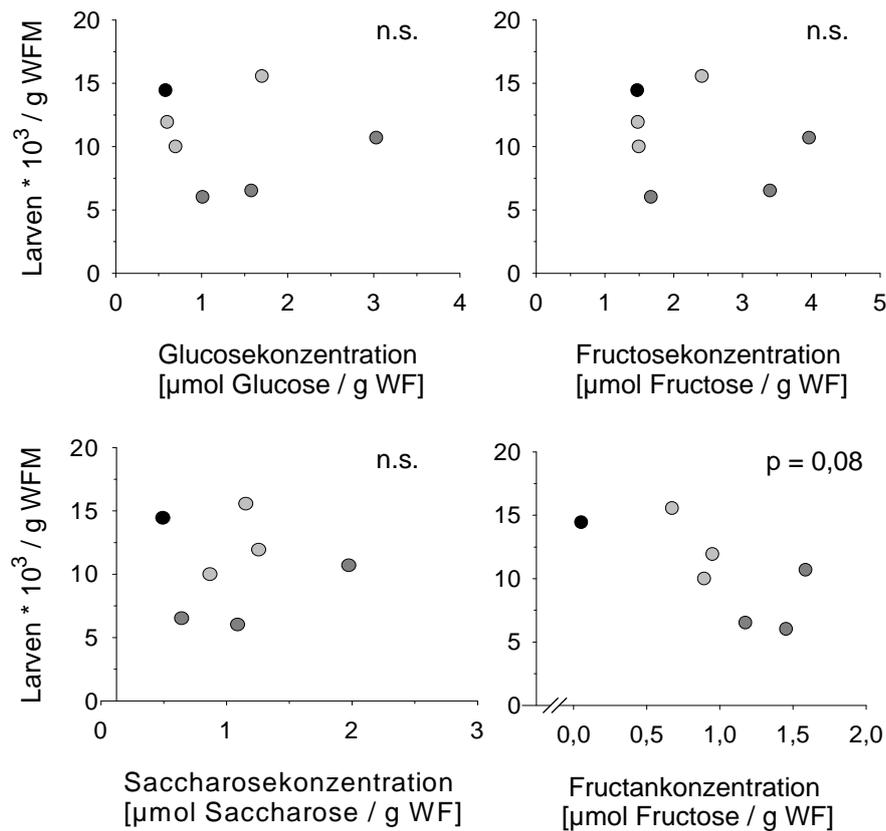


Abb. 3-35: Zusammenhang zwischen der Glucose-, Fructose-, Saccharose- und Fructankonzentration der Wurzeln der transgenen Linien und dem Wildtyp und der Anzahl Larven von *M. incognita* in der 1. Versuchsserie. Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen.

3.2.5 Entwicklung des Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata* Say)

Die Auswirkung der gentechnischen Veränderung auf die Entwicklung des Kartoffelkäfers (*L. decemlineata*) wurde unter zwei Aspekten untersucht. Zum einen wurde im Labor mit Futter aus dem Gewächshaus die Auswirkung auf das Larvenwachstum, die Reproduktion und das genetische Muster untersucht. Zum anderen wurde im Freisetzungversuch der natürliche Befall und in Detailuntersuchungen mit Freilandfutter die Reproduktion und das Larvenwachstum des Kartoffelkäfers ermittelt.

3.2.5.1 Einfluss der Nahrungsquelle auf das Larvengewicht des Kartoffelkäfers unter Laborbedingungen

Die Auswirkung der transgenen Linien auf die Larvenentwicklung des Kartoffelkäfers im Vergleich zum Wildtyp wurde über die Gewichtszunahme der Larven vom 1. bis 4. Larvenstadium (L₁-L₄) erfasst (Abb. 3-36). Der Versuchstart fand dabei mit frisch geschlüpften Larven des L₁-Stadiums statt, die ein Larvengewicht von 0,9 – 1,1 mg

aufwiesen. Die folgenden Wägungen der Larven erfolgten am 3.-5. Tag, 7. Tag, 9. Tag und 11. Tag nach Versuchsbeginn.

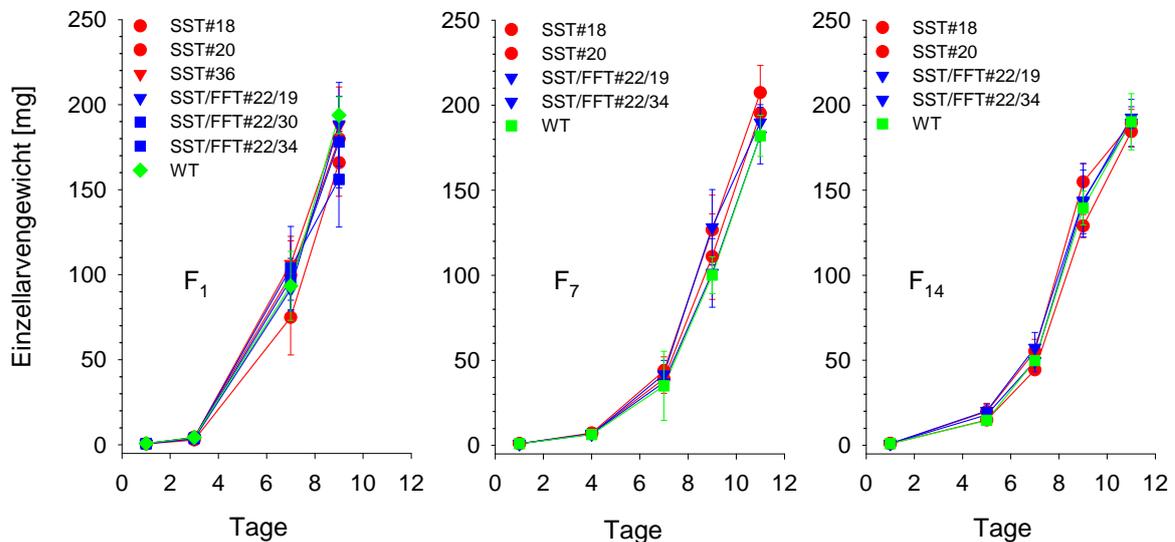


Abb. 3-36: Mittleres Einzellarvengewicht von *L. decemlineata* durch die Fütterung mit Laub der transgenen Linien und dem Wildtyp in der 1., 7. und 14. Generation. Werte sind Mittelwerte aus 5 (F_1), 5 (F_{14}) und 6 (F_7) unabhängigen Wiederholungen à 5 (F_1) bzw. 20 (F_7, F_{14}) Larven.

Die Larven der 1. Generation stammten aus Eigelegen einer über mehrere Jahre bestehenden diapausefreien Laborzucht des Kartoffelkäfers auf der Kartoffelsorte Désirée (Wildtyp). Am 3. Tag nach Versuchsansatz betrug das mittlere Einzellarvengewicht der 1. Generation $2,8 \pm 1,2$ mg (SST#18) bis $4,4 \pm 0,6$ mg (SST#20). Mit zunehmendem Larvenstadium stieg die Fraßaktivität und damit auch die Gewichtszunahme der Larven an. Am 9. Tag nach Versuchsstart war das Larvengewicht auf $156,0 \pm 28,1$ mg (SST/FFT#22/30) bis $193,8 \pm 10,9$ mg (Wildtyp) gestiegen. Dabei unterschied sich das Larvengewicht der transgenen Linien an allen Wägeterminen in Folge der hohen Streuung nicht vom Wildtyp.

Um einen langfristigen Einfluss der Nahrungsquelle auf die Larvenentwicklung des Kartoffelkäfers abschätzen zu können, wurden unter Laborbedingungen auf den transgenen Linien und dem Wildtyp im Vergleich Subpopulationen über mehrere Generationen aufgebaut. Während der Zucht der Subpopulationen auf den transgenen Linien und Wildtyp gingen in der 5. Generation die Subpopulationen der Linien SST#36 und SST/FFT#22/30 verloren und fehlen daher bei den nachfolgenden dargestellten Untersuchungen.

Im Gegensatz zu dem Larvengewicht der 1. Generation war in der 7. Generation das Larvengewicht der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp erhöht, jedoch nicht

signifikant. Das Larvengewicht zwischen den SST-Linien und SST/FFT-Linien unterschied sich in Analogie zur 1. Generation nicht. Auch nach 14 Generationen der Larven zeigte sich kein Unterschied des Larvengewichtes. Im Vergleich zum Larvengewicht nach der 7. Generation war das Larvengewicht nach der 14. Generation des Wildtyps nicht mehr geringer als das Larvengewicht der transgenen Linien an den jeweiligen Wägeterminen.

Während der Versuchsdauer trat eine Mortalität zwischen 5-15 % auf. Diese wurde jedoch weder von der Linie noch von der Dauer der Zucht der Subpopulationen beeinflusst.

Die Fütterung der Larven des Kartoffelkäfers mit dem Laub der transgenen Linien und des Wildtyps unter Laborbedingungen hatte weder einen kurzfristigen (1. Generation) noch einen langfristigen (7. und 14. Generation) Effekt auf das Larvengewicht.

3.2.5.2 Einfluss der Nahrungsquelle auf das Larvengewicht unter Freilandbedingungen

Analog zu den Versuchen des Larvengewichtes im Labor wurde in der Vegetationsperiode 2003 an den Pflanzen des Freisetzungversuches der Einfluss der Transformation auf das Larvengewicht in der 1. Generation untersucht (Abb. 3-37). Im Gegensatz zu den Laboruntersuchungen erfolgte die Ausbringung der Larven von der diapausefreien Laborzucht auf Désirée erst im L₂-Stadium (5. Tag nach Schlupf, 10 mg Larvengewicht). Dadurch wurde eine zu hohe Mortalität durch die Witterungsbedingungen im Freiland verhindert.

Drei Tage nach Ausbringung der Larven (8. Tag) betrug das Larvengewicht $20,3 \pm 7,5$ mg (SST/FFT#22/19) bis $25,8 \pm 0,7$ mg (SST/FFT#22/34). Zu diesem Zeitpunkt unterschied sich das Larvengewicht der transgenen Linien und dem Wildtyp nicht. Analog zu den Laboruntersuchungen stieg auch in der Freilanduntersuchung mit fortschreitender Larvenentwicklung die Fraßaktivität der Larven und somit das Larvengewicht, jedoch mit einem geringeren Zuwachs zwischen zwei Wägeterminen. Im Gegensatz zu den Laboruntersuchungen stieg mit zunehmendem Larvengewicht im Freiland auch die Streuung und der Einfluss der Linie auf das Larvengewicht. So lag das Larvengewicht am 13. Tag nach Larvenschlupf zwischen $87,7 \pm 32,1$ mg (SST/FFT#22/19) und $141,0 \pm 17,1$ mg (SST#20). Im Vergleich zum Larvengewicht des Wildtyps war das Larvengewicht der SST/FFT-Linien 22/19 und 22/30 sowie der Linie SST#36 reduziert. Das Larvengewicht der Linie SST/FFT#22/34 sowie der SST-Linie 18 glich dem des Wildtyps, während die Larven auf der SST-Linie 20 im Vergleich zum Wildtyp ein

höheres Larvengewicht aufwiesen.

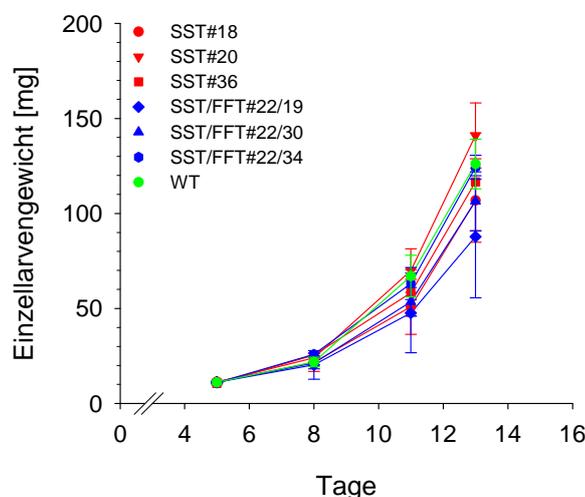


Abb. 3-37: Mittleres Einzellarvengewicht von *L. decemlineata* durch Fraß am Laub der transgenen Linien und dem Wildtyp im Freisetzungversuch 2003. Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Wiederholungen à 20 Larven.

Im Gegensatz zu den Laboruntersuchungen zeichnete sich somit im Freiland ein Einfluss der transgenen Linien als Nahrungsquelle auf das Larvengewicht in der 1. Generation ab. Dabei war dieser Einfluss jedoch linienspezifisch und nicht konstruktsspezifisch.

Parallel zu den Untersuchungen der Auswirkung der Nahrungsquelle auf das Larvengewicht des Kartoffelkäfers in der 1. Generation unter Labor- und Freilandbedingungen (3.2.5.1 und 3.2.5.2) wurden Blattproben der Futterpflanzen zur Kohlenhydratbestimmung entnommen und zur Analytik der Glucose-, Fructose-, Saccharose- und Fructankonzentrationen im Blatt dem MPI Golm übergeben. Die Ergebnisse sind getrennt nach Anzuchtbedingungen des Laubes (Labor und Freiland) in der Abbildung 3-38 enthalten.

Unter Laborbedingungen war sowohl die Glucose- als auch Fructosekonzentration im Blatt der SST-Linien im Vergleich zum Wildtyp um ca. 2 $\mu\text{mol/g}$ FG reduziert. Dagegen war die Glucose- und Fructosekonzentration der SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp tendenziell erhöht. Die Saccharosekonzentration aller Linien war unter Laborbedingungen identisch. Bei der Fructankonzentration wies nur die SST-Linie 18 eine analoge Konzentration zum Wildtyp im Blatt auf. Die Fructankonzentration aller SST/FFT-Linien und der SST-Linien 20 und 36 war im Vergleich zum Wildtyp erhöht.

Die Unterschiede der Glucose-, Fructose-, und Fructankonzentrationen zwischen den transgenen Linien und Wildtyp blieben jedoch ohne Auswirkung auf das Larvengewicht

unter Laborbedingungen in der 1. Generation (Abb. 3-36).

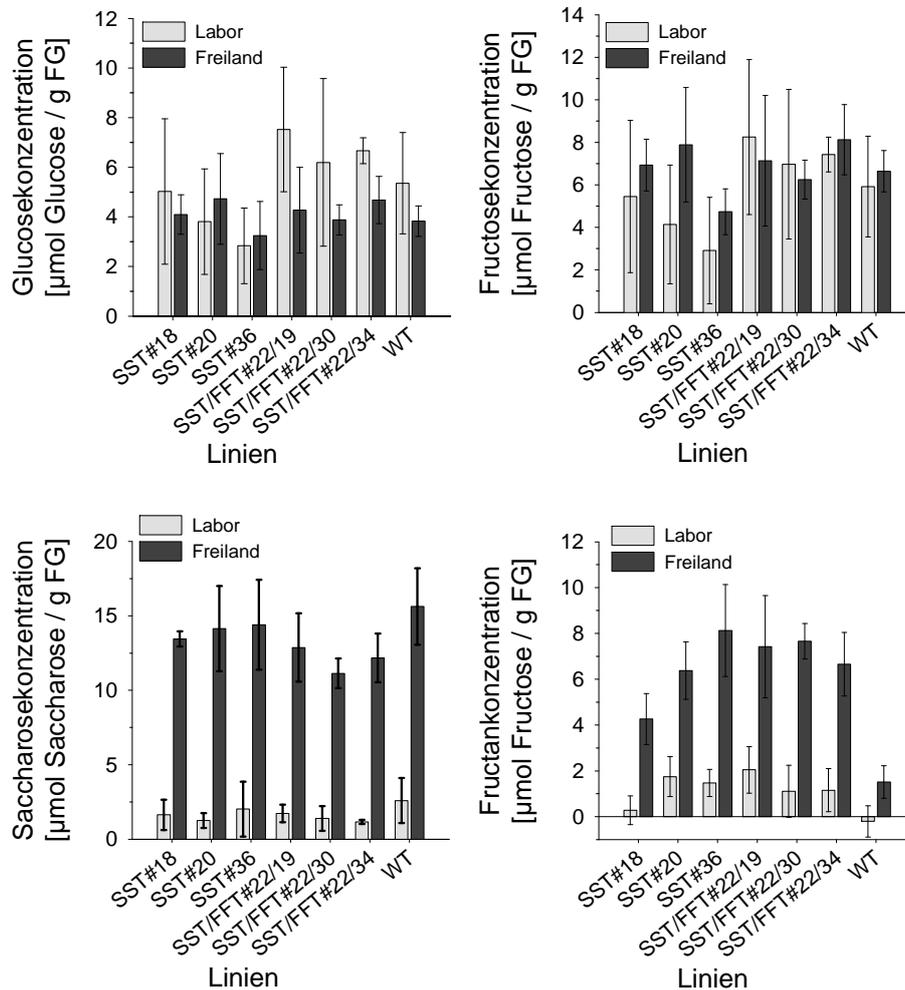


Abb. 3-38: Glucose-, Fructose-, Saccharose- und Fructankonzentration im Laub der Futterpflanzen während des Larvenfütterungsversuchs der 1. Generation von *L. decemlineata* unter Labor- und Freilandbedingungen (2001 bzw. 2003). Werte sind Mittelwerte von 3 unabhängigen Pflanzen.

Im Laub unter Freilandbedingungen 2003 war die Glucose- und Fructosekonzentration des Blattes zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp auf demselben Niveau. Lediglich die SST-Linie 36 hatte eine im Vergleich zum Wildtyp tendenziell reduzierte Fructosekonzentration. Die Saccharosekonzentration im Blatt aller transgenen Linien war geringer als beim Wildtyp, wobei die SST/FFT-Linien eine stärkere Reduktion als die SST-Linien aufwiesen. Die Fructankonzentration aller transgenen Linien war höher als beim Wildtyp, jedoch nicht homogen. Die Fructankonzentration der SST/FFT-Linien unterschied sich untereinander nicht, hingegen die Fructankonzentration der SST-Linien untereinander. Möglicherweise handelt es sich bei der Fructankonzentration um einen SST-Linieneffekt, da alle SST/FFT-Linien auch auf eine SST-Linie (22) zurückgehen. Insgesamt können die durch die Fütterung mit Freilandpflanzen auftretenden

Gewichtsunterschiede zwischen den Larven der transgenen Linien und dem Wildtyp (Abb. 3-37) nicht mit den Unterschieden im Zuckerhaushalt des Blattes in Zusammenhang gebracht werden.

Die Gesamtzuckergehalte im Blatt waren sowohl von den Anzuchtbedingungen (Gewächshaus/Freiland) als auch vom Entwicklungsstadium der Pflanzen abhängig. Im Laub aus der Vegetationsperiode 2003 war die Glucosekonzentration des Blattes unter Freilandbedingungen im Vergleich zum Laub unter Laborbedingungen reduziert. Die Fructosekonzentration zwischen beiden Anzuchtbedingungen glich sich in Abhängigkeit von der Linie. Während sich die Fructosekonzentration des Wildtyps und der SST/FFT-Linien auf dem Niveau der Fructosekonzentration unter Laborbedingungen befand, war die der SST-Linien im Freiland im Vergleich zum Labor erhöht. Die Saccharosekonzentration war unter Freilandbedingungen bei allen Linien im Gegensatz zu den Gewächshausbedingungen gestiegen. Bei der Fructankonzentration im Blatt war bei allen Linien ein Anstieg unter Freilandbedingungen im Vergleich zu den Laborbedingungen zu verzeichnen.

3.2.5.3 Einfluss der Nahrungsquelle auf die Reproduktion des Kartoffelkäfers unter Laborbedingungen

Neben dem Einfluss der Nahrungsquelle auf das Larvengewicht wurde auch der mögliche Einfluss auf die Reproduktion der Kartoffelkäferweibchen unter Laborbedingungen beobachtet (Abb. 3-39). Durch Versuchsserien mit den Subpopulationen konnte neben der kurzfristigen Auswirkung auch die langfristige Auswirkung der Nahrungsquelle auf die Reproduktion der Kartoffelkäferweibchen erfasst werden. Die Erfassung der Reproduktion erfolgte durch die Zählung der Eier, die in einem Zeitraum von 24 h von jeweils 10 separierten Weibchen gelegt wurden. Die Erhebung wurde in einem Zeitraum von 7 Tagen dreimal wiederholt. Die Subpopulationen auf den Linien SST#36 und SST/FFT#22/30 sind nach der 5. Generation eingebrochen und daher nicht bei dem langfristigen Einfluss der Nahrungsquelle auf die Reproduktion berücksichtigt worden.

In der 1. Generation lag die Anzahl der Eier/Weibchen zwischen $79,7 \pm 3,8$ (SST#18) und $96,1 \pm 9,9$ (SST/FFT#22/19). Weder die mit den SST-Linien gefütterten Weibchen noch die der SST/FFT-Linien wiesen eine veränderte Anzahl Eier/Weibchen im Vergleich zum Wildtyp auf. In der 11. Generation betrug die Anzahl der Eier/Weibchen $53,0 \pm 11,2$ (SST/FFT#22/19) bis $71,0 \pm 9,2$ (SST#18). Ebenso wie in der 1. Generation unterschied

sich in der 11. Generation die Anzahl Eier/Weibchen zwischen den SST-Linien, SSF/FFT-Linien und Wildtyp nicht. Im Vergleich zur 1. Generation war jedoch in der 11. Generation unabhängig von der Linie das Niveau der Eier/Weibchen reduziert.

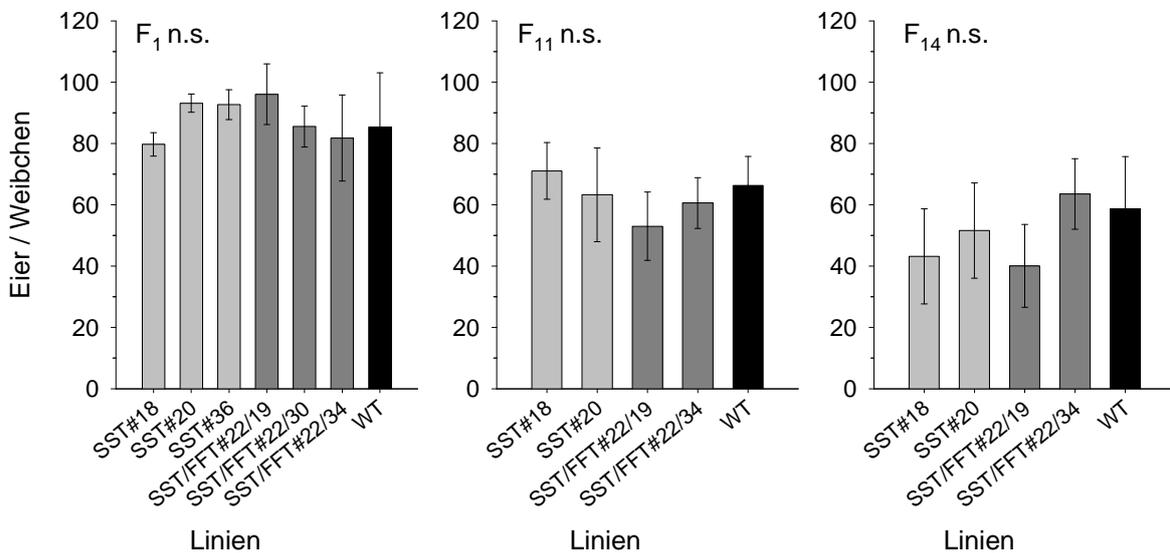


Abb. 3-39: Reproduktion von *L. decemlineata* durch Fütterung mit Laub der transgenen Linien und dem Wildtyp in der 1., 11. und 14. Generation. Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen à 10 Weibchen. * symbolisieren signifikante, n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

Nach 14 Generationen wurden über alle Linien zwischen $40,1 \pm 13,5$ (SST/FFT#22/19) und $63,6 \pm 11,5$ (SST/FFT#22/34) Eier/Weibchen gelegt. Wie auch nach der 1. und 11. Generation traten keine Unterschiede zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp in der Eiablage auf. Im Vergleich zur 11. Generation war insgesamt das Niveau der Anzahl Eier/Weibchen in der 14. Generation gesunken.

Im Anschluss an die Reproduktionsversuche wurden die abgelegten Eier zur Bestimmung der Schlupfrate der Larven genutzt. Dabei wurde der Larvenschlupf 4-5 Tage nach Ermittlung der Eianzahl der Reproduktionsversuche erfasst (Abb. 3-40).

Die Schlupfrate der Larven aus dem Reproduktionsversuch der 1. Generation lag zwischen $74,2 \pm 3,1$ % (SST#20) und $84,1 \pm 1,7$ % (SST#36) und unterschied sich zwischen den transgenen Linien und Wildtyp nicht. Nach der 11. Generation lag die Schlupfrate der Larven zwischen $67,1 \pm 6,6$ % (Wildtyp) und $74,3 \pm 5,7$ % (SST#20), wobei analog zur Schlupfrate der 1. Generation keine Unterschiede zwischen den transgenen Linien und Wildtyp auftraten. Ebenso wie die Anzahl Eier/Weibchen war auch die Schlupfrate der Larven in der 11. Generation im Vergleich zur 1. Generation bei allen Varianten reduziert. Die Schlupfrate der Eier nach der 14. Generation betrug $76,5 \pm 5,9$ % (SST#20) bis

90,8 ± 1,0 % (SST#18). Zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp war kein Unterschied in der Schlupfrate der Larven vorhanden. Insgesamt lag das Niveau der Schlupfrate über alle Linien auf dem der 1. Generation.

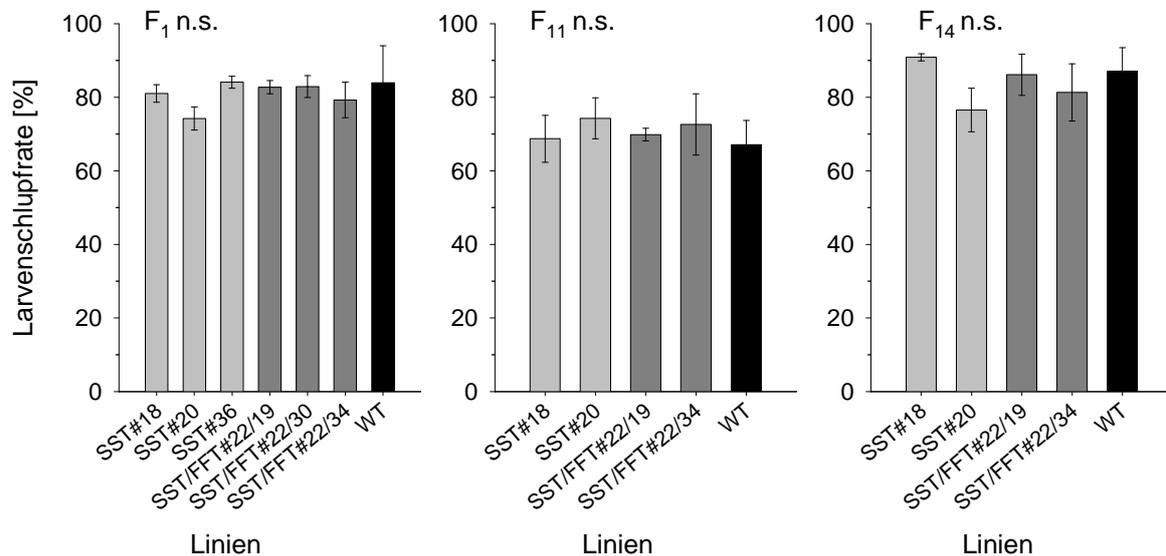


Abb. 3-40: Schlupfrate der Larven von *L. decemlineata* aus den Eiern der Reproduktionsversuche nach der 1., 11. und 14. Generation. Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen à 10 Weibchen. * symbolisieren signifikante, n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

Weder die kurz- noch die langfristige Fütterung des Kartoffelkäfers mit dem Laub der transgenen Linien und dem Wildtyp aus der Gewächshausanzucht beeinflusste die Reproduktion der Weibchen und den Larvenschlupf.

3.2.5.4 Einfluss der Fütterung der Larven unter Freilandbedingungen auf deren spätere Reproduktion als Käfer

Nach Fütterung der Larven mit dem Laub der Linien aus dem Freisetzungsversuch in der 1. Generation wurde auch der Einfluss der Nahrungsquelle während der larvalen Entwicklung des Kartoffelkäfers auf die spätere Reproduktion der Kartoffelkäferweibchen bestimmt (Abb. 3-41). Nach der Metamorphose der Larven des Freilandversuchs im Labor wurden die geschlüpften Käfer einheitlich mit dem Laub des Wildtyps Désirée gefüttert. Nach Reifungsfraß der Weibchen erfolgte die Erfassung der Reproduktion und Larvenschlupfrate analog wie unter Punkt 3.2.5.3.

Die Anzahl der Eier/Weibchen lag zwischen $79,7 \pm 3,8$ (SST#18) und $96,1 \pm 9,9$ (SST/FFT#22/19). Im Vergleich zum Wildtyp war die Eiablage der transgenen Linien SST#20, SST#36 und SST/FFT#22/19 erhöht, während die der restlichen transgenen

Linien dem des Wildtyps glichen. Die reduzierten Larvengewichte nach Fütterung mit Blättern der Linien SST/FFT#22/19 und 22/30 führten nicht zu einer reduzierten Reproduktionsleistung der Käfer. Im Gegenteil, Larven aus der Fütterung mit SST/FFT#22/19 zeigten eine höhere Anzahl abgelegter Eier als der Wildtyp, gefolgt von Larven, wo das Futter ohne Auswirkung auf das Larvengewicht blieb (SST#20 und 36).

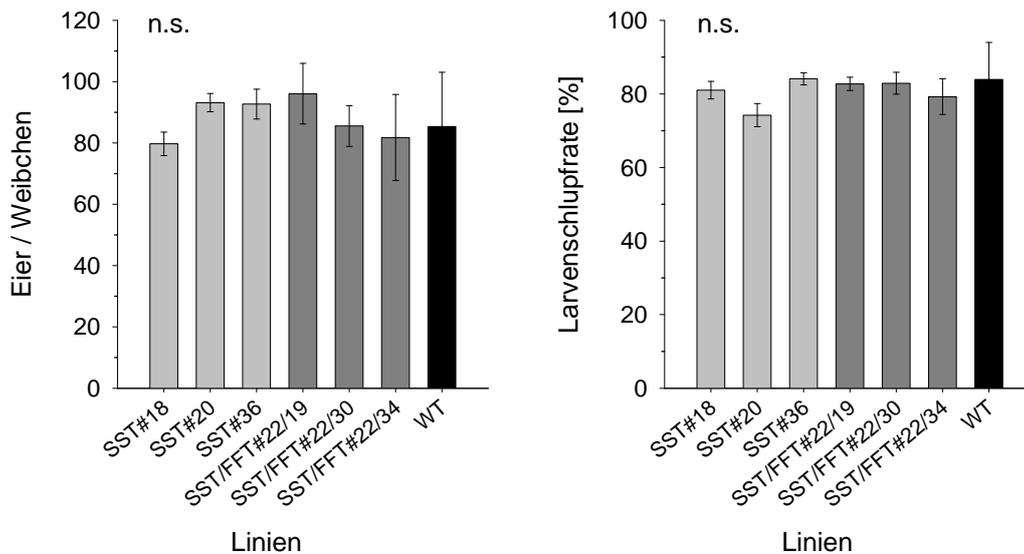


Abb. 3-41: Anzahl der Eier/Weibchen und Larvenschlupfrate von *L. decemlineata* nach Fütterung der Larven mit Laub der transgenen Linien und dem Wildtyp aus dem Freilandversuch 2003 und Fütterung der Käfer mit Désirée. Werte sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Wiederholungen à 10 Weibchen. * symbolisieren signifikante, n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

Die Larvenschlupfrate aus den Eiern der Reproduktionsuntersuchungen betrug $74,2 \pm 3,1$ % (SST#20) bis $84,1 \pm 1,7$ % (SST#36). Die Schlupfrate der transgenen Linien glich der des Wildtyps. Es wurde kein Einfluss der transgenen Linien als Futter der Larven auf die Schlupfrate später abgelegter Eier ermittelt.

3.2.5.5 Genotypische Auswirkungen einer permanenten Fütterung des Kartoffelkäfers mit transgenem Futter

Mit Hilfe von 11 RAPD-Primern wurde die Auswirkung einer permanenten Fütterung mit transgenem Laub auf das genetische Muster der Subpopulationen untersucht. Die Auswertung der RADP-Muster erfolgte dabei über den Nei & Li-Koeffizienten mit Hilfe des Programms MVSP. Dieser Koeffizient gibt die Ähnlichkeit der RAPD-Muster an (Abb. 3-42).

Nach der 1. Generation betrug die Ähnlichkeit des genetischen Muster der Kartoffelkäfer aller Linien über 96,6 %. Mit zunehmenden Generationen nahmen die Unterschiede im genetischen Muster zu, ohne jedoch über 10 % anzusteigen. So wiesen nach der 6. Generation die genetischen Muster über alle Linien eine Ähnlichkeit von 95,6 % auf, die in der 9. Generation auf 91,8 % sank. Eine weitere Zunahme der Heterogenität der genetischen Muster wurde nicht registriert. Nach der 13. Generation blieb das Niveau der Heterogenität auf dem der 9. Generation stehen.

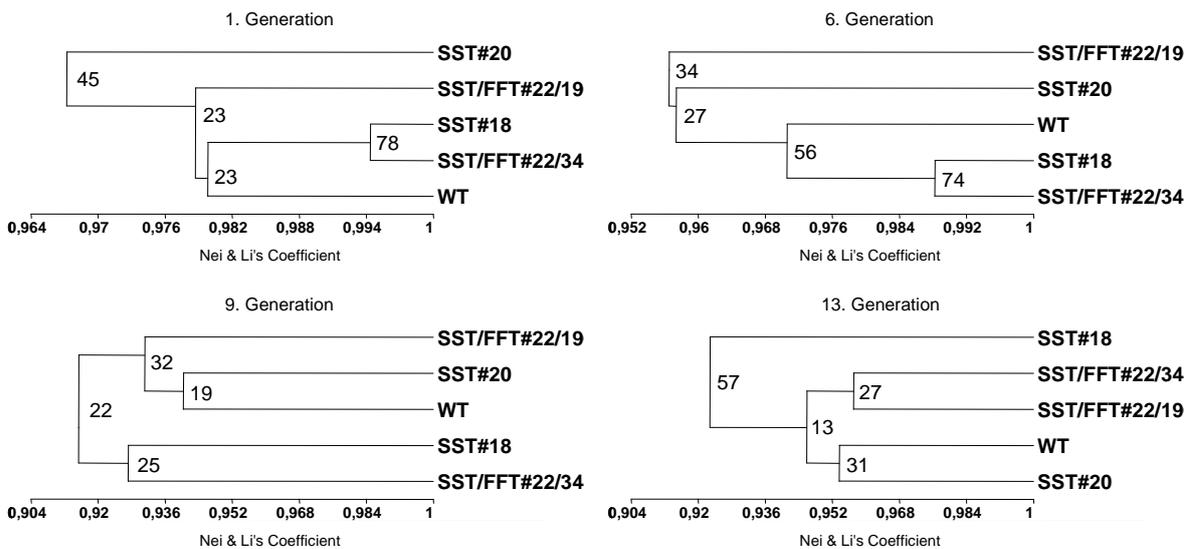


Abb. 3-42: Nei & Li-Koeffizienten der Subpopulationen von *L. decemlineata* nach der 1., 6., 9. und 13. Generation der Käfer auf den transgenen Linien und dem Wildtyp aus 11 RAPD-Primern.

Innerhalb einer Generation war eine Clusterung zwischen Linien zu verzeichnen, die allerdings nicht konstruktsspezifisch war. So kam es in der 1. Generation zur Clusterung der transgenen Linien SST#18 und SST/FFT#22/34, die bis zur 6. Generation mit einem Bootstrapwert über 60 bestehen blieb. Auch in der 9. Generation blieb diese Clusterung noch bestehen, jedoch mit einem Bootstrapwert unter 60, so dass hier von einer zufälligen Ähnlichkeit ausgegangen werden muss. Erst in der 13. Generation fand die Clusterung zwischen den beiden SST/FFT-Linien statt, aber mit einem niedrigen Bootstrapwert (27). Vermutlich beruht die Clusterung der transgenen Linien SST#18 und SST/FFT#22/34 mit dem hohen Bootstrapwert auf genetische Ähnlichkeiten im Ausgangsmaterial der Subpopulation.

Die geringen genetischen Unterschiede basierten auf wenige polymorphe Banden (Abb. 3-43), so dass insgesamt anzunehmen ist, dass die gentechnischen Veränderungen keine Auswirkungen auf die Selektion bestimmter Genotypen hatten.

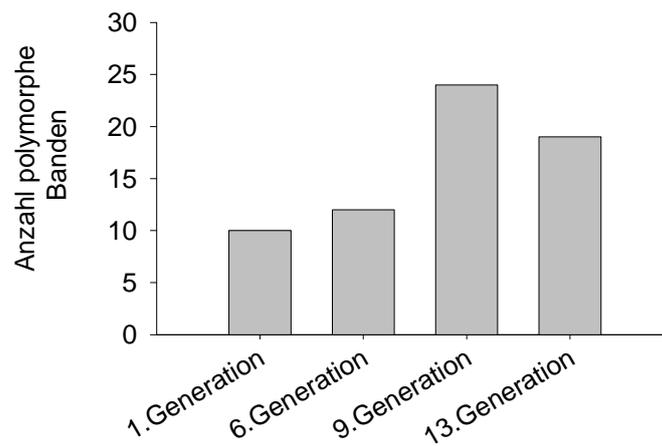


Abb. 3-43: Anzahl der polymorphen Banden durch 11 RAPD-Primer in der 1., 6., 9. und 13. Generation von *L. decemlineata* auf dem Laub der transgenen Linien und dem Wildtyp.

3.2.5.6 Natürlicher Befall mit dem Kartoffelkäfer im Freisetzungsversuch

Im Freisetzungsversuch der Vegetationsperiode 2001 und 2003 wurde die Auswirkung der Transformation auf den natürlichen Kartoffelkäferbefall über die Anzahl Eigelege/Pflanze erfasst (Abb. 3-44).

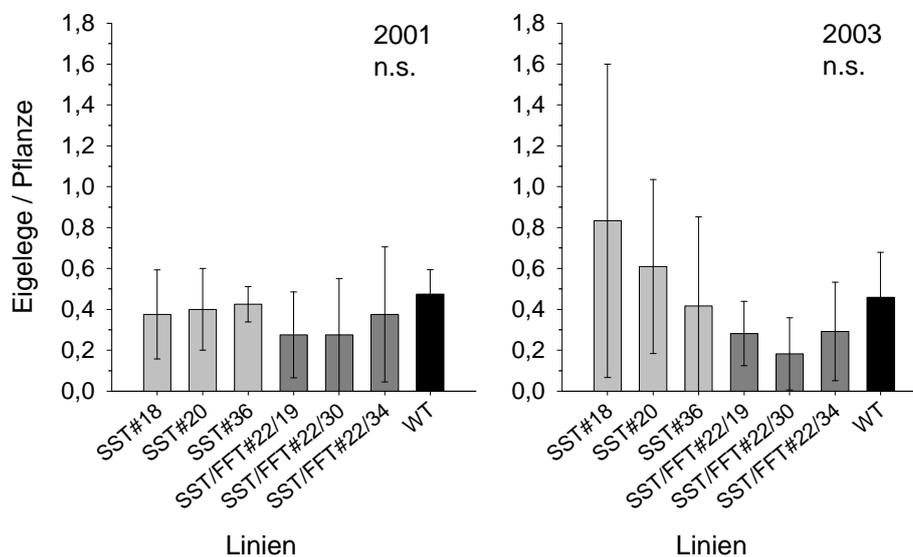


Abb. 3-44: Kartoffelkäferbefall in den Vegetationsperioden 2001 und 2003. Werte sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Wiederholungen à 12 Pflanzen \pm SD. * symbolisieren signifikante, n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

In der Vegetationsperiode 2001 betrug die Anzahl Eigelege/Pflanze $0,28 \pm 0,21$ (SST/FFT#22/19) bis $0,48 \pm 0,12$ (Wildtyp). Während die Anzahl Eigelege/Pflanze der SST-Linien der des Wildtyps gleich, war der Befall der SST/FFT-Linien tendenziell im

Vergleich zum Wildtyp reduziert. In der Vegetationsperiode 2003 lag die Anzahl der Eigelege/Pflanze zwischen $0,18 \pm 0,18$ (SST/FFT#22/30) und $0,83 \pm 0,77$ (SST#18). Ebenso wie im Jahr 2001 war die Anzahl der Eigelege/Pflanze der SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp verringert. Die SST-Linien wiesen im Gegensatz zur Vegetationsperiode 2001 linienabhängig eine höhere Anzahl Eigelege/Pflanze als der Wildtyp auf.

Die über beide Vegetationsperioden tendenziell reduzierte Anzahl Eigelege/Pflanze der SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp lässt einen Einfluss der Transformation bei den SST/FFT-Linien auf den Kartoffelkäferbefall vermuten. Da der natürliche Primärbefall der Parzelle durch den Kartoffelkäfer stark von ihrer Lage zu den Überwinterungsflächen der Käfer abhing, was zu großen Variabilitäten führte, wurden ab 2002 Detailuntersuchungen zur Anzahl Eigelege/Pflanze an den transgenen Linien und dem Wildtyp unter begehbaren Käfigen durchgeführt. In der Vegetationsperiode 2002 wurde zunächst geklärt, ob die reduzierte Anzahl der Eigelege des Kartoffelkäfers an den Pflanzen der SST/FFT-Linien von der Nähe bzw. Entfernung des Kartoffelkäfers zur Pflanze abhängig ist. Zu diesem Zweck wurden in 3 Wiederholungen die frisch geschlüpften Käfer aus der diapausefreien Laborzucht 1.) zentriert in der Käfigmitte (Variante 1) und 2.) gezielt an jede einzelne Pflanze (Variante 2) ausgebracht. Nach 22 Tagen erfolgte die Bonitur der Pflanzen in den Käfigen auf die Anzahl Eigelege/Pflanze und Weibchen (Abb. 3-45).

Unabhängig von der Linie betrug die Anzahl der Eigelege/Pflanze und Weibchen bei der zentrierten Ausbringungsform $0,13 \pm 0,05$ und $0,11 \pm 0,06$ bei der Ausbringungsform direkt an die Pflanze. Die Form der Ausbringung der Kartoffelkäfer in den Käfigen hatte somit keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl Eigelege/Pflanze und Weibchen.

Die Anzahl der Eigelege/Pflanze und Weibchen der transgenen Linien und des Wildtyps über beide Ausbringungsformen lag zwischen $0,06 \pm 0,02$ (SST/FFT#22/34) und $0,18 \pm 0,07$ (SST#36). Im Gegensatz zu den Ergebnissen des natürlichen Befalls mit Kartoffelkäfern (Abb. 3-44) war an den SST/FFT-Linien nicht bei allen Linien die Anzahl Eigelege/Pflanze und Weibchen reduziert, nur bei der Linie SST/FFT#22/34. Die Anzahl Eigelege/Pflanze und Weibchen der SST-Linien war verglichen mit der des Wildtyps erhöht, im Falle der Linie SST#36 sogar signifikant.

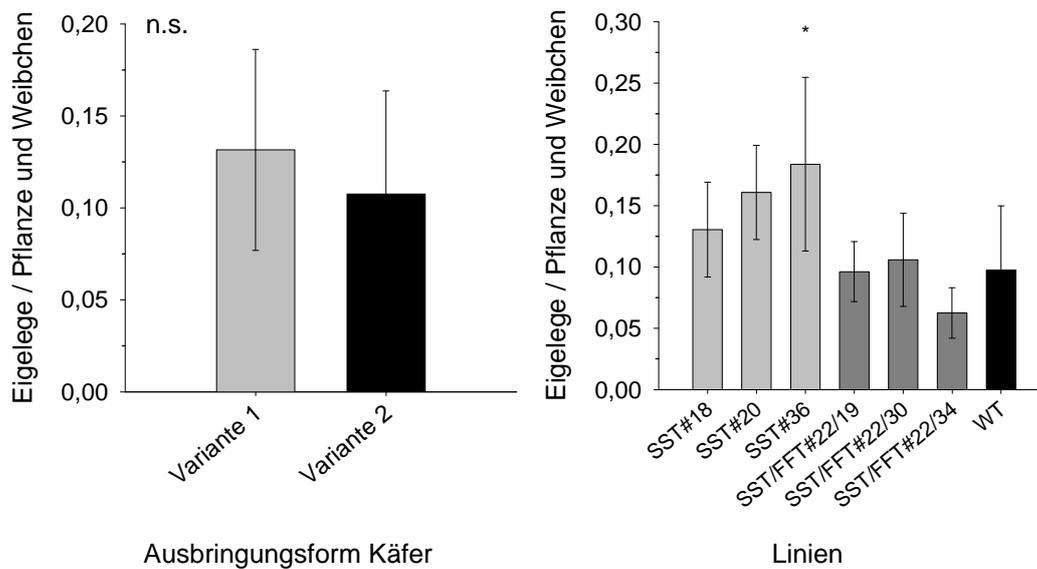


Abb. 3-45: Einfluss der Ausbringungsform und Linien auf die Anzahl Eigelege/Pflanze und Weibchen von *L. decemlineata* der Detailuntersuchung in den Käfigen der Vegetationsperiode 2002. Werte sind Mittelwerte aus 3 (Ausbringungsform) bzw. 6 (Linien) unabhängigen Wiederholungen à 4 Pflanzen \pm SD. * symbolisieren signifikante, n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

In den Detailuntersuchungen des Kartoffelkäfers in den Käfigen der Vegetationsperiode 2002 konnten somit nicht die Ergebnisse des natürlichen Befalls der transgenen Linien und des Wildtyp bestätigt werden. Die Detailuntersuchungen 2002 fanden vom 1.-28. Juli statt und somit zu einem späteren Entwicklungsstadium der Pflanzen als die Bonituren des natürlichen Befalls (1.6.2001, 8.6.2003). Um Effekte des Entwicklungsstadiums der Pflanzen auf die Anzahl Eigelege/Pflanze und Weibchen ermitteln zu können, wurden in der Vegetationsperiode 2003 die Detailuntersuchungen des Kartoffelkäfers in den Käfigen an zwei Zeitpunkten durchgeführt (Abb. 3-46).

Die 1. Ausbringung der frisch geschlüpften Käfer, zentriert in den Käfigen, erfolgte ab dem 1.6.2003. Dieser Zeitpunkt entsprach dem Entwicklungsstadium der Pflanzen während der Bonitur des natürlichen Primärbefalls mit Kartoffelkäfern. Bei der anschließenden Bonitur lag die Anzahl Eigelege/Pflanze und Weibchen zwischen $0,12 \pm 0,04$ (SST/FFT#22/34) und $0,20 \pm 0,04$ (Wildtyp). Dabei war bei allen SST/FFT-Linien die Anzahl Eigelege/Pflanze und Weibchen im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert. Auch die SST-Linien wiesen eine geringere Anzahl Eigelege/Pflanze und Weibchen im Vergleich zum Wildtyp auf, jedoch nicht signifikant. Nach der 2. Ausbringung der Käfer ab dem 1.7.2003 betrug die Anzahl Eigelege/Pflanze und Weibchen $0,05 \pm 0,02$ (SST/FFT#22/34) bis $0,10 \pm 0,04$ (SST#20). Im Gegensatz zur

1. Ausbringung der Käfer unterschied sich die Anzahl Eigelege/Pflanze und Weibchen zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp bei der 2. Ausbringung nicht. Die höhere Anzahl Eigelege/Pflanze und Weibchen der SST-Linien aus der Detailuntersuchung 2002 konnte in der 2. Ausbringung 2003, trotz gleichem Entwicklungsstadium der Pflanze, nicht bestätigt werden.

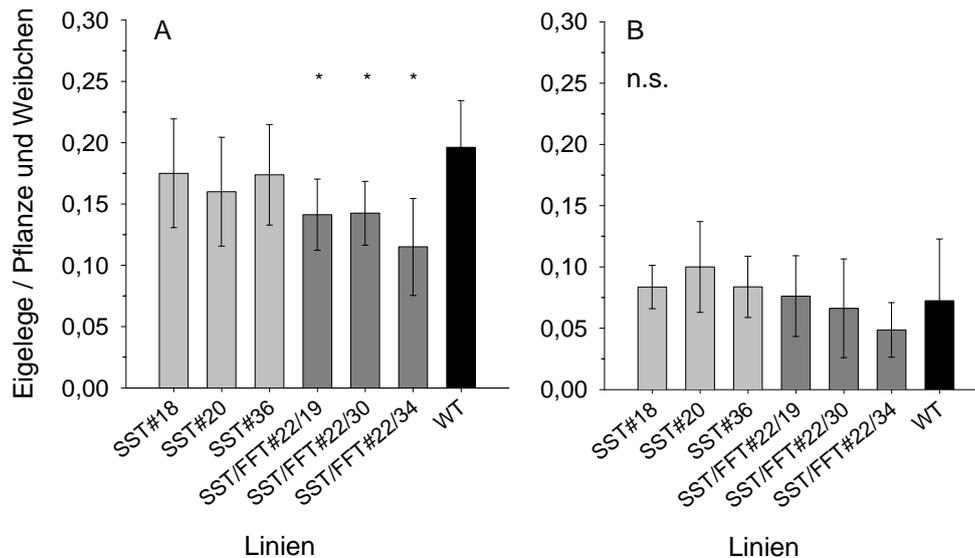


Abb. 3-46: Einfluss des Entwicklungsstadiums der Pflanzen (A: 1.6.-25.6.2003 Knospen- bis Blütenstadium, B: 1.7.-28.7.2003 Blüten- bis Beerenstadium) auf die Anzahl Eigelege/Pflanze und Weibchen von *L. decemlineata* in Detailuntersuchung in den Käfigen der Vegetationsperiode 2003. Werte sind Mittelwerte aus 8 unabhängigen Wiederholungen à 4 Pflanzen \pm SD. * symbolisieren signifikante, n.s. nicht signifikante Unterschiede der transgenen Linien zum Wildtyp ($p < 0,05$; Dunnett-Test).

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass sich die Anzahl Eigelege/Pflanze und Weibchen in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium verringert. Insbesondere während der frühen Entwicklung der Pflanzen zeigte sich ein reduzierender Einfluss der Transformation der SST/FFT-Linien auf die Anzahl Eigelege/Pflanze und Weibchen im Vergleich zum Wildtyp.

Zur Abschätzung des möglichen Einflusses des Kohlenhydratstatus in den Blättern auf die Anzahl der Eigelege/Pflanze und Weibchen während der beiden Ausbringungstermine der Kartoffelkäfer in den Käfigen der Vegetationsperiode 2003 wurden Blattproben an den beiden Terminen 16.06.03 und 14.07.03 für die Kohlenhydratanalytik entnommen. Durch das MPI-Golm erfolgte die Bestimmung der Glucose-, Fructose-, Saccharose- und Fructankonzentration der Blätter, die in Abbildung 3-47 dargestellt ist.

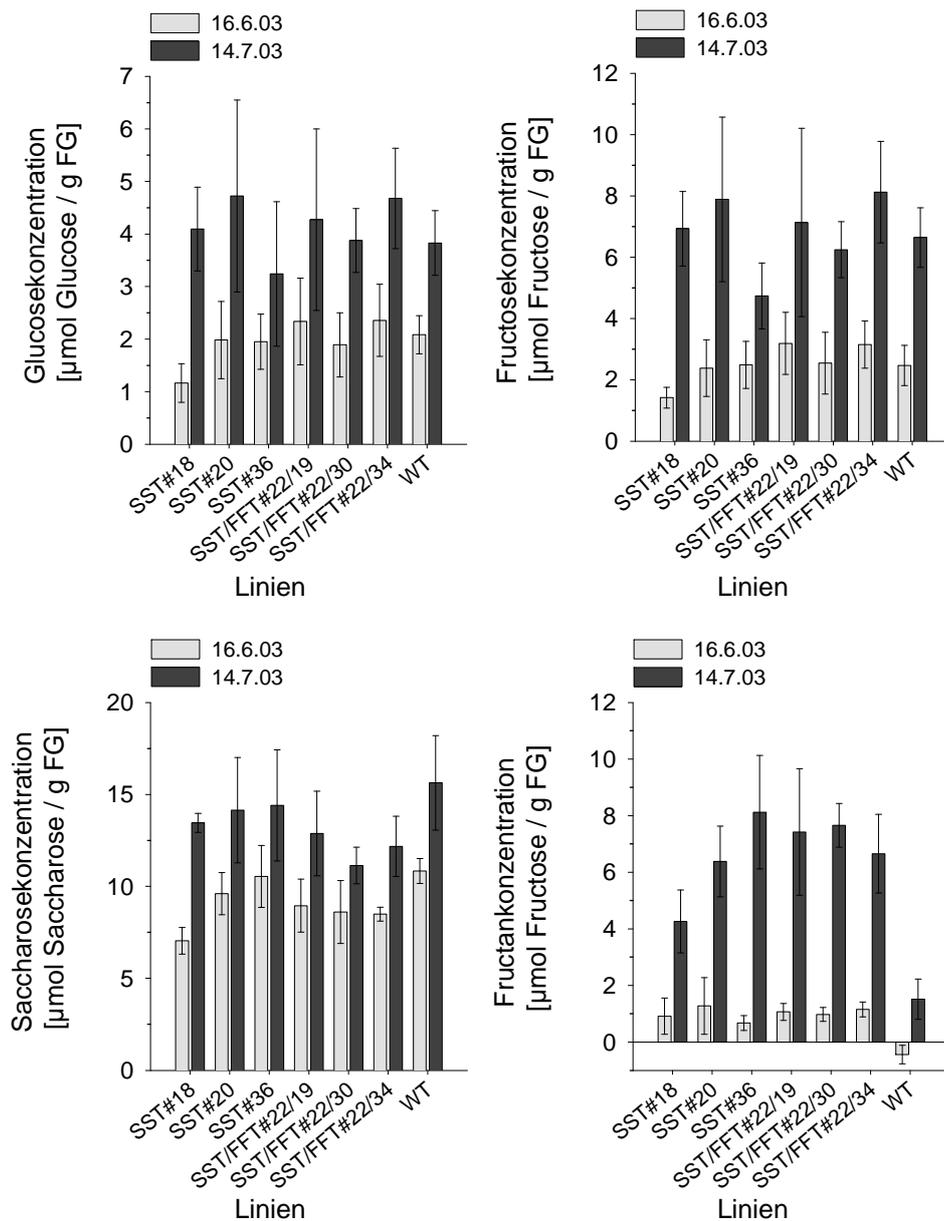


Abb. 3-47: Glucose-, Fructose-, Saccharose- und Fructankonzentration im Blatt während der 1. (16.6.03) und 2. Ausbringung (14.7.03) von *L. decemlineata* in den Großkäfigen der Vegetationsperiode 2003. Werte sind Mittelwerte von 3 unabhängigen Pflanzen.

Zum Zeitpunkt der 1. Ausbringung der Kartoffelkäfer unterschied sich die Glucose- und Fructosekonzentration der transgenen Linien nicht vom Wildtyp. Lediglich die Linie SST#18 wies tendenziell verringerte Konzentrationen zum Wildtyp auf. Im Gegensatz dazu war die Saccharosekonzentration der SST/FFT-Linien über alle Linien im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Auch die SST-Linien zeigten in Abhängigkeit von der Linie eine niedrigere Saccharosekonzentration im Blatt als der Wildtyp. Möglicherweise handelt es sich bei der einheitlich reduzierten Saccharosekonzentration der drei SST/FFT-Linien um einen Linieneffekt, der auf die Expression des enthaltenen SST-Enzyms zurückgeht. Die

Fructankonzentration war bei allen transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp erhöht und unterschied sich jedoch nicht zwischen den transgenen Linien.

Die Glucose- und Fructosekonzentration der transgenen Linien und des Wildtyps unterschied sich auch nicht zum Zeitpunkt der 2. Ausbringung der Käfer. Lediglich die SST-Linie 36 wies tendenziell verringerte Konzentrationen auf. Sowohl bei den SST-Linien als auch bei den SST/FFT-Linien war die Saccharosekonzentration im Vergleich zum Wildtyp reduziert, wobei die Abnahme des Niveaus bei den SST/FFT-Linien stärker war. Innerhalb der Konstrukte traten keine Linieneffekte der Saccharosekonzentration auf. Die Fructankonzentration aller transgenen Linien war im Vergleich zum Wildtyp erhöht, wobei der Anstieg der SST/FFT-Linien homogen war, während die SST-Linien in Abhängigkeit von der Linie einen Anstieg auf ein unterschiedliches Niveau der Fructankonzentration aufwiesen. Vermutlich handelt es sich bei der einheitlich erhöhten Fructankonzentration der drei SST/FFT-Linien um einen Linieneffekt, der auf die Expression des enthaltenen SST-Enzyms zurückgeht.

Alle Kohlenhydratkonzentrationen waren unabhängig von der Linie bei der 2. Ausbringung im Vergleich zur 1. Ausbringung gestiegen. Die Unterschiede in den Kohlenhydratkonzentrationen zwischen beiden Ausbringungsterminen erklären jedoch nicht die reduzierte Anzahl Eigelege/Pflanze und Weibchen der SST/FFT-Linien zum Zeitpunkt der 1. Ausbringung.

4 Diskussion

4.1 Auswirkungen der Transformation auf die Phänologie, die Morphologie und den Kohlenhydratgehalt

4.1.1 Einfluss der Fructansynthese auf den Kohlenhydratmetabolismus der Knolle und die Knollenmorphologie

Die Verteilung assimilierter Kohlenhydrate zwischen verschiedenen Pflanzenorganen und Stoffwechselwegen ist von zentraler Bedeutung für das Pflanzenwachstum, die Entwicklung und den Ertrag (GIFFORD & EVANS, 1981). Häufig wird dabei diskutiert, ob die Verteilungsrate der Kohlenhydrate zu den Sink-Organen durch die Kohlenhydratquelle oder durch die Sink-Organen selbst limitiert wird (FARRAR, 1999). Bei Kartoffeln stellen die Knollen, in denen primär Stärke gespeichert wird, den Hauptsink für die Kohlenhydrate dar. Während SWEETLOVE ET AL. (1998) herausfanden, dass der Ertrag bei Kartoffeln durch die Kohlenhydratquelle und nicht durch den kohlenhydratspeichernden Metabolismus limitiert wird, deuten einige Untersuchungen darauf hin, dass auch die Sinkstärke und dabei insbesondere die Stärkespeicherung einen Einfluss auf den Ertrag haben kann. Bei MÜLLER-RÖBER ET AL. (1992) war durch die transgene antisense-Hemmung der ADP-Glucose-Pyrophosphorylase bei Kartoffeln der Sorte Désirée der Stärkegehalt in den Knollen drastisch reduziert und der Gehalt an löslichen Zuckern, primär Saccharose, bis auf 30-40 % des Knollentrockengewichts gestiegen. Gleichzeitig war die Anzahl der Knollen/Stolonen und pro Pflanze in den Transgenen gestiegen. Während das Frischgewicht der Knollen/Pflanze erhöht war, wurde das Trockengewicht der Knollen/Pflanze reduziert. Dies deutet darauf hin, dass die Sinkstärke in den stärkeleeren Knollen gesunken ist. Durch die antisense-Hemmung der Saccharosesynthetase in Kartoffeln zeigte sich bei ZRENNER ET AL. (1995) ebenfalls die Reduktion des Stärkegehaltes und des Trockengewichtes der Knollen. Der Gehalt löslicher Zucker in den Knollen war jedoch erhöht. Im Gegensatz zu MÜLLER-RÖBER ET AL. (1992) war die Anzahl der Knollen unverändert. Die Abnahme des Knollentrockengewichtes deutet jedoch darauf hin, dass auch die Saccharosesynthetase einen Einfluss auf die Sinkstärke der Knollen hat.

Die Integration des Enzyms Saccharose-Saccharose-Fructosyltransferase (SST) bei den SST-Linien und zusätzlich des Enzyms Fructose-Fructose-Fructosyltransferase (FFT) bei den SST/FFT-Linien aus der Artischocke (*Cynara scolymus*) in Kartoffeln der Sorte Désirée führt zur Bildung von Fructanen des Inulintyps (HEYER, 2000; HELLWEGE ET AL., 2000). Dabei erfolgt die Expression der Enzyme in der Vakuole unter dem konstitutiven

Promotor des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV), was zur Bildung von Inulin in allen Pflanzenorganen führt (HELLWEGE ET AL., 2000). Bei den SST-Linien werden primär Oligofructane wie Kestose und Nystose mit einem Polymerisationsgrad (PG) von 2 bis 3 Fructoseeinheiten gebildet, während es bei den SST/FFT-Linien zur Bildung von Fructanen mit Kettenlängen bis zu 20 Fructoseeinheiten kommt. Nach HELLWEGE ET AL. (2000) beträgt der Fructangehalt der Knollen in den SST/FFT-Linien maximal 5 % des Trockengewichtes, der sich in der Reduktion des Stärkegehaltes widerspiegelt. Somit stellt das Fructan in den SST- und SST/FFT-Linien ein alternatives und kein additives Speicherkohlenhydrat in den Knollen dar. Sowohl die vakuoläre Synthese von Fructanen durch die Enzyme Levansucrose aus *E. amylovora* bzw. *B. subtilis* (VAN DER MEER ET AL., 1994; RÖBER ET AL., 1996) als auch die apoplastische, cytosolische und plastidäre Synthese von Levan (RÖBER ET AL., 1996; CAIMI ET AL., 1997; GERRITS, 2000) in transgenen Kartoffeln führte zur Reduktion des Stärkegehaltes in den Knollen. Die Bildung von Oligofructanen durch das SST-Enzym führt durch die Kettenverlängerung der Fructanmoleküle, in Folge der Spaltung von Saccharose in Glucose und Fructose, zur Reduktion der Saccharosekonzentration in den Zellen, wodurch die durch Saccharose induzierte Feedback-Hemmung der Photosynthese verhindert werden kann (POLLOCK, 1986; VAN DER MEER ET AL., 1994). Gleichzeitig führt die Fructansynthese zum Anstieg des Glucosegehaltes bei den SST-Linien und bei den SST/FFT-Linien in Abhängigkeit von der Linie (HEYER, 2000; HELLWEGE ET AL., 2000). Entgegen der Annahme, dass die freie Glucose der Fructansynthese wieder zu Saccharose zurück synthetisiert wird, oder über die Hexokinase phosphoryliert und in die Stärkesynthese überführt wird, kommt es in den Knollen zur Akkumulation von freier Glucose (EDELMAN & JEFFORD, 1968; GERRITS, 2000). Ein erhöhter Gehalt an Glucose in transgenen Knollen wurde auch unabhängig von der Lokalisation der Levansucrose (Vakuole, Plastiden) und seiner Herkunft (*E. amylovora*, *B. subtilis*) gefunden (RÖBER ET AL., 1996; GERRITS, 2000). GEIGER ET AL. (1998) fanden durch die exogene Zugabe von Glucose zu Kartoffelknollenscheiben einen Anstieg der Intermediärprodukte der Glykolyse und somit der Respiration der Knollen. Auch die Integration von Hefeinvertasen im Cytosol der Knolle unter dem Knollenspezifischen Promotor Patatin führte zum Anstieg des Glucosegehaltes in den Knollen und der glykolytischen Intermediärprodukte (SONNEWALD ET AL., 1997; TRETHERWEY ET AL., 1998; TRETHERWEY ET AL., 1999). Parallel war auch ein Abfall des Saccharosegehaltes in den Knollen festzustellen. Durch die Integration der Saccharosephosphorylase aus *Pseudomonas saccharophila*, die zur Spaltung von Saccharose unter Bildung von Fructose

und Glucose-1-Phosphat führt, konnten TRETHEWEY ET AL. (2001) jedoch zeigen, dass nicht ein erhöhter Gehalt an Glucose in den Knollen für die Induktion der Glykolyse verantwortlich ist, sondern entweder die Reduktion des Saccharosegehaltes im Cytosol oder ein Signal, was durch die erhöhte Spaltung von Saccharose induziert wird. In Folge dessen, dass die Synthese der Fructane bei den SST- und SST/FFT-Linien einen neuen Kohlenhydratspeicher für die Kartoffel darstellt, der in Konkurrenz mit der Stärkesynthese steht, war mit einem Einfluss auf den Ertrag über die Sinkstärke zu rechnen. Aber auch die Veränderungen der Kohlenhydratverhältnisse in der Knolle, insbesondere der Saccharose- und Glucosegehalte, ließen einen Einfluss auf den Ertrag vermuten.

Bei den untersuchten SST-Linien und SST/FFT-Linien führte die Fructansynthese weder bei HEYER (2000) und HELLWEGE ET AL. (2000) unter Gewächshausbedingungen zu Ertragsunterschieden im Frischgewicht, noch in den dargestellten Ergebnissen unter Freilandbedingungen zur Veränderung des Flächenertrages im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3-16). Dies bestätigte sich in beiden Anbaujahren. Die Reduktion des Ertragsniveaus um 1/3 in der Vegetationsperiode 2003 im Vergleich zu 2001 ist auf geringere Niederschläge zurückzuführen (Abb. 2-2). Auch die Knollenmorphologie der SST-Linien und SST/FFT-Linien unterschied sich nicht vom Wildtyp. Dies ist auf die Vakuole als Syntheseort für die Fructane zurückzuführen (VAN DER MEER ET AL., 1994; RÖBER ET AL., 1996). Die Fructansynthese im Cytosol und Apoplasten zeigte veränderte Knollenmorphologien bei RÖBER ET AL. (1996) und CAIMI ET AL. (1997). Auch bei Mais konnte in Abhängigkeit von dem Lokalisationsort der Fructansynthese (Vakuole oder Cytosol) ein Einfluss auf die Samenmorphologie festgestellt werden (CAIMI ET AL., 1996). Im Gegensatz zu GERRITS (2000), wo die in den Plastiden lokalisierte Levansynthese zu morphologischen Veränderungen der Stärkekörner geführt hat, zeigte sich durch die vakuoläre Fructansynthese der SST- und SST/FFT-Linien in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen keine Veränderung der Morphologie der Stärkekörner (Abb. 3-19). Vermutlich begründet sich dieser Unterschied auch in dem Syntheseort der Fructane.

Die fehlende Ertragsreduktion des Flächenertrages der SST-Linien und SST/FFT-Linien in den dargestellten Ergebnissen als auch bei HEYER (2000) und HELLWEGE ET AL. (2000) im Vergleich zur Ertragsreduktion bei KNIPP (2004) und HONERMEIER & KNIPP (2006) geht möglicherweise auf eine geringere Fructanakkumulation zurück, die sich in der Stärkereduktion der Knollen widerspiegelt. Auch CAIRNS (2003) führt eine fehlende Ertragsreduktion bei Pflanzen, die ursprünglich zu keiner Fructansynthese befähigt sind,

auf deren geringe Akkumulationsrate von Fructanen durch Pflanzenfructosyltransferasen zurück. Im Freisetzungsversuch betrug die Reduktion des Stärkegehaltes bei den SST- und SST/FFT-Linien 1-2 % des Frischgewichtes der Knollen (Abb. 3-18). Während in der Vegetationsperiode 2001 die Abnahme des Stärkegehaltes der SST-Linien nur 1 % betrug und die der SST/FFT-Linien 2 %, zeigten sich in der Vegetationsperiode 2003 keine Unterschiede im Abfall des Stärkegehaltes der Knollen zwischen den SST- und SST/FFT-Linien. Im Gegensatz zu KNIPP (2004) führte die Trockenheit der Vegetationsperiode 2003 zu keinem Anstieg der Fructangehalte in den Knollen. Die Abnahme des Stärkegehaltes um 2 % Frischgewicht der SST/FFT-Linien entspricht auch den von HEYER (2000) und HELLWEGE ET AL. (2000) gefundenen Reduktionen des Stärkegehaltes in den Knollen durch die Fructansynthese unter Gewächshausbedingungen. Bei KNIPP (2004) und HONERMEIER & KNIPP (2006) ergab sich hingegen eine Reduktion des Stärkegehaltes um 4,4 % Trockenmasse bei den SST/FFT-Linien und 2,5 % Trockenmasse bei den SST-Linien unter Gewächshausbedingungen. Auch bei RÖBER ET AL. (1996) und VAN DER MEER ET AL. (1994) führte die vakuoläre Levansynthese zu einer höheren Fructanakkumulation in den Knollen mit gleichzeitiger Ertragsreduktion. Es wurden Fructangehalte zwischen 7-12 % bzw. 7 % des Trockengewichtes der Knollen erreicht. Dies bestätigt die Vermutung, dass die geringe Fructanakkumulation der SST- und SST/FFT-Linien, ermittelt über den Stärkegehalt, verantwortlich für das Ausbleiben der Ertragsreduktion in den dargestellten Ergebnissen war. Auch das Ausbleiben einer Veränderung der Sinkstärke in den dargestellten Untersuchungen begründet sich darin. Die Anzahl der Knollen/Pflanze stellt ein Indiz für die Sinkstärke dar (VAN DER MEER ET AL., 1994; RÖBER ET AL., 1996; GERRITS, 2000). Je mehr Knollen gebildet werden, desto geringer ist die Sinkstärke der Knollen. Eine Abnahme der Sinkstärke durch die Zunahme der Knollen/Pflanze bei den SST/FFT-Linien ergab sich bei KNIPP (2004) und HONERMEIER & KNIPP (2006). Auch bei VAN DER MEER ET AL. (1994) und RÖBER ET AL. (1996) führte die vakuoläre Speicherung von Fructanen durch die Enzyme Levansucrose aus *B. subtilis* und *E. amylovora* zur Reduktion der Sinkstärke. In den vorliegenden Untersuchungen wurde zwar nicht die Knollenanzahl/Pflanze bestimmt, jedoch die Knollengrößenverteilung von 20 kg der geernteten Knollen (Abb. 3-17). In der Vegetationsperiode 2001 war bei den SST-Linien der Anteil an übergroßen Knollen dem des Wildtyps überlegen, was darauf hindeutet, dass eine geringere Anzahl Knollen/Pflanze gebildet war und die Sinkstärke möglicherweise erhöht war. Die Knollengrößenverteilung der SST/FFT-Linien glich hingegen der des Wildtyps. Im Gegensatz dazu glich in der

Vegetationsperiode 2003 die Knollengrößenverteilung der SST-Linien der des Wildtyps, hingegen wiesen die SST/FFT-Linien einen höheren Anteil kleiner Knollen im Vergleich zum Wildtyp auf. Dies deutet darauf hin, dass eine höhere Anzahl Knollen/Pflanze bei den SST/FFT-Linien gebildet und somit möglicherweise die Sinkstärke reduziert war.

Nach CAIRNS (2003) wird die Fructanakkumulation durch die Substratkonzentration (Saccharose) und das Pflanzenalter bestimmt. Die Saccharosekonzentration wird wiederum durch die Lichtintensität bestimmt. Gleichzeitig besitzen die in den Pflanzen vorhandenen Invertasen die Fähigkeit, neben Saccharose auch kurzkettige Oligofruktane, wie die Kestose oder Nystose, zu spalten. Unterschiede in den Kulturbedingungen zwischen den dargestellten Ergebnissen im Vergleich zu denen von KNIPP (2004) und HONERMEIER & KNIPP (2006) können somit die Ursache für die differenzierte Fructanakkumulation und der sich daraus ergebenden abweichenden Ergebnisse der SST- und SST/FFT-Linien in der Ertragsbildung und der Sinkstärke sein.

Fazit:

Die Fructansynthese der SST- und SST/FFT-Linien hat zu keiner Veränderung des Flächenertrages, der Knollengrößenverteilung und der Morphologie der Stärkekörner unter Freilandbedingungen geführt. Insgesamt führte die Fructansynthese in den SST-Linien und SST/FFT-Linien nicht zur zusätzlichen Speicherung von Kohlenhydraten in der Knolle und damit auch nicht zur Erhöhung der Sinkstärke, sondern zur alternativen Speicherung der Stärke, was durch die Reduktion des Stärkegehaltes deutlich wird. Die Fructansynthese stellt somit neben der Stärkesynthese eine alternative Sinkquelle für die in die Knolle transportierten Kohlenhydrate dar.

4.1.2 Einfluss der Fructansynthese auf den Kohlenhydratmetabolismus des Blattes

Neben der Fructansynthese in der Knolle war bei den SST- und SST/FFT- Linien auch die Fructanbildung in den Blättern nachzuweisen. Die Fructangehalte der Blätter in den SST-Linien lagen zwischen 0,2-1,8 μmol Fructose/g FG und waren damit in Abhängigkeit von der Linie im Vergleich zu den von HELLWEGE ET AL. (2000) gefundenen Fructangehalten (0,45-0,65 μmol Hexose/g FG) unter Gewächshausbedingungen verdreifacht (Abb. 3-38). Die Fructankonzentration der SST/FFT-Linien lag dabei im gleichen Bereich. Die Saccharosekonzentration mit 2 $\mu\text{mol/g}$ FG der SST-Linien unter Gewächshausbedingungen war um die Hälfte zu der von HELLWEGE ET AL. (2000) gefundenen Konzentration reduziert und unterschied sich nicht von den SST/FFT-Linien

und dem Wildtyp. Dagegen war sowohl die Glucose- als auch Fructosekonzentration in den Blättern im Vergleich zu den von HELLWEGE ET AL. (2000) gefundenen Konzentrationen im Blatt bei den SST-Linien verdoppelt bis verdreifacht und lag dabei tendenziell jedoch unter dem Niveau des Wildtyps. Die Glucose- und Fructosekonzentrationen der SST/FFT-Linien lag auf dem Niveau des Wildtyps und somit im Vergleich zu den SST-Linien erhöht. Die in der vorliegenden Arbeit abweichenden Fructan-, Saccharose-, Glucose- und Fructosekonzentrationen im Blatt unter Gewächshausbedingungen im Vergleich zu HELLWEGE ET AL. (2000) können entweder auf Unterschiede im Beprobungszeitpunkt (Tageszeit), der Lichtquelle, dem Entwicklungsstadium der Pflanzen oder der beprobten Blatttage beruhen.

Die mögliche Abhängigkeit der Kohlenhydratgehalte im Blatt von dem Entwicklungsstadium der Pflanzen wird bei der Betrachtung der Kohlenhydratgehalte unter Freilandbedingungen (Abb. 3-47) deutlich. So betrug der Fructangehalt im Blatt aller transgenen Linien zum Zeitpunkt des Knospenstadiums (16.6.03) 1 μmol Fructose/g FG und lag damit auf dem Niveau unter Gewächshausbedingungen und stieg bis zum Beerenstadium (14.7.03) in Abhängigkeit von den Linien auf 4-8 μmol Fructose/g FG. Zwischen den SST/FFT-Linien unterschied sich die Fructankonzentration nicht. Bei den SST-Linien zeigte sich eine linienspezifische Fructankonzentration zum Zeitpunkt des Beerenstadiums. Auch KNIPP (2004) fand im BBCH-Stadium 65-69 unter Gewächshausbedingungen 10-fach höhere Fructangehalte bei den SST/FFT-Linien als HELLWEGE ET AL. (2000). In den von VAN DER MEER ET AL. (1994) untersuchten transgenen Kartoffeln mit Levanakkumulation durch das Enzym Levansucrase aus *Bacillus subtilis* ergab sich eine von dem Blattalter abhängige Fructanakkumulation. So war ein Anstieg der Fructangehalte von 50 mg/g TG in den jüngsten Blättern auf 300 mg/g TG in alten Blättern zu verzeichnen. Bei PILON-SMITS ET AL. (1999) und EBSKAMP ET AL. (1994) stieg in transgenen Fructan-bildenden Zuckerrüben (*Beta vulgaris*) und Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) mit zunehmendem Blatt- und Pflanzenalter die Konzentration von Fructan an. Für eine stetige Akkumulation der Fructane in den Blättern der SST- und SST/FFT-Linien sprechen auch die Saccharosekonzentrationen der Blätter unter Freilandbedingungen. Diese lagen bereits zum Knospenstadium zwischen 7,5 und 10 $\mu\text{mol/g}$ FG und stiegen zum Beerenstadium auf 12,5-15 $\mu\text{mol/g}$ FG an und lagen damit auf dem von HELLWEGE ET AL. (2000) ermittelten Niveau der Knollen unter Gewächshausbedingungen. Zu beiden Terminen waren dabei die Saccharosegehalte der SST/FFT-Linien tendenziell zum Wildtyp reduziert. Bei den SST-Linien war im

Knospenstadium in Abhängigkeit von der Linie eine reduzierte Saccharosekonzentration im Vergleich zum Wildtyp zu verzeichnen, während zum Zeitpunkt des Beerenstadiums kein Unterschied mehr zum Wildtyp bestand. Somit können die Saccharosekonzentrationen unter Freilandbedingungen nicht, wie von HELLWEGE ET AL. (2000) behauptet, die Ursache für die differenzierte Fructankonzentration zwischen den Blättern und der Knolle sein. Möglicherweise sind die höheren Fructankonzentrationen der Knollen die Folge einer längeren Akkumulationsphase im Vergleich zu den jungen vollentwickelten Blättern. Andererseits kann es jedoch auch in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium zu einer differenzierten Verteilung der Saccharose aus den Blättern kommen. Zum Zeitpunkt des Knospenstadiums beginnt auch die Knollenbildung, die einen starken Sink für die assimilierte Saccharose in den Blättern bildet, während zum Zeitpunkt des Beerenstadiums die Knollenbildung teilweise schon abgeschlossen ist.

Die entwicklungsabhängige Fructansynthese kommt auch in Pflanzen vor, die natürlicherweise Fructane bilden. So fanden HELLWEGE ET AL. (1997) bei *Cynara scolymus* in Keimlingen, Blättern und sekundären Wurzeln nur geringe Mengen, hingegen in den primären Wurzeln hohe Gehalte der SST-RNA. Auch VAN LAERE & VAN DEN ENDE (2002) konnten bei jungen Chicoreewurzeln eine höhere SST-Expression feststellen als in alten Wurzeln. Bei Topinambur (*Helianthus tuberosus*) zeigte sich in der Knolle eine entwicklungsabhängige RNA-Expression von SST und FFT, die zum Zeitpunkt der Stolonenbildung hoch war und sowohl in reifen dormanten als auch in keimenden Knollen gegen Null ging (VAN DER MEER ET AL., 1998). Die RNA-Expression in Blättern und Wurzeln war gering bis nicht vorhanden. Ein hohes Expressionsniveau wiesen dagegen Stängel und Blüte auf.

Fazit:

Die konstitutive Integration der SST- und SST/FFT- Enzyme führte zur Fructansynthese in den Blättern sowohl unter Gewächshaus- als auch Freilandbedingungen. In Abhängigkeit von der Anzuchtmethode der Pflanzen unterschied sich der Saccharose- und Fructangehalt in den Blättern, während der Glucose- und Fructosegehalt der Blätter kaum Unterschiede aufwies. Der Gehalt an Fructanen stieg mit zunehmendem Entwicklungsstadium der Pflanzen an. Dies deutet entweder auf eine entwicklungsabhängige Fructansynthese oder auf eine Akkumulation der Fructane hin. Über alle Anzuchtbedingungen und Entwicklungsstadien unterschied sich die Fructose- und Glucosekonzentration zwischen den transgenen SST- und SST/FFT-Linien und dem Wildtyp kaum. Die

Saccharosekonzentration der SST/FFT-Linien war im Vergleich zum Wildtyp reduziert, die der SST-Linien unverändert. Die Fructankonzentration war bei allen transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Zwischen den SST/FFT-Linien traten keine Unterschiede im Niveau der Fructangehalte auf, während sich bei den SST-Linien ein Linieneffekt andeutete.

4.1.3 Einfluss der Fructansynthese auf die Staudenmorphologie

4.1.3.1 Veränderte Staudenmorphologie durch den Einfluss auf den Wasserhaushalt

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von HELLWEGE ET AL. (1998), HEYER (2000) und HELLWEGE ET AL. (2000), die bei den transgenen SST- und SST/FFT-Linien keine morphologischen Veränderungen der oberirdischen Staude unter Gewächshausbedingungen fanden, traten in den vorliegenden 3-jährigen Untersuchungen sowohl unter Freilandbedingungen als auch bei den Gewächshausuntersuchungen von KNIPP (2004) und HONERMEIER & KNIPP (2006) morphologische Abweichungen der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp auf. So zeigten die SST/FFT-Linien einen tendenziell verzögerten Feldaufgang (Abb. 3-2), insbesondere in der Vegetationsperiode 2002. In Folge der verlangsamten frühen Entwicklung war auch der Anteil des Knospen- und Blütenstadiums (Abb. 3-3, 3-4) in Abhängigkeit von der Vegetationsperiode 3 bis 7 Wochen nach Feldaufgang bei den SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Der Feldaufgang der SST-Linien war dagegen unverändert. Der Anteil im Knospen- bzw. Blütenstadium befindlicher Pflanzen der SST-Linien war in Abhängigkeit von der Linie und Vegetationsperiode teilweise zum Wildtyp verringert. Neben der verzögerten Entwicklungsgeschwindigkeit war auch die Haupttrieblänge der SST/FFT-Linien sowohl unter Freiland- (Abb. 3-8) als auch Gewächshausbedingungen (Abb. 3-9) verkürzt und die Anzahl der Infloreszenzen (Abb. 3-15) verringert. Die Haupttrieblänge (Abb. 3-8, 3-9) der SST-Linien glich dabei dem Wildtyp und die Anzahl der Infloreszenzen (Abb. 3-15) war in Abhängigkeit von der Linie und der Vegetationsperiode im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Die morphologischen Parameter Anzahl der Augenaustriebe (Abb. 3-12) und Anzahl der Seitentriebe/Haupttrieb (Abb. 3-14) wiesen keinen Unterschied zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp auf. Lediglich in der Vegetationsperiode 2001 zeigten die SST/FFT-Linien eine erhöhte Verzweigung des Haupttriebes, die jedoch nicht in der Vegetationsperiode 2003 bestätigt werden konnte. Insgesamt führte die verzögerte Entwicklung der SST/FFT-Linien sowie der verkürzte Haupttrieb zu einem verringerten Deckungsgrad der Bestände bis zum Abschluss der Vegetationsperiode (Abb. 3-5, 3-6). Es

deutet sich damit an, dass dieser Phänotyp eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Wasserstress haben könnte.

Während bei der cytosolischen, apoplastischen und plastidären Lokalisation der Fructansynthese in ursprünglich nicht Fructan synthetisierenden Pflanzenarten morphologische Veränderungen auftraten, insbesondere Blattnekrosen und -chlorosen (CAIMI ET AL., 1996; CAIMI ET AL., 1997; VAN DER MEER ET AL., 1998; SEVENIER ET AL., 1998; GERRITS, 2000), zeigten sich bei der vakuolären Lokalisation der Levansynthese in Kartoffeln unter Gewächshausbedingungen keine oberirdischen phänotypischen Veränderungen (VAN DER MEER ET AL., 1994; RÖBER ET AL., 1996). Jedoch konnten auch zahlreiche Untersuchungen mit Enzymen der Kohlenhydratsynthese bei Kartoffeln zeigen, dass ein Eingriff in die Assimilatverteilung der Kohlenhydrate morphologische Konsequenzen haben kann. Die Antisense-Hemmung des Triosephosphat-Translokators des Chloroplastens führte bei RIESMEIER ET AL. (1993) zur verzögerten Jugendentwicklung der Kartoffelpflanzen. Die verzögerte Entwicklung der Pflanzen ist durch den verringerten Export der assimilierten Triosephosphate aus den Chloroplasten ins Cytosol zu erklären, wodurch es zu einer reduzierten Versorgung der Sinkorgane mit Photoassimilaten kommt. Auch durch die Integration von Hefeinvertase in die Vakuole trat bei BÜSSIS ET AL. (1997) ein verzögerter Wuchs der transgenen Kartoffeln auf. Die Haupttrieblänge erreichte nur 70 % des Wildtyps. Durch die Invertase war ein Anstieg an Glucose und Fructose in den Blättern zu verzeichnen. Parallel dazu stieg auch der Gehalt an Saccharose. Der Saccharoseanstieg wird von BÜSSIS ET AL. (1997) dadurch erklärt, dass durch die Zunahme des Hexosegehaltes in der Vakuole der osmotische Druck steigt, zu dessen Ausgleich Saccharose im Cytosol akkumuliert wird. Parallel war auch eine Erhöhung des Aminosäuregehaltes, insbesondere Prolin, zu verzeichnen. Insgesamt war der Phänotyp mit Pflanzen zu vergleichen, die einem leichten Wasserstress ausgesetzt sind, wofür auch der leicht reduzierte Wassergehalt der Blätter sprach. Während sich bei den SST- und SST/FFT-Linien im Gegensatz zu BÜSSIS ET AL. (1997) die Saccharose-, Glucose- und Fructosegehalte im Blatt nicht wesentlich vom Wildtyp unterschieden, kann jedoch die Synthese der löslichen Fructane in der Vakuole zu einer Veränderung des osmotischen Druckes geführt haben, wodurch ebenfalls bei den SST/FFT-Linien der Wasserdefizit-Phänotyp begründet sein könnte. Dafür spricht auch der von KNIPP (2004) gefundene höhere spezifische Wasserverbrauch der SST/FFT-Linien. Neben der Reduktion der Haupttrieblänge bei Kartoffeln unter Wasserstress wird auch die Blattanzahl und die Blattlänge verringert (DEBLONDE & LEDENT, 2001; TOURNEUX ET AL., 2003). Dies führte

bei TOURNEUX ET AL. (2003) zur Abnahme des Blattflächenindex und des Deckungsgrades der Stauden. Einen reduzierten Deckungsgrad zeigten auch die SST/FFT-Linien in den drei Vegetationsperioden. Wasserstress hatte in den Untersuchungen von TOURNEUX ET AL. (2003) keinen Einfluss auf die Anzahl an Augenaustrieben / Pflanzknolle. Auch in den eigenen Versuchen traten bei den SST/FFT-Linien keine Veränderungen in der Anzahl der Augenaustriebe/Pflanzknolle auf. Dass bei den SST/FFT-Linien trotz der phänotypischen Merkmale, die auf eine erhöhte Wasserstressanfälligkeit hinwiesen, keine Ertragsreduktionen im Vergleich zum Wildtyp und den SST-Linien auftraten, kann dadurch begründet werden, dass durch die morphologischen Veränderungen einer Ertragsreduktion entgegengewirkt wurde (TOURNEUX ET AL., 2003) oder dass sich der Trockenmassegehalt der Knollen erhöht hat (DEBLONDE & LEDENT, 2001). So fanden auch DEBLONDE & LEDENT (2001) bei verschiedenen Kartoffelsorten unter Wasserstress eine Reduktion der Knollenanzahl, die jedoch in Folge der Zunahme des Trockengewichtes der Knollen zu keiner Veränderung des Gesamtertrages führte. Dagegen spricht jedoch die von HONERMEIER & KNIPP (2006) gefundene parallele Reduktion des Knollen- und Trockenmassegehaltes der SST/FFT-Linien. Eine weitere Anpassungsstrategie von Pflanzen an Wasserstress ist die Reduktion der Blütenbildung (TAIZ & ZEIGER, 2000), die auch bei den SST/FFT-Linien in beiden Vegetationen auftrat, und bei den SST-Linien nur in der Vegetation 2003, wo die Pflanzen, bedingt durch die geringen Niederschläge, einem externen Wasserstress ausgesetzt waren.

Die fehlenden morphologischen Unterschiede der SST/FFT-Linien bei den Gewächshausuntersuchungen von HELLWEGE ET AL. (1998), HEYER (2000) und HELLWEGE ET AL. (2000) können möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass die Lichtintensität der Anzuchtbedingungen zu gering war. Nach CAIRNS (2003) ist für die Beurteilung der phänotypischen Effekte von transgenen Fructan-bildenden Pflanzen eine ausreichende Lichtintensität für die Bereitstellung des Fructansubstrates Saccharose wie auch eine ausreichende Akkumulationsphase von Fructanen notwendig. Eine weitere Erklärung kann in der Verwendung des Pflanzenmaterials liegen. Während HELLWEGE ET AL. (1998), HEYER (2000) und HELLWEGE ET AL. (2000) ihre Gewächshauspflanzen aus adaptierten Sprossstecklingen der *in-vitro*-Kultur erhalten haben, stammten die Pflanzen der eigenen Untersuchungen sowie der Versuche von KNIPP (2004) und HONERMEIER & KNIPP (2006) aus Pflanzknollen. In Abhängigkeit von dem verwendeten Pflanzenmaterial bei transgenen Kartoffeln mit antisense-Hemmung der cytosolischen Phosphorylase hatte die Transformation bei DUWENIG ET AL. (1997) eine differenzierte morphologische

Auswirkung. Die transgenen Pflanzen aus Sprossstecklingen der Gewebekultur zeigten im Gewächshaus im Gegensatz zu den transgenen Pflanzen aus Pflanzknollen keine morphologischen Unterschiede zum Wildtyp. Bei gleicher Lagerung der Pflanzknollen war bei den transgenen Knollen eine frühere und stärkere Verzweigung der Keimlinge zu verzeichnen. Bedingt durch das veränderte Keimverhalten der transgenen Pflanzknollen war der Auflauf beschleunigt und die Anzahl der Augenaustriebe/Pflanzknolle sowie der Ertrag erhöht. Außerdem zeigte sich ein verstärktes Blühverhalten. Die Unterschiede im Keimverhalten der Pflanzknollen konnten dabei nicht auf eine Veränderung der Stärkemobilisation oder des Kohlenhydratstatus in den transgenen Knollen zurückgeführt werden. Wegen der verkürzten Dormanz der transgenen Knollen und wegen der Verzweigung der Keime, die auf eine Veränderung der apikalen Dominanz in den Keimen hindeuten, schlossen DUWENIG ET AL. (1997) durch die antisense-Hemmung der cytosolischen Phosphorylase einen Einfluss auf den Phytohormonhaushalt durch die Transformation nicht aus.

Die phänologischen und morphologischen Veränderungen der SST/FFT-Linien unter Freiland- und Gewächshausbedingungen können, statt auf mögliche Veränderungen des Wasserhaushaltes durch die Fructansynthese, auch auf eine Veränderung des Phytohormonhaushaltes, insbesondere auf Änderungen des Gibberellinsäuregehaltes, hinweisen.

4.1.3.2 Veränderte Staudenmorphologie durch den Einfluss auf das physiologische Alter der Pflanzknollen und dem Gibberellinsäuregehalt

Der Feldaufgang und die frühe oberirdische Krautentwicklung werden neben den Witterungsbedingungen maßgeblich durch den Keimzustand und durch das physiologische Alter der Pflanzknollen beeinflusst. Nach der Knolleninduktion durchläuft die Knolle das Stadium der Dormanz, in dem trotz optimaler Bedingungen keine Keimung stattfindet. Durch physiologische und biochemische Prozesse verändert sich die Keimfähigkeit in den Knollen. Nach Beendigung der Dormanz erfolgt zunächst ein Anstieg der Keimfähigkeit bis zu einem Maximum und im Anschluss wieder ein Abfall der Keimfähigkeit der Knollen (VAN DER ZAAG & VAN LOON, 1987). Das physiologische Stadium der Knolle wird häufig als physiologisches Alter bezeichnet und durch das chronologische Alter vom Zeitpunkt der Knollenbildung an (Tage, Wochen) oder durch die akkumulierte Temperatursumme (Gradtage, dd) angegeben (STRUİK & WIERSEMA, 1999). Sowohl die Dauer der Dormanz, als auch der Verlauf der Veränderung der Keimfähigkeit, und somit

das physiologische Alter der Knollen, sind sortenspezifisch und können durch die Lagerungstemperatur der Knollen beeinflusst werden (REUST, 1986; BURTON, 1989; VAN ITTERSUM & SCHOLTE, 1992; VAN ITTERSUM, 1993). Die Erhöhung des physiologischen Alters von Pflanzknollen durch erhöhte Lagerungstemperaturen führt zu einem beschleunigten Feldaufgang nach der Pflanzung (VAN DER ZAAG & VAN LOON, 1987; KNOWLES & BOTAR, 1991; KARALUS & RAUBER, 1997; ASIEDU ET AL., 2003). So konnte VAN ITTERSUM (1993) durch die Erhöhung der Lagertemperatur von 18°C auf 28°C bei Knollen der Sorte Désirée eine Verkürzung des Zeitraums zwischen Pflanzung und beginnendem Feldaufgang um 18 Tage erzielen. Parallel war auch das frühe oberirdische Krautwachstum der Pflanzen von Knollen bei hoher Lagertemperatur erhöht. Bei KNOWLES & BOTAR (1991) zeigten Pflanzen aus physiologisch älteren Knollen ebenfalls eine vermehrte und vergrößerte frühe Blattbildung. Dieser Effekt wurde jedoch mit fortschreitender Entwicklung von Pflanzen physiologisch jüngerer Knollen kompensiert, da diese eine erhöhte Blattbildungsrate aufwiesen.

Der verzögerte Feldaufgang (Abb. 3-2) und der reduzierte Deckungsgrad (Abb. 3-6) der SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp deuten darauf hin, dass die SST/FFT-Linien zum Zeitpunkt der Pflanzung in den drei Vegetationsperioden trotz gleicher Vermehrungs- und Lagerbedingungen ein vom Wildtyp abweichendes physiologisches Alter der Pflanzknollen aufwiesen. Es ist dabei zu vermuten, dass die SST/FFT-Linien zum Zeitpunkt der Pflanzung physiologisch jüngere Pflanzknollen besaßen, da Pflanzen physiologisch älterer Knollen im Vergleich zu Pflanzen physiologisch jüngerer Knollen neben einem schnelleren Feldaufgang und früheren Krautwachstum auch eine frühere Seneszenz des Krautes aufweisen (VAN DER ZAAG & VAN LOON, 1987; VAN ITTERSUM, 1993; ASIEDU ET AL., 2003). Bei den SST/FFT-Linien war im Vergleich zum Wildtyp keine verfrühte Seneszenz zu beobachten. Gegen die Veränderung des physiologischen Alters der Pflanzknollen der SST/FFT-Linien spricht jedoch die unveränderte Anzahl der Augenaustriebe/Pflanzknolle (Abb. 3-12). In einigen Untersuchungen zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen dem physiologischen Alter der Pflanzknollen und der Anzahl der Augenaustriebe/Pflanzknolle (KNOWLES & BOTAR, 1991; STRUIK & WIERSEMA, 1999). Bei KARALUS & RAUBER (1997) führte die Vorkeimung der Knollen hingegen zur Reduktion der Augenaustriebe. Die Anzahl der Augenaustriebe/Pflanze der Sorte Désirée war in physiologisch jüngeren Pflanzknollen erhöht und sank mit zunehmendem physiologischem Alter bei VAN DER ZAAG & VAN LOON (1987). MOLL (1985) fand nur bei frühen Kartoffelsorten einen Einfluss des physiologischen Alters auf

die Anzahl der Augenaustriebe, während bei mittleren und späten Sorten das physiologische Alter der Pflanzknollen zu keiner Veränderung der Anzahl der Augenaustriebe führte. Bei der Sorte Désirée handelt es sich um eine mittelfrühe Sorte, was für die fehlende Auswirkung des physiologischen Alters der Pflanzknollen auf die Anzahl der Augenaustriebe/Pflanzknolle spricht. Die Anzahl der Augenaustriebe/Pflanzknolle wird jedoch maßgeblich durch das Pflanzknollengewicht beeinflusst (STRUİK & WIERSEMA, 1999). Bei VAN ITTERSUM (1992) zeigte sich ein positiver Einfluss zwischen dem Pflanzknollengewicht und der Anzahl der Augenaustriebe für die Sorte Désirée. Diese Beziehung blieb auch durch die Transformation unbeeinflusst. So führte die Erhöhung der Pflanzknollengewichte (Abb. 3-7) in den Anbaujahren 2002 und 2003 im Vergleich zu 2001 zur Zunahme der Augenaustriebe/Pflanzknolle (Abb. 3-12, 3-13) bei allen Linien.

Durch das physiologische Alter der Pflanzknollen wird auch der Ertrag beeinflusst (VAN DER ZAAG & VAN LOON, 1987; STRUIK & WIERSEMA, 1999; ASIEDU ET AL., 2003). Bei ASIEDU ET AL. (2003) ergab sich, dass in Abhängigkeit von der Sorte physiologisch ältere Pflanzknollen bei einer kurzen Vegetationsperiode von 65 Tagen nach der Pflanzung zu höheren Gesamterträgen führen als physiologisch jüngere Pflanzknollen. Durch die Verlängerung der Vegetationsperiode auf 95 Tage nach Pflanzung wurde dieser Effekt jedoch kompensiert und es bestanden keine Ertragsunterschiede zwischen physiologisch jungen und alten Pflanzknollen. In den drei Anbaujahren der dargestellten Ergebnisse betrug die Vegetationsperiode nach der Pflanzung mindestens 135 Tage, und war somit lang genug, um mögliche Ertragsunterschiede, trotz Veränderungen im physiologischen Alter der SST/FFT-Linien, zu kompensieren.

Die physiologisch jüngeren Pflanzknollen der SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp beruhen möglicherweise auf einer Veränderung der Dormanz in Folge der Transformation. Die Dormanz der Knollen wird neben der genotypischen Reaktion und der Lagerungstemperatur auch durch Pflanzknollengewicht, Licht, Stickstoffdüngung und Gibberellinsäuregehalt beeinflusst (STRUİK & WIERSEMA, 1999). So konnte VAN ITTERSUM (1992) zeigen, dass mit zunehmendem Pflanzknollengewicht die Dormanz bei der Sorte Diamant sank. Im Gegensatz dazu war bei der Sorte Désirée kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Knollengröße und der Dormanzdauer festzustellen. Die Überlegung daraus ist, dass die Dauer der Dormanz mit der Knolleninduktion zusammenhängt. Kleinere Knollen werden zu einem späteren Zeitpunkt an den Stolonen initiiert. Die verwendeten Pflanzknollen der SST/FFT-Linien und dem Wildtyp

unterschieden sich zwar in Abhängigkeit von der Vegetationsperiode im Pflanzknollengewicht, jedoch nicht einheitlich über die drei Vegetationsperioden, so dass ein möglicher Einfluss des Pflanzknollengewichtes als Begründung für eine differenzierte Dormanz auszuschließen ist.

Gibberellinsäure kontrolliert viele Prozesse im Lebenszyklus höherer Pflanzen und einige Prozesse sind essentiell für ein normales Pflanzenwachstum und die Entwicklung. Am bekanntesten ist der Einfluss von Gibberellinsäure auf die Keimung, die Zell- und Sprossstreckung, die Blütenentwicklung und die Knollenbildung bei Kartoffeln (DAVIS, 1995; LANGE, 1998; HEDDEN & PROEBSTING, 1999; OLSZEWSKI ET AL., 2002). Bei Kartoffeln hat Gibberellinsäure auch einen Einfluss auf die Dormanz der Knollen. Seit 1950 ist bekannt, dass exogen applizierte Gibberellinsäure die Dormanz reduziert (BURTON, 1989; VAN ITTERSUM & SCHOLTE, 1993; STRUIK & WIERSEMA, 1999). Der endogene Gibberellinsäuregehalt in den Knollen verändert sich während der Dormanz (BURTON, 1989). Bei den von SUTTLE (2004) untersuchten Knollen der Sorte Russet Burbank zeigte sich zunächst direkt nach der Ernte ein hoher Gehalt an GA 19, GA 20 und GA 1, der anfangs im Laufe der Lagerung (33-93 Tage nach Einlagerung) sank, um am Ende der Dormanzphase wiederum anzusteigen (93-135 Tage nach Einlagerung). Die exogene Gibberellinsäureapplikation 7-14 Tage vor der Krautsikkation mit einer anschließenden Knollenlagerung bei 18°C führte bei VAN ITTERSUM & SCHOLTE (1993) zu einer Verkürzung der Dormanz um 21-22 Tage bei der Sorte Diamant und um 20-27 Tage bei der Sorte Désirée. Auch CARRERA ET AL. (2000) fanden in transgenen Kartoffeln der Art *Solanum tuberosum ssp. andigena*, die eine Überexpression des Gens der Gibberellin-20-Oxidase aufwiesen, dem Enzym zur Katalyse von GA₁, eine Verkürzung der Dormanz um 30-60 Tage im Vergleich zum Wildtyp. Im Gegensatz dazu konnte SUTTLE (2004) bei frisch geernteten Knollen der Sorte Russet Burbank keinen verkürzenden Einfluss der Dormanz durch die exogene Gibberellinsäurebehandlung ermitteln; erst durch die Lagerung der Knollen zeigte sich ein vorzeitiges Dormanzende durch die exogene Gibberellinsäurebehandlung. Während der Einfluss der Gibberellinsäure auf die Dormanzdauer noch umstritten ist, ist die Förderung der Keimung der Knollen nach Dormanzende durch Gibberellinsäure unumstritten (VAN ITTERSUM & SCHOLTE, 1993; VAN ITTERSUM ET AL., 1993; CARRERA ET AL., 2000; SUTTLE, 2004).

Die Ursache für das mögliche jüngere physiologische Alter der Pflanzknollen der SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp, trotz gleicher Vermehrungs- und Lagerungsbedingungen, kann somit in der Verlängerung der Dormanz durch reduzierte

Gibberellinsäuregehalte in Folge der Transformation liegen. Ein weiterer Hinweis auf eine Reduktion des Gibberellinsäuregehaltes bei den SST/FFT-Linien durch die Transformation geben die signifikant verkürzten Haupttriebe (Abb. 3-8, 3-9) in den drei Vegetationsperioden. So fanden CARRERA ET AL. (2000) bei transgenen Kartoffeln der Art *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*, die die Antisense Kopie des Gens Gibberellin-20-Oxidase exprimierten, einen reduzierten Gehalt von GA₂₀, GA₁ und GA₈ im obersten Abschnitt der letzten drei Internodien des Haupttriebes. Gleichzeitig zeigten die Pflanzen eine um bis zu 58 % verkürzte Haupttrieblänge im Vergleich zum Wildtyp. Die Reduktion der Haupttrieblänge war dabei auf eine Verkürzung der Internodien zurückzuführen. Die Anzahl der Nodien des Haupttriebes war dabei unbeeinflusst. Parallel dazu zeigten Transgene mit einer Überexpression der Gibberellin-20-Oxidase in Folge einer verstärkten Internodienstreckung längere Haupttriebe als der Wildtyp. Auch KNIPP (2004) fand bei den SST/FFT-Linien die Verkürzung der Internodien. JACKSON & PRAT (1996) konnten bei Transgenen von *S. tuberosum* ssp. *andigena* mit einem Phytochrom B-Mangel einen erhöhten Gibberellinsäuregehalt ermitteln, was zu einem gestreckten Haupttrieb im Vergleich zum Wildtyp führte. Durch die exogene Applikation von Ancymidol, einem GA-Hemmer, wurde sowohl die Haupttrieblänge des Wildtyps als auch der Transgenen auf ein Niveau gestaucht. Die exogene Applikation von Gibberellinsäure (GA₃) hingegen führte zur Streckung der Haupttriebe des Wildtyps und der Transgenen auf einem Niveau. Auch bei anderen Pflanzenarten konnte der Einfluss von Gibberellinsäure auf die Haupttrieblänge festgestellt werden. Bei *Arabidopsis*-GA-Mutanten konnten WILSON ET AL. (1995) sowie PENG & HARBERD (1997) ebenfalls eine verkürzte Haupttrieblänge als Folge des Gibberellinsäuremangels feststellen. Auch bei den Zierpflanzen *Fuchsia* cv. Lord Byron und *Pharbitis nil* Stamm Kidachi war eine Haupttriebstreckung durch die exogene Applikation von Gibberellinsäure (GA₃) zu erzielen (KING ET AL., 2000).

Zahlreiche exogene Umweltfaktoren, wie die Stickstoffversorgung, Temperatur und Lichtintensität und Tageslänge, beeinflussen die Knollenbildung bei Kartoffeln, jedoch durch ihre Wirkung auf den endogenen Gibberellinsäuregehalt der Pflanze (JACKSON ET AL., 1996; JACKSON & PRAT, 1996; JACKSON, 1999; FERNIE ET AL., 2001). Für die Knollenbildung ist ein niedriger Gibberellinsäuregehalt der Pflanzen notwendig. Bei MACHACKOVA ET AL. (1998) wiesen Pflanzen der fakultativen Kurztagpflanze *S. tuberosum* ssp. *andigena* unter knolleninduktiven Bedingungen (Kurztag) um 1/4 bis 1/10 geringere Gibberellinsäuregehalte auf als unter nicht induktiven Bedingungen (Langtag, Kurztag mit Nachtunterbrechung). Die Reduktion der Gibberellinsäuresynthese durch

Antisense des Enzyms Gibberellin-20-Oxidase bei Transgenen von *S. tuberosum* ssp. *andigena* führte unter induktiven Kurztagsbedingungen bei CARRERA ET AL. (2000) zum früheren und höheren Knollenansatz als beim Wildtyp. Im Gegensatz dazu führte der Anstieg des Gibberellinsäuregehaltes durch Überexpression der Gibberellin-20-Oxidase zu transgenen Pflanzen, die eine längere Einwirkung der Kurztagbedingungen für die Knollenbildung benötigten, mit einer geringeren Anzahl an Knollen im Vergleich zum Wildtyp. Die Hemmung der Gibberellinsäuresynthese durch Ancymidol führte bei JACKSON & PRAT (1996) selbst unter nicht induktiven Langtagsbedingungen für *S. tuberosum* ssp. *andigena* zur Knollenbildung. Auch bei der *in-vitro* Vermehrung von *S. tuberosum* zeigte sich ein Einfluss des Gibberellinsäuregehaltes auf die Knollenbildung (XU ET AL., 1998). Sowohl die exogene Zugabe von Gibberellinsäure als auch die Reduktion des Saccharosegehaltes im Medium führten zu keiner Knolleninduktion. Gibberellinsäure förderte die Stolonenstreckung. Dies bestätigte sich auch im endogenen Gibberellinsäuregehalt der Pflanzen. Während der Stolonenstreckung war ein hoher endogener Gibberellinsäuregehalt nachzuweisen, der mit der Anschwellung der Stollenspitzen deutlich sank. Dabei zeigte sich jedoch, dass der endogene GA-Gehalt stark von der Saccharosekonzentration des Mediums abhing. Je geringer der Saccharosegehalt im Medium war, desto höher war der endogene GA-Gehalt. Dies lässt darauf schließen, dass der endogene GA-Gehalt durch den endogenen Saccharosegehalt in der Pflanze reguliert wird.

Ebenso wie ein geringerer Gibberellinsäuregehalt bei den SST/FFT-Linien zu der reduzierten Haupttrieblänge geführt haben kann, erklärt sich dadurch eine frühere Knolleninduktion, trotz physiologisch jüngerer Pflanzknollen, und dadurch der fehlende Ertragsunterschied zum Wildtyp. Ursächlich für die Veränderung des Gibberellinsäuregehaltes bei den SST/FFT-Linien kann die in Folge der Fructansynthese veränderte Saccharosekonzentration der Pflanzen sein. Zum Zeitpunkt des Knospenstadiums, wo auch der Knollenansatz stattfindet, war in den Blättern der SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp eine verringerte Saccharosekonzentration nachzuweisen. Unter der Annahme, dass diese Unterschiede auch in den Stolonen auftraten, begründet dies die nach XU ET AL. (1998) geringeren Gibberellinsäuregehalte in den Stolonen und den früheren Knollenansatz.

Die Blütenentwicklung wird durch zahlreiche Umweltfaktoren wie Tageslänge und Temperatur als auch die Entwicklung der Pflanzen (Juvenilität) reguliert, die im Zusammenhang mit der Gibberellinsäuresynthese stehen (BURTON, 1989; DAVIS, 1995;

MOURADOV ET AL., 2002; OLSZEWSKI ET AL., 2002). So konnte bei zahlreichen Pflanzenarten die Notwendigkeit von Gibberellinsäure zur Blütenbildung durch exogene Applikation von Gibberellinsäure oder durch Verwendung von GA-Mutanten nachgewiesen werden (PENG & HARBERD, 1997; KING ET AL., 2000; BLAZQUEZ ET AL., 2002). Bei Kartoffeln der Art *S. tuberosum* ssp. *andigena* konnten MACHACKOVA ET AL. (1998) unter blüteninduzierenden Langtagbedingungen einen erhöhten Gehalt an Gibberellinsäure im Vergleich zu Pflanzen unter nicht blüteninduktiven Bedingungen feststellen. Die bei den SST/FFT-Linien beobachtete reduzierte Anzahl an Blüten der SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp kann somit auf einen reduzierten Gibberellinsäuregehalt durch die Transformation zurückzuführen sein.

Fazit:

Die Fructansynthese führte bei den SST/FFT-Linien unter Freiland- und Gewächshausbedingungen zu einer oberirdischen morphologischen Veränderung, jedoch zu keiner Ertragsveränderung. Die morphologischen Veränderungen weisen dabei sowohl auf eine mögliche Veränderung des Wasserhaushaltes als auch des Gibberellinsäuregehaltes durch die Transformation hin. Für die Klärung der Ursache der morphologischen Veränderung sind jedoch weitere Detailuntersuchungen notwendig.

4.1.4 Genetische Stabilität der transgenen SST- und SST/FFT-Linien

Die Transformation zur Herstellung der transgenen SST- und SST/FFT-Linien erfolgte über Blattexplantate der Kartoffelsorte Désirée in der *in-vitro*-Kultur (HELLWEGE ET AL., 2000). Durch die Regeneration der Transgene über eine Kallusphase in der *in-vitro*-Kultur kann die Performance der Transgene nicht nur direkt durch die Integration, den Integrationsort und die Kopienzahl des Konstruktes im Genom beeinflusst werden, sondern auch indirekt durch die somaklonale Variation (DALE & MCPARTLAN, 1992). Die somaklonale Variation tritt in der *in-vitro*-Kultur spontan auf, insbesondere bei Verwendung von unorganisierten Zellen, wie dem Kallusgewebe oder den Protoplasten. Dabei auftretende Veränderungen des Ploidiegrades oder der chromosomalen Struktur sowie der Genmutation in den Zellen können zur Veränderung des Phänotyps führen (RAMULU, 1986; KARP ET AL., 1989). Die phänotypischen Abweichungen durch die somaklonale Variation sind bei der Kartoffel weitreichend, vom Reifegrad und der Staudenentwicklung (Trieblänge, Blattgröße) bis hin zu Ertragsparametern (Knollenanzahl, Knollengröße, Knollenform, Knollenfarbe) und Krankheitsresistenzen (RAMULU, 1986;

RIETVELD ET AL., 1991; DALE & MCPARTLAN, 1992; RIETVELD ET AL., 1993; THIEME & GRIESS, 1996). Bei phänotypischen Abweichungen von transgenen Kartoffellinien stellt sich somit die Frage nach der Ursache. Auch bei den untersuchten SST- und SST/FFT-Linien traten im Freisetzungsversuch von 2001 bis 2003 Unterschiede zum Wildtyp im Feldaufgang (Abb. 3-2), der Entwicklung zum Knospen- und Blütenstadium (Abb. 3-3, 3-4), der Haupttrieblänge (Abb. 3-8), der Bildung der Infloreszenzen 1. Ordnung (Abb. 3-15) und dem Deckungsgrad (Abb. 3-6) auf. Der Flächenertrag war hingegen von der Transformation unbeeinflusst (Abb. 3-16). Die Abschätzung des Anteils der somaklonalen Variation und des Geneffektes bei phänotypischen Unterschieden von transgenen Linien kann durch Verwendung zweier Kontrollpflanzentypen über die morphologischen Merkmale erfolgen. Durch die Verwendung von Kontrollpflanzen aus regenerierten Knollenscheiben, analog zur Herstellung der Transgenen, als auch Kontrollpflanzen aus Sprosskeimen der Knollen konnten DALE & MCPARTLAN (1992) zeigen, dass die Reduktion der mittleren Haupttrieblänge und des mittleren Knollenertrages/Pflanze von 70 transgenen Linien der Sorte Désirée sowohl auf die in der *in-vitro*-Kultur auftretende somaklonale Variation als auch auf einen Geneffekt zurückgehen. Das mittlere Gewicht großer Knollen/Pflanze und die mittlere Anzahl großer Knollen/Pflanze gingen hingegen nur auf die somaklonale Variation in der Gewebekultur zurück. Auch die Zunahme der Streuung bei vier untersuchten Pflanzenparametern in der Kontrolle aus Knollenscheiben im Vergleich zu den Kontrollen aus Sprosskeimen spricht für das Auftreten der somaklonalen Variation. Dadurch, dass sich nur die Wüchsigkeit der Pflanzen zwischen den Kontrollen aus Blattexplantaten und Kontrollen aus Pflanzknollen unterschied, halten jedoch FLIS & ZIMNOCH-GUZOWSKA (2000) den Anteil der somaklonalen Variation an phänotypischen Veränderungen bei transgenen Linien für überschätzt. Die Häufigkeit der somaklonalen Variation in der *in-vitro*-Kultur variiert jedoch in Abhängigkeit des verwendeten Gewebes (KARP ET AL., 1989) und des Genotyps (RIETVELD ET AL., 1993; BORDALLO ET AL., 2004). Auch wenn in den eigenen Untersuchungen nur der Wildtyp aus Sprossstecklingen der *in-vitro*-Kultur die Kontrolle zu den SST- und SST/FFT-Linien bildete, ist die Ursache des veränderten Phänotyps der transgenen Linien in der Fructansynthese, statt der somaklonalen Variation des Kulturverfahrens, zu suchen. Dafür spricht der einheitlich über die drei SST/FFT-Linien reduzierte Wuchs bzw. der unveränderte Wuchs der SST-Linien im Vergleich zum Wildtyp, unter der Annahme, dass die somaklonale Variation bei der Kallusphase in der *in-vitro*-Kultur allgegenwärtig ist. Aber auch auf molekularer Ebene zeigte sich mit Hilfe der

ISSR-PCR kein Hinweis auf die somaklonale Variation bei den SST- und SST/FFT-Linien (Abb. 3-20). Durch die ISSR-Primer wird komplementär der Bereich der Mikrosatelliten, in Serie geschaltete Wiederholungen aus 2 bis 6 Nukleotiden, der DNA amplifiziert. Bei Kartoffeln (*S. tuberosum*) wird die ISSR-PCR zur Differenzierung von Sorten (PREVOST & WILKINSON, 1999; MCGREGOR ET AL., 2000; BORNET ET AL., 2002) und zur Identifizierung von Somaklonen einer Sorte (ALBANI & WILKINSON, 1998) eingesetzt. Die in dieser Arbeit verwendeten vier ISSR-Primer UBC 834, 836, 841 und 889 führten zu einer eindeutigen Differenzierung der Kartoffelsorten Désirée, Granola, Agria, Linda und Solara über die Bandenprofile (Ergebnis nicht dargestellt). Zwischen den SST- und SST/FFT-Linien und dem Wildtyp zeigten sich keine Unterschiede im Bandenprofil der Primer UBC 834, 836 und 889. Lediglich bei dem Primer UBC 841 zeigten die SST- und SST/FFT- Linien im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine Bande im Bereich von 650 bp. Nach ALBANI & WILKINSON (1998) reicht bereits das Fehlen bzw. Hinzukommen einer einzelnen Bande im Bandenprofil eines Primers aus, um auf eine eingetretene somaklonale Variation hinzudeuten. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass bei allen 6 transgenen Linien im gleichen Mikrosatellitenbereich eine genetische Veränderung während der Transformation aufgetreten ist. Auch die Integration der Konstrukte hat nicht im repetitiven DNA-Bereich stattgefunden, wie die Ergebnisse der RT-PCR von ULRICH zeigen (pers. Mitt.). Vielmehr deutet das Fehlen der Bande von 650 bp durch den Primer UBC 841 beim Wildtyp auf dessen genetische Abweichung zu den transgenen Linien hin. Dies bestätigt sich auch durch den Vergleich der Bandenprofile der ISSR-Primer des Wildtyps (Désirée) aus der Gewebekultur mit den konventionell vermehrten Pflanzknollen der Sorte Désirée vom Händler. Die Pflanzen aus der konventionellen Vermehrung wiesen durch den ISSR-Primer UBC 841 die Bande im Bereich von 650 bp auf. Der Ursprung der genetischen Veränderung des Wildtyps aus der Gewebekultur kann zwei Ursprünge haben. Zum einen kann es zur somaklonalen Variation in der Gewebekultur gekommen sein. Die Homogenität der Bandenprofile der 4 ISSR-Primer über die drei Vegetationsperioden bestätigt, dass die Pflanzknollenherstellung der transgenen Linien und des Wildtyps unter Gewächshausbedingungen nach vorangegangener Mikropropagation der Linien aus der *in-vitro*-Kultur über Sprossstecklinge zur keiner somaklonalen Variation während des Untersuchungszeitraumes geführt hat. Auch AHLUOWALIA (1994) fand durch die Massenvermehrung von mehreren tausend Sprossstecklingen in der *in-vitro*-Kultur keine morphologischen Veränderungen. Die somaklonale Variation durch Sprossstecklinge oder Meristemspitzen ist auch unwahrscheinlich, da die Zellvermehrung nur durch mitotische

Teilung erfolgt (RAMULU, 1986; KARP ET AL., 1989). Somit müsste die somaklonale Variation beim Wildtyp vorher stattgefunden haben. Andererseits kann der Wildtyp jedoch auch aus einem anderen ursprünglichen Pflanzenpool stammen als die transgenen Linien, was die molekularen Unterschiede zu den transgenen Linien erklären könnte. Auch wenn aus dem molekularen Unterschied des Wildtyps aus der *in-vitro*-Kultur keine phänotypischen Auswirkungen erkennbar waren, ist daraus doch insgesamt abzuleiten, dass bei der Untersuchung der Performance von transgenen Linien darauf zu achten ist, dass die verwendete Kontrolle isogen zu den transgenen Linien ist.

Fazit:

Sowohl die morphologischen Veränderungen der transgenen SST- und SST/FFT-Linien als auch die molekulare Charakterisierung geben keinen Hinweis darauf, dass die phänotypischen Veränderungen der transgenen Linien in der somaklonalen Variation begründet sind. Das jährlich verwendete Pflanzgut war, bezogen auf die jeweilige transgene Linie, homogen.

4.2 Auswirkungen der Transformation auf Krankheiten und Schaderreger

4.2.1 Die Entwicklung von *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary auf den transgenen Pflanzen und Knollen

Der Zusammenhang zwischen der Anfälligkeit von Kartoffeln (*S. tuberosum*) gegenüber *Phytophthora infestans* und dem Kohlenhydratgehalt der Pflanzen ist schon lange bekannt. Junge und alte Kartoffelstauden sind anfälliger gegenüber *P. infestans* als mittelalte Kartoffelstauden, wofür bereits GRAINGER (1956) die parallele Veränderung des Verhältnisses vom Kohlenhydratgehalt der gesamten Pflanze zur restlichen Sprossstrockenmasse (C_p/R_s -Verhältnis) verantwortlich macht. Auch wenn bei WARREN ET AL. (1973) die Reduktion des C_p/R_s -Verhältnisses nicht zu der von GRAINGER (1956) gefundenen Reduktion der Anfälligkeit junger Kartoffelstauden mit *P. infestans* führte, so wurde durch die Injektion einer Fructose-/Glucoselösung (1:1) in den Stängel ein Anstieg der Anfälligkeit der Blätter gegenüber *P. infestans* erzielt. Die Untersuchungen von PHUKAN (1993) und DANIELE ET AL. (2003) zeigen, dass bei einigen Kartoffelsorten die Unterschiede in der horizontalen Resistenz gegenüber *P. infestans* auf die Kohlenhydratgehalte der Blätter bzw. deren Veränderung nach erfolgter Infektion zurückzuführen sind. ENGSTRÖM & STRÖMBERG (1996) konnten durch die vorherige Induktion der systemisch erworbenen Resistenz bei der resistenten Kartoffelsorte Matilda

eine zusätzliche Reduktion der Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* erzielen. Die Blätter der induzierten Pflanzen wiesen signifikant geringere Saccharosegehalte im Vergleich zur Kontrolle zum Zeitpunkt der Infektion mit *P. infestans* auf.

Die genetische Modifikation der SST- und SST/FFT-Linien hat die Kohlenhydratverhältnisse der Kartoffelsorte Désirée verändert (s. 4.2). Die Synthese von kurz- und langkettigen Fructanen (HELLWEGE ET AL., 2000) stellt gleichzeitig eine neue Kohlenhydratquelle in der Kartoffel bereit, wodurch mit einer Veränderung der Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* bei den SST- und SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp zu rechnen war. Die transgene Veränderung von Kohlenhydratverhältnissen kann direkt oder indirekt, durch Beeinflussung von weiteren pathogenrelevanten Mechanismen, auf die Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* wirken. Die konstitutive Expression der bakteriellen Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* in transgenen Linien der Sorte Désirée bei TADEGE ET AL. (1998) führte in den Blättern zum 5- bis 12-fachen Anstieg von Acetaldehyd und zur 2- bis 10-fachen Reduktion von Saccharose. Die signifikant angestiegene Resistenz gegenüber *P. infestans* war dabei jedoch nicht auf die Reduktion der Saccharose zurückzuführen, sondern auf die in Folge der Transformation ausgelöste hypersensitive Reaktion der Pflanzen, die sich auch in den Blättern der nicht infizierten Kontrollpflanzen durch die Läsionenbildung abzeichnete. Bei CONRATH ET AL. (2003) führte die verringerte Aktivität des in den Plastiden lokalisierten ATP/ADP-Transporters in transgenen Linien der Sorte Désirée (AATP1) zur Reduktion der Stärke und zum Anstieg von Glucose in den Knollen. Identische metabolische Veränderungen wurden auch in transgenen Linien der Sorte Désirée durch die Expression von im Cytoplasma lokalisierter Hefe-Invertase (U-Inv) erzielt. Während die U-Inv-Transgenen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Erwinia carotovora* zeigten, war diese bei den AATP1-Transgenen deutlich reduziert. Trotz unveränderter Kohlenhydratverhältnisse in den Blättern bei den AATP1-Transgenen war deren Widerstandsfähigkeit gegenüber *P. infestans* gestiegen. Bei der Behandlung der Blätter mit Elicitoren ergaben sich eine erhöhte H₂O₂-Freisetzung und gesteigerte Aktivität von pathogenassoziierten Genen (pathogen-related genes), woraus CONRATH ET AL. (2003) schließen, dass die gesteigerte Abwehr der transgenen AATP1-Linien gegenüber *E. carotovora* und *P. infestans* nicht direkt von der Kohlenhydratmodifikation abhängt.

Bei den untersuchten SST- und SST/FFT-Linien war die Blattanfälligkeit gegenüber *P. infestans* in Abhängigkeit von der Vegetationsperiode verändert (Abb. 3-21). Während in der Vegetationsperiode 2001 die SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp 7 Tage nach

Infektion einen reduzierten Sporulationsindex aufwiesen, unterschied sich dieser in der Vegetationsperiode 2003 nicht vom Wildtyp. Der Sporulationsindex der SST-Linien glich in beiden Vegetationsperioden dem des Wildtyps. Die Untersuchung der Blattkohlenhydrate Glucose, Fructose, Saccharose und Fructan vor der Infektion der Blätter mit *P. infestans* in den Vegetationsperioden 2001 und 2003 zeigten für alle Kohlenhydrate Unterschiede zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp (Abb. 3-22, Abb. 3-23). Dabei ergab sich zwischen der Fructosekonzentration der Blätter und dem Sporulationsindex von *P. infestans* 7 Tage nach der Infektion ein über beide Vegetationsperioden signifikant gesicherter Zusammenhang. Neben Glucose und Saccharose stellt auch Fructose eine günstige Nahrungsquelle für das vegetative Wachstum von *P. infestans* in der Flüssigkultur dar (HENNIGER, 1959; SAKAI, 1961; HENNIGER, 1963; HOHL, 1983; HOHL, 1991). Im Vergleich zum Anstieg des Fructosegehaltes (bis zu 300 %) in den Blättern von transgenen Kartoffeln mit integrierten *rolC*-Gen aus *A. rhizogenes* und dem daraus resultierenden Anstieg des Blattbefalls durch *A. alternata* und *B. cinerea* bei FLADUNG & GRIFFERS (1993) war die Veränderung der Fructosekonzentration bei den SST/FFT-Linien eher gering (2001: -40 %; 2003: +29 %). Die in Abhängigkeit von den Anbaujahren differenzierte Anfälligkeit der Blätter der SST/FFT-Linien lässt daher vermuten, dass dies auf die natürlichen saisonalen Fructoseschwankungen im Blatt statt auf die Transformation zurückzuführen ist (s. 4.2). Der unterschiedliche Fructosegehalt zum Zeitpunkt der Biotests lässt sich damit erklären, dass in der Vegetationsperiode 2001 der Feldaufgang der SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp verzögert war, während in der Vegetationsperiode 2003 durch die gezielte Vorkeimung eine Angleichung erzielt wurde (Abb. 3-2). Die Anfälligkeit von Kartoffelstauden gegenüber *P. infestans* variiert sowohl mit dem Pflanzenalter als auch mit der Blattetage. Nach PHUKAN (1993) ist dafür der steigende Gehalt an löslichen Kohlenhydraten und Stärke von den oberen zu den unteren Blättern verantwortlich. Bei CARNEGIE & COLHOUN (1983) stieg die Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* von den oberen zu den unteren Blättern einer Pflanze. Somit wäre der reduzierte Sporulationsindex der SST/FFT-Linien in der Vegetationsperiode 2001 im Vergleich zum Wildtyp auf ein jüngeres Blattalter und den damit einhergehenden natürlicherweise niedrigeren Fructosegehalt begründet, statt auf einen Einfluss durch die Fructansynthese in den transgenen Linien. Die geringen Veränderungen der Blattanfälligkeit der SST- und SST/FFT-Linien gegenüber *P. infestans* schließen auch einen indirekten Einfluss der durch die Transformation bedingten

Kohlenhydratmodifikationen auf pathogenrelevante Mechanismen wie bei TADEGE ET AL. (1998) und CONRATH ET AL. (2003) aus.

Anders verhielt sich hingegen der Einfluss der Fructansynthese auf die Knollenanfälligkeit gegenüber *P. infestans*. Der über 7 Tage kumulierte Deckungsgrad des Myzels (Wochensumme) auf den Knollenscheiben war bei den SST/FFT-Linien über die drei Vegetationsperioden (2001-2003) im Vergleich zum Wildtyp reduziert und bei den SST-Linien unverändert (Abb. 3-25). Der parallele Vergleich der Konzentrationen von Glucose, Fructose, Saccharose und Fructan in den Knollen von allen Linien zum Zeitpunkt der Infektion in der Vegetationsperiode 2001 zeigte die negative Beziehung zwischen dem Fructangehalt und dem Deckungsgrad des Myzels auf den Knollenscheiben (Abb. 3-26). Aus dieser Beziehung ließ sich ableiten, dass erst Fructankonzentrationen über 7 µmol Fructose/g Frischgewicht zur Reduktion des Myzelwachstums führen. Daraus erklärt sich der fehlende Einfluss der Fructansynthese in der Blattanfälligkeit der transgenen Linien gegenüber *P. infestans*, da diese geringere Fructankonzentrationen aufwiesen. Der negative Einfluss von Fructan in Form von Inulin auf das vegetative Myzelwachstum von *P. infestans* wurde auch in der Flüssigkultur bestätigt (Abb. 3-27). Die schlechte Verwertung von Polysacchariden als Nahrungsquelle für *P. infestans*, trotz vorhandener degradierender Enzyme, ist bekannt (HOHL, 1991). Bei SAKAI (1961) trat in der Flüssigkultur von *P. infestans* durch Inulin als Kohlenhydratquelle eine Reduktion des Myzelwachstums um 66 % im Vergleich zu Glucose (100 %) auf. In den dargestellten Ergebnissen wurde das Myzeltrockengewicht in Flüssigkultur bei 10%-iger Inulinzugabe um 22 % und bei 40%-iger Inulinzugabe um 33 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert.

Das reduzierte Myzelwachstum auf den Knollenscheiben der SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp kann auf zwei Ursachen beruhen:

1. *verzögerte Primärinfektion*. Die Primärinfektion durch die Zoosporen kann direkt nach der Inokulation bei den SST/FFT-Linien verzögert sein. Die Untersuchungen von CLARKE & KASSIM (1977) ergaben, dass die differenzierte horizontale Resistenz von Kartoffelsorten in der Geschwindigkeit des Eindringens von Zoosporen und Sporangien von *P. infestans* in Knollenscheiben begründet ist, also der ersten Infektionsphase. In der zweiten Infektionsphase, dem vegetativen Wachstum von *P. infestans* durch die Ausbreitung der Hyphen im Knollengewebe, traten keine Unterschiede in der Wachstumsrate zwischen den Sorten auf. In der dritten Infektionsphase, in der sich das Luftmyzel mit reproduktiven Strukturen auf der Knollenoberfläche etabliert, hatte die Wundperidermbildung ebenfalls keinen Einfluss auf die horizontale Resistenz der Knollen.

Auch die im Blatt gefundene Abhängigkeit der Ausbreitung des Myzels im Mesophyllgewebe von der Nährstoffzusammensetzung der Epidermiszelle (HOHL, 1991) spricht dafür, dass die 1. Infektionsphase von *P. infestans* für Unterschiede in der Anfälligkeit zwischen Sorten entscheidend ist.

2. *verminderte Nahrungsqualität*. Die Nährstoffaufnahme von *P. infestans* findet sowohl über die Haustorien als auch über die inter-, intra- und transzellulären Hyphen statt (HOHL, 1991). Mit anhaltender Versuchsdauer (7.-9. Tag nach Infektion) vergrößerte sich der Deckungsgrad des Myzels auf den Knollenscheiben bei allen transgenen Linien und dem Wildtyp (Abb. 3-24). Der Unterschied des Deckungsgrades zwischen den SST/FFT-Linien und dem Wildtyp blieb bestehen, vergrößerte sich jedoch mit zunehmender Versuchsdauer. Daher ist davon auszugehen, dass 1. neben der möglichen verzögerten Penetration der Zoosporen in der ersten Infektionsphase auch 2. die Wachstumsrate des Myzels in der zweiten Infektionsphase bei den SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp reduziert war. Das Fructan wird nicht zusätzlich, sondern ersatzweise als Kohlenhydrat in den untersuchten transgenen Linien gebildet, wodurch von einer schlechteren Nährstoffversorgung sowohl der Haustorien als auch der inter-, intra- und transzellulären Hyphen ausgegangen werden kann.

Fazit:

In den Blättern zeigte sich keine gentechnisch bedingte Veränderung der horizontalen Resistenz der SST- und SST/FFT-Linien gegenüber *P. infestans*. In den Knollen war die horizontale Resistenz bei den SST-Linien unverändert, hingegen bei den SST/FFT-Linien gestiegen. Durch den Zusammenhang zwischen den Fructangehalten in den Knollen der transgenen Linien und dem Deckungsgrad des Myzels von *P. infestans* sowie dem Myzelwachstum in den Nährlösungsversuchen mit Inulin als Kohlenhydratquelle kann das Fructan für diese Veränderung verantwortlich gemacht werden.

4.2.2 Die Entwicklung des Kartoffelkrebses *Synchytrium endobioticum* Schilb. (Perc.) auf den transgenen Knollen

Die Infektion mit *S. endobioticum* erfolgt über die Zoosporen in meristematischen Zellen der Wirtspflanzen (LANGERFELD, 1984; STACHEWICZ, 2002). Bei der Kartoffel werden bevorzugt die Augenknospen und Stolonen infiziert, während die Wurzeln nicht befallen werden. Die Zoosporen können dabei aus den asexuellen oder sexuellen Sporangien stammen, wobei die asexuelle haploide Form nur am wachsenden Wirt zu finden ist

(LANGERFELD, 1984). Die Resistenz gegenüber den Krebspathotypen 1 ist eine wichtige Voraussetzung für die Sortenzulassung. Nach ZAKOPAL & KRUSEK (1972) sind für die Resistenz zwei Hauptfaktoren verantwortlich: nekrogene Abortion und Reaktionsvermögen. Charakteristisch für die Abwehrreaktion ist in der Regel das Absterben und Verbräunen von Gewebezonen im Infektionsbereich. Nach GÄUMANN (1951 zit. in LANGERFELD, 1984) folgt nach der direkten Wirkung von nekrogenen Stoffen das Verhungern des obligat biotrophen Pilzes.

In den hier dargestellten Untersuchungen zur Anfälligkeit der transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp erfolgte die Infektion der Augenknospen mit den Zoosporen aus den Sommersporangien. Die Effekte der gentechnischen Veränderung auf den Schlupf der Zoosporen aus den Dauersporangien über die Wurzelexsudate wie bei BRIERLEY (1922 zit. in KÖHLER, 1931b) und SHARMA & CAMMACK (1976) konnten damit allerdings nicht abgeschätzt werden. Gegenüber dem für den Wildtyp (Désirée) avirulenten Pathotyp 1 von *S. endobioticum* ergaben sich bei den SST- und SST/FFT-Linien (Abb. 3-28) keine Veränderungen im Anteil der Augenaustriebe mit frühen und späten Abwehrnekrosen (Boniturnoten 1 und 2). Ebenso war der Anteil der Augenaustriebe mit zerstreutem und dichtem Befall (Boniturnoten 4 und 5) bei den sechs transgenen Linien gegenüber dem für den Wildtyp virulenten Pathotyp 18 von *S. endobioticum* unverändert (Abb. 3-28). Die Anzahl der Wucherungen durch den Pathotyp 18 von *S. endobioticum* unterschieden sich auch nicht an den Augenplatten der transgenen Linien und des Wildtyps. Hingegen war das Gewicht der Wucherungen an allen transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp reduziert, wenn auch nicht signifikant (Abb. 3-29). Als Hauptfaktoren für die Größe der Wucherung gelten ein hoher Befallsdruck, zeitlich und räumlich ausreichendes meristematisches Gewebe sowie eine optimale Feuchtigkeit (SCHICK & KLINKOWSKI, 1962; HAMPSON & HAARD, 1980; HAMPSON ET AL., 1994; HAMPSON & COOBES, 1997). Dies begründet sich in der Ausbreitungsstrategie von *S. endobioticum*. Nach der Migration der Zoosporen vergrößert sich die Wirtszelle durch die Mitose des Erregers und der Plasmainhalt des Erregers teilt sich in mehreren Segmenten, den Sporangien. Pro infizierte Wirtszelle werden 3 bis 8 Sporangien gebildet, die 200 bis 300 Zoosporen enthalten (STACHEWICZ, 2002). Gleichzeitig wird vom Erreger ein Toxin ausgeschieden, das zur Zellteilung der Wirtszelle und der Zellen in den umliegenden Schichten führt (KÖHLER, 1931a; LANGERFELD, 1984). Ab einer gewissen Größe des Erregers platzt die infizierte Zelle und durch die freiwerdenden Zoosporen erfolgt bei ausreichendem meristematischem Gewebe und Feuchtigkeit die Neuinfektion. *S. endobioticum* bildet, z.B. im Vergleich zu

P. infestans, kein Myzel, so dass die Ausbreitung im Gewebe nur durch Selbstinfektion stattfindet. Da die Infektionsbedingungen sowohl für die transgenen Linien als auch den Wildtyp in den dargestellten Untersuchungen identisch waren, scheidet der Einfluss des Infektionsdrucks bei der Inokulation sowie die Unterschiede in der Feuchtigkeit während der Inkubation als mögliche Ursachen für das geringere Wuchergewicht an den transgenen Linien aus. *S. endobioticum* hängt als obligat biotropher Pilz in seiner Ernährung von der Wirtszelle ab. Nach BAAYEN ET AL. (2005) stellen die Wucherungen an den Pflanzen einen Sink für Nährstoffe dar. Die Wirtszelle stirbt erst, wenn der Erreger nicht mehr auf seine Nahrungsquelle angewiesen ist (KÖHLER 1948 zit. in LANGERFELD, 1984). Für die schwankende Größe der Zoosporen 60-70 Stunden nach Infektion der Zelle machte KÖHLER (1931a) die Lage des Erregers und damit seinen Ernährungszustand verantwortlich. In den mikroskopischen Aufnahmen von ARTSCHWAGER (1923) zeigte sich in dem umliegenden Gewebe einer infizierten Wirtszelle die Anreicherung von mit Stärke gefüllten Parenchymzellen. Obwohl die transgenen SST- und SST/FFT-Linien vom Wildtyp abweichende Glucose-, Fructose- Saccharose- und Fructankonzentrationen in den Knollen aufwiesen, konnte zwischen ihnen und der Größe der Wucherung kein Zusammenhang gefunden werden (Abb. 3-30). Möglicherweise geht die Reduktion des Wuchergewichtes auf die reduzierten Stärkegehalte in den transgenen Knollen zurück (Abb. 3-18), da nach KÖHLER (1931b) die aus den Blättern abtransportierte Stärke statt in die Knollen in die Wucherungen gelagert und verbraucht wird. Hinweise hierzu aus Untersuchungen an konventionellen Sorten mit unterschiedlichem Stärkegehalt liegen allerdings nicht vor.

Fazit:

Die gentechnische Veränderung hat weder gegenüber dem avirulenten Pathotyp 1 noch dem virulenten Pathotyp 18 von *S. endobioticum* zu gesicherten Veränderungen in der Anfälligkeit der SST- und SST/FFT-Linien geführt. Das in der Tendenz reduzierte Gewicht der Wucherung durch den Pathotyp 18 von *S. endobioticum* an den transgenen Linien konnte weder dem Gehalt von Glucose, Fructose, Saccharose noch dem bisher für den Pilz unbekanntem Fructan in den Knollen zugeordnet werden.

4.2.3 Die Entwicklung von Nematoden auf den transgenen SST- und SST/FFT-Linien

4.2.3.1 Die Entwicklung von *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens

Die Entwicklung von *Globodera rostochiensis* ist, neben der direkten Wirt-/Parasit-Wechselwirkung, auch von der Schlupfinduktion und Anlockung durch die Wirtspflanze sowie dem Eindringungsverhalten der infektiösen juvenilen L₂-Larven in die Wurzeln abhängig (MÜLLER & RUMPENHORST, 2000). Der Schlupf der L₂-Larven aus den Zysten von *G. rostochiensis* wird zu 70-80 % von den in den Wurzelausscheidungen der Wirtspflanze befindlichen Schlupffaktoren ausgelöst (EVANS & HAYDOCK, 1990; TIMMERMANS ET AL., 2006). Durch die Wurzelausscheidungen von 25 Kartoffelsorten (*S. tuberosum*) erzielte EVANS (1983) einen Schlupf von 21-67 % der juvenilen L₂-Larven von *G. rostochiensis* 3 Wochen nach Zugabe der Wurzelexsudate. Ursächlich für eine differenzierte Schlupfinduktion kann sowohl die chemische Zusammensetzung als auch die Menge der Wurzelausscheidungen sein. Da bei den SST- und SST/FFT-Linien die Integration der Fructansynthesegene unter dem konstitutiven Promoter des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) erfolgt ist, war auch in den Wurzeln mit einer Veränderung der Kohlenhydratgehalte im Vergleich zum Wildtyp sowie der zusätzlichen Bildung von Fructanen zu rechnen, was über die Wurzelausscheidungen einen Einfluss auf die Schlupfinduktion vermuten ließ. Eine qualitative Beeinflussung der Schlupffaktoren durch die Integration der Fructansynthese in den SST- und SST/FFT-Linien war dabei unwahrscheinlich, da bisher nur Terpenoide oder Nortriterpene als Hauptschlupffaktoren für *G. rostochiensis* identifiziert wurden (ATKINSON ET AL., 1987; DEVINE & JONES, 2000; LILLEY ET AL., 2005). SCHENK ET AL. (1999) gelang aus den Wurzelausscheidungen von *S. tuberosum* und *S. lycopersicum* die Identifizierung des Solanoeclepin A als Schlupffaktor für *G. rostochiensis* und *G. pallida*. In seiner Struktur ähnelt es dem in Kidneybohnen (*Phaseolus vulgaris* var. *communis*) gefundenen Glycinoeclepin A (Terpenoid), welches den Schlupf von *Heterodera glycine* auslöst. Für die Quantität der Schlupffaktoren kann sowohl die Syntheseleistung der Wurzeln als auch das Wurzelwachstum verantwortlich sein. EVANS & HAYDOCK (1990) vermuten, dass Kartoffelsorten mit geringem Wurzelwachstum auch verringerte Wurzelausscheidungen aufweisen, die zu einer schwächeren Schlupfinduktion führen und in Folge dessen den Befall der Pflanzen senken. RAWSTHORNE & BRODIE (1986) fanden einen positiven linearen Zusammenhang zwischen dem Wurzelfrischgewicht bzw. der Wurzellänge und dem Schlupf von *G. rostochiensis* bei den resistenten Kartoffelsorten Rosa und Hudson in den ersten drei Wochen nach Auflauf.

Bei TIMMERMANS ET AL. (2006) war der Schlupf von *G. pallida* mit der Wurzellängendichte von der Kartoffelsorte Bintje und der Fangpflanze *S. sisymbriifolium* positiv korreliert. Bei den SST/FFT-Linien war das Sprosswachstum unter Freilandbedingungen (Abb. 3-5, Abb. 3-6, Abb. 3-8) und auch im Gewächshaus während der drei Versuchsserien zur Anfälligkeit von *G. rostochiensis* im Vergleich zu den SST-Linien und dem Wildtyp reduziert (Abb. 3-9). Die positive Beziehung des Spross-/Wurzelverhältnisses (TRUDGILL & COTES, 1983) wie auch die Ergebnisse der Wurzelfrischmasse aus der 1. Versuchsserie mit *M. incognita* (Abb. 3-33) lassen vermuten, dass das Wurzelwachstum der SST/FFT-Linien im Vergleich zu den SST-Linien und dem Wildtyp während der drei Versuchsserien zur Anfälligkeit von *G. rostochiensis* reduziert war, und somit auch die Schlupfinduktion.

Auch nach der Schlupfinduktion war bei den SST- und SST/FFT-Linien mit einem Einfluss auf die Entwicklung der juvenilen L₂-Larven von *G. rostochiensis* zu rechnen. Nach erfolgreicher Invasion der L₂-Larven von *G. rostochiensis* in der Streckungszone der Wurzelspitzen (MULDER & VAN DER WAL, 1997) und der Induktion des Synzytiums wird über die Nährstoffversorgung durch die Wirtspflanze sowohl das Geschlechterverhältnis der Larven als auch die Reproduktion der sedentären (= sesshaften) Weibchen beeinflusst (SIJMONS, 1993; LILLEY ET AL., 2005). Ein Indiz für eine geringe Nährstoffversorgung durch die Wirtspflanze ist nach CASTELLI ET AL. (2005) die Zunahme des Männchen/Weibchen-Verhältnisses, somit die Abnahme der Zystenanzahl an den Wurzeln. Neben dem Genotyp bestimmen auch das Pflanzenwachstum, die Entwicklung und die jeweiligen Umweltbedingungen die Nährstoffversorgung der Nematoden über die Wurzel, was sich unter anderem aus dem von SEINHORST (1992) gefundenen proportionalen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Zysten des Pathotyps 1 von *G. rostochiensis* an der Sorte Irene (*S. tuberosum*) und deren Sprosstrockengewicht ergibt.

Trotz möglicher qualitativer und der quantitativen Veränderungen der Kohlenhydrate bei den SST- und SST/FFT-Linien und der morphologischen Modifikation der SST/FFT-Linien unterschied sich die Anzahl der sedentären Weibchen am äußeren Wurzelballen in den drei durchgeführten Versuchsserien nicht vom Wildtyp (Abb. 3-31). Ebenso war die Reproduktion der sedentären Weibchen, ermittelt über die Anzahl der Eier und Larven in einer Stichprobe von 10 Zysten der Größe 0,75–1,0 mm in zwei Versuchsserien, bei den SST- und SST/FFT-Linien unverändert (Abb. 3-32).

Das Ausbleiben der Verringerung der sedentären Weibchen der SST/FFT-Linien in Folge einer schwächeren Schlupfinduktion durch das reduzierte Wurzelwachstum kann einerseits

dadurch begründet sein, dass die Schlupffaktoren der Wurzelausscheidungen über einen weiten Konzentrationsbereich aktiv sind (DEVINE & JONES, 2000). Bei EVANS (1983) verloren die Wurzelausscheidungen in Abhängigkeit von der Sorte (25 Sorten von *S. tuberosum*) erst durch eine 4- bis 16-fache Verdünnung ihre Wirkung zur Schlupfinduktion der juvenilen L₂-Larven von *G. rostochiensis*. Andererseits muss ein schwächeres Wurzelwachstum nicht generell mit einer reduzierten Schlupfinduktion einhergehen. Den schwächeren Schlupf bei der resistenten Sorte Rosa (*S. tuberosum*) im Vergleich zur resistenten Sorte Hudson konnten RAWSTHORNE & BRODIE (1986) auf das Wurzelvolumen zurückführen. Bei gleichem Wurzelfrischgewicht war die Anzahl der Wurzelspitzen und die Wurzellänge der Haupt- und Lateralwurzeln der Sorte Rosa größer als die der Sorte Hudson. Die Sorte Rosa wies einen kleineren Wurzeldurchmesser in den Haupt- und Lateralwurzeln auf als die Sorte Hudson, was zu dem geringeren Wurzelvolumen führte. Die Reduktion des Wurzeldurchmessers der SST/FFT-Linien kann somit das verringerte Wurzelfrischgewicht kompensiert haben, wodurch sich keine Unterschiede in der Menge der Wurzelausscheidungen zu den SST-Linien und dem Wildtyp ergaben. Die Exsudation der Wurzel findet an der gesamten Wurzel statt (RAWSTHORNE & BRODIE, 1986) und die Orientierung der geschlüpften juvenilen L₂-Larven von *G. rostochiensis* zur Wurzel erfolgt über den CO₂-, Aminosäure-, pH-, Ionen- und/oder Zuckergradienten der Wurzeln (PERRY, 1998). Die Zunahme des Wurzelvolumens der SST/FFT-Linien schließt somit auch Unterschiede in der Anlockung der geschlüpften L₂-Larven aus. Aber auch nach erfolgreicher Invasion der L₂-Larven in die Wurzeln schien der kleinere Wuchs der SST/FFT-Linien trotz des von SEINHORST (1992) gefundenen proportionalen Zusammenhangs zwischen dem Sprosstrockengewicht und der Anzahl sedentärer Weibchen nicht zur Reduktion der Weibchen bei den SST/FFT-Linien im Vergleich zu den SST-Linien und dem Wildtyp geführt zu haben. Die Kohlenhydratgehalte in den Wurzelspitzen nach Infektion mit *M. incognita* zeigen einen Anstieg von Glucose, Fructose, Saccharose und Fructan bei den SST/FFT-Linien im Vergleich zu den SST-Linien und dem Wildtyp (Abb. 3-35). Bei *Heterodera schachtii* führte die externe Zugabe von Saccharose zu den Wurzeln von *Brassica rapa* var. *silvestris* zum Anstieg der Weibchen (GRUNDLER ET AL., 1991). Somit kann ein stärkerer Anstieg der Wurzelkohlenhydrate bei den SST/FFT-Linien zur Kompensation einer durch den reduzierten Wuchs verringerten Nährstoffversorgung der sedentären Weibchen von *G. rostochiensis* geführt haben, wodurch sich auch die gleiche Reproduktionsstärke der sedentären Weibchen an den SST/FFT- Linien, SST-Linien und dem Wildtyp ergab.

Unabhängig von der transgenen Linie und dem Wildtyp schwankte das Niveau der gebildeten Zysten/Pflanze zwischen den drei Versuchsserien. Die mittlere Anzahl der am äußeren Wurzelballen sichtbaren Zysten über alle transgenen Linien und dem Wildtyp betrug in der 1. Versuchsserie 235 Zysten/Pflanze, in der 2. Versuchsserie 552 Zysten/Pflanze und in der 3. Versuchsserie 358 Zysten/Pflanze. Nach MÜLLER & RUMPENHORST (2000) ist die Vermehrung von *G. rostochiensis* neben den Wirtspflanzenfaktoren auch stark von den Umweltfaktoren Boden, Wasserversorgung, Temperatur und Belichtung abhängig. Der unterschiedliche Zeitraum zwischen der 1. und 3. Versuchsserie (jeweils von Januar-März) zur 2. Versuchsserie (März-Mai) lässt trotz Temperaturregulierung und Zusatzbeleuchtung des Gewächshauses einen Einfluss der Umweltfaktoren auf das Niveau der Zysten nicht ausschließen. Durch die längere Lagerung der Knollen der 2. Versuchsserie bis zum Versuchsansatz waren diese jedoch physiologisch älter als die Knollen der 1. und 3. Versuchsserie. Dies zeigte sich auch im schnelleren Auflauf der Pflanzen der 2. Versuchsserie und den längeren Trieben in den ersten 3 Wochen nach Auflauf im Vergleich zu den Pflanzen der 1. und 3. Versuchsserie (nicht dargestellt). Den Einfluss des physiologischen Alters der verwendeten Knollen auf die Zystenanzahl von *G. rostochiensis* an den Wurzeln bestätigen die Untersuchungen von DALE & PHILLIPS (1995). Neben den genotypischen Unterschieden der 14 anfälligen Kartoffelsorten (*S. tuberosum*) stieg mit zunehmendem physiologischen Alter auch die Anzahl der Zysten/Pflanze, da das Wurzelwachstum der Pflanzen erhöht war. In den dargestellten Ergebnissen spricht die 2 Monate längere Lagerung der Knollen der 2. Versuchsserie im Vergleich zur 1. und 3. Versuchsserie für den Einfluss des physiologischen Alters der Knollen auf das Niveau der Zystenbildung.

Neben der Anzahl der sedentären Weibchen an den Wurzeln trat auch in der Reproduktion der sedentären Weibchen zwischen den Versuchsserien unabhängig von den transgenen Linien und dem Wildtyp ein Niveauunterschied auf. In der 1. Versuchsserie betrug die mittlere Anzahl der Eier und Larven/Zyste der Größe 0,75-1 mm 393 Eier und Larven/Zyste und sank in der 2. Versuchsserie auf 236 Eier und Larven/Zyste. Obwohl ARNTZEN & VAN EEUWIJK (1992) bei *G. rostochiensis* und WARD ET AL. (1985) bei *G. pallida* keine Korrelation zwischen der Anzahl der Zysten/Pflanze und der Anzahl Eier/Zyste fanden, deutet die reduzierte Anzahl Larven und Eier/Zyste in der 2. Versuchsserie auf die Folge einer möglichen intraspezifischen Konkurrenz durch die höhere Anzahl der sedentären Weibchen/Pflanze im Vergleich zu der 1. Versuchsserie hin. Die Untersuchungen von SEINHORST (1993) zur Vermehrungsrate von *G. rostochiensis* in

Abhängigkeit von der Inokulationsdichte ergaben, dass bei einer Konkurrenz der Larven um die Infektionsstellen (Wurzelraum) die Anzahl der sich entwickelnden Weibchen aktiv reduziert wird. Ermöglicht der Wurzelraum einer hohen Anzahl von Weibchen die Entwicklung, kommt es bei auftretendem Nahrungsmangel zur Reduktion der Anzahl der Eier/Zyste. Dies spricht dafür, dass die reduzierte Anzahl Eier/Zyste in der 2. Versuchsserie im Vergleich zur 1. Versuchsserie der dargestellten Ergebnisse eine Folge einer unzureichenden Nährstoffversorgung der sedentären Weibchen war. Wie auch bei der Anzahl der Zysten/Pflanze kann der Einfluss von Umweltfaktoren auf die Reproduktion der sedentären Weibchen von *G. rostochiensis* zwischen der 1. und 2. Versuchsserie nicht ausgeschlossen werden. Bei HOLZ ET AL. (1999) betrug die Reproduktion der sedentären Weibchen von *G. rostochiensis* an der Sorte Désirée in zwei Versuchsserien 200 Eier/Zyste (Bolivien) und 600 Eier/Zyste (England). Die 8- bis 10-fach höhere Infektionsdichte in Bolivien deutete auf die intraspezifische Konkurrenz der sedentären Weibchen um die Nährstoffe hin. Gleichzeitig wurden in Bolivien die Untersuchungen unter Kurztagbedingungen durchgeführt, welche ebenfalls zur Reduktion der Reproduktion der sedentären Weibchen von *G. rostochiensis* führen, wodurch HOLZ ET AL. (1999) einen Umwelteinfluss nicht ausschließen. Bei WARD ET AL. (1985) sank die Anzahl der Eier/Zyste von *G. pallida* mit steigender Temperatur. Durch die unterschiedlichen Untersuchungszeiträume der 1. und 2. Versuchsserie ist damit ein Umwelteinfluss auf die Reproduktion der sedentären Weibchen in den dargestellten Ergebnissen nicht auszuschließen.

Fazit:

Die quantitative und qualitative Veränderung der Kohlenhydrate in den Wurzeln der SST- und SST/FFT-Linien sowie der reduzierte Wuchs der SST/FFT-Linien haben zu keiner Veränderung der Anfälligkeit gegenüber *G. rostochiensis* geführt.

4.2.3.2 Die Entwicklung von *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood

Durch das Fehlen eines Dauerstadiums im Entwicklungszyklus von *M. incognita* (MÜLLER & RUMPENHORST, 2000) erfolgte die Infektion der Pflanzen in den dargestellten Untersuchungen mit infektiösen L₂-Larven, was die Abschätzung des Einflusses der Transformation auf die Schlupfinduktion von *M. incognita* ausschließt. Im Gegensatz zu *G. rostochiensis* ist bei *M. incognita* jedoch der Einfluss der Wurzelexsudate der Wirtspflanzen auf deren Schlupf gering. Bei ZHAO ET AL. (2000) war der Schlupf der Eier

von *M. incognita* durch die Wurzelexsudate von Brechbohnen (*Phaseolus vulgaris*) unverändert und stieg bei Erbsen (*Pisum sativum*) nur um 5 % im Vergleich zur Wasserkontrolle. Die Wurzelexsudate von Luzernesämlingen (*Medicago sativa*) steigerten den Schlupf von *M. incognita* zwar um 20 % bei HAMLIN ET AL. (1973), jedoch betrug der Schlupf auch schon bei der Wasserkontrolle 50-80 %, so dass die Wirkung der Exsudate als marginal zu werten ist. Auch die Zugabe von Glucose im Bereich von 10^{-3} - 10^{-7} mol hatte keinen Einfluss auf den Schlupf der Eier von *M. incognita*. Nach erfolgreicher Penetration der L₂-Larven werden diese über die hypertrophierten Riesenzellen vom Phloem der Wirtspflanze mit Nährstoffen und Energie versorgt (DORHOUT ET AL., 1993) und wirken auf die Wirtspflanze als metabolisches Sink (CARNEIRO ET AL., 1999). Die metabolischen Folgen des Befalls durch *M. incognita* auf die Pflanze sind Veränderungen im Nährstoffgehalt, der Translokation der Photosyntheseprodukte, der Transpiration und der Wasserversorgung, was sich morphologisch in der Modifikation des Wurzelwachstums sowie in der Reduktion des Sprosswachstums und Ertrages widerspiegelt (MELAKEBERHAN ET AL., 1985; MELAKEBERHAN & FERRIS, 1989; ANWAR, 1995). Bei Tomaten (*Lycopersicon lycopersicum*), Kuhbohnen (*Vigna sinensis*), Weinreben (*Vitis vinifera*) und Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) konnten Unterschiede in der Anfälligkeit gegenüber *M. incognita* und dem Kohlenhydratstatus der Wirtspflanze bzw. deren Modifikation durch die Infektion festgestellt werden (MASOOD & HUSAIN, 1975; SHARMA & SETHI, 1976; MELAKEBERHAN ET AL., 1990; KHOSHKHO ET AL., 1994). Deshalb sollte durch die Integration der Fructansynthese in die SST- und SST/FFT-Linien der Kartoffel (*S. tuberosum* cv. Désirée) mit einer Veränderung der Anfälligkeit gegenüber *M. incognita* gerechnet werden. In zwei von drei Versuchsserien hat sich diese Hypothese für die SST/FFT-Linien, nicht aber für die SST-Linien bestätigt, indem eine verringerte Reproduktion von *M. incognita* an den SST/FFT-Linien beobachtet wurde (Abb. 3-34). In der 1. Versuchsserie war die ausgespülte Larvenanzahl/g WF der SST/FFT-Linien 22/30 und 22/24 tendenziell geringer als die des Wildtyps und in der 3. Serie wiesen die SST/FFT-Linien 22/19 und 22/34 eine signifikant geringere Reproduktion auf als der Wildtyp. In der 2. Versuchsserie traten keine Unterschiede in der Anzahl der Larven/g WF zwischen den SST/FFT-Linien und dem Wildtyp auf.

Die Reproduktion von *M. incognita* steht sowohl mit der Infektionspopulation (MELAKEBERHAN ET AL., 1985; MELAKEBERHAN & FERRIS, 1989; KHOSHKHO ET AL., 1994; CARNEIRO ET AL., 1999; VOVLAS ET AL., 2005) als auch dem Pflanzenwachstum (BASU & SUKUL, 1983; CANTO-SAENZ & BRODIE, 1987; ANWAR, 1995) im positiven

Zusammenhang. Der Wuchs der SST/FFT-Linien war unter Freiland- und Gewächshausbedingungen (Abb. 3-6, Abb. 3-8, Abb. 3-9) im Vergleich zu den SST-Linien und dem Wildtyp reduziert. Um den Einfluss des Pflanzenwachstums auf die Reproduktion von *M. incognita* zu minimieren, wurde in den dargestellten Ergebnissen die Anzahl der ausgespülten Larven auf das Frischgewicht der Wurzeln statt auf die Pflanzen bezogen, wodurch sich der Unterschied zwischen der Anzahl der ausgespülten Larven an den SST/FFT-Linien und dem Wildtyp verringerte (nicht dargestellt). Trotzdem kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass nicht die kleinere Blattfläche der SST/FFT-Linien über die verringerte Assimilatfläche und verringerte Photosynthese ursächlich für die reduzierte Reproduktion von *M. incognita* an den SST/FFT-Linien verantwortlich war. Die Kohlenhydratgehalte der Wurzeln in der 1. Versuchsserie, unmittelbar vor Beginn der Gewinnung der Larven ermittelt, sprechen für eine ausreichende Versorgung der sedentären Weibchen von *M. incognita* an den SST/FFT-Linien. Die Konzentration der reduzierten Kohlenhydrate Glucose und Fructose als auch Saccharose überwog bei allen transgenen Linien der des Wildtyps, wobei die SST/FFT-Linien die höchsten Konzentrationen aufwiesen (Abb. 3-35). Nach MASOOD & HUSAIN (1975) ist die höhere Resistenz der Tomatensorte Nemared gegenüber *M. incognita* auf deren Reduktion des totalen Kohlenhydratgehaltes nach Infektion zurückzuführen. Die anfällige Sorte Marglobe reagierte mit einem Kohlenhydratanstieg durch die Infektion mit *M. incognita*. In den Wurzeln von Weinpflanzen (*Vitis vinifera*) wurde durch den Befall mit *M. incognita* weder bei der resistenten noch der anfälligen Weinsorte der Gehalt an reduzierten Kohlenhydraten beeinflusst, jedoch stieg der Gehalt der nicht reduzierten Kohlenhydraten in der anfälligen Sorte und sank in der resistenten Sorte (MELAKEBERHAN ET AL., 1990). Auch die von KHOSHKHO ET AL. (1994) untersuchte anfällige Baumwollsorte (*Gossypium hirsutum*) zeigte in den Wurzeln einen Anstieg des Kohlenhydratgehaltes, während die resistente Sorte durch den Befall mit *M. incognita* ihren Kohlenhydratgehalt in den Wurzeln reduzierte. Obwohl die Infektion mit *M. incognita* bei der resistenten und anfälligen Kuhbohnenart (*Vigna sinensis*) bei SHARMA & SETHI (1976) zur Reduktion des gesamten Kohlenhydratgehaltes in den Wurzeln führte, war der Kohlenhydratgehalt der resistenten Sorte generell geringer als der der anfälligen Sorte, wodurch sie die geringere Anfälligkeit der resistenten Sorte erklären. Demnach hätten die SST/FFT-Linien auf Grund ihrer höheren Kohlenhydratgehalte in den Wurzeln im Vergleich zum Wildtyp eine über dem Wildtyp liegende Reproduktion von *M. incognita* aufweisen müssen. Im Gegensatz dazu reagierten anfällige Bittermandelpflanzen (*Prunus dulcis*) und die

anfällige Tomatensorte Rutgers (*Lycopersicon esculentum*) auf die Infektion mit *M. incognita* mit einer Reduktion der Kohlenhydrate in den Wurzeln im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (NASR ET AL., 1980; ANWAR, 1995). Unter der Annahme, dass die Kohlenhydratgehalte der Wurzeln die Reproduktion von *M. incognita* an transgenen Linien und dem Wildtyp beeinflussten, scheint eine höhere Reproduktion von *M. incognita* mit einer stärkeren Reduktion des Kohlenhydratgehaltes in den Wurzeln einherzugehen, wie von NASR ET AL. (1980) und ANWAR (1995) gefunden. Nach CARNEIRO ET AL. (1999) ist die Veränderung der Kohlenhydratgehalte durch den Nematodenbefall von der Pflanzen- und Nematodenart abhängig. Daher sind für eine eindeutige Abschätzung des Einflusses des Kohlenhydratgehaltes der Wurzeln auf die Reproduktion von *M. incognita* an den transgenen SST- und SST/FFT-Linien sowie dem Wildtyp noch Detailuntersuchungen notwendig, die auch eine Aussage über die Richtung der Veränderung der Kohlenhydratgehalte durch die Infektion mit *M. incognita* ermöglichen. Parallel zum höheren Gehalt an Glucose, Fructose und Saccharose war bei den SST/FFT-Linien die Fructankonzentration in den Wurzeln im Vergleich zum Wildtyp und den SST-Linien am höchsten. Auch wenn sich dabei ein negativer Zusammenhang zwischen der Fructankonzentration in den Wurzeln und der Larvenanzahl von *M. incognita* in der 1. Versuchsserie andeutete, konnte dieser nicht gesichert werden. Demgegenüber war auch in der 3. Versuchsserie die Larvenanzahl/g WF bei den SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp reduziert, bei zwei Linien sogar signifikant. Die Fructansynthese hängt vom Entwicklungsstadium der Pflanzen ab und steigt mit zunehmendem Alter der Pflanzen (s. 4.2). Die 3. Versuchsserie fand von Juni-Juli statt, die 1. Versuchsserie von Januar-März. Unter der Annahme, dass die Pflanzen in der 3. Versuchsserie durch höhere Temperaturen und Strahlungsintensitäten im Gewächshaus bei gleicher Standdauer ein höheres Entwicklungsstadium erreicht hatten als in der 1. Versuchsserie, kann dieses zur stärkeren Fructansynthese und somit zur Reduktion der Reproduktion von *M. incognita* an den SST/FFT-Linien geführt haben. Dabei kann allerdings keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Fructane selbst zu einer möglichen Reduktion der Reproduktion von *M. incognita* geführt haben oder durch eine metabolische Konkurrenzwirkung.

Neben den Unterschieden in der Reproduktion von *M. incognita* zwischen den SST/FFT-Linien und dem Wildtyp unterschied sich auch das Niveau der Reproduktion zwischen den drei dargestellten Versuchsserien. Über alle Linien war die Anzahl der Larven der 2. Versuchsserie mit $6,50 \cdot 10^3$ Larven/g WF geringer als der 1. und 3. Versuchsserie mit

10,74*10³ Larven/g WF und 10,98*10³ Larven/g WF. Die Infektionspopulation betrug in der 1. Versuchsserie 7.200 L₂-Larven und in der 2. und 3. Versuchsserie 5.000 L₂-Larven. In der 1. und 3. Versuchsserie standen die Pflanzen 10 Wochen im Gewächshaus, in der 2. Versuchsserie hingegen nur 8 Wochen. Da in der 3. Versuchsserie das Niveau der 1. Versuchsserie erzielt wurde, trotz reduzierter Infektionspopulation, ist das verringerte Niveau der Reproduktion in der 2. Versuchsserie auf die kürzere Standdauer der Pflanzen und somit das kleinere Pflanzenwachstum zurückzuführen (BASU & SUKUL, 1983; CANTO-SAENZ & BRODIE, 1987; ANWAR, 1995). Im Vergleich zu CANTO-SAENZ & BRODIE (1987), die durch *M. incognita* mit einer Infektionspopulation von 10.000 L₂-Larven/Pflanze die Reproduktion 14,72 *10³ Eier/Pflanze nach 7 Wochen und 40,16 *10³ Eier/Pflanze nach 11 Wochen an einer anfälligen Kartoffelsorte (*S. tuberosum*) erzielten, war die Reproduktion von *M. incognita* in den drei dargestellten Versuchsserien geringer. Dies kann dabei mit der geringeren Infektionspopulation als auch mit dem Wurzelfrischgewicht als Bezugsgröße für die Reproduktion begründet werden.

Fazit:

Durch die gentechnische Veränderung zeigte sich in zwei von drei Versuchsserien eine Reduktion der Reproduktion von *M. incognita* an den SST/FFT-Linien. Es deutete sich dabei an, dass diese Veränderung auf die Morphologie und die Fructangehalte der Wurzeln zurückgeht, was aber noch weiterer Detailuntersuchungen bedarf. Die Reproduktion von *M. incognita* an den SST-Linien war hingegen unverändert.

4.2.4 Einfluss der Nahrungsqualität auf den Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*) Say

4.2.4.1 Die Larvenentwicklung unter Labor- und Freilandbedingungen

Für die Larven des Kartoffelkäfers ist die Wirkung einiger primärer und sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe auf deren Fraßverhalten und Entwicklung gut beschrieben. Zur Fraßstimulation der L₄-Larven führen z.B. Saccharose, die Aminosäuren L-Alanin, γ -Aminobuttersäure (GABA) und L-Serin sowie die Phospholipide Lecithin, Phosphatidylinositol und Phosphatidyl-L-Serin (HSIAO & FRAENKEL, 1968a; 1968b). Die Zugabe von Chlorogensäure und Metanabol auf synthetischem Medium steigert das L₃-Larvengewicht (HSIAO & FRAENKEL, 1968 b; ZWOLINSKA-SNIATALOWA & KRZYMANSKA, 1980). Das abgeschreckte Fraßverhalten und die gestörte Entwicklung der Larven auf den Wildkartoffeln *S. okadae*, *S. oplocense*, *S. demissin*, *S. chacoense* ist hingegen auf deren

Glykoalkaloide zurückzuführen (MELVILLE ET AL., 1985; SIDEN ET AL., 1986; PELLETIER ET AL., 2001).

Bei den in dieser Arbeit verwendeten transgenen Kartoffellinien (SST, SST/FFT) stellte die „unnatürliche“ Fructanbildung des Inulintyps die Veränderung der Nahrungsqualität der Kartoffelsorte Désirée (Wildtyp) dar. Die konstitutive Expression der Gene führte neben der Bildung von Fructan im Blatt auch zu Veränderungen der Kohlenhydratkonzentrationen von Glucose, Fructose und Saccharose (Abb. 3-38). Trotz modifizierter Kohlenhydratkonzentrationen ergab die kurzfristige Fütterung (1. Generation) der Kartoffelkäferlarven vom L₁- bis L₄-Stadium mit den SST- und SST/FFT- Linien unter Laborbedingungen keinen zum Wildtyp abweichenden Verlauf der Larvengewichte (Abb. 3-36). Auch bei der langfristigen Fütterung der Larven und Adulten des Kartoffelkäfers mit den SST- und SST/FFT-Linien über mehrere Generationen (F₇, F₁₄) trat kein Unterschied im Verlauf der Larvengewichte zum Wildtyp auf. Lediglich die Gewichtszunahme der Larven zwischen zwei Wägeterminen unterschied sich über alle Linien zwischen den Generationen. Während in der 1. Generation die Larven innerhalb von 9 Tagen ein Gewicht von 156-193 mg erreichten, erlangten sie dieses Gewicht in der 7. und 14. Generation erst nach 11 Tagen. Ursache für die verringerte Gewichtszunahme war vermutlich die Veränderung der Versuchsdurchführung. In der 1. Generation bildeten 5 Larven eine Wiederholung. Um den Anteil der Individuen am mittleren Larvengewicht zu verkleinern, wurde in der 7. und 14. Generation die Larvenanzahl/Wiederholung auf 20 erhöht. Trotz paralleler Vergrößerung der Versuchsgefäße und einer Fütterung *ad libitum* hatte der Anstieg der Larven/Wiederholung eine Reduktion der Gewichtszunahme zur Folge, was auf einen möglichen Konkurrenzeffekt zwischen den Larven hindeutete. Auch bei LUCAS ET AL. (1995) trat eine intraspezifische Konkurrenz des Kartoffelkäfers durch unterschiedlich hohe Populationsdichten der Larven (15 Larven/Pflanzen bzw. 40 Larven/Pflanze) auf, was sich im negativen Zusammenhang zwischen der Populationsdichte und dem Gewicht der Adulten und deren Lipidgehalt zeigte. Durch den Anstieg der Populationsdichte sank bei LUCAS ET AL. (1995) die Entwicklungszeit vom Ei bis zum Adulten. In den hier dargestellten Ergebnissen verlängerte sich hingegen der Zeitraum bis zum Erreichen eines bestimmten Larvengewichtes durch den Anstieg der Populationsdichte. Es ist möglich, dass die Verkürzung der Entwicklungsdauer bei einer hohen Populationsdichte der Kartoffelkäferlarven im Zeitraum der Verpuppung stattfindet, die hier jedoch auf Grund unterschiedlicher Versuchsdurchführungen nicht verglichen werden konnte.

Für die Einschätzung der Nahrungsqualität reicht die alleinige Betrachtung des Larvengewichtes nicht aus. Durch die Fütterung von L₃-Larven mit der transgenen Oryzacystatin I produzierenden Kartoffellinie (OCI) stieg bei CLOUTIER ET AL. (1999) parallel zum Larvengewicht auch die konsumierte Laubmenge, so dass sich die Verwertungseffizienz der Larven auf der transgenen OCI-Linie nicht von der Kontrolle unterschied. Im Gegensatz dazu fanden HORTON ET AL. (1997) zunächst keine Unterschiede in der Gewichtszunahme von L₄-Larven über einen Zeitraum von 48 h bei 2 von 8 untersuchten Kartoffellinien (*S. tuberosum*). Die Einbeziehung der konsumierten Laubmenge ergab jedoch eine erhöhte Fraßaktivität auf diesen Linien, die zu einem reduzierten bereinigten Larvengewicht führte. Aus diesem kompensatorischen Fraßverhalten der L₄-Larven schlossen HORTON ET AL. (1997) auf eine verringerte Nahrungsqualität der beiden Kartoffellinien. In eigenen Zusatzuntersuchungen zur konsumierten Laubmenge der Larven vom L₁- bis L₄-Stadium traten jedoch auch keine Unterschiede zwischen den SST- und SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp auf (nicht dargestellt), so dass unter Gewächshausbedingungen weder das Larvengewicht noch das Fraßverhalten durch die Fructansynthese in den transgenen Linien beeinflusst waren. Gleichzeitig schlossen die Zusatzuntersuchungen zur konsumierten Laubmenge den Einfluss der für die Transformation verwendeten Markergene (*nptII* SST und SST/FFT-Linien; *hph* SST/FFT-Linien) auf das Fraßverhalten der Larven aus. Bei LECARDONNEL ET AL. (1999) hatte die Integration des Markergens *nptII* in die Kartoffelsorte Désirée (*S. tuberosum*) auch keine Auswirkung auf die Fraßaktivität der L₂-Larven, während die Integration des Markerkonstruktes *nptII-gus* zum Anstieg der Fraßaktivität von L₂-Larven um 50 % führte. Die physiologischen Veränderungen des Kartoffelkäfers durch transgene Linien mit integriertem *nptII-gus*-Konstrukt stehen nach DE TURCK ET AL. (2002) im Zusammenhang mit der β -Glucuronidaseaktivität.

Im Gegensatz zum Verlauf der Larvengewichte an Gewächshauspflanzen über mehrere Generationen deuteten sich an Freilandpflanzen Unterschiede zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp an (Abb. 3-37). Am 13. Tag nach Larvenschlupf war das Larvengewicht auf den Linien SST/FFT#22/19, SST/FFT#22/30 und SST#18 im Vergleich zum Wildtyp reduziert, das der Linie SST#20 erhöht. Auch die Kohlenhydratgehalte zwischen den Gewächshaus- und Freilandpflanzen waren differenziert (Abb. 3-38). In der Glucose- und Fructosekonzentration lagen zwischen den Gewächshaus- und Freilandpflanzen annähernd identische Werte vor, wodurch sie als

Ursache auszuschließen waren. Dies bestätigen auch die Untersuchungen von HSIAO & FRAENKEL (1968a), wo weder Glucose und Fructose noch zahlreiche andere Kohlenhydrate, unabhängig von der Konzentration, einen Effekt auf das Fraßverhalten der Larven des Kartoffelkäfers ausübten. Anders die Saccharose: Ab einer Konzentration von 0,08-3,5 % Saccharose im Nährmedium trat eine messbare Fraßstimulanz der L₄-Larven des Kartoffelkäfers auf. Eine Steigerung der Fraßaktivität um den Anteil von 5 % gefressener Blattfläche über 48 h von L₁/L₂-Larven durch die Behandlung der Blattscheiben mit 3,5 %-iger Saccharoselösung ergab sich auch bei FLEISSNER ET AL. (2003). In den Blättern der hier untersuchten Gewächshauspflanzen betrug der Saccharosegehalt des Wildtyps nur 0,088 % des Blattfrischgewichtes und lag bei allen transgenen Linien unterhalb dieses Wertes, was eine Erklärung für die ausbleibende messbare Veränderung der Larvengewichte an den transgenen Linien nach HSIAO & FRAENKEL (1968a) sein kann. In den Blättern der Freilandpflanzen betrug der Saccharosegehalt des Wildtyps 0,54 % des Blattfrischgewichtes und sank bei den SST-Linien auf 0,49-0,46 % und den SST/FFT-Linien auf 0,44-0,38 % des Blattfrischgewichtes, was in dem Bereich der messbaren Fraßreduktion nach HSIAO & FRAENKEL (1968a) lag. Da jedoch bei den transgenen Linien unter Freilandbedingungen der Verlauf der Larvengewichte im Vergleich zum Wildtyp sowohl stieg als auch sank, konnte die Veränderung der Saccharosekonzentration in den Blättern der transgenen Linien nicht alleine für die Veränderung der Larvengewichte verantwortlich sein. Ein fehlender Einfluss von Saccharose ergab sich auch bei HOUGH-GOLDSTEIN ET AL. (1991), wo keine Unterschiede in der konsumierten Blattfläche bei L₄-Larven und Adulten durch die Benetzung von Blattscheiben mit einer 0,1 M Saccharoselösung (3,5 %) auftraten. Ebenso führte die Zugabe von Saccharose zu keiner Veränderung bei der Etablierung einer Kartoffelkäferpopulation auf synthetischem Medium nach FORRESTER bei GELMAN ET AL. (2001). Die Veränderung des Verlaufes der Larvengewichte im Freiland an den SST- und SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp konnte ebenfalls nicht den Fructankonzentrationen der Blätter zugesprochen werden, da diese bei allen transgenen Linien höher war. DOMEK ET AL. (1995) vermuten, dass der Kartoffelkäfer auch komplexere Kohlenhydratstrukturen als Energiequelle nutzt, da die Gehalte an Glucose, Fructose und Saccharose in älteren Blättern der Sorte Kennebec unter Gewächshausbedingungen deutlich höher waren als in jüngeren Blättern. Ältere Blätter werden jedoch vom Kartoffelkäfer nur mit einer geringeren Präferenz konsumiert (DE WILDE ET AL., 1969; MITCHELL & LOW, 1994). Dafür sprechen auch die eigenen

Ergebnisse, da die Veränderung des Verlaufes der Larvengewichte an den SST- und SST/FFT-Linien unter Freilandbedingungen weder mit der Glucose-, Fructose-, Saccharose- noch mit der Fructankonzentration in Beziehung gebracht werden konnte.

Neben den Pflanzeninhaltsstoffen können auch morphologische Parameter wie die Blattbehaarung einen Einfluss auf die Wechselwirkung von Schaderreger und Wirtspflanze ausüben. So konnte bei zahlreichen Kulturpflanzen die Beeinflussung der Orientierung, Eiablage sowie Nahrungsaufnahme und -verwertung durch die Behaarung verschiedener Pflanzenorgane ermittelt werden (FRITSCH ET AL., 1988; SMITH, 1989; BERNAYS & CHAPMAN, 1994). Die reduzierte Nahrungsaufnahme von frisch geschlüpften Kartoffelkäfern bei den Unkrautarten *S. rostratum* und *S. elaeagnifolium* im Vergleich zur Kartoffel (*S. tuberosum*) und Tomate (*L. esculentum*) führt HARRISON (1987) ebenfalls auf die stärkere einfache Blattbehaarung der beiden Unkrautarten zurück. Bei der Wildkartoffel *S. berthaultii* (Hawkes) beruht der Resistenzmechanismus gegenüber dem Kartoffelkäfer auf zwei Arten von Drüsenhaaren (Typ A und B). Die Behaarung führt zur Abnahme der Wachstumsraten, des Fraßes und der Fruchtbarkeit, sowie zum Anstieg der Larvenmortalität, insbesondere der jungen Larven (CASAGRANDE, 1982; DIMOCK & TINGEY, 1988; NEAL ET AL., 1991; JANSKY ET AL., 1999). Die Exsudate üben zum einen eine deterrente Wirkung auf den Kartoffelkäfer aus (YECHNO & TINGEY, 1994), und zum anderen stellen die Blatthaare nach DIMOCK & TINGEY (1988) eine physikalische Barriere für frisch geschlüpfte Kartoffelkäferlarven dar. Bei PELLETIER (1990) führte der Anstieg der Drüsenhaardichte durch die Wasserversorgung der Pflanzen zu keiner Veränderung der L₁-Larvenmortalität, was gegen die Wirkung der Drüsenhaare als physikalischen Barriere sprach. Auch wenn von den vorhandenen Drüsenhaaren (Typ A und B) der Kulturkartoffel (*S. tuberosum*), aufgrund der geringen Dichte und abweichenden Drüsensekret im Vergleich zu *S. berthaultii*, möglicherweise keine Resistenz gegenüber dem Kartoffelkäfer ausgeht (STEFFENS ET AL., 1990), wurde dennoch die einfache Blattbehaarung bei den transgenen SST- und SST/FFT-Linien durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen und die Bestimmung der Blatthaardichte in der Vegetation 2003 ermittelt (Abb. 3-10, 3-11). Die Untersuchung wurde auf die Freilandpflanzen beschränkt, da sich nur dort Unterschiede im Verlauf der Larvengewichte zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp zeigten. Auf der Blattunterseite war die Blatthaardichte (Blatthaare/mm²) der SST-Linien 18 und 20 sowie der SST/FFT-Linien 22/19 und 22/30 im Vergleich zum Wildtyp signifikant gestiegen. Bei den SST/FFT-Linien zeigte sich wie beschrieben ein

verkleinerter Wuchs, so dass die erhöhte Blatthaardichte analog zu PELLETIER (1990) vermutlich auf eine reduzierte Blattfläche zurückgeführt werden kann. Bei den SST-Linien, die in den drei untersuchten Vegetationsperioden keinen offensichtlichen veränderten Habitus im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen, blieb die Ursache der gesteigerten Blatthaardichte ungeklärt. Da das Larvengewicht im Freiland hingegen nicht bei allen transgenen Linien mit gesteigerter Blatthaardichte reduziert war, sprach dies gegen einen Einfluss der Blattbehaarung auf das Larvengewicht. Auch die fehlenden Unterschiede in der Larvenmortalität zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp, sowie die erst ab dem L₃-Stadium beginnende Differenzierung der Larvengewichte zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp schlossen den Einfluss der Blattbehaarung auf das Larvengewicht aus.

Fazit:

Durch die Transformation der SST- und SST/FFT-Linien ergaben sich keine kurz- und langfristigen Veränderungen des Fraßverhaltens und des Gewichts der Larven des Kartoffelkäfers unter Gewächshausbedingungen. Unter Freilandbedingungen deutete sich eine linienabhängige Veränderung der Larvengewichte an den SST- und SST/FFT-Linien an. Dies konnte weder alleine durch die Kohlenhydratgehalte noch durch die Blattbehaarung erklärt werden.

4.2.4.2 Die Reproduktion unter Labor- und Freilandbedingungen

Außer der larvalen Entwicklung wird auch die Reproduktion des Kartoffelkäfers durch die Wirtspflanze bestimmt. Unterschiede in der Reproduktion wurden dabei ebenso zwischen verschiedenen Wirtspflanzenarten (DE WILDE ET AL., 1969; JANSSON ET AL., 1989; WEBER & FERRO, 1996) wie auch zwischen verschiedenen Sorten der Kulturkartoffel (*S. tuberosum*) gefunden (JANSSON & SMILOWITZ, 1986; YASAR & GÜNGÖR, 2005). Dabei konnten die Unterschiede in der Reproduktion sowohl auf chemische (Stickstoff, Proteine, Glykoalkaloide, etc.) als auch auf physikalische (Blattbehaarung, Blattdicke) Parameter der Wirtspflanzen zurückgeführt werden. Bei den SST- und SST/FFT-Linien mit verändertem Kohlenhydratmetabolismus zeigte sich dagegen kein Unterschied in der Reproduktion unter Laborbedingungen über 24 Stunden im Vergleich zum Wildtyp in der 1. Generation (Abb. 3-39). Ebenso hatte der larvale Fraß an den Freilandpflanzen, der Unterschiede zwischen dem Verlauf der Larvengewichte an den SST- und SST/FFT-Linien zeigte, keinen Einfluss auf die Reproduktion der 1. Generation unter Laborbedingungen (Abb. 3-

41). Dass die Reproduktion des Kartoffelkäfers stärker durch die Wirtspflanze der Adulten und nicht der Wirtspflanze der Larven beeinflusst ist, belegen die Untersuchungen von HARE (1983). Die Reproduktion der Weibchen bei Fütterung der Larven und Adulten mit *S. dulcamara* war im Vergleich zu *S. tuberosum* um 84,6 % reduziert. Bei einer larvalen Fütterung mit *S. dulcamara* und einem Adultenfraß mit *S. tuberosum* zeigte sich nur die Reproduktionsabnahme von 27,3 %. Dagegen fanden WEBER & FERRO (1996) einen positiven linearen Zusammenhang zwischen der Entwicklung vom Ei bis zur Verpuppung und der Fruchtbarkeit der Weibchen an 8 verschiedenen Wirtspflanzenarten. WEBER & FERRO (1996) vermuten jedoch, dass dieser Zusammenhang nicht bei allen Wirtspflanzenarten auftritt, was sich in den gefundenen Ergebnissen an den SST- und SST/FFT-Linien bestätigt.

Über alle Linien betrug die mittlere Eiablage in der 1. Generation zwischen 80-100 Eier/Weibchen am 16.-20. Tag nach Käferschlupf. Dies überstieg deutlich die von PEFFEROEN ET AL. (1981) gefundene Eiablage/Weibchen von 45-53 am 16.-20. Tag nach Käferschlupf. Auch in den Untersuchungen von JANSSON ET AL. (1989) bildete die Eiablage von 80 Eiern/Weibchen an *S. tuberosum* die Ausnahme. Beide Untersuchungen wiesen eine von den dargestellten Ergebnissen abweichende Versuchsdurchführung auf, die verantwortlich für die bestehenden Differenzen in der Eiablage sein kann. Bei JANSSON ET AL. (1989) wurde die Eiablage täglich erfasst, jedoch durch die Haltung eines Geschlechterpaares. Die Eiablage der Weibchen wird durch die Männchen gestört (eigene Beobachtungen). Bei PEFFEROEN ET AL. (1981) wurde die Eiablage nur zweitägig erfasst, was möglicherweise zum Fraß bereits gelegter Eier geführt hat.

Auch die langfristige Haltung des Kartoffelkäfers (F₁₁, F₁₄) auf den SST- und SST/FFT-Linien zeigte keine Unterschiede in der Reproduktion zum Wildtyp (Abb. 3-39). Im Gegensatz zu GELMANN ET AL. (2001), wo sich eine Steigerung der Reproduktion durch die langfristige Haltung (F₇-F₈) der Käferpopulationen auf synthetischen Medien zeigte, sank die Reproduktion in der 11. und 14. Generation. Die über die Generationen sinkende Eiablage deutet zunächst auf einen Einfluss der transgenen Linien hin, der erst durch eine langfristige Haltung zum Ausdruck kommt. Da jedoch auch die Reproduktion des Käfers am Wildtyp parallel dazu sank, ist die Ursache dafür bei externen Faktoren zu suchen und nicht bei der Nahrungsqualität (THORPE & BENNETT, 2002).

In Abhängigkeit von der Generation betrug die Larvenschlupfrate über alle Linien zwischen 70-90 % (Abb. 3-40, 3-41), was sich mit der gefundenen Überlebensfähigkeit der Eier bei THORPE & BENNETT (2002) deckt. Mögliche auftretende Veränderungen in den

Kohlenhydratkonzentrationen der Blätter bei den SST- und SST/FFT-Linien unter Gewächshausbedingungen, wie in Abbildung 3-38 dargestellt, hatten somit keinen Einfluss auf die Reproduktion und auf die Vitalität der Eier.

Unter Freilandbedingungen zeigte sich jedoch eine veränderte Eiablage des Kartoffelkäfers an den SST- und SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp. So war die Anzahl der Eigelege an den Pflanzen der SST/FFT-Linien in den Vegetationsperioden 2001 und 2003 tendenziell im Vergleich zum Wildtyp durch den natürlichen Befall vom Kartoffelkäfer reduziert (Abb. 3-44). Bei den SST-Linien glich die Anzahl der Eigelege 2001 der des Wildtyps, während sich 2003 eine zum Wildtyp erhöhte Anzahl Eigelege / Pflanze zeigte. Die Distanz zwischen einem Kartoffelbestand und der Überwinterungsstätte des Kartoffelkäfers spielt eine entscheidende Rolle bei der Ausbreitung des Kartoffelkäfers im Bestand (WEBER & FERRO, 1993; FRENCH ET AL., 1993). Der Abstand zwischen den Kartoffelparzellen und der Überwinterungsstätte des Kartoffelkäfers aus der vorangegangenen Vegetation beim Anbau der transgenen Linien und dem Wildtyp war trotz einer dreijährigen Fruchtfolge sehr gering. Durch die randomisierte Anordnung der Teilparzellen in jeder Vegetationsperiode über die 4 Wiederholungen war die Lage zu den Überwinterungsstätten des Kartoffelkäfers als Ursache für die reduzierte Eiablage der SST/FFT-Linien auszuschließen. Auch die zentrale bzw. direkt an die Pflanze gesetzte Ausbringung von Kartoffelkäfern in den begehbaren Käfigen in der Vegetationsperiode 2002 hat keinen Unterschied in der Eiablage/Pflanze/Weibchen gezeigt (Abb. 3-45). Die gefundene reduzierte Eiablage an den SST/FFT-Linien durch den natürlichen Befall (2001, 2003) konnte dabei nicht bestätigt werden. Lediglich bei der SST/FFT-Linie 22/34 war die Anzahl Eigelege/Pflanze und Weibchen im Vergleich zum Wildtyp reduziert, während die der SST-Linien zum Wildtyp erhöht war. Die Ausbringung von Kartoffelkäfern aus der Laborzucht in den begehbaren Käfigen zu zwei Entwicklungsstadien der Pflanzen in der Vegetationsperiode 2003 (Abb. 3-46) bestätigte die Annahme, dass die differenzierte Präferenz des Kartoffelkäfers an den SST- und SST/FFT-Linien sowie dem Wildtyp saisonal bzw. vom Entwicklungsstadium der Pflanzen abhängig war. Zum Zeitpunkt des Knospen- bis Blütenstadiums (1. Ausbringung), was dem Zeitpunkt des natürlichen Befalls entsprach, war die Anzahl Eigelege/Pflanze/Weibchen der SST/FFT-Linien signifikant zum Wildtyp reduziert, während sich die der SST-Linien nicht vom Wildtyp unterschied. Zum Zeitpunkt des Blüten- bis Beerenstadiums (2. Ausbringung), was der Detailuntersuchung 2002 entsprach, traten keine Unterschiede in der Anzahl

Eigelege/Pflanze/Weibchen zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp auf. Eine vom Wirtspflanzenalter bzw. Entwicklungsstadium der Kartoffelpflanze abhängige Eiablage zeigen auch die Untersuchungen von DE WILDE ET AL. (1969). Durch die Verwendung von 7 Wochen alten Kartoffelpflanzen der Sorte Eigenheimer sank die tägliche Eiablage/Weibchen auf 1/4 im Vergleich zu 3 Wochen alten Kartoffelpflanzen. Damit war die über alle Linien verringerte Eiablage der 2. Ausbringung in der Vegetationsperiode 2003 auf die älteren Pflanzen zurückzuführen.

Gleichzeitig bedeutete dies auch, dass der Einflussfaktor, der für die reduzierte Eiablage an den SST/FFT-Linien im frühen Knospen- bis Blütenstadium verantwortlich war, sich auch saisonal verändern muss, so dass er im Blüten- bis Beerenstadium zu keinem Unterschied in der Eiablage zwischen den SST/FFT- Linien und Wildtyp führte. Die untersuchten Glucose-, Fructose-, Saccharose- und Fructankonzentrationen des Blattes in der Vegetationsperiode 2003 zeigten ebenfalls eine saisonale Veränderung (Abb. 3-47, Kapitel 4.2). Neben der signifikant verringerten Eiablage/Pflanze/Weibchen der SST/FFT-Linien war parallel auch die Saccharosekonzentration in diesen Linien im Vergleich zum Wildtyp reduziert, was auf einen möglichen Einfluss der Saccharose auf die Eiablage des Kartoffelkäfers hindeutete. Dagegen sprach jedoch die noch stärkere Reduktion der Saccharosekonzentration der SST-Linie 18, ohne Veränderung der Anzahl Eigelege/Pflanze/Weibchen. Auch die saisonale Veränderung von Saccharose spricht gegen einen alleinigen Einfluss auf die Eiablage des Kartoffelkäfers bei den untersuchten Linien, da auch im Blüten- bis Beerenstadium die Konzentration der SST/FFT-Linien zum Wildtyp reduziert war, jedoch ohne Einfluss auf die Anzahl der Eigelege/Pflanze/Weibchen. Auch die Konzentrationsunterschiede von Glucose, Fructose und Fructan waren als alleinige Einflussfaktoren auf die Eiablage des Kartoffelkäfers auszuschließen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die saisonal abhängigen Kohlenhydratkonzentrationen in Kombination mit anderen Pflanzeninhaltsstoffen für die reduzierte Eiablage an den SST/FFT-Linien verantwortlich waren. Auch HARE (1983) fand, dass die saisonale Anfälligkeit von *S. dulcamara* durch den Kartoffelkäfer sowohl von der Konzentration der löslichen Proteine als auch der Glykoalkaloide abhängt, die sich wiederum beide saisonal verändern. Wenn Pflanzeninhaltsstoffe für die veränderte Eiablage der SST/FFT-Linien verantwortlich sind, so kann durch die Versuchsdurchführung nicht deren Wirkungsweise eindeutig geklärt werden. Die reduzierte Anzahl an Eigelegen an den SST/FFT-Linien kann die Folge eines reduzierten Befalls mit Adulten, und somit einer verringerten Präferenz sein, oder der Befall mit

Adulten war unverändert, jedoch die Nahrungsqualität hat zur Abnahme der Eiablage geführt.

Die Präferenz des Kartoffelkäfers für eine Wirtspflanze wird neben deren Nährstoffqualität auch durch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und deren olfaktorische, gustatorische und visuelle Reize auf den Kartoffelkäfer bestimmt. Während dem Duftmuster von Kartoffelpflanzen unter Laborbedingungen eindeutig eine Rolle bei der Wirtspflanzenfindung des Kartoffelkäfers zugesprochen wird (VISSER & AVE 1978; SCHÜTZ ET AL., 1997), ist der Einfluss über lange Distanzen umstritten (JERMY, 1958; JERMY ET AL., 1988). Durch die Applikation synthetischer Stoffe, deren Attraktivität auf den Kartoffelkäfer aus dem komplexen Duftmuster der Kartoffelpflanze identifiziert wurde (SCHÜTZ ET AL., 1997; DICKENS, 2000), konnten MARTEL ET AL. (2005) unter Feldbedingungen eine signifikant erhöhte Besiedlung durch den Kartoffelkäfer im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachweisen. Die in Folge der Transformation veränderten Kohlenhydratgehalte der transgenen SST- und SST/FFT-Linien sprechen dafür, dass auch ihr Duftmuster verändert wurde. Dies bestätigt sich auch in dem von SCHÜTZ (pers. Mitt., 2001) gefundenen veränderten Duftmuster der SST/FFT-Linie 22/34. Auch die mit dem Tagesrhythmus und dem Pflanzenalter gefundene Veränderung des volatilen Duftmusters von Kartoffeln (*S. tuberosum* cv. Désirée) von AGELOPOULOS ET AL. (2000) spricht für eine vom Pflanzenalter abhängige verringerte Präferenz der Adulten für die SST/FFT-Linien und würde die reduzierte Eiablage erklären. PELLETIER ET AL. (2001) fanden eine verringerte Besiedlung von *S. tarijense* durch Adulte im Vergleich zu *S. tuberosum*, die eine geringere Eiablage zur Folge hatte, und führten diese auf eine fraßabschreckende Wirkung der Pflanzen zurück, die nur die Adulten betraf, während die Larvenentwicklung unbeeinflusst war.

Als visuelle Reize für den Kartoffelkäfer gelten die Schattierungen, Farbe, Musterung und Sonneneinstrahlung (JERMY, 1958; JERMY ET AL., 1988; SZENTESI ET AL., 2002; BOITEAU ET AL., 2003). Die reduzierte Haupttrieblänge (Abb. 3-8) und der fehlende Bestandesschluss (Abb. 3-5, 3-6) der SST/FFT-Linien im Vergleich zu den SST-Linien und dem Wildtyp können über die visuelle Wahrnehmung des Kartoffelkäfers zu einer reduzierten Präferenz geführt haben. Aber auch die verzögerte Entwicklung (Abb. 3-2, 3-3, 3-4) der SST/FFT-Linien, und damit deren geringere Laubmasse, kann für eine Abnahme der Präferenz der adulten Kartoffelkäfer verantwortlich sein. So zeigten JANSSON & SMILOWITZ (1986), dass späte Kartoffelsorten stärker als frühe Sorten vom Kartoffelkäfer befallen wurden. Die späten Sorten bildeten eine höhere Blattmasse und hatten einen

höheren Stickstoffgehalt in den Blättern. Die multiple Regression zeigte einen stärkeren Zusammenhang zwischen dem Stickstoffgehalt (anstatt dem Frischgewicht) der Blätter und der Abundanz des Kartoffelkäfers. Da jedoch auch ein positiver Zusammenhang zwischen dem Stickstoffgehalt und dem Blattfrischgewicht bestand, vermuteten JANSOON & SMILOWITZ (1986), dass die Abundanz des Kartoffelkäfers direkt durch die Blattmasse und indirekt durch den Stickstoffgehalt beeinflusst wurde. Den Einfluss der Blattmasse auf die Anzahl der Käfer/Pflanze bestätigen HORTON & CAPINERA (1987). Durch die Zunahme der Pflanzendichte und der Pflanzendiversität sank die Anzahl der Käfer/Pflanze. Mit zunehmender Pflanzendichte reduzierte sich die Blattfläche der Einzelpflanzen, so dass sich beim Bezug der Käfer auf die Blattfläche (m^2) kein Einfluss der Pflanzendichte auf die Anzahl der Käfer zeigte. Daraus folgern HORTON & CAPINERA (1987), dass der Kartoffelkäfer stärker auf die verfügbare Blattfläche reagiert als auf die Pflanzenanzahl.

Dies bedeutet für die SST/FFT-Linien, dass die verringerte Anzahl an Eigelegen in einem geringeren Befall mit Adulten begründet war. Durch einen Bezug der Anzahl Eigelege auf die Blattfläche (m^2) nach HORTON & CAPINERA (1987), bestände somit eventuell kein Unterschied in der Anzahl Eigelege zwischen den SST/FFT-Linien und dem Wildtyp. Des Weiteren muss das oberirdische Wachstum im Blüten- bis Beerenstadium der SST/FFT-Linien dem des Wildtyps entsprochen haben, da zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied zwischen der Eiablage/Pflanze/Weibchen in den begehbaren Käfigen der Vegetationsperiode 2003 auftrat. Auch bei JANSOON & SMILOWITZ (1986) traten die Unterschiede in der Blattdrockenmasse der Kartoffelsorten unterschiedlichen Reifegrades im frühen Entwicklungsstadium stärker auf als im späteren Entwicklungsstadium.

Auch die Blattbehaarung beeinflusst die Reproduktion und Präferenz des Kartoffelkäfers. Durch die Drüsenhaare (glandulare Trichome) an den Blättern der Wildkartoffel *S. berthaultii* ist die Eiablage des Kartoffelkäfers signifikant reduziert (CASAGRANDE, 1982; FRANCA & TINGEY, 1994). Durch Verwendung zweier Linien von *S. berthaultii* sowie der differenzierten Entfernung der Blatthaare konnten YENCHO & TINGEY (1994) zeigen, dass die konsumierte Laubmenge der Adulten des Kartoffelkäfers erst durch die Entfernung beider Blatthaartypen (A und B) auf dem Niveau von *S. tuberosum* stieg. Auch die untersuchten SST/FFT- und SST-Linien zeigten in Folge der Transformation Unterschiede in der Blattbehaarung zum Wildtyp. Die einfache Blattbehaarung (Abb. 3-11) war sowohl bei den SST-Linien 18 und 20 als auch bei den SST/FFT-Linien 22/19 und 22/30 signifikant zum Wildtyp erhöht. Damit konnte sie nicht alleine für die reduzierte Anzahl der Eigelege des Kartoffelkäfers an den SST/FFT-Linien verantwortlich sein.

Fazit:

Die Fructansynthese führte zu keiner kurz- und langfristigen Veränderung der Reproduktion des Kartoffelkäfers unter Gewächshausbedingungen. Unter Freilandbedingungen traten Unterschiede in der Eiablage bzw. Präferenz der Adulten an den SST/FFT-Linien auf. Diese konnten weder alleine den Kohlenhydratgehalten noch der Blattbehaarung zugeordnet werden. Der vermutete Einfluss des Duftmusters, der Entwicklung und des Wuchses der SST/FFT-Linien auf die Präferenz und die daraus resultierende verringerte Eiablage der Adulten des Kartoffelkäfers bedarf noch weiterer Detailuntersuchung.

4.2.4.3 Langfristiger Einfluss der Nahrungsqualität auf den Genotyp

In Abhängigkeit von seinem Lebensraum kann der Kartoffelkäfer wirtspflanzenspezifische Populationen ausbilden. So wurden in Nordamerika Populationen gefunden, die ausschließlich die Wildkräuter *S. rostratum*, *S. angustifolium*, *S. elaeagnifolium* und *S. carolinense* besiedelten (HAISO, 1988), auf denen sich wiederum andere Populationen nicht entwickelten. Dabei handelte es sich jedoch nicht um echte Wirtspflanzen geprägte Populationen (Rassen, Biotypen), da sie bei dem Angebot von mehreren Wirtspflanzen auch andere wählten. Die Erweiterung des Wirtspflanzespektrums hat nicht zwingend die Veränderungen des sensorischen Systems zur Folge (HARRISON, 1987). Die physiologische Anpassung von Populationen des Kartoffelkäfers an die Wirtspflanze lässt vermuten, dass sich dies auch im Genom widerspiegelt. Die Untersuchung des Isoenzymprofils von 11 amerikanischen und europäischen Populationen an *S. tuberosum* und einer mexikanischen Population der Wildkartoffel zeigte Unterschiede. Innerhalb der Populationen auf *S. tuberosum* zeigten sich, trotz unterschiedlicher geographischer Herkünfte, nur geringe Unterschiede (JACOBSON & HSIAO, 1983). Auch in der Analyse der mitochondrialen DNA durch ZEHNDER ET AL. (1992) fanden sich nur geringe Unterschiede zwischen Populationen von *S. tuberosum*, trotz geographischer Distanzen. Hingegen wies die Käferpopulation aus Moreles (Mexiko) mit der Wirtspflanze *S. rostratum* einen komplett abweichenden mitochondrialen Genotyp auf. Bei AZEREDO-ESPIN ET AL. (1996) war die Variabilität der mtDNA einer texanischen Population mit *S. rostratum* und *S. triquintrum* als Wirtspflanze größer als bei anderen amerikanischen Populationen mit *S. tuberosum* als Wirtspflanze. Die Abnahme der Variabilität der mtDNA bei den Populationen auf *S. tuberosum* führen sie zum einen auf die Wirtspflanze, zum anderen auf agronomische Techniken (Anbau in Rotation, Insektizideinsatz) zurück. In den europäischen

Populationen ist nur ein Halotyp der mtDNA zu finden, wodurch die Identifizierung der genetischen Variabilität über die nukleare DNA erfolgen muss (GRAPPUTO ET AL., 2005). Auch wenn die größten genomischen Unterschiede nur bei Kartoffelkäferpopulationen mit verschiedenen Wirtspflanzenarten auftraten, stellte sich in dieser Arbeit die Frage, in wie weit die Fructansynthese, als neue Kohlenhydratquelle in der Kulturkartoffel (*S. tuberosum*), einen Selektionsdruck auf das Genom des Kartoffelkäfers ausübt. Nach der 1. Generation auf den transgenen Linien, dem Status quo, betrug die über 11 RAPD-Primer ermittelte Ähnlichkeit des genetischen Musters 96,6 % (Abb. 3-42). Bei LÉRY ET AL. (2003) betrug die Ähnlichkeit des genetischen Musters von 10 Larven des Kartoffelkäfers zwischen 67-76 %, ermittelt über nur drei RAPD-Primer. SIDORENKO & BEREZOVSKA (2002) fanden bei drei russischen Populationen des Kartoffelkäfers durch 40 RAPD-Primer eine genetische Ähnlichkeit von 66-91 %. Beide Untersuchungen fanden mit Individuen aus dem Freiland statt. Dies deutet darauf hin, dass die hohe genetische Ähnlichkeit der Subpopulationen in der 1. Generation die Folge der über Jahre im Labor ohne Diapause gehaltenen Dauerzucht ist. Auch die nicht auftretende intraspezifische Variabilität in der RAPD-PCR von 5 unabhängigen Eigelegen aus der Dauerzucht bestätigen die hohe genetische Homogenität der Dauerzucht (nicht dargestellt). Da sich eine Selektion des Genoms aber auch erst nach mehreren Generationen manifestieren kann, wie der Einsatz von Insektiziden und die daraus resultierende Bildung von insektizidresistenten Populationen zeigt, wurden die SST- und SST/FFT-Subpopulationen über 13 Generationen im Labor gehalten. Obwohl sich durch die langfristige Haltung der Subpopulationen keine Veränderungen im Larvengewicht und der Reproduktion zeigten, sank die Ähnlichkeit des genetischen Musters in der 13. Generation über alle Linien um etwa 4 % auf 92,3 %. Somit übten die Fructansynthese und die integrierten Gene über die Nahrungsqualität auf das Genom des Kartoffelkäfers einen Selektionsdruck aus. Die Abnahme der genetischen Ähnlichkeit beruhte auf die Zunahme weniger polymorpher Banden (Abb. 3-43). Im Durchschnitt wurden pro Primer 0,9 (1. Generation) bis 1,7 (13. Generation) polymorphe Banden erzielt. Bei BROWN ET AL. (1997) ergab die Untersuchung von 9 Stämmen von *O. surinamensis* mittels RAPD-PCR einen Polymorphismus von 4,35 Banden/Primer. Auch bei SIDORENKO ET AL. (2000), SIDORENKO & BEREZOVSKA (2002) und LÉRY ET AL. (2003) ergab die RAPD-PCR des Kartoffelkäfers einen höheren Polymorphismus der Primer. Der geringe Polymorphiegrad der Primer kann zum einen dadurch erklärt werden, dass die RAPD-PCR der Subpopulationen mit gepoolten DNA-Proben stattfand, bestehend aus 5 Eigelegen. Durch die Verwendung der gepoolten DNA werden Individuen-spezifische

RAPD-Marker nicht bzw. kaum reproduziert (CARTER ET AL., 1996). Dadurch kann eine höhere Anzahl an RAPD-Primern verwendet werden, wodurch auch größere Bereiche des Genoms untersucht werden. Außerdem repräsentiert diese Methode besser den Einfluss auf die Population als auf Individuen. Andererseits zeigte sich in der 1. Generation eine hoch gesicherte Clusterung (Bootstrapwert von 75) der Subpopulationen SST#18 und SST/FFT#22/34, die auch noch über die 6. und 9. Generation bestehen blieb. Da in beide Linien unterschiedliche Konstrukte integriert waren und sie sich auch im Polymerisationsgrad der Fructane unterschieden, ist davon auszugehen, dass diese Clusterung zufällig bei der Etablierung der Subpopulationen aus der Dauerzucht entstand. Erst in der 13. Generation wurde diese zufällige Clusterung durch konstruktsspezifische Clusterung der SST/FFT-Linien abgelöst. Durch den geringen Bootstrapwert von 42 kann die Clusterung zwischen den Subpopulationen auf den Linien SST/FFT#22/19 und SST/FFT#22/34 jedoch nicht als gesichert angesehen werden. Somit kann der geringe Polymorphismus der RAPD-Primer auch darauf zurück geführt werden, dass der Selektionsdruck der Fructansynthese und der integrierten Gene unter Laborbedingungen nur gering war, im Vergleich zum Selektionsdruck durch die Geographie oder den Insektizideinsatz (SIDORENKO ET AL., 2000; SIDORENKO & BEREZOVSKA, 2002).

Fazit:

Die permanente Fütterung von Subpopulationen des Kartoffelkäfers auf den SST- und SST/FFT-Linien unter Laborbedingungen zeigte die Abnahme der Ähnlichkeit des genetischen Musters. Somit stellen die Fructansynthese und die integrierten Gene einen Selektionsfaktor auf das Genom des Kartoffelkäfers dar. Unter Berücksichtigung der Variabilität von Freilandpopulationen ist der Selektionsdruck jedoch als gering anzusehen.

4.3 Risikobewertung der Fructan-bildenden transgenen SST- und SST/FFT-Linien

Die Ergebnisse (Tab. 4-1) zeigen für die Risikobewertung, dass die genetischen Veränderungen in der Fructan-Kartoffel, unabhängig ob durch Transformation oder somaklonale Variation, zu keinen negativen Veränderungen bei der Pflanzengesundheit geführt haben. Somit ist zu erwarten, dass die Intensität des Pflanzenschutzes nicht über das bisher vorhandene Niveau ansteigen wird. Allerdings könnte der fehlende Bestandesschluss als Folge des verkürzten Haupttriebes bei den Fructan-Kartoffeln (SST/FFT-Linien) einerseits zu einem höheren Unkrautdruck führen. Die Unkrautbekämpfung kann diesen Bedingungen aber angepasst werden (z.B. Terminierung

der mechanischen Bodenbearbeitung, Wahl eines Bodenherbizids), ohne dass damit eine intensivere Anwendung von Herbiziden im Vergleich zu konventionellen Kartoffeln notwendig ist. Andererseits verbessert der offene Bestand die Prävention einer *Phytophthora*-Infektion durch eine verbesserte Abtrocknung der Bestände in den Morgenstunden.

Tab. 4-1: Zusammenfassung der Veränderungen der ermittelten Merkmale an den SST- und SST/FFT-Linien im Vergleich zum Wildtyp. = keine Veränderung; ↑ Anstieg, ↓ Reduktion.

Merkmal		SST	SST/FFT	
Phänologie	Feldaufgang	=	↓	
	Knospenstadium	↓	↓	
	Blütenstadium	↓	↓	
	Deckungsgrad	=	↓	
Morphologie	Haupttrieblänge	=	↓	
	Blatthaare	↑	↑	
	Anzahl Augentriebe	=	=	
	Anzahl Seitentriebe / Haupttrieb	=	=	
	Anzahl Blüten / Infloreszenz 1. Ordnung	↓	↓	
Ertragsparameter	Flächenertrag	=	=	
	Knollengrößenverteilung	=	=	
	Stärkegehalt	↓	↓	
	Morphologie Stärke	=	=	
Schadorganismen	<i>P. infestans</i>	=	=	
		Knolle	=	↓
	<i>S. endobioticum</i>	Pathotyp 1	=	=
		Pathotyp 18	=	=
	<i>G. rostochiensis</i>		=	=
	<i>M. incognita</i>		=	↓
	<i>L. decemlineata</i>	Natürlicher Befall	=	↓
		Larvengewicht GWH (kurz- u. langfristig)	=	=
		Larvengewicht FL	=	↓
		Reproduktion GWH (kurz- u. langfristig)	=	=
		Reproduktion FL	=	↓
		Larvenschlupfrate GWH (kurz- u. langfristig)	=	=
		Genetisches Muster	=	=

Hinsichtlich weiterer Aspekte der Risikobewertung sind die Ergebnisse zur substantiellen Äquivalenz von CATCHPOLE ET AL. (2005) wertvoll. Sie belegen, dass nur die erwarteten metabolischen Veränderungen auf der Grundlage der neuen genetischen Elemente auftraten. Alle anderen Merkmale lagen im Bereich des konventionellen Sortenspektrums. Im Rahmen von Fütterungsversuchen durch BÖHME ET AL. (2005) konnte gezeigt werden, dass bei Schweinen die tägliche Zunahme im Vergleich zur Fütterung mit isogenen Knollen nur geringfügig niedriger lag (668 g/d zu 711 g/d).

Diese positive Bewertung geht konform mit der jüngsten Stellungnahme der EFSA (2006) im Rahmen des Inverkehrbringens der stärkemodifizierten Kartoffel Amflora (EH92-527-1) von der BASF.

5. Zusammenfassung

Die gentechnische Veränderung von Kartoffeln hat in der Pflanzenzüchtung in Deutschland eine zunehmende Bedeutung. Den Hauptanteil macht dabei die knollen-spezifische Stärkemonifikation zur Optimierung der industriellen Verarbeitung der Kartoffel als nachwachsender Rohstoff aus. Mit den ersten Zulassungen unter dem Label *Amflora* ist schon bald zu rechnen. Aber auch die Integration von Genen zur Synthese neuer, in der Kartoffel nicht ursprünglicher Substanzen, wurde und wird weiter erforscht. Aufgrund der großen Skepsis der Verbraucher in Deutschland (und Europa) gegenüber gentechnisch veränderten Lebensmittel wurden allerdings eine ganze Reihe von in den 90iger Jahren des letzten Jahrhunderts begonnen Arbeiten wieder eingestellt. Hierzu zählt auch die Fructan-Kartoffel, die zu einem prebiotischen Lebensmittel entwickelt werden sollte. Für die gentechnische Produktion von Fructan als Rohstoff bleibt neben der Zuckerrübe aber weiterhin die Kartoffel eine Option. Das hohe Niveau bei den rechtlichen Rahmenbedingungen in der Europäischen Gemeinschaft und den Mitgliedsstaaten sowie die umfangreichen europäischen und nationalen Forschungen zur biologischen Sicherheit haben an der Skepsis der Verbraucher nur wenig geändert!

Um mögliche sicherheitsrelevante Risiken für Mensch, Tier und Umwelt durch die Freisetzung und den Anbau von transgenen Pflanzen abschätzen (*Risikobewertung*) und gegebenenfalls gegensteuern zu können (*Risikomanagement*), bedarf es zuallererst einer Umweltverträglichkeitsprüfung und eines Überwachungsplans nach der „RICHTLINIE 2001/18/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 12. März 2001 über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates“. Für die in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehenden 6 Linien der Fructan-bildenden Kartoffel (*S. tuberosum* cv. Désirée), die am Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm transformiert und selektiert wurden, wurden die relative Performance und ausgewählte Aspekte der ökologischen Interaktion (Ursache-Wirkung-Betrachtung) im Labor, Gewächshaus und Freiland von insgesamt 6 Partnern im Rahmen eines 4-jährigen vom BMBF geförderten Verbundvorhabens (Kenn-Nr.: 0312632A - E) im Programm „Sicherheitsbewertung und anbaubegleitendes Monitoring“ untersucht.

Im Mittelpunkt der Analysen standen jeweils drei transgene Kartoffellinien von folgenden zwei Konstrukten: das einfach transformierte Konstrukt 1-SST und das doppelt transformierte Konstrukt 1-SST/FFT. Beide Gene, *sst* und *fft*, stammen aus der Artischocke (*Cynara scolymus*), und nur die Linien mit dem *fft*-Gen sind in der Lage, langkettige

Fructane zu bilden. Die experimentelle Grundlage für die Erhebungen von 2001 bis 2003 bildete die von 2000 bis 2005 währende Freisetzung von Fructan-Kartoffeln (BVL-Kz.: ZG 6786-01-122 und 6786-01-136) in Dahnsdorf durch das Institut für integrierten Pflanzenschutz der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) in Kleinmachnow.

Der umfassende Eingriff in den Kohlenhydratmetabolismus der Kartoffelsorte Désirée durch die gewebeunspezifische Integration der Fructansynthese ließ eine Veränderung der Pflanzengesundheit der transgenen Linien und daraus mögliche Konsequenzen für den Pflanzenschutz erwarten. Die Abschätzung und Bewertung dieser Auswirkungen war Ziel dieser Arbeit. Eingeschlossen waren auch Effekte auf den Bestandaufbau, die z.B. für die Konkurrenzfähigkeit der Kartoffel gegenüber Unkräutern von Bedeutung sind, indem Veränderungen in der Morphologie und der Phänologie der transgenen Pflanzen im Vergleich zur Ausgangssorte untersucht wurden. Die Bestimmung der Anfälligkeit gegenüber den beiden Krankheiten Kartoffelkrebs (*Synchytrium endobioticum*) und Kraut- und Knollenfäule (*Phytophthora infestans*) sowie den Nematoden *Meloidogyne incognita*, *Globodera rostochiensis* und dem Kartoffelkäfer *Leptinotarsa decemlineata* erfolgten unter Laborbedingungen mit Pflanzenmaterial aus der Freisetzung und/oder dem Gewächshaus. Die Untersuchungen zur Auswirkung der Nahrungsqualität auf den Kartoffelkäfer erfolgten sowohl unter Labor- als auch Freilandbedingungen in extra dafür aufgebauten begehbaren Käfigen. Zur Bewertung des direkten Zusammenhanges zwischen der Anfälligkeit der transgenen Fructan-bildenden Linien und deren Kohlenhydratstatus wurden vom Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm die Fructose-, Glucose, Saccharose- und Fructangehalte von Blatt-, Wurzel- und Knollenproben bestimmt.

Die Untersuchungen führten insgesamt zu folgenden Ergebnissen und Schlussfolgerungen:

- 1) Der gentechnische Eingriff führte bei einer Reihe von Merkmalen zu teilweise signifikanten Veränderungen bei den transgenen Kartoffeln gegenüber der isogenen Ausgangssorte einerseits. Andererseits wurden auch gentechnisch begründete Unterschiede zwischen den beiden Konstrukten als auch einzelnen Linien beobachtet. Eine eindeutige Zuordnung dieser Variabilität z.B. zum neuen Inhaltsstoff Fructan oder zu veränderten Zuckerkonzentrationen war allerdings nicht in jedem Fall möglich.
- 2) Die Homogenität des im Gewächshaus erzeugten Pflanzgutes war sehr gut. Der mittels ISSR-PCR nachgewiesene genetische Unterschied zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp, sowie der Unterschied zwischen den beiden Wildtypen (isogene Sorte)

aus der *in-vitro*-Vermehrung bzw. von einem Händler lassen allerdings vermuten, dass entweder die isogene Vergleichssorte aus dem Gewächshaus nicht aus dem gleichen Genpool wie die transgenen Linien stammt, oder dass vor dem Untersuchungszeitraum eine Spontanmutation (sog. somaklonale Variation) beim Wildtyp stattgefunden haben muss.

- 3) Alle drei SST/FFT-Linien wiesen gegenüber dem Wildtyp Verzögerungen im Feldaufgang und bei der Knospen- und Blütenbildung auf. Die Haupttrieblänge war verkürzt und der vollständige Bestandesschluss blieb über die gesamte Vegetation aus. Ein Einfluss der Pflanzknollengröße auf die Haupttrieblänge konnte ausgeschlossen werden. Die Anzahl der Einzelblüten an der Infloreszenz 1. Ordnung war reduziert. Die Blattbehaarung der Unterseite war in Abhängigkeit von der Linie mehr oder weniger dichter im Vergleich zur isogenen Ausgangssorte. Ohne Sicherung blieben die Anzahl der Augenaustriebe und die Anzahl der Seitentriebe pro Haupttrieb, da die beobachteten Veränderungen nicht konstant über mehrere Vegetationsperioden bestätigt werden konnten. Die genetischen Veränderungen blieben ohne Auswirkung auf den Flächenertrag, die Knollengrößensortierung und die Stärkemorphologie. In Abhängigkeit von der Vegetationsperiode betrug die Reduktion des Stärkegehaltes bei den SST/FFT-Linien 2-3 %. Diese Abnahme korreliert mit dem Fructangehalt und zeigt damit an, dass die Fructanbiosynthese auf Kosten der Stärkebiosynthese stattfindet. Die o.g. Veränderungen der phänotypischen und morphologischen Merkmale traten in allen drei SST/FFT-Linien auf, so dass entweder von einem Einfluss der in diesen SST/FFT-Linien integrierten SST-Linie oder einem direkten Effekt der zweiten Transformation – der Integration des FFT-Gens - ausgegangen werden kann.
- 4) In den drei SST-Linien trat linienabhängig eine verzögerte Knospen- und Blütenentwicklung, eine reduzierte Anzahl Einzelblüten an der Infloreszenz 1. Ordnung, eine gesteigerte Blattbehaarung und ein reduzierter Stärkegehalt um 2-3 % im Vergleich zum Wildtyp auf. Diese linienabhängigen Veränderungen verstärken die Vermutung, dass einige phänotypische Veränderungen der SST/FFT-Linien auf das SST-Konstrukt zurückzuführen sind.
- 5) Die phänotypischen und morphologischen Veränderungen bei allen sechs Linien liegen im Rahmen des vom Bundessortenamt (BSA) geführten konventionellen Sortenspektrums der Kartoffeln. Aus Sicht des Pflanzenschutzes wäre ev. durch den

- fehlenden Bestandesschluss die Herbizidstrategie in Fructan-Kartoffeln über eine Bevorzugung von Bodenherbiziden anzupassen.
- 6) In den Untersuchungen, auch der anderen Verbundpartner, konnte nicht geklärt werden, ob die beobachteten **pleiotropen Effekte** bei den SST/FFT-Linien entweder auf eine Veränderung des Wasserhaushaltes oder des Phytohormonhaushaltes (Gibberellinsäure) zurückzuführen sind. Es ist anzunehmen, dass die komplexen gentechnischen Eingriffe während der Transformation Auswirkungen auf ganze Metabolismuskaskaden der Kartoffel auslösten, die dann in ihrer Gesamtheit die untersuchten Merkmale sichtbar oder *unsichtbar* modifizierten.
 - 7) Die Blattanfälligkeit gegenüber *P. infestans* war bei allen SST- und SST/FFT-Linien unverändert. Die Knollenanfälligkeit war dagegen bei den SST/FFT-Linien als Folge des Fructanvorkommens reduziert und bei den SST-Linien unverändert. Der negative Zusammenhang zwischen dem Fructangehalt der Knollen und dem Myzelwachstum konnte auch in Flüssigkultur bestätigt werden.
 - 8) Die Knollenreaktion der SST- und SST/FFT-Linien gegenüber den Pathotyp 1 und 18 des Kartoffelkrebses (*S. endobioticum*) war im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Auch in der Anzahl der Wucherungen und deren Gewicht traten keine Unterschiede zwischen den transgenen Linien und dem Wildtyp auf.
 - 9) Alle SST- und SST/FFT-Linien und der Wildtyp reagierten einheitlich auf den Zystennematoden (*G. rostochiensis*). Die Reproduktion des Nematoden blieb ebenfalls unverändert.
 - 10) Bei den SST/FFT-Linien deutete sich aber im Vergleich zum Wildtyp und den SST-Linien eine Reduktion der Reproduktion des Wurzelgallennematoden (*M. incognita*) an. Als Ursache für diesen gentechnisch bedingten Effekt kommen entweder das veränderte Wurzelvolumen - als Folge des verkürzten Haupttriebes - oder das nachgewiesene Fructan in den Wurzeln in Betracht.
 - 11) Die Entwicklung der Larven, der Larvenschlupf und die Reproduktion der Weibchen des Kartoffelkäfers (*L. decemlineata*) waren unter Gewächshausbedingungen weder kurz- noch langfristig durch die veränderte Nahrungsqualität in den SST- und SST/FFT-Linien beeinflusst.
 - 12) Die langfristige Fütterung von *L. decemlineata* mit transgenen Pflanzen im Labor führte zur Abnahme der genetischen Ähnlichkeit (RAPD-Muster) der sieben Subpopulationen um etwa 4 %. Die große genetische Homogenität der jahrzehntelangen Laborzucht blieb davon aber unbeeindruckt.

- 13) Unter Freilandbedingungen konnte in der Tendenz ein Einfluss der Nahrungsqualität auf das Larvengewicht und die Wirtspflanzenpräferenz für die Reproduktion von *L. decemlineata* beobachtet werden. In Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Pflanzen trat ein verringerter Befall an den SST/FFT-Linien sowohl durch den natürlichen Befall als auch nach künstlicher Ausbringung auf. Die Ursachen hierfür können entweder auf die veränderte Morphologie (Wuchs, Blattbehaarung) oder auf die Art und Konzentration der Inhaltsstoffe (einschließlich volatiler Substanzen) in den SST/FFT-Linien gegenüber dem Wildtyp und den SST-Linien zurückgehen. Aber auch synergistische Effekte sind denkbar (s. Punkt 1).
- 14) Die unterschiedliche Ausprägung in den ausgewählten Merkmalen des Kartoffelkäfers einerseits und in den Kohlenhydratgehalten zwischen Gewächshaus- und Freilandpflanzen andererseits machen deutlich, dass für eine robuste Risikoabschätzung der Fructan-Kartoffel eine Freisetzung unabdingbar ist. Auch muss die Verwendung von langjährigen diapausefreien Laborzuchten für die Biotests weiter hinterfragt werden.

Alle o.g. Veränderungen im Phänotyp und in der Anfälligkeit der drei SST/FFT-Linien gegenüber *P. infestans*, *M. incognita*, und *L. decemlineata* würden zu keiner Neueinstufung der Anfälligkeitsreaktion der Kartoffelsorte Désirée nach den Kriterien des Bundessortenamtes führen. Die Anfälligkeit war bei allen SST/FFT-Linien vermindert, so dass mit keinem erhöhten Einsatz von Pflanzenschutzmitteln beim Anbau zu rechnen wäre. Dies geht konform mit den Leitlinien des integrierten Pflanzenschutzes und den Zielen des Reduktionsprogramms chemischer Pflanzenschutz des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. Aus dem Blickwinkel von Pflanzengesundheit und Pflanzenschutz ergeben sich durch den Anbau der Fructan-Kartoffel keine umwelt- und agrarrelevanten Bedenken, die über jene beim Anbau konventioneller Kartoffelsorten hinausgehen würden. Für das geforderte anbaubegleitende Monitoring beim Anbau von transgenen Kartoffeln reichen in diesem Fall die bei konventionellen Kartoffeln seit Jahren durchgeführten Schaderregerbeobachtungen aus.

6. Summary

Consumers in Germany and Europe have a generally negative view of genetically modified food, and much GM research started in the 1990s had to be abandoned due to this critical attitude. Nevertheless, interest in genetically modified potatoes in Germany has risen significantly in recent years. Most research effort is spent on tuber-specific starch modification strategies aimed at optimizing industrial processing of the potato as a renewable raw material. *Amflora* will presumably be the first genetically modified starch potato marketed in the near future. Another approach entails the insertion of genes that synthesize target substances not naturally available in the potato. The fructan-producing potato, which was designed as a prebiotic food, is an example of this research. The only other crop suitable for the induction of fructan production by genetic engineering is the sugar beet.

Neither the strict regulations imposed by the European Union and its member states nor by the extensive European and national research regarding biological safety have been able to sway the sceptics on the consumer side. European Parliament and Council Directive 2001/18/EC of 12 March 2001 regarding the deliberate release into the environment of genetically modified organisms, which replaces Council Directive 90/220/EEC, prescribes mandatory monitoring procedures and environmental impact studies for the identification of possible risks to human and animal health and to the environment due to the release and cultivation of transgenic plants (risk assessment); it also provides for the implementation of adequate countermeasures (risk management).

The present study focuses on six fructan-producing transgenic lines of the potato variety *S. tuberosum* cv. Désirée, which were developed by the Max Planck Institute (MPI) of Molecular Plant Physiology in Golm, Germany. The relative performance and other selected ecological interaction parameters (case-specific considerations) of these GM potatoes were investigated under laboratory, greenhouse and field conditions. The field studies were conducted at the Dahnsdorf Field Station of the Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry (BBA) in the German state of Brandenburg by six research groups over a period of four years. This research was sponsored by the German Ministry of Education and Research (BMBF) under the “Safety Assessment and Cultivation - Accompanying Monitoring” program (grant no. 0312632 A-E).

Three transgenic potato lines with a single transformed construct (1-SST) and three with a double transformed construct (1-SST/FFT) were assessed. Both genes (*sst* and *fft*) are derived from the artichoke (*Cynara scolymus*). The three lines containing the *fft* gene are

able to produce long-chain fructans, but the *sst* lines are not. Field trials (ZG 6786-01-122 and 6786-01-136) conducted from 2000 to 2005 in Dahnsdorf (state of Brandenburg) by the BBA's Institute of Integrated Plant Protection formed the experimental basis for the analysis performed from 2001 to 2003.

The extensive intervention into the carbohydrate metabolism of the potato variety Désirée caused by the tissue-unspecific integration of fructan synthesis was expected to have an effect on the health of the transgenic lines and could have additional implications for plant protection. The present study was therefore designed to evaluate and assess these effects, including crop development effects that might influence the competitive strength of potatoes against weeds. We therefore analyzed the morphology and phenology of the transgenic lines in comparison to that of the isogenic line (wild type). Susceptibility of the transgenic lines to the diseases potato wart (*Synchytrium endobioticum*) and late blight (*Phytophthora infestans*) and to the pests yellow cyst nematode (*Globodera rostochiensis*), root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) was studied in a laboratory environment using field and/or greenhouse plant material. The effects of food quality on the Colorado potato beetle were investigated under both laboratory and field conditions (*walk-in* field cages). The fructose, glucose, saccharose and fructan content of leaf, root and tuber samples were determined by the Max Planck Institute in Golm for the tests of direct correlation between the susceptibility of the fructan-producing lines and their carbohydrate status.

Summary of main study findings:

- 1) Genetic intervention led to statistically significant and non-significant changes in certain traits of the transgenic lines compared to the isogenic cultivar (wild type). Genetically based intra-construct differences were also observed for both constructs and lines. Correlation between these findings and the newly produced fructan or sugar content could not be established in all cases.
- 2) The seed tubers generated in the greenhouse remained genetically homogenous for three years. ISSR-PCR studies showed genetic differences between all transgenic lines and the isogenic line and differences between *in-vitro* propagated and commercially available isogenic cultivars. It is thus probable that the isogenic line propagated in the greenhouse is not derived from the same genetic pool as the transgenic lines or that a spontaneous mutation (somaclonal variation) of the isogenic cultivar occurred before testing.

- 3) Compared to the wild variety, all three SST/FFT lines showed delays in crop emergence, bud development and flowering. The main sprout length was shorter and the entire crop cover was missing during the entire vegetation period. Effects of seed tuber size on main sprout length could be excluded. The number of single flowers at first-order inflorescence was reduced. Depending on the line, the hairs on the lower side of the leaves were more or less dense than those of the isogenic cultivar. The number of sprouts and side sprouts per main sprout remained constant, but this data is not validated because the observed changes could not be confirmed over all years. The genetic modifications had no effect on yield, tuber size or starch morphology. Depending on the year, the starch content of the SST/FFT lines was 2 to 3 percent lower than that of the wild variety. This relative decrease correlates with the fructan content and shows that fructan biosynthesis occurs at the expense of starch biosynthesis. The above-mentioned changes in phenology and morphology were observed in all three SST/FFT lines. These changes are presumably due to direct effects of SST line insertion or second transformation (integration of the FFT construct).
- 4) The three SST lines exhibited variable delays in bud and flower development, reductions in the number of single flowers at first-order inflorescence, increases in leaf hair growth, and reductions in starch content (2-3 %) compared to the isogenic cultivar. Based on these line-specific changes, we presume that some phenological changes in the SST/FFT lines were caused by the SST construct.
- 5) The phenological and morphological changes in all six lines were within the scope of the conventional variety spectrum of the potatoes controlled by the German Federal Office of Plant Varieties (Bundessortenamt). From the viewpoint of plant protection, it might be prudent to adapt the herbicide strategy to give preference to ground herbicides due to the missing crop cover with the SST/FFT lines.
- 6) Based on our findings and those of our research partners, we could not determine whether the observed **pleiotropic effects** of the SST/FFT lines were caused by changes in the water supply or by shifts in the balance of a plant hormone (gibberellic acid). It seems probable that the complicated genetic interventions may have influenced various cascades of potato metabolism during the transformation process and that these interactions could have led to detectable or *undetectable* modifications in various traits.

- 7) Genetic modification did not alter leaf susceptibility to *P. infestans* in any of the SST or SST/FFT lines. However, tuber susceptibility decreased in the SST/FFT lines due to the presence of fructan, but remained unchanged in the SST lines. The negative correlation between tuberal fructan content and mycel growth was also confirmed in liquid cultures.
- 8) The reactions of the transgenic tubers with **potato wart** (*S. endobioticum*) pathotypes 1 and 18 were identical to those of the wild type. In addition, no differences between the transgenic and isogenic lines were observed in regard to the number of proliferations and weight.
- 9) The transgenic and isogenic lines showed identical reactions to the **yellow cyst nematode** (*G. rostochiensis*). Reproduction of the nematode also remained unchanged.
- 10) Reproduction of the **root-knot nematode** (*M. incognita*) was lower in the SST/FFT lines than in the isogenic line. This effect of genetic modification is presumably due to altered root volume as a result of shortening of the main sprout or to the availability of fructan in the root.
- 11) The altered food quality in the SST and SST/FFT lines under greenhouse conditions did not have any long or short-term effects on larval development and eclosion or on female reproduction of the **Colorado potato beetle** (*L. decemlineata*).
- 12) The long-term feeding of *L. decemlineata* with transgenic plants in the lab decreased the genetic similarity (RAPD pattern) of all seven subpopulations by about 4 percent, but the strong homogeneity of the laboratory population established by decades of laboratory breeding was not affected.
- 13) Effects of food quality on larval weight and host preference for the reproduction of *L. decemlineata* were only observed under field conditions. Depending on the stage of plant development, variable reductions in infestation appeared in the SST/FFT lines after both natural infestation and artificial output. This effect is most probably due to a change in morphology (growth, leaf hair) or in the type and concentration of plant chemicals (including volatile substances) in the SST/FFT lines compared to the isogenic cultivar and the SST lines. Nevertheless, synergistic effects are also possible.
- 14) Based on the observed differences in parameter values for selected traits of the Colorado potato beetle and in the carbohydrate content of greenhouse and field plants, we conclude that field cultivation is indispensable for achieving a robust risk assessment for the fructan potato. In addition, the feasibility of achieving long-term,

diapause-free laboratory populations of *L. decemlineata* for such biotests remains questionable.

None of the observed changes in the three SST/FFT lines regarding their phenotype, morphology and susceptibility to *P. infestans*, *M. incognita*, and *L. decemlineata* justify a new classification of the susceptibility reaction of the potato variety Désirée according to the criteria of the German Federal Office of Plant Varieties (Bundessortenamt). Since the susceptibility of all SST/FFT lines to pests and diseases was lower than that of the isogenic line, we do not expect that their cultivation would lead to an increased need for pesticides. This is in compliance with guidelines for integrated plant protection and with the objectives of the German Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection's Reduction Program for Chemical Plant Protection. From a plant health and plant protection perspective, the cultivation of the transgenic fructan potato does not raise any more agricultural or environmental issues than the cultivation of conventional potato varieties. The disease monitoring procedure for conventional potatoes, which has been in place for many years, is thus sufficient to fulfil the monitoring requirements for cultivation of the transgenic potatoes.

7. Literaturverzeichnis

- Agelopoulos, N. G., Chamberlain, K. & Pickett, J. A. 2000. Factors affecting volatile emissions of intact potato plants, *Solanum tuberosum*: Variability of quantities and stability of ratios. *Journal of Chemical Ecology*, 26(2): 497-511.
- Ahloowalia, B. S. 1994. Production and performance of potato mini-tubers. *Euphytica*, 75(3): 163-172.
- Albani, M. C. & Wilkinson, M. J. 1998. Inter simple sequence repeat polymerase chain reaction for the detection of somaclonal variation. *Plant Breeding*, 117(6): 573-575.
- Amador, V., Bou, J., Martinez-Garcia, J., Monte, E., Rodriguez-Falcon, M., Russo, E. & Prat, S. 2001. Regulation of potato tuberization by daylength and gibberellins. *International Journal of Developmental Biology*, 45: 37-38.
- Anwar, S. A. 1995. Influence of *Meloidogyne incognita*, *Paratrichodorus minor* and *Pratylenchus scribneri* on root-shoot growth and carbohydrate partitioning in tomato. *Pakistan Journal of Zoology*, 27(2): 105-113.
- Arntzen, F. K. & van Eeuwijk, F. A. 1992. Variation in resistance level of potato genotypes and virulence level of potato cyst nematode populations. *Euphytica*, 62(2): 135-143.
- Artschwager, E. 1923. Anatomical studies on potato wart. *Journal of Agriculture Research*, 23: 963-967.
- Asiedu, S. K., Astatkie, T. & Yiridoe, E. K. 2003. The effect of seed-tuber physiological age and cultivar on early potato production. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 189(3): 176-184.
- Atkinson, H. J., Fowler, M. & Isaac, R. E. 1987. Partial-purification of hatching activity for *Globodera rostochiensis* from potato root diffusate. *Annals of Applied Biology*, 110(1): 115-125.
- Azeredo-Espin, A. M. L., Schroder, R. F. W., Roderick, G. K. & Sheppard, W. S. 1996. Intraspecific mitochondrial DNA variation in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Biochemical Genetics*, 34(7/8): 253-268.
- Baayen, R. P., Bonthuis, H., Withagen, J. C. M., Wander, J. G. N., Lamers, J. L., Meffert, J. P., Cochius, G., van Leeuwen, G. C. M., Hendriks, H., B. Heerink, G. J., van den Boogert, P. H. J. F., van de Griend, P. & Bosch, R. A. 2005. Resistance of potato cultivars to *Sychytrium endobioticum* in field and laboratory tests, risk of secondary infection, and implications for phytosanitary regulations. *EPPO Bulletin*, 35(1): 9-23.
- Basu, S. & Sukul, N. 1983. Effect of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on the total protein, carbohydrate and lipid in roots at different growth stages of *Hibiscus esculentus*. *Indian Journal of Nematology*, 13(1): 66-70.
- Bayrische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) 2005. Agrarmärkte, Jahresbericht 2005, Teilauszug:Kartoffeln.
http://www.lfl.bayern.de/iem/agrarmarktpolitik/15579/GGTSPU-styx.bba.de-2304-3649743-DAT/linkurl_0_6_0_3.pdf.
- BBA 2006. Gentechnik-Datenbank BioSearch.
http://www.bba.bund.de/cln_045/nn_913132/DE/Home/biolsich/gentechnik/Tab_Diagr_tabelle.html.
- Bernays, E. A. & Chapman, R. F. 1994. *Host-plant selection by phytophagous insects*. Chapman & Hall, New York.
- Biemelt, S., Sonnewald, U., Galmbacher, P., Willmitzer, L. & Müller, M. 2003. Production of human Papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *Journal of Virology*, 77(17): 9211-9220.

- Blazquez, M. A., Trenor, M. & Weigel, D. 2002. Independent control of gibberellin biosynthesis and flowering time by the circadian clock in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 130(4): 1770-1775.
- BMELV-Statistik 2005. Agrarbericht 2005.
<http://www.bmelv-statistik.de/data/GGTSPU-styx.bba.de-2304-3649858-DAT/000E6A08E076133B9E516521C0A8D816.0.pdf>.
- Böhme, H., Hommel, B. & Flachowsky, G. 2005. Nutritional assessment of silage from transgenic inulin synthesizing potatoes for pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 14(1): 333-336.
- Boiteau, G., Alyokhin, A. & Ferro, D. N. 2003. The Colorado potato beetle in movement. *Canadian Entomologist*, 135(1): 1-22.
- Bordallo, P. N., Silva, D. H., Maria, J., Cruz, C. D. & Fontes, E. P. 2004. Somaclonal variation on in vitro callus culture potato cultivars. *Horticultura Brasileira*, 22(2): 300-304.
- Bornet, B., Goraguer, F., Joly, G. & Branchard, M. 2002. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome*, 45(3): 481-484.
- Börnke, F., Biemelt, S., Hofius, D., Hajirezaei, M., Lepsky, S. & Sonnewald, U. 2002. Gentechnik in der Pflanzenzüchtung - Stand und Perspektiven.
http://www.ipk-gatersleben.de/de/02/06/02/2002/GGTSPU-styx.bba.de-2304-3651638-DAT/MNW_BOERNKE_BIEMELT_etal_2002.pdf.
- Börnke, F., Hajirezaei, M. & Sonnewald, U. 2001. Cloning and characterisation of the gene cluster for palatinose metabolism from the phytopathogenic bacterium *Erwinia rhapontici*. *Journal of Bacteriology*, 183: 2425-2430.
- Broer, I. 2006. Produktion von "Kunststoffen" in transgenen Pflanzen. *LandesTechnologieAnzeiger*, 2: 9.
- Brown, R. J., Malcolm, C. A., Mason, P. L. & Nichols, R. A. 1997. Genetic differentiation between and within strains of the saw-toothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) at RAPD loci. *Insect Molecular Biology*, 6(3): 285-289.
- BSA 2000. Kartoffel. In Bundessortenamt (BSA) (Ed.), *Richtlinien für die Durchführung von landwirtschaftlichen Werteprüfungen und Sortenwesen*: 4.1-4.18. Landbuch Verlag, Hannover.
- BSA 2006. Datenbank beschreibende Sortenliste.
<http://www.bundessortenamt.de/internet20/>.
- Burton, W. G. 1989. *The potato*. Longman Group, Essex, UK.
- Büssis, D., Heineke, D., Sonnewald, U., Willmitzer, L., Raschke, K. & Heldt, H. W. 1997. Solute accumulation and decreased photosynthesis in leaves of potato plants expressing yeast-derived invertase either in the apoplast, vacuole or cytosol. *Planta*, 202(1): 126-136.
- BVL 2006. Beschreibung der Freisetzungsvorhaben.
http://www.bvl-berlin.de/cgi/lasso/fsl/liste_d.lasso.
- Caimi, P. G., Mccole, L. M., Klein, T. M. & Hershey, H. P. 1997. Cytosolic expression of the *Bacillus amyloliquefaciens* SacB protein inhibits tissue development in transgenic tobacco and potato. *New Phytologist*, 136(1): 19-28.
- Caimi, P. G., Mccole, L. M., Klein, T. M. & Kerr, P. S. 1996. Fructan accumulation and sucrose metabolism in transgenic maize endosperm expressing a *Bacillus amyloliquefaciens* SacB gene. *Plant Physiology*, 110(2): 355-363.
- Cairns, A. J. 2003. Fructan biosynthesis in transgenic plants. *Journal of Experimental Botany*, 54(382): 549-567.

- Caldiz, D. O., Clua, A., Beltrano, J. & Tenenbaum, S. D. 1998. Ground cover, photosynthetic rate and tuber yield of potato (*Solanum tuberosum* L.) crops from seed tubers with different physiological age modified by foliar applications of plant growth regulators. *Potato Research*, 41(2): 175-185.
- Canto-Saenz, M. & Brodie, B. B. 1987. Comparison of compatible and incompatible response of potato to *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 19(2): 218-221.
- Carnegie, S. F. & Colhoun, J. 1983. Effects of plant nutrition on susceptibility of potato leaves to *Phytophthora infestans*. *Phytopathologische Zeitschrift (Journal of Phytopathology)*, 108(3-4): 242-250.
- Carneiro, R. G., Mazzafera, P. & Ferraz, L. C. C. B. 1999. Carbon partitioning in soybean infected with *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. *Journal of Nematology*, 31(3): 348-355.
- Carrera, E., Bou, J., Garcia-Martinez, J. L. & Prat, S. 2000. Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. *Plant Journal*, 22(3): 247-256.
- Carter, M. C. A., Robertson, J. L., Haack, R. A., Lawrence, R. K. & Hayes, J. L. 1996. Genetic relatedness of North American populations of *Tomicus piniperda* (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Economic Entomology*, 89(6): 1345-1353.
- Casagrande, R. A. 1982. Colorado potato beetle (Coleoptera, Chrysomelidae) resistance in a wild potato, *Solanum berthaultii*. *Journal of Economic Entomology*, 75(2): 368-372.
- Castelli, L., Bryan, G., Blok, V. C., Ramsay, G. & Phillips, M. S. 2005. Life stage responses observed amongst fifteen wild *Solanum* species resistant to *Globodera pallida*. *Nematology*, 7: 701-711.
- Catchpole, G. S., Beckmann, M., Enot, D. P., Mondhe, M., Zywicki, B., Taylor, J., Hardy, N., Smith, A., King, R. D., Kell, D. B., Fiehn, O. & Draper, J. 2005. Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40): 14458-14462.
- Clarke, D. D. & Kassim, M. Y. A. 1977. Resistance factors in potato-tuber tissue to hyphal growth of *Phytophthora infestans*. *Physiological Plant Pathology*, 11(3): 267-277.
- Cloutier, C., Fournier, M., Jean, C., Yelle, S. & Michaud, D. 1999. Growth compensation and faster development of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) feeding on potato foliage expressing oryzacystatin I. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 40(2): 69-79.
- Conrath, U., Linke, C., Jeblick, W., Geigenberger, P., Quick, W. P. & Neuhaus, H. E. 2003. Enhanced resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani* in leaves and tubers, respectively, of potato plants with decreased activity of the plastidic ATP/ADP transporter. *Planta*, 217(1): 75-83.
- Dale, M. F. B. & Phillips, M. S. 1995. The effect of physiological age of potato-tubers on female production of potato cyst nematodes (*Globodera pallida* Pa-2/3). *European Journal of Plant Pathology*, 101(1): 51-56.
- Dale, P. J. & McPartlan, H. C. 1992. Field performance of transgenic potato plants compared with controls regenerated from tuber disks and shoot cuttings. *Theoretical and Applied Genetics*, 84(5-6): 585-591.
- Daniele, E., Dommes, J. & Hausman, J. F. 2003. Carbohydrates and resistance to *Phytophthora infestans* in potato plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 25(2): 171-178.

- Daniell, H., Streatfield, S. J. & WycOFF, K. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*, 6(5): 219-226.
- Davies, P. J. 1995. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.
- De Turck, S., Giordanengo, P., Cherqui, A., Ducrocq-Assaf, C. & Sangwan-Norreel, B. 2002. Transgenic potato plants expressing the *nptII-gus* marker genes affect survival and development of the Colorado potato beetle. *Plant Science*, 162(3): 373-380.
- De Wilde, J., Bongers, W. & Schooneveld, H. 1969. Effects of hostplant age on phythophagous insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 12: 714-720.
- Deblonde, P. M. K. & Ledent, J. F. 2001. Effects of moderate drought conditions on green leaf number, stem height, leaf length and tuber yield of potato cultivars. *European Journal of Agronomy*, 14(1): 31-41.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. & Hicks, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(4): 19-21.
- Devine, K. J. & Jones, P. W. 2000. Purification and partial characterisation of hatching factors for the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* from potato root leachate. *Nematology*, 2: 231-236.
- Dickens, J. 2000. Orientation of Colorado potato beetle to natural and synthetic blends of volatiles emitted by potato plants. *Agricultural and Forest Entomology*, 2(3): 167-172.
- Dimock, M. B. & Tingey, W. M. 1987. Mechanical interaction between larvae of the Colorado potato beetle and glandular trichomes of *Solanum berthaultii* Hawkes. *American Potato Journal*, 64(9): 507-515.
- Dimock, M. B. & Tingey, W. M. 1988. Host acceptance behavior of Colorado potato beetle larvae influenced by potato glandular trichomes. *Physiological Entomology*, 13(4): 399-406.
- Domek, J. M., Cantelo, W. W., Wagner, R. M., Li, B. W. & Millerihli, N. J. 1995. Nutritional composition of potato foliage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(6): 1512-1515.
- Dorhout, R., Gommers, F. J. & Kolloffel, C. 1993. Phloem transport of carboxyfluorescein through tomato roots infected with *Meloidogyne incognita*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 43(1): 1-10.
- Duwenig, E., Steup, M., Willmitzer, L. & Kossmann, J. 1997. Antisense inhibition of cytosolic phosphorylase in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) affects tuber sprouting and flower formation with only little impact on carbohydrate metabolism. *Plant Journal*, 12(2): 323-333.
- Ebskamp, M. J. M., Van der Meer, I. M., Spronk, B. A., Weisbeek, P. J. & Smeekens, S. C. M. 1994. Accumulation of fructose polymers in transgenic tobacco. *Bio-Technology*, 12(3): 272-275.
- Edelman, J. & Jefford, T. G. 1968. The metabolism of fructose polymers in plants. 4. Beta-fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus* L. *New Phytologist*, 67: 517-531.
- EFSA 2006. Opinion of the GMO Panel on an application (Reference EFSA-GMO-UK-2005-14) for the placing on the market of genetically modified potato EH92-527-1 with altered starch composition, for production of starch and food/feed uses, under Regulation (EC) No 1829/2003 from BASF Plant Science [1]. http://www.efsa.europa.eu/de/science/gmo/gmo_opinions.html.
- Engström, K. & Strömberg, A. 1996. Changes in sugar content during induction of systemic acquired resistance to Late Blight caused by *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary in potato. *Journal of Phytopathology*, 144: 33-36.

- Evans, K. 1983. Hatching of potato cyst nematodes in root diffusates collected from 25 potato cultivars. *Crop Protection*, 2(1): 97-103.
- Evans, K. & Haydock, P. P. J. 1990. A review of tolerance by potato plants of cyst nematode attack, with consideration of what factors may confer tolerance and methods of assaying and improving it in crops. *Annals of Applied Biology*, 117(3): 703-740.
- FAO 2006. Buried treasure: the potato.
<http://www.Fao.Org/Ag/Magazine/0611sp1.Htm>.
- Farrar, J.F. 1999. Carbohydrate: where does it come from, where does it go? In: J.A. Bryant, M.M. Burrell & N.J. Kruger, (eds), *Plant carbohydrate biochemistry*: 29–46 Oxford, Bios.
- Fernie, A. R. & Willmitzer, L. 2001. Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiology*, 127(4): 1459-1465.
- Fladung, M. & Gieffers, W. 1993. Resistance reactions of leaves and tubers of RoIC transgenic tetraploid potato to bacterial and fungal pathogens - Correlation with sugar, starch and chlorophyll content. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 42(2): 123-132.
- Fleissner, C., Roppel, P. & Hommel, B. 2003. Basisempfindlichkeit des Kartoffelkäfers (*L. decemlineata* Say) für *Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis* unter besonderer Berücksichtigung des Zusatzes von Kohlenhydraten.
<http://www.entomologentagung2003.uni-halle.de/pdf/sektion11.pdf>
- Flis, B. & Zimnoch-Guzowska, E. 2000. Field performance of transgenic clones obtained from potato cv. Irga. *Journal of Applied Genetics*, 41(2): 81-90.
- Franca, F. H. & Tingey, W. M. 1994. Influence of light level on performance of the Colorado potato beetle on *Solanum tuberosum* l and on resistance expression in *S. berthaultii* Hawkes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119(5): 915-919.
- Franke, W. 1992. *Nutzpflanzenkunde*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Freier B., Triltsch, H., Pluschkell, U., Jahn, M., Pallutt, B., Lindner, K. & Burth, U. 1997. *Integrierter Pflanzenschutz im Ackerbau - ein Leitfaden für Landwirte*. Berlin, Germany, Brynda, 1997, 84 p..
- French, N. M., Follett, P., Nault, B. A. & Kennedy, G. G. 1993. Colonization of potato fields in eastern North-Carolina by Colorado potato beetle. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 68(3): 247-256.
- Fritzsche, R., Decker, H., Lehmann, W., Karl, E. & Geißler, K. 1988. *Resistenz von Kulturpflanzen gegen tierische Schaderreger*. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Geiger, M., Stitt, M. & Geigenberger, P. 1998. Metabolism in slices from growing potato tubers responds differently to addition of sucrose and glucose. *Planta*, 206(2): 234-244.
- Gelman, D., Bell, R., Liska, L. & Hu, J. 2001. Artificial diets for rearing the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Insect Science (Tucson)*, 1(7): 1-14.
- Gerrits, N. 2000. *Fructan-accumulation transgenic potato plants*. Dissertation der Universität Utrecht, Utrecht, NL.
- Gianfagna, T. J., Carter, C. D. & Sacalis, J. N. 1992. Temperature and photoperiod influence trichome density and sesquiterpene content of *Lycopersicon hirsutum*. *Plant Physiology*, 100(3): 1403-1405.
- Gifford, R. M. & Evans, L. T. 1981. Photosynthesis, carbon partitioning and yield. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 32: 485-509.
- Grainger, J. 1956. Host nutrition and attack by fungal parasites. *Phytopathology*, 46(8): 445-456.

- Grapputo, A., Boman, S., Lindstrom, L., Lyytinen, A. & Mappes, J. 2005. The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle populations. *Molecular Ecology*, 14(14): 4207-4219.
- Grundler, F., Betka, M. & Wyss, U. 1991. Influence of changes in the nurse cell system (syncytium) on sex determination and development of the cyst nematode *Heterodera schachtii* - Total amounts of proteins and amino-acids. *Phytopathology*, 81(1): 70-74.
- Haber, B. 2003. Fruktooligosaccharide und Inulin; Stellungnahme der Arbeitsgruppe "Fragen zur Ernährung" der Lebensmittelchemischen Gesellschaft. *Ernährungs-Umschau*, 50(10): 383-385.
- Hack, H., Gall, H., Klemke, T., Klose, R., Meier, U., Stauss, R. & Witzemberger, A. 1993. Phenological growth stages of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 45(1): 11-19.
- Hamlén, R. A., Bloom, J. R. & Lukežić, F. L. 1973. Hatching of *Meloidogyne incognita* eggs in neutral carbohydrate fraction of root exudates of gnotobiotically grown Alfalfa. *Journal of Nematology*, 5(2): 142-146.
- Hampson, M.C. & Coombes, J.W. 1997. Pathogenesis of *Synchytrium endobioticum*: IX. Effect of irrigation regimes and soil mixes on disease incidence with pathotype 2. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 47-51.
- Hampson, M.C., Coombes, J.W. & McRae, K.B. 1994. Pathogenesis of *Synchytrium endobioticum*: VIII. Effect of temperature and resting spore density (pathotype 2) on incidence of potato wart disease. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16: 195-198.
- Hampson, M.C. & Haard, N.F. 1980. Pathogenesis of *Synchytrium endobioticum*: 1. Infection responses in potato and tomato. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2: 143-147.
- Häni, F., Popow, G., Reinhard, H., Schwarz, A., Tanner, K. & Vorlet, M. 1992. *Pflanzenschutz im Integrierten Ackerbau*. LmZ, Zollikofen.
- Hare, J. D. 1983. Seasonal variation in plant-insect associations: Utilization of *Solanum dulcamara* by *Leptinotarsa decemlineata*. *Ecology*, 64(2): 345-361.
- Harrison, G. D. 1987. Host-plant discrimination and evolution of feeding preference in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Physiological Entomology*, 12(4): 407-415.
- Hedden, P. & Proebsting, W. M. 1999. Genetic analysis of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology*, 119(2): 365-370.
- Heitefuss, R., König, K., Obst, A. & Reschke, M. 1993. *Pflanzenkrankheiten und Schädlinge im Ackerbau*. DLG-Verlag Frankfurt (Main).
- Hellwege, E. M., Czapla, S., Jahnke, A., Willmitzer, L. & Heyer, A. G. 2000. Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(15): 8699-8704.
- Hellwege, E.M., Raap, M., Gritscher, D., Willmitzer, L. & Heyer, A.G. 1998. Differences in chain length distribution of inulin from *Cynara scolymus* and *Helianthus tuberosus* are reflected in a transient plant expression system using the respective 1-FFT cDNA. *Federation of European Biochemical Societies* 427: 25-28
- Hellwege, E. M., Gritscher, D., Willmitzer, L. & Heyer, A. G. 1997. Transgenic potato tubers accumulate high levels of 1-kestose and nystose: functional identification of a sucrose sucrose 1-fructosyltransferase of artichoke (*Cynara scolymus*) blossom discs. *Plant Journal*, 12(5): 1057-1065.
- Henniger, H. 1959. Versuche zur Kultur verschiedener Rassen von *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary auf künstlichen Nährböden. *Phytopathologische Zeitung*, 34: 285-306.

- Henniger, H. 1963. Zur Kultur von *Phytophthora infestans* auf vollsynthetischen Nährsubstraten. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, 3: 126-135.
- Heyer, A. 2000. Production of modified carbohydrates in transgenic plants. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 43: 94-98.
- Hodgson, W. A. 1962. Studies on the nature of partial resistance in the potato to *Phytophthora infestans*. *American Potato Journal*, 39: 8-13.
- Hohl, H. R. 1983. Nutrition of *Phytophthora*. In D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, & P. H. Tsao (Eds.), *Phytophthora, its biology, taxonomy, ecology, and pathology*: 41-54. The American Phytopathological Society; St. Paul, Minnesota.
- Hohl, H. R. 1991. Nutrition. In D. S. Ingram & P. H. Williams (Eds.), *Phytophthora infestans, the cause of Light Blight of potato*: 53-83. Academic Press, London.
- Holz, R. A., Troth, K. & Atkinson, H. J. 1999. The influence of potato cultivar on lipid content and fecundity of Bolivian and British populations of *Globodera rostochiensis*. *Journal of Nematology*, 31(4): 357-366.
- Honermeier, B. & Knipp, G. 2006. Fructan potatoes - health promoting fibre in a novel tuber. *Kartoffelbau*, 57(7): 336-338.
- Horton, D. R. & Capinera, J. L. 1987. Effects of plant diversity, host density and host size on population ecology of the Colorado potato beetle (Coleoptera, Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 16(4): 1019-1026.
- Horton, D. R., Chauvin, R. L., Hinojosa, T., Larson, D., Murphy, C. & Biever, K. D. 1997. Mechanisms of resistance to Colorado potato beetle in several potato lines and correlation with defoliation. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 82(3): 239-246.
- Hough-Goldstein, J., Tisler, A. M., Zehnder, G. W. & Uyeda, K. A. 1991. Colorado potato beetle (Coleoptera, Chrysomelidae) consumption of foliage treated with *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* and various feeding stimulants. *Journal of Economic Entomology*, 84(1): 87-93.
- Hsiao, T. H. 1988. Host specificity, seasonality and bionomics of *Leptinotarsa* beetles. In P. Jolivet, E. Petitpierre & T. H. Hsiao (Eds.), *Biology of Chrysomelidae*: 581-599. Kluwer Academic Publishers.
- Hsiao, T. H. & Fraenkel, G. 1968a. Isolation of phagostimulative substances from host plant of Colorado potato beetle. *Annals of the Entomological Society of America*, 61(2): 476-484.
- Hsiao, T. H. & Fraenkel, G. 1968b. The influence of nutrient chemicals on the feeding behavior of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 61(1): 44-54.
- Jackson, S. D. 1999. Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. *Plant Physiology*, 119(1): 1-8.
- Jackson, S. D., Heyer, A., Dietze, J. & Prat, S. 1996. Phytochrome B mediates the photoperiodic control of tuber formation in potato. *Plant Journal*, 9(2): 159-166.
- Jackson, S. D. & Prat, S. 1996. Control of tuberisation in potato by gibberellins and phytochrome B. *Physiologia Plantarum*, 98(2): 407-412.
- Jacobson, J. W. & Hsiao, T. H. 1983. Isozyme variation between geographic populations of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 76(2): 162-166.
- James, C. 2005. Global Status of Commercialized Biotech/GM crops: ISAAA Brief 34. <http://www.isaaa.org/>.
- Jansky, S., Austin-Phillips, S. & McCarthy, C. 1999. Colorado potato beetle resistance in somatic hybrids of diploid interspecific *Solanum* clones. *Hortscience*, 34(5): 922-927.

- Jansson, R. K. & Smilowitz, Z. 1986. Influence of potato persistence, foliar biomass and foliar nitrogen on abundance of *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 15(3): 726-732.
- Jansson, R. K., Zitzman, A. E. & Lashomb, J. H. 1989. Effects of food plant and diapause on adult survival and fecundity of Colorado potato beetle (Coleoptera, Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 18(2): 291-297.
- Jermey, T. 1958. Untersuchungen über Auffinden und Wahl der Nahrung beim Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata* Say). *Ent.Exp.and Applied*, 1: 197-208.
- Jermey, T., Szentesi, A. & Horvath, J. 1988. Host plant finding in phytophagous insects - the case of the Colorado potato beetle. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 49(1-2): 83-98.
- Karalus, W. & Rauber, R. 1997. Effect of presprouting on yield of maincrop potatoes (*Solanum tuberosum* L.) in organic farming. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 179(4): 241-249.
- Karp, A., Jones, M. G. K., Foulger, D., Fish, N. & Bright, S. W. J. 1989. Variability in potato tissue-culture. *American Potato Journal*, 66(10): 669-684.
- Khoshkhoo, N., Hedin, P. A. & McCarty, J. C. 1994. Free sugars in root-knot nematode susceptible and resistant cotton plant-roots and leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(2): 366-368.
- King, R. W., Seto, H. & Sachs, R. M. 2000. Response to gibberellin structural variants shows that ability to inhibit flowering correlates with effectiveness for promoting stem elongation of some plant species. *Journal of Plant Growth Regulation*, 19(4): 437-444.
- Knipp, G. 2004. *Untersuchungen zur Stresstoleranz und Überdauerungsfähigkeit von gentechnisch veränderten Fructan bildenden Kartoffeln (Solanum tuberosum L.)*. Dissertation der Justus-Liebig-Universität Gießen, Shaker Verlag, Aachen.
- Knowles, N. R. & Botar, G. I. 1991. Modeling the effects of potato seed-tuber age on plant establishment. *Canadian Journal of Plant Science*, 71(4): 1219-1232.
- Köhler, E. 1931a. Zur Biologie und Cytologie von *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. *Phytopathologische Zeitschrift*, 4: 43-55.
- Köhler, E. 1931b. Der Kartoffelkrebs und sein Erreger (*Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc.). *Zeitschrift für Wissenschaftliche Landwirtschaft*, 5: 673-828.
- Köhler, E. 1948. Betrachtungen zum Resistenzproblem bei *Synchytrium*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheit und Pflanzenschutz*, 55: 10-16.
- Kolbe, H. & Beckmann, S. 1997. Development, growth and chemical composition of the potato crop (*Solanum tuberosum* L.). 2. Tuber and whole plant. *Potato Research*, 40(2): 135-153.
- Kovach, W. L. 1999. *MVSP - A multi-variate statistical package for windows vers. 3.1.* [3.1]. Kovach computing Services, Pentraeth, Wales, UK.
- Lange, T. 1998. Molecular biology of gibberellin synthesis. *Planta*, 204(4): 409-419.
- Langerfeld, E. 1984. *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Band 219, Parey Buchverlag Berlin
- Langerfeld, E. & Stachewicz, H. 1992. Bewertung des Abwehrverhaltens von Kartoffelsorten gegenüber dem Erreger des Kartoffelkrebses (*Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc.). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 44(8): 175-178.
- Lapwood, D. H. 1965. Laboratory assessments of the susceptibility of potato-tuber to blight (*Phytophthora infestans*). *European Potato Journal*, 8: 215-229.

- Lecardonnel, A., Prevost, G., Beaujean, A., Sangwan, R. S. & Sangwan-Norreel, B. S. 1999. Genetic transformation of potato with *nptII-gus* marker genes enhances foliage consumption by Colorado potato beetle larvae. *Molecular Breeding*, 5(5): 441-451.
- Lery, X., Larue, B., Cossette, J. & Charpentier, G. 2003. Characterization and authentication of insect cell lines using RAPD markers. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(10): 1035-1041.
- Liebe, D. 2004. *Molekulargenetische Untersuchungen zur Abgrenzung von Populationen des Maiszünslers Ostrinia nubilalis Hübner als eine Voraussetzung für das Insektenresistenzmanagement (IRM) von Bacillus thuringiensis-Mais (Bt-Mais)*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Lilley, C. J., Atkinson, H. J. & Urwin, P. E. 2005. Molecular aspects of cyst nematodes. *Molecular Plant Pathology*, 6(6): 577-588.
- Lucas, E., Deoliveira, D. & Houle, M. J. 1995. Intraspecific competition by the Colorado potato beetle (Coleoptera, Chrysomelidae) on potato plants, *Solanum tuberosum*. *Environmental Entomology*, 24(3): 576-580.
- Machackova, I., Konstantinova, T. N., Sergeeva, L. I., Lozhnikova, V. N., Golyanovskaya, S. A., Dudko, N. D., Eder, J. & Aksenova, N. P. 1998. Photoperiodic control of growth, development and phytohormone balance in *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum*, 102(2): 272-278.
- Martel, J. W., Alford, A. R. & Dickens, J. C. 2005. Synthetic host volatiles increase efficacy of trap cropping for management of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Agricultural and Forest Entomology*, 7(1): 79-86.
- Masood, A. & Husain, I. S. 1975. Carbohydrate changes and their role in the resistance and susceptibility of three tomato varieties against root-knot disease. *Geobios*, 2(5): 132-135.
- McGregor, C. E., Lambert, C. A., Greyling, M. M., Louw, J. H. & Warnich, L. 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica*, 113(2): 135-144.
- Melakeberhan, H., Brooke, R. C., Webster, J. M. & Dauria, J. M. 1985. The influence of *Meloidogyne incognita* on the growth, physiology and nutrient content of *Phaseolus vulgaris*. *Physiological Plant Pathology*, 26(3): 259-268.
- Melakeberhan, H. & Ferris, H. 1989. Impact of *Meloidogyne incognita* on physiological efficiency of *Vitis vinifera*. *Journal of Nematology*, 21(1): 74-80.
- Melakeberhan, H., Ferris, H. & Dias, J. M. 1990. Physiological response of resistant and susceptible *Vitis vinifera* cultivars to *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 22(2): 224-230.
- Melville, A. A., Storch, R. H., Bushway, R. J. & Alford, A. R. 1985. Growth and development of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae), fed foliage of 3 *Solanum* species. *Maine Agricultural Experiment Station Technical Bulletin*, (115): 1-8.
- Mitchell, B. K. & Low, R. 1994. The structure of feeding behavior in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Insect Behavior*, 7(5): 707-729.
- Moll, A. 1985. The effect of the physiological age of seed tubers on growth and yield of potato cultivars of different maturity classes. *Potato Research*, 28(2): 233-250.
- Mouradov, A., Cremer, F. & Coupland, G. 2002. Control of flowering time: Interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell*, 14: S111-S130.
- Müller-Röber, B., Sonnewald, U. & Willmitzer, L. 1992. Inhibition of the ADP-Glucose-Pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences

- tuber formation and expression of tuber storage protein genes. *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal*, 11(4): 1229-1238.
- Mulder, A. & Van der Wal, A. F. 1997. Relationship between potato cyst nematodes and their principal host. I. A literature review. *Potato Research*, 40(3): 317-326.
- Müller, J. & Rumpfenhorst, H. J. 2000. *Die Prüfung von Pflanzen auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen Schadorganismen in der Biologischen Bundesanstalt: Teil 1: Prüfung von Kulturpflanzen auf Resistenz gegen pflanzenparasitäre Nematoden*. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Band 372, Parey Buchverlag Berlin.
- Nasr, T. A., Ibrahim, I. K. A., Elazab, E. M. & Hassan, M. W. A. 1980. Effect of root-knot nematodes on the mineral, amino-acid and carbohydrate concentrations of almond and peach rootstocks. *Nematologica*, 26(2): 133-138.
- Neal, J. J., Plaisted, R. L. & Tingey, W. M. 1991. Feeding-behavior and survival of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), larvae on *Solanum berthaultii* Hawkes and an F-6 *Solanum tuberosum* X *S. berthaultii* hybrid. *American Potato Journal*, 68(10): 649-658.
- Nei, M. & Li, W. H. 1979. Mathematical-model for studying genetic-variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10): 5269-5273.
- OECD 2002. Consensus document on compositional considerations for new varieties of potatoes: key food and feed nutrients, anti-nutrients and toxicants. [http://www.oilis.oecd.org/oilis/2002doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2002\)5](http://www.oilis.oecd.org/oilis/2002doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2002)5).
- Orke, E.-C. & Steiner, U. 1996. *Ertragsverluste und Pflanzenschutz. Die Anbausituation für die wirtschaftlich wichtigsten Kulturpflanzen*. Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Olszewski, N., Sun, T. P. & Gubler, F. 2002. Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism and response pathways. *Plant Cell*, 14: S61-S80.
- Peferoen, M., Huybrechts, R. & Deloof, A. 1981. Longevity and fecundity in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 29(3): 321-329.
- Pelletier, Y. 1990. The effect of water-stress and leaflet size on the density of trichomes and the resistance to Colorado potato beetle larvae (*Leptinotarsa decemlineata* [Say]) in *Solanum berthaultii* Hawkes. *Canadian Entomologist*, 122(11-12): 1141-1147.
- Pelletier, Y., Clark, C. & Tai, G. C. 2001. Resistance of three wild tuber-bearing potatoes to the Colorado potato beetle. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 100(1): 31-41.
- Peng, J. & Harberd, N. P. 1997. Gibberellin deficiency and response mutations suppress the stem elongation phenotype of phytochrome-deficient mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 113(4): 1051-1058.
- Perry, R. N. 1998. The physiology and sensory perception of potato cyst nematodes, *Globodera* species. In R. J. Marks & B. B. Brodie (Eds.), *Potato cyst nematodes: biology, distribution and control*: 27-49. Wallingford: CABI Publication.
- Phukan, S. N. 1993. Changes of carbohydrate content of potato varieties due to infection of *Phytophthora infestans*. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 23(3): 223-226.
- Pilon-Smits, E. A. H., Terry, N., Sears, T. & van Dun, K. 1999. Enhanced drought resistance in fructan-producing sugar beet. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(4): 313-317.
- Pollock, C. J. 1986. Fructans and the Metabolism of Sucrose in Vascular Plants. *New Phytologist*, 104(1): 1-24.

- Prevost, A. & Wilkinson, M. J. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 98(1): 107-112.
- Putz, B. 1986. Kartoffeln. In J. Oehmichen (Ed.), *Pflanzenproduktion*: 431-463. Parey Buchverlag Berlin.
- Ramulu, K. S. 1986. Origin and nature of somaclonal variation in potato. *Advances in Agricultural Biotechnology*, 20: 188-201.
- Rawsthorne, D. & Brodie, B. B. 1986. Relationship between root-growth of potato, root diffusate production and hatching of *Globodera rostochiensis*. *Journal of Nematology*, 18(3): 379-384.
- Reust, W. 1986. EAPR working group `Physiological age` of the potato. *Potato Research*, 29: 268-271.
- Riesmeier, J. W., Flugge, U. I., Schulz, B., Heineke, D., Heldt, H. W., Willmitzer, L. & Frommer, W. B. 1993. Antisense repression of the chloroplast triose phosphate translocator affects carbon partitioning in transgenic potato plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(13): 6160-6164.
- Rietveld, R. C., Bressan, R. A. & Hasegawa, P. M. 1993. Somaclonal variation in tuber disc-derived populations of potato. 2. Differential effect of genotype. *Theoretical and Applied Genetics*, 87(3): 305-313.
- Rietveld, R. C., Hasegawa, P. M. & Bressan, R. A. 1991. Somaclonal variation in tuber disk-derived populations of potato. 1. Evidence of genetic stability across tuber generations and diverse locations. *Theoretical and Applied Genetics*, 82(4): 430-440.
- Ritsema, T. & Smeekens, S. 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 223-230.
- Röber, M., Geider, K., Müller-Röber, B. & Willmitzer, L. 1996. Synthesis of fructans in tubers of transgenic starch-deficient potato plants does not result in an increased allocation of carbohydrates. *Planta*, 199(4): 528-536.
- Roßberg, D., Gutsche, V., Enzian, S. & Wick, M. 2002. *Neptun 2000 - Erhebungen von Daten zum tatsächlichen Einsatz chemischer Pflanzenschutzmittel im Ackerbau Deutschlands*. Berichte aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Heft 98, Saphir Verlag Ribbesbüttel.
- Sakai, R. 1961. Studies on the nutritional physiology of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Hokkaido National Agricultural Experiment Station Report*, 57: 1-158.
- Sauter, A. & Hüsing, B. 2005. TA-Projekt Grüne Gentechnik-Transgene Pflanzen der 2. und 3. Generation.
<http://www.tab.fzk.de/de/projekt/zusammenfassung/GGTSPU-styx.bba.de-2304-3650358-DAT/ab104.pdf>.
- Schenk, H., Driessen, R. A. J., de Gelder, R., Goubitz, K., Nieboer, H., Bruggemann-Rotgans, I. E. M. & Diepenhorst, P. 1999. Elucidation of the structure of Solanoecepin A, a natural hatching factor of potato and tomato cyst nematodes, by single-crystal x-ray diffraction. *Croatia Chemica Acta*, 72(2-3): 593-606.
- Schick, R. & Klinkowski, M. 1962. *Die Kartoffel, Band 2*. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin.
- Schöber, B. & Höppner, E. 1972. Zur Methodik der Resistenzprüfung von Kartoffelknollen gegen den Erreger Braunfäule, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Potato Research*, 15: 378-383.
- Schöber-Butin, B. 2001. *Die Kraut- und Braunfäule der Kartoffel und ihr Erreger Phytophthora infestans (Mont.) de Bary*. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Band 384, Parey Buchverlag, Berlin.

- Schöber-Butin, B., Garbe, V. & Bartels, G. 1999. *Farbatlas Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen*. Eugen Ulmer Verlag Stuttgart.
- Schütz, S., Weißbecker, B., Klein, A. & Hummel, H. E. 1997. Host plant selection of the Colorado potato beetle as influenced by damage induced volatiles of the potato plant. *Naturwissenschaften*, 84: 212-217.
- Seinhorst, J. W. 1992. The relation between rate of reproduction and average number of eggs per cyst in *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *Nematologica*, 38(3): 335-352.
- Seinhorst, J. W. 1993. The Regulation of numbers of cysts and eggs per cyst produced by *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* on potato roots at different initial egg densities. *Nematologica*, 39(1): 104-114.
- Sevenier, R., Hall, R. D., Van der Meer, I. M., Hakkert, H. J. C., van Tunen, A. J. & Koops, A. J. 1998. High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet. *Nature Biotechnology*, 16(9): 843-846.
- Sharma, N. K. & Sethi, C. L. 1976. Influence of *Meloidogyne incognita* and *Heterodera cajani* on carbohydrate content of cowpea. *Indian Journal of Nematology*, 6(2): 171-173.
- Sharma, R. & Cammack, R. H. 1976. Spore Germination and Taxonomy of *Synchytrium endobioticum* and *Synchytrium succisae*. *Transactions of the British Mycological Society*, 66: 137-147.
- Sidorenko, A. P. & Berezovskaya, O. P. 2002. Genetic structure of populations of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Genetika (Moskva)*, 38(11): 1485-1491.
- Sidorenko, A. P., Berezovskaya, O. P. & Sozinov, A. A. 2000. The assessment of genetic polymorphism in populations of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say) using RAPD markers. *Genetika (Moskva)*, 36(5): 651-656.
- Sijmons, P. C. 1993. Plant-Nematode Interactions. *Plant Molecular Biology*, 23(5): 917-931.
- Sinden, S. L., Sanford, L. L., Cantelo, W. W. & Deahl, K. L. 1986. Leptine glycoalkaloids and resistance to the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) in *Solanum chacoense*. *Environmental Entomology*, 15(5): 1057-1062.
- Smith, C. M. 1989. *Plant resistance to insects*. Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, USA.
- Sonnewald, U., Brauer, M., von Schaewen, A., Stitt, M. & Willmitzer, L. 1991. Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast - A powerful tool for studying sucrose metabolism and sink source interactions. *Plant Journal*, 1(1): 95-106.
- Sonnewald, U., Hajirezaei, M. R., Kossmann, J., Heyer, A., Trethewey, R. N. & Willmitzer, L. 1997. Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of a yeast invertase. *Nature Biotechnology*, 15(8): 794-797.
- Stachewicz, H. 2002. Bedeutung und Bekämpfung des Kartoffelkrebses in Deutschland. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Band 388, 16-24, Parey Buchverlag, Berlin
- Stachewicz, H. 1996. Die Krebsresistenzprüfung von Kartoffelzuchtstämmen und -sorten in der Bundesrepublik Deutschland. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 48: 181-186.
- Stachewicz, H. & Langerfeld, E. 1998. Zur Geschichte des Kartoffelkrebses in Deutschland. In B. Schöber-Butin (Ed.), *100 Jahre Pflanzenschutzforschung; Krankheiten und Schädlinge der Kartoffel*: 39-62. Parey Buchverlag Berlin.

- Steffens, J. C., Kowalski, S. P. & Yu, H. 1990. Characterization and cloning of glandular trichome and plastid polyphenoloxidases. In M. Vayda & W. D. Park (Eds.), *Molecular Biology of the Potato*: 103-112. CAB International, Oxon, UK.
- Struik, P. C. & Wiersema, S. G. 1999. *Seed potato technology*. Wageningen Academic Publishers, NL.
- Suttle, J. C. 2004. Involvement of endogenous gibberellins in potato tuber dormancy and early sprout growth: a critical assessment. *Journal of Plant Physiology*, 161(2): 157-164.
- Sweetlove, L. J., Kossmann, J., Riesmeier, J. W., Trethewey, R. N. & Hill, S. A. 1998. The control of source to sink carbon flux during tuber development in potato. *Plant Journal*, 15(5): 697-706.
- Szentesi, A., Weber, D. C. & Jermy, T. 2002. Role of visual stimuli in host and mate location of the Colorado potato beetle. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 105(2): 141-152.
- Tadege, M., Bucher, M., Stahli, W., Suter, M., Dupuis, I. & Kuhlemeier, C. 1998. Activation of plant defense responses and sugar efflux by expression of pyruvate decarboxylase in potato leaves. *Plant Journal*, 16(6): 661-671.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2000. *Physiologie der Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.
- Thieme, R. & Griess, H. 1996. Somaclonal variation of haulm growth, earliness and yield in potato. *Potato Research*, 39(3): 355-365.
- Thornton, M. 2003. The rise and fall of NewLeaf potatoes. http://nabc.cals.cornell.edu/pubs/nabc_15/chapters/GGTSPU-styx.bba.de-2304-3651823-DAT/Thornton.pdf.
- Thorpe, K. W. & Bennett, R. L. 2003. Colorado potato beetle (Coleoptera : Chrysomelidae) survival and fecundity after short- and long-term rearing on artificial diets. *Journal of Entomological Science*, 38(1): 48-58.
- Timmermans, B. G. H., Vos, J., Stomph, T. J., van Nieuwburg, J. & van der Putten, P. E. L. 2006. Growth duration and root length density of *Solanum sisymbriifolium* (Lam.) as determinants of hatching of *Globodera pallida* (Stone). *Annals of Applied Biology*, 148(3): 213-222.
- Tourneux, C., Devaux, A., Camacho, M. R., Mamani, P. & Ledent, J. F. 2003. Effects of water shortage on six potato genotypes in the highlands of Bolivia (I): morphological parameters, growth and yield. *Agronomie*, 23(2): 169-179.
- TransGen 2006. Nachwachsende Rohstoffe: Neue Stärkekartoffeln. http://www.transgen.de/gentechnik/nachwachsende_rohstoffe/704.doku.html.
- Trethewey, R. N., Fernie, A. R., Bachmann, A., Fleischer-Notter, H., Geigenberger, P., & Willmitzer, L. 2001. Expression of a bacterial sucrose phosphorylase in potato tubers results in a glucose-independent induction of glycolysis. *Plant Cell and Environment*, 24(3): 357-365.
- Trethewey, R. N., Geigenberger, P., Hennig, A., Fleischer-Notter, H., Müller-Röber, B. & Willmitzer, L. 1999. Induction of the activity of glycolytic enzymes correlates with enhanced hydrolysis of sucrose in the cytosol of transgenic potato tubers. *Plant Cell and Environment*, 22(1): 71-79.
- Trethewey, R. N., Geigenberger, P., Riedel, K., Hajirezaei, M. R., Sonnwald, U., Stitt, M., Riesmeier, J. W. & Willmitzer, L. 1998. Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. *Plant Journal*, 15(1): 109-118.
- Trudgill, D. L. & Cotes, L. M. 1983. Tolerance of potato to potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*) in relation to the growth and efficiency of the root-system. *Annals of Applied Biology*, 102(2): 385-397.

- Uni Karlsruhe 2003. Kartoffeln für gesündere Augen.
http://www.presse.uni-karlsruhe.de/pm_1279.html.
- Van der Meer, I. M., Ebskamp, M. J. M., Visser, R. G. F., Weisbeek, P. J. & Smeekens, S. C. M. 1994. Fructan as a new carbohydrate sink in transgenic potato plants. *Plant Cell*, 6(4): 561-570.
- Van der Meer, I. M., Koops, A. J., Hakkert, J. C. & van Tunen, A. J. 1998. Cloning of the fructan biosynthesis pathway of Jerusalem artichoke. *Plant Journal*, 15(4): 489-500.
- Van der Zaag, D. E. & van Loon, C. D. 1987. Effect of physiological age on growth vigor of seed potatoes of 2 cultivars. 5. Review of literature and integration of some experimental results. *Potato Research*, 30(3): 451-472.
- Van Ittersum, M. K. 1992. Variation in the duration of tuber dormancy within a seed potato lot. *Potato Research*, 35(3): 261-269.
- Van Ittersum, M. K. 1993. Advancing growth vigor of seed potatoes by storage-temperature regimes. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 41(1): 23-36.
- Van Ittersum, M. K. & Scholte, K. 1992. Relation between growth-conditions and dormancy of seed potatoes. 2. Effects of temperature. *Potato Research*, 35(4): 365-375.
- Van Ittersum, M. K. & Scholte, K. 1993. Shortening dormancy of seed potatoes by a haulm application of gibberellic-acid and storage-temperature regimes. *American Potato Journal*, 70(1): 7-19.
- Van Ittersum, M. K., Scholte, K. & Warshavsky, S. 1993. Advancing growth vigor of seed potatoes by a haulm application of gibberellic-acid and storage-temperature regimes. *American Potato Journal*, 70(1): 21-34.
- Van Laere, A. & van den Ende, W. 2002. Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant Cell and Environment*, 25(6): 803-813.
- Vijn, I. & Smeekens, S. 1999. Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology*, 120(2): 351-359.
- Visser, J. H. & Ave, D. A. 1978. General green leaf volatiles in the olfactory orientation of the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 24(3): 738-749.
- Vovlas, N., Mifsud, D., Landa, B. B. & Castillo, P. 2005. Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on potato. *Plant Pathology*, 54(5): 657-664.
- Ward, S. A., Rabbinge, R. & Denouden, H. 1985. Construction and preliminary evaluation of a simulation-model of the population-dynamics of the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 91(1): 27-44.
- Warren, R. C., King, J. E. & Colhoun, J. 1973. Reaction of potato plants to *Phytophthora infestans* in relation to their carbohydrate content. *Transactions of the British Mycological Society*, 61(AUG): 95-105.
- Weber, D. C. & Ferro, D. N. 1993. Distribution of overwintering Colorado potato beetle in and near Massachusetts potato fields. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 66(2): 191-196.
- Weber, D. C. & Ferro, D. N. 1996. Flight and fecundity of Colorado potato beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) fed on different diets. *Annals of the Entomological Society of America*, 89(2): 297-306.
- Wilson, R. N. & Somerville, C. R. 1995. Phenotypic suppression of the gibberellin-insensitive mutant (GAI) of arabidopsis. *Plant Physiology*, 108(2): 495-502.
- Xu, X., van Lammeren, A. A. M., Vermeer, E. & Vreugdenhil, D. 1998. The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation in vitro. *Plant Physiology*, 117(2): 575-584.
- Yasar, B. & Gungor, M. A. 2005. Determination of life table and biology of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera : Chrysomelidae), feeding

- on five different potato varieties in Turkey. *Applied Entomology and Zoology*, 40(4): 589-596.
- Yencho, G. C. & Tingey, W. M. 1994. Glandular trichomes of *Solanum berthaultii* alter host preference of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, 70(3): 217-225.
- Zakopal, J. & Krusek, K. 1972. Methode zur mikroskopischen Ermittlung der Widerstandsfähigkeit von Kartoffelsorten gegen Kartoffelkrebs. Sb. Ved. Praci Celostatni Konf. Ochr. Rostl., 4(1): 321-327
- Zehnder, G. W., Sandall, L., Tisler, A. M. & Powers, T. O. 1992. Mitochondrial DNA diversity among 17 geographic populations of *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 85(2): 234-240.
- Zhao, X. W., Schmitt, M. & Hawes, M. C. 2000. Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematode behavior. *Phytopathology*, 90(11): 1239-1245.
- Zrenner, R., Salanoubat, M., Willmitzer, L. & Sonnewald, U. 1995. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L). *Plant Journal*, 7(1): 97-107.
- Zwolinska-Sniatalowa, Z. & Krzymanska, J. 1980. The development of the larvae of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*, Say) reared on a modified artificial diet supplemented with some growth stimulants. *Bulletin De L'Academie Polonaise Des Sciences, Sciences Biologiques*, 28(3): 157-162.

8. Anhang

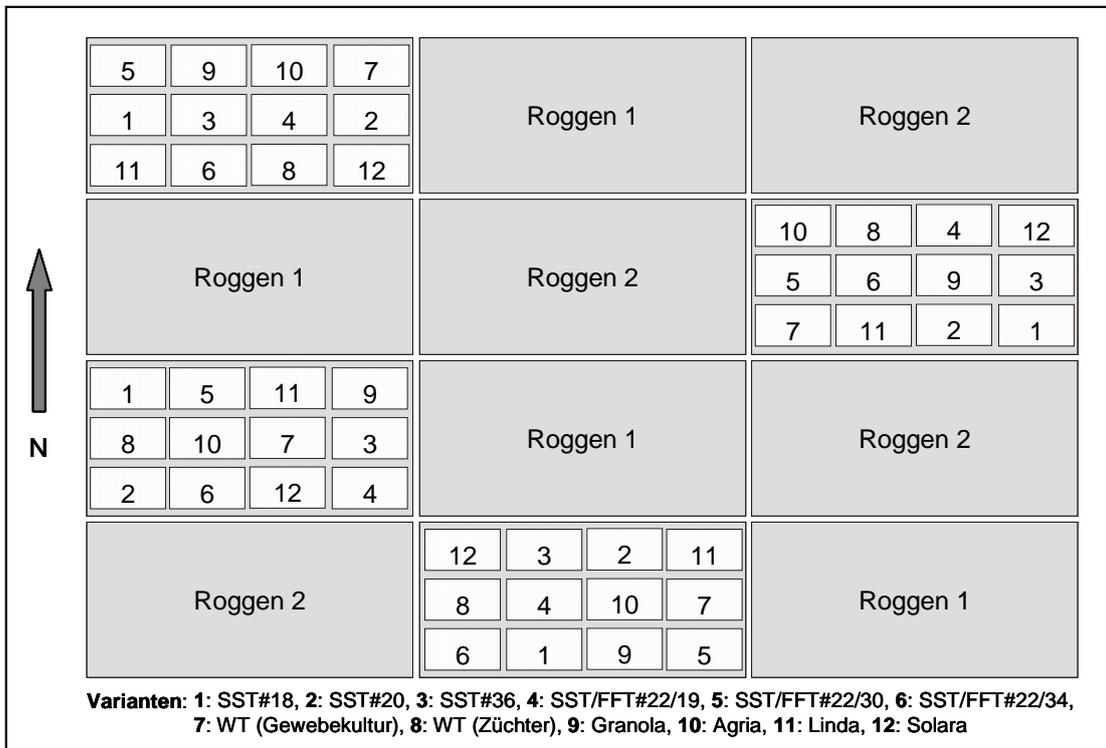


Abb. 8-1: Blockanlage des Freisetzungversuches in der Vegetationsperiode 2001.

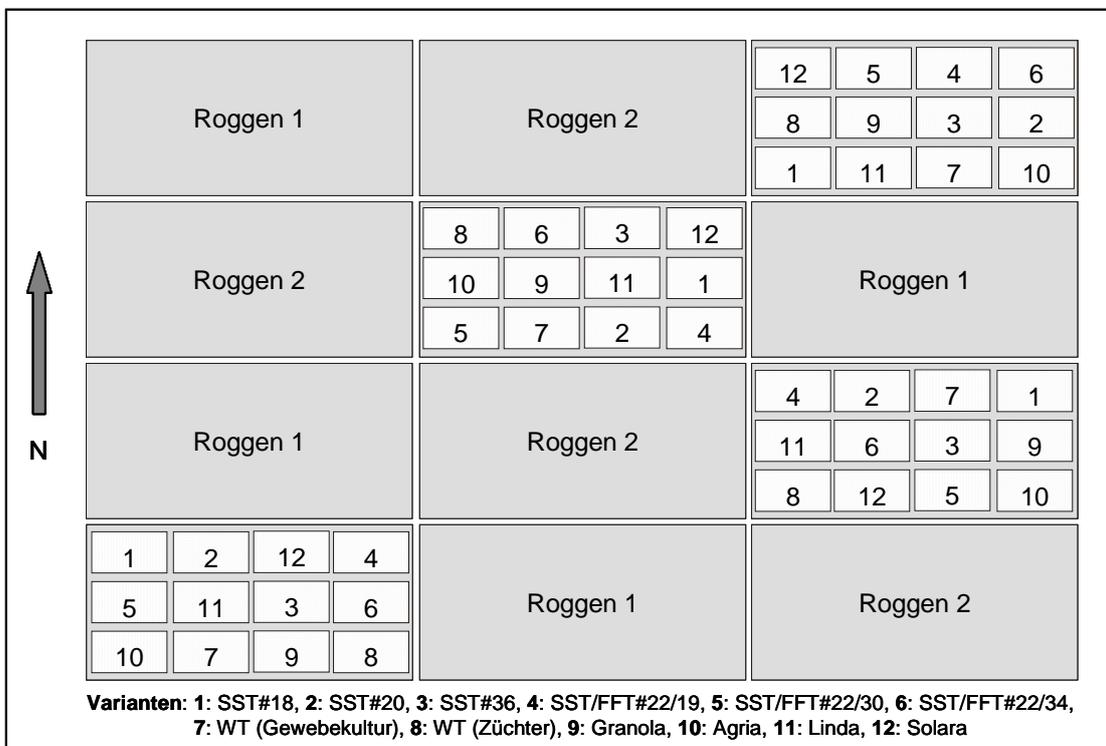


Abb. 8-2: Blockanlage des Freisetzungversuches in der Vegetationsperiode 2002.

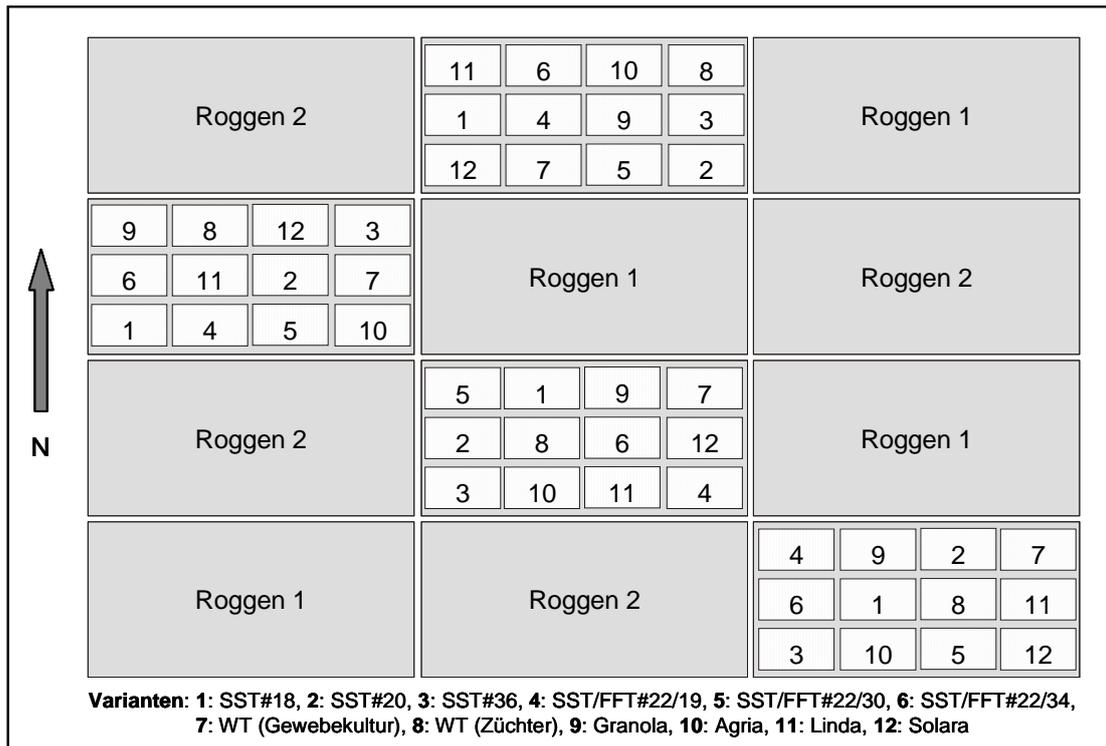


Abb. 8-3: Blockanlage des Freisetzungversuches in der Vegetationsperiode 2003.

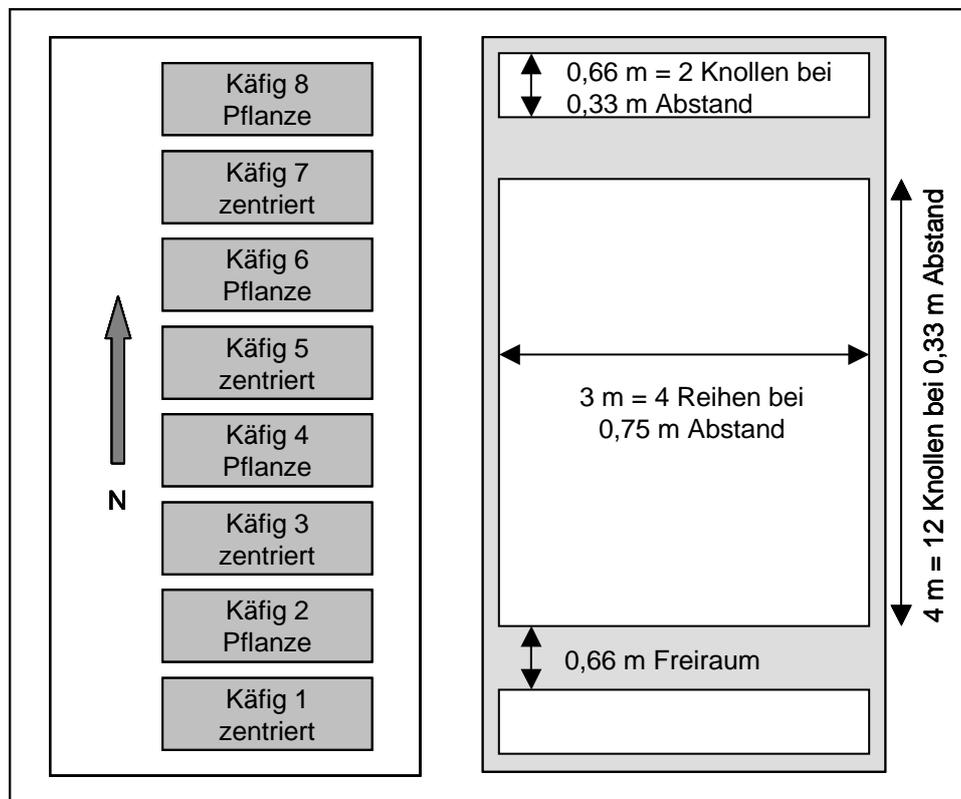


Abb. 8-4: Anordnung und Verteilung der Ausbringung (links) sowie Detailplan der Bepflanzung (rechts) der Großkäfige in der Vegetationsperiode 2002.

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

Varianten: 1: SST#18, 2: SST#20, 3: SST#36, 4: SST/FFT#22/19, 5: SST/FFT#22/30, 6: SST/FFT#22/34, 7: WT (Gewebekultur), 8: WT (Züchter), 9: Granola, 10: Agria, 11: Linda, 12: Solara

Abb. 8-5: Anlagepläne der Großkäfige in der Vegetationsperiode 2002.

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

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

Varianten: 1: SST#18, 2: SST#20, 3: SST#36, 4: SST/FFT#22/19, 5: SST/FFT#22/30, 6: SST/FFT#22/34, 7: WT (Gewebekultur), 8: WT (Züchter), 9: Granola, 10: Agria, 11: Linda, 12: Solara

Abb. 8-6: Anlagepläne der Großkäfige in der Vegetationsperiode 2003.

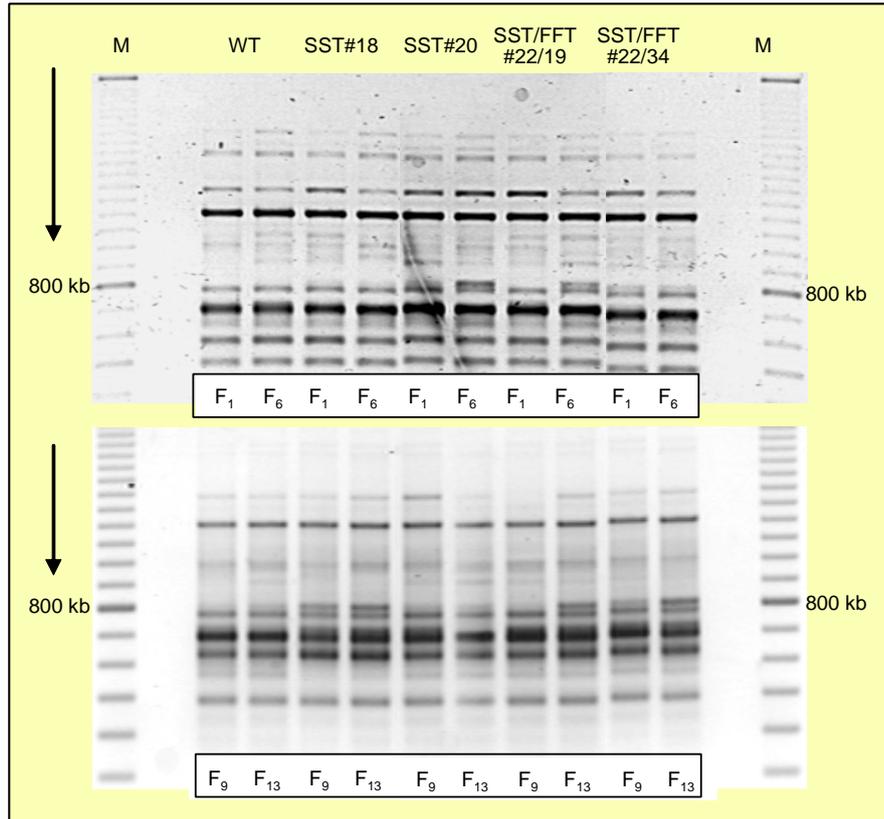


Abb. 8-7: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer OPA-07 (5'-GAA ACG GGT G-3').

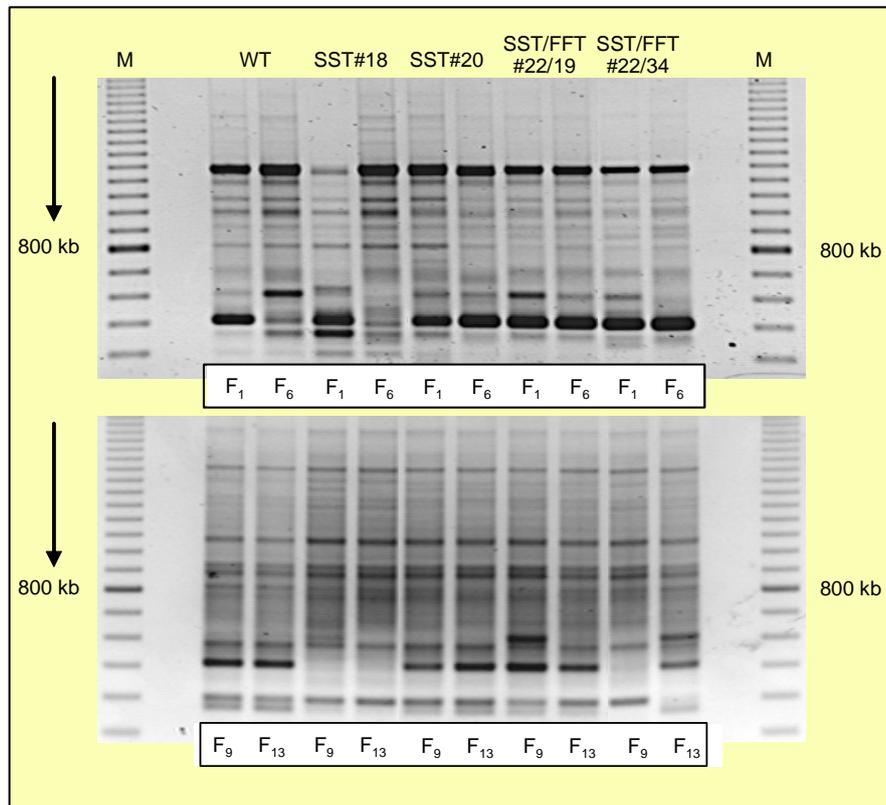


Abb. 8-8: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer OPB-01 (5'-GTT TCG CTC C-3').

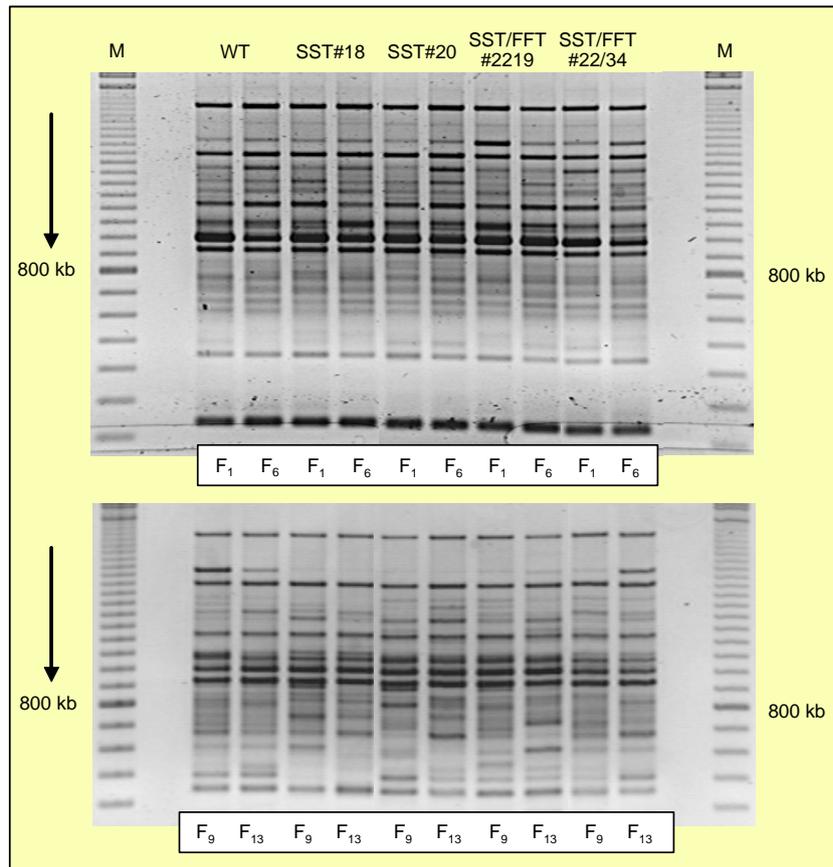


Abb. 8-9: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer OPB-08 (5'-GTC CAC ACG G-3').

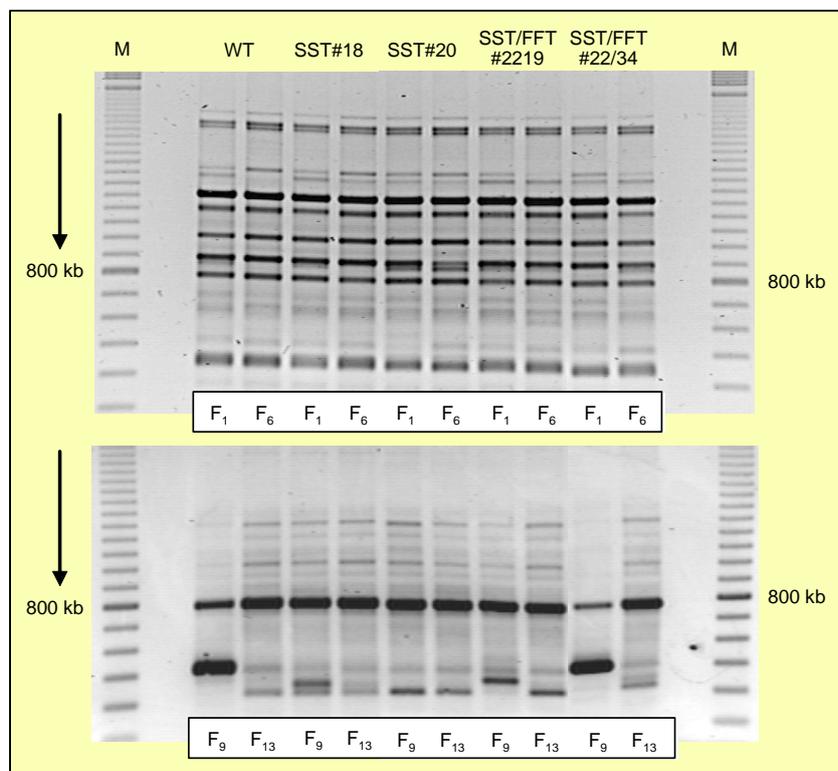


Abb. 8-10: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer OPC-15 (5'-GAC GGA TCA G-3').

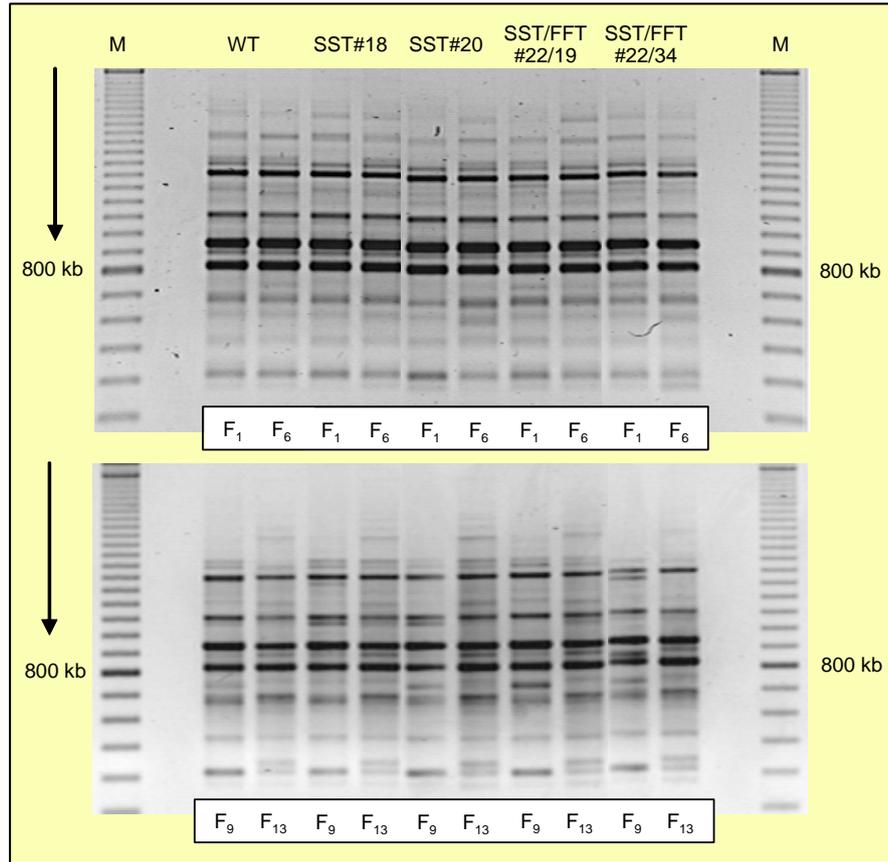


Abb. 8-11: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer Roth A-11 (5'-CAA TCG CCG T-3').

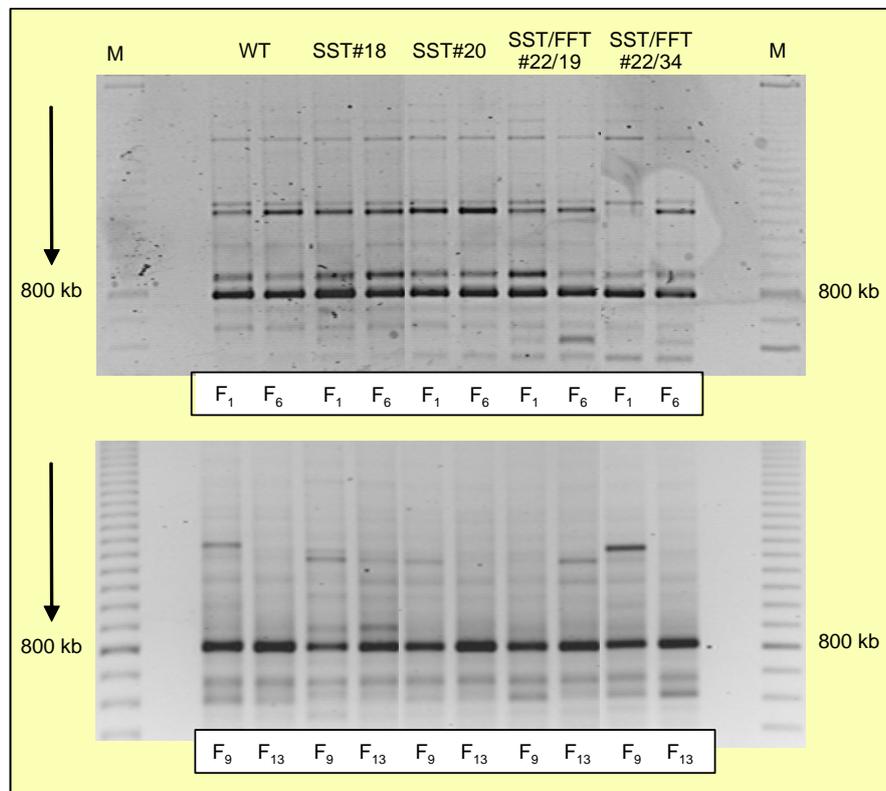


Abb. 8-12: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer Roth A-16 (5'-AGC CAG CGA A-3').

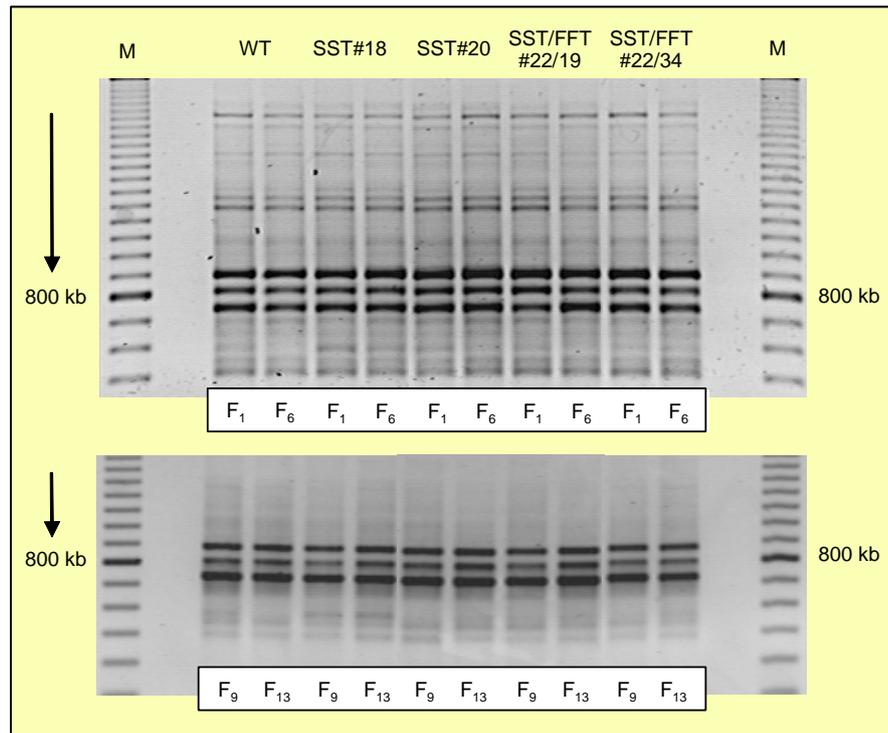


Abb. 8-13: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer Roth A 18 (5'-AGG TGA CCG T-3').

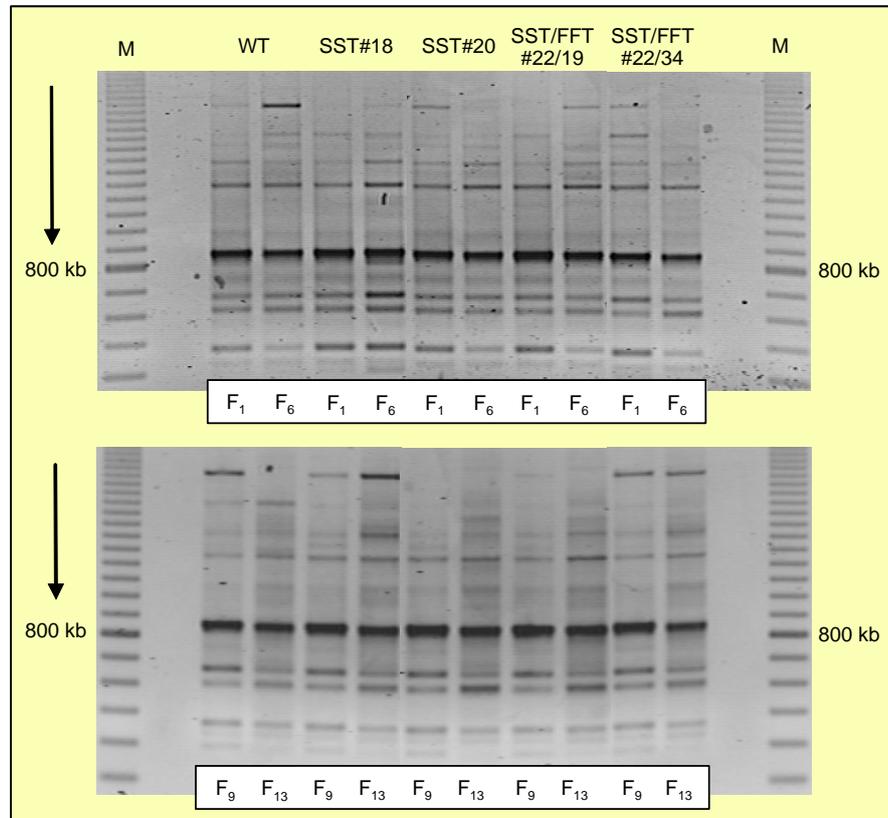


Abb. 8-14: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer Roth A-19 (5'-CAA ACG TCG G-3').

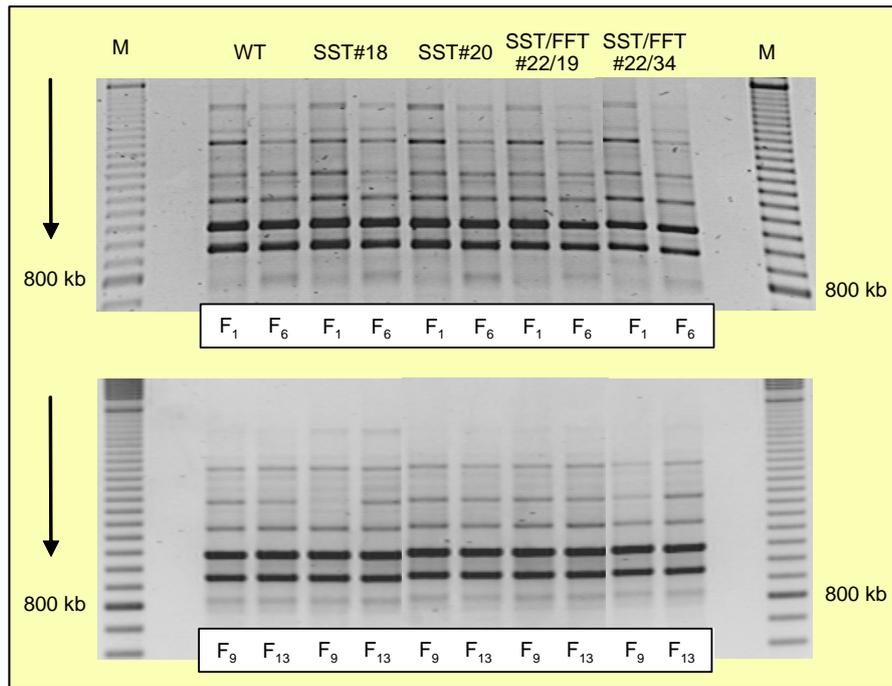


Abb. 8-15: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer Roth A-20 (5'-GTT GCG ATC C-3').

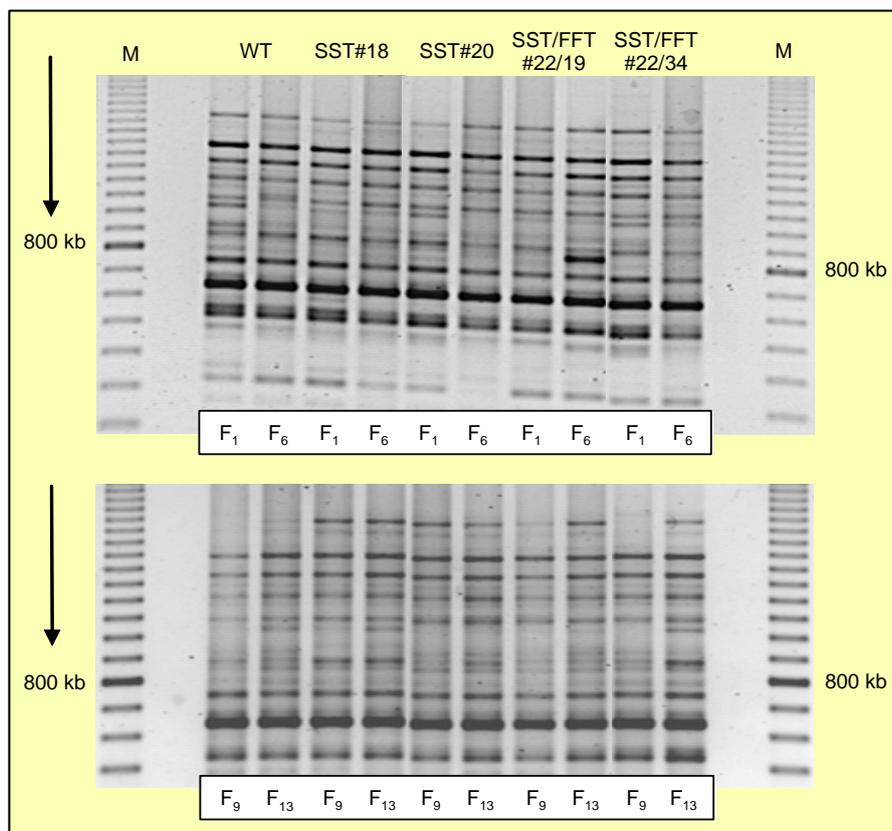


Abb. 8-16: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer MWG180-08 (5'-CGC CCT CAG C-3').

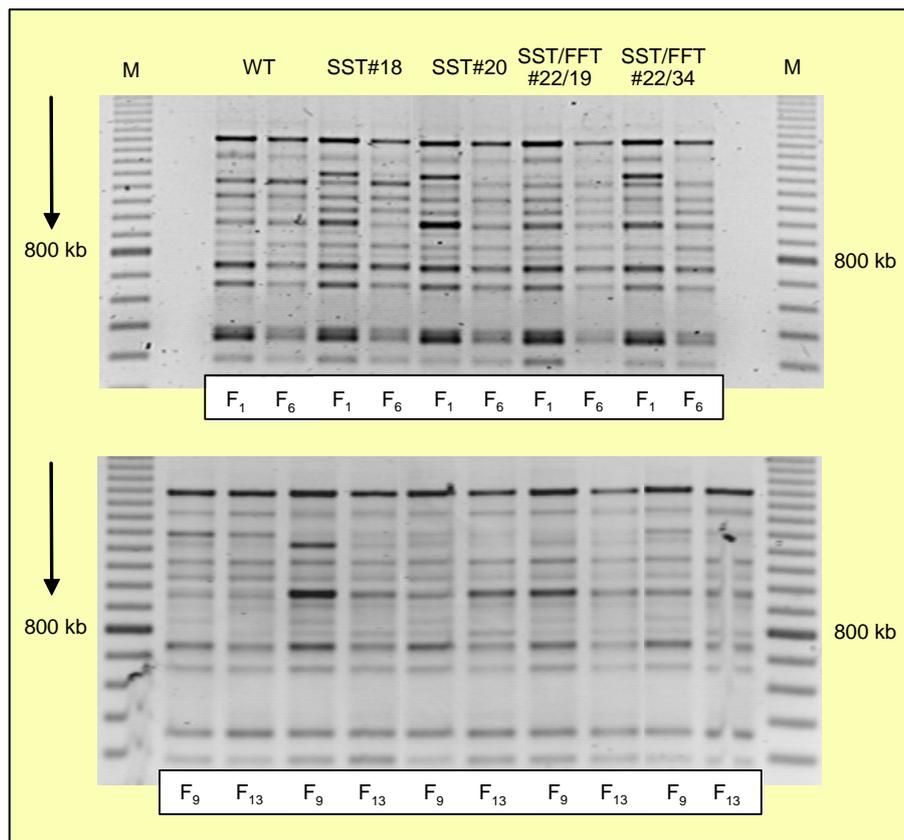


Abb. 8-17: Banden der Kartoffelkäfersubpopulationen durch den RAPD-Primer MWG280-08 (5'-GGC CAC AGC G-3').

Veröffentlichungen von Teilen dieser Arbeit

Teile dieser Arbeit wurden auf nationalen und internationalen Tagungen in Form von Posterpräsentationen veröffentlicht, die nachfolgend in chronologischer Reihenfolge aufgeführt sind.

Roppel, P. & Hommel, B. (2002): Field experiments about performance of transgenic potato lines compared with the untransformed isogenic variety. In: 15th EAPR Conference (2002). Abstracts of Papers and Posters, Eds. G. Wenzel & I. Wulfert

Roppel, P.; Hommel, B.; Stachewicz, H. & Große, E. (2002): Vergleich von gentechnisch modifizierten Kartoffeln mit ihrer isogenen Sorte Désirée hinsichtlich pflanzenschutzrelevanter Eigenschaften. Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Heft 390, 547

Fleissner, C.; Roppel, P. & Hommel, B. (2003): Basisempfindlichkeit des Kartoffelkäfers (*L. decemlineata* Say) für *Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis* unter besonderer Berücksichtigung des Zusatzes von Kohlenhydraten. Entomologentagung Halle, 24.3.-26.3.; <http://www.entomologentagung2003.uni-halle.de/pdf/sektion11.pdf>

Roppel, P. & Hommel, B. (2003): Wachstum und Entwicklung des Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata* Say) an transgenen Fructan-Kartoffeln. Entomologentagung Halle, 24.3.-26.3.; <http://www.entomologentagung2003.uni-halle.de/pdf/sektion11.pdf>

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre nicht möglich gewesen, wenn ich nicht die umfangreiche Unterstützung und Hilfe vieler Menschen gehabt hätte. Mein besonderer Dank gilt daher:

BBA-Kleinmachnow

- Dr. B. Hommel für die intensive Betreuung, Motivation und Rückendeckung während der gesamten Arbeitsphase. Die Diskussionen mit ihm, sein fachliches Wissen und wertvollen Korrekturvorschläge haben wesentlich zur Bereicherung der Arbeit beigetragen.
- Prof. Dr. U. Burth für die Betreuung der Arbeit und die Ermöglichung der Überwachung der Freisetzungsversuche.
- R. Barche für die uneingeschränkte Unterstützung bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, auch wenn diese einen erheblichen Mehraufwand bedurften.
- K. Briesemann für die Unterstützung bei den Zuchten von *L. decemlineata* und der Flüssigkultur von *P. infestans*.
- A. Metke für die Unterstützung im Labor (insbesondere der PCR) und im Freisetzungsversuch und dafür, dass sie einfach da war.
- Dr. H. Stachewicz für die Bereitstellung von Räumlichkeiten und verschiedenen Pathotypen von *S. endobioticum* zur Durchführung der Biotests, sowie seiner fachlichen Beratung.
- Dr. E. Große für die Bereitstellung von Infektionsmaterial von *M. incognita* und *G. rostochiensis* und die fachliche Beratung bei den Untersuchungen.
- Dr. E. Moll für die statistische Beratung.
- Gewächshaus
(U. Dörr, S. Breitkreuz,
L. Migotti, H. Maslowski) für die Bereitstellung der Klimakammern und der umfangreichen Gewächshausfläche, die Unterstützung in der Anzucht der Kartoffelpflanzen sowie deren Versorgung am Wochenende und die netten Stunden, die wir miteinander verbracht haben.
- Versuchsfeld Dahnsdorf
(H. Baier, B. Ziehe, M. Thede
G. Müller, F. Senst, M. Mahr,
D. Poschau, Herr Stephan) für die Flexibilität, versuchstechnische Durchführung, Mithilfe bei den Erhebungen im Freisetzungsversuch und vor allem für die Bereitschaft der Überwachung der Freisetzungsversuche.

BBA-Braunschweig

Dr. B. Schöber-Butin
und C. Wagner

für die Bereitstellung der Laborstämme von *P. infestans* sowie die Enthüllung einiger Geheimnisse im Umgang mit *P. infestans*.

Justus-Liebig-Universität Gießen

Prof. Dr. B. Honermeier

für die fachliche Begleitung der Arbeit, den gewährten Freiraum bei der Durchführung der Untersuchungen und die Übernahme des Erstgutachtens.

Prof. Dr. H. E. Hummel

für die fachlichen Anregungen und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie in Golm

Prof. Dr. A. Heyer

für die Bereitstellung der transgenen Linien, die fachlichen Diskussionen und die Kohlenhydratanalytik.

Dr. K. Köhl

für die Bereitstellung der Pflanzknollen der Freisetzungsversuche, die fachlichen Diskussionen und die Kohlenhydratanalytik.

BAZ in Aschersleben

Dr. Ehrig

vom Institut für Resistenzforschung und Pathogendiagnostik sei für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Blattbehaarung und der Knollenstärke gedankt.

VDLUFA Potsdam

für die Bereitstellung der Stärkewaage.

BMBF

für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen des BMBF-Förderprogramms „Sicherheitsforschung und anbaubegleitendes Monitoring“.

Familie

Meinem Mann Alf Richter und meinen Eltern sowie zahlreichen Freunden danke ich dafür, dass sie immer an mich geglaubt und mir den Rücken freigehalten haben. Insbesondere nach der Geburt meines Sohnes und der noch nicht vollendeten Dissertation. Ohne sie wäre diese Arbeit sicher nie zustande gekommen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, 5. Februar 2007

Pia Roppel

Lebenslauf

Name: Pia Roppel
Geboren: 14. März 1972 in Elmshorn
Familienstand: verheiratet, zwei Söhne geboren am 16. Juli 2004 und 8. Oktober 2007
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

8/1978 - 7/1982 Grund- und Hauptschule Hemdingen
8/1982 - 5/1992 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Quickborn

Berufliche Ausbildung:

8/1992 - 6/1994 Ausbildung zur Chemisch-Technischen-Assistentin an der Theodor-Litt-Schule in Neumünster

freiwilliges ökologisches Jahr:

8/1994 - 7/1995 Kinder- und Jugendbauernhof der AWO Kiel

Studium:

10/1995 - 10/2000 Gartenbaustudium an der Leibniz Universität Hannover
Diplomarbeit: Genotypische Unterschiede bei *Zea mays* in der Reaktion auf Phosphatmangel und Aluminiumüberschuss.

Berufserfahrung:

5/2001 - 5/2004 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für integrierten Pflanzenschutz der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) in Kleinmachnow
Untersuchungen von phänologischen und pflanzenschutzrelevanten Effekten einer transgenen Fructan-Expression in Kartoffeln (*Solanum tuberosum* L.) unter Freiland- und Laborbedingungen

6/2004 - 8/2005 Mutterschutz und Erziehungszeit

8/2005 - 11/2005 Wissenschaftliche Angestellte in der Arbeitsgruppe „Koexistenz, GVO Monitoring“ des Referates Gentechnik am Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) in Berlin
Betreuung des EU-Projektes „Sigma“, befristet durch Vertretung von Erziehungszeit

seit 12/2005 Volontärin am Institut für integrierten Pflanzenschutz der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) in Kleinmachnow
Fertigstellung der Dissertation