

Untersuchungen zur Verbreitung von Fremdgenen in gentechnisch veränderten Pflanzen der Art *Beta vulgaris* L. – Monitoring in Agrar- und Küstenökosystemen

Matthias Pohl-Orf, Ulrike Brand, Ingolf Schuphan und Detlef Bartsch

Synopsis

The spreading of foreign genes from genetically modified plants of *Beta vulgaris* L. – Monitoring in agro- and coastal ecosystems

Plant breeders use transgenic resistance in sugar beet (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *altissima* DÖLL) against the rhizomania disease, which is caused by the soil-born beet necrotic yellow vein virus (BNYVV). It is necessary to assess the ecological consequences of gene flow and spread of transgenic traits to intraspecific relatives like Swiss chard (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *vulgaris* Lain et. DC) or wild beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima* ARCANG.). Therefor the ecologically important factors were investigated in a –on the one hand specific (experimental use of transgenic plants) and on the other hand a general monitoring program.

In the specific part the ecologically important ability to survive in the winter was measured in field experiments. As tested plants, transgenic and conventional sugar beet and hybrids used. A strong correlation between winter cold sum and hibernation rate could be observed, but no difference was found between transgenic genotypes and their non-transgenic controls. In experiments with sugar beet Swiss chard hybrids, transgenic plants were found to have lower rates of first year flowering (bolting) than non transgenic controls.

In the general monitoring program, investigations regarding the gene flow between sugar beet and wild beet in coastal ecosystems have been carried out using RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA – polymerase chain reaction). There are several indications that gene flow has occurred near seed production areas in Italy. These data are useful as baseline to determine future changes in the natural populations due to transgen introgression. The potential role of BNYVV (ABE & TAMADA 1986) in coastal ecosystems with mesohaline soil conditions was inspected. The data demonstrated a decrease of BNYVV infection with increasing salt concentration in the soil

These results and recent data on competitiveness experiments indicate even though the outcrossing of transgenic virus resistance into wild beet populations

is very probable, only minor ecological effects can be expected due to the absence of ecological advantages in coastal ecosystems.

Beta vulgaris, transgenic plants, biosafety, monitoring, hibernation, genetic diversity, RAPD-PCR, sugar beet, wild beet

Beta vulgaris, Transgene Pflanzen, biologische Sicherheit, Überwachung, Überwinterung, genetische Diversität, RAPD-PCR, Zuckerrübe, Wildrübe

1 Einleitung

Das Monitoring der Verbreitung gentechnisch veränderter Organismen ist ein aktueller Aufgabenschwerpunkt ökologischer Wissenschaft.

Nach MAAS (1996) ist die Einteilung in *spezifisches Monitoring* und *allgemeines Monitoring* sinnvoll, wobei mit spezifischem Monitoring der direkte Nachweis von Ursache-Wirkungsbeziehungen gemeint ist, wohingegen ein allgemeines Monitoring auch Untersuchungen umfaßt, bei denen kein direkter Bezug zwischen dem auslösenden Faktor und der beobachteten Wirkung besteht. Auf die hier vorgestellten Arbeiten bezogen läßt sich hiernach eine Unterteilung in Untersuchungen mit (*spezifisches Monitoring*) und ohne transgene Pflanzen (*allgemeines Monitoring*) treffen. Der Aufbau des Forschungskonzeptes soll zum einen die Möglichkeit einer Auskreuzung experimentell klären (Kreuzbarkeit mit verwandten Subspezies, Pollenverbreitung bei Schossen nach Überwinterung und Verwandtschaftsanalyse verschiedener *B. vulgaris* Genotypen.) und zum anderen die potentiellen Konsequenzen einer solchen Auskreuzung im natürlichen Habitat erfassen (Selektionsdruck bzgl. BNYVV-Infektion und genetische Interaktion zwischen Wild- und Kulturrüben).

Bei dem Untersuchungsobjekt handelt es sich um *Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* var. *altissima* DÖLL, die Zuckerrübe, die mittels gentechnischer Methoden gegen die Zuckerrübenkrankheit Rhizomania (Wurzelbärtigkeit) resistent gemacht wurde.

Im Bereich des spezifischen Monitorings wurde in vorhergehenden Versuchen die Auskreuzungsfähigkeit mit wild- und kulturverwandten Subspezies (BARTSCH & POHL-ORF 1996), die Reichweite des Pollenfluges mit Fangpflanzenversuchen und das Konkurrenzverhalten gegenüber Ackerunkräutern (BARTSCH & al. 1996) untersucht. Hier dargestellt werden Versuche zur Überwinterungsfähigkeit transgener und konventioneller Zuckerrüben-Hybriden.

Im Rahmen des allgemeinen Monitorings sind bereits Untersuchungen zur Populationsdynamik von *B. vulgaris* ssp. *maritima* (Arcang.) Populationen des Po-Deltas und der Adriaküste und zum BNYVV-Befallsdruck (*beet necrotic yellow vein virus*) in Wildhabitaten (BARTSCH & SCHMIDT 1996) durchgeführt worden. In dieser Arbeit wurden mittels RAPD-PCR Untersuchungen vorgenommen, die zum einen den Grad genetischer Diversität in Wildrübenpopulationen und zum anderen Mechanismen genetischer Interaktion zwischen Wild- und Kulturrüben zeigen sollten. Weiterhin wurde untersucht, welche Faktoren für den fehlenden BNYVV-Befall und den damit verbundenen fehlenden Selektionsdruck zugunsten transgener Pflanzen in den Wildhabitaten verantwortlich sind.

2 Material und Methoden

Pflanzenmaterial

Die von PLANTA, Einbeck, zur Verfügung gestellten gentechnisch veränderten Zuckerrüben enthalten als zusätzliche transgene Sequenzen die c-DNA des Hüllproteingens des BNYVV (MEULEWATER & al. 1989), *nptII* als Kanamycinresistenzgen (BECK & al. 1982) und das *bar*-Gen aus dem Bodenbakterium *Streptomyces hygroscopicus* (THOMPSON & al. 1987), das Resistenz gegen Phosphinothricin verleiht. Einzelheiten zu den verwendeten Pflanzentypen sind aus Tabelle 1 zu entnehmen.

Bei der Beschaffung von Samenmaterial von *B. maritima* ARCANG. wurden verschiedene Wege beschritten. Aus eigenen Sammlungen stammen Samen italienischer Populationen des Po-Deltas und des niederländischen Küstengebietes. Wildstandorte von *B. maritima* sind in Deutschland nur auf Helgoland bekannt (ROTHMALER 1990), wohingegen in den Niederlanden zahlreiche Vorkommen (FRESE 1991, DE VRIES 1992) beschrieben sind und ein Standort an der Küste der Halbinsel Walcheren (Vlissingen) beprobt wurde. Die Samen von Unkrautrüben (einjährige Hybride zwischen Wild- und Zuckerrüben, VAN DIJK & BOUDRY 1991) wurden 1993 in Alsdorf-Warden bei Aachen gesammelt. Weitere Saatgutproben aus Griechenland, Frankreich, Portugal und Irland wurden vom Institut für Pflanzenbau der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft

(FAL), Braunschweig-Völkenrode, zur Verfügung gestellt.

Überwinterungsversuche

Versuche zur Winterhärte von *Beta vulgaris* L. wurden in den Jahren 1994 bis 1997 durchgeführt. Im Winter 94/95 kamen ausschließlich konventionelle Zuckerrüben zum Einsatz. In den darauffolgenden Wintern (95/96 und 96/97) wurde sowohl mit konventionellen als auch mit transgenen Hybriden gearbeitet, wobei ein Standort mit BNYVV-Befall (Mainz) und ein Standort ohne Befall (Aachen) gewählt wurde. Für den Standort Mainz wurde ein Teil der Versuchspflanzen vor der Aussaat in BNYVV-haltiger Erde angezogen (Vorgehensweise bei der Inokulation s.u. unter BNYVV-Befall und ELISA). Es wurden fünffache Wiederholungen in randomisiertem Blockdesign angelegt, wobei zwischen 90 bzw. 150 Pflanzen in 3 bzw. 5 Reihen ausgebracht wurden. Bei der Anlage der Versuchsfelder mit transgenen Pflanzen mußte mit einer geringeren Samenmenge operiert werden. Aus diesem Grund wurde gepflanzt, anstatt wie bei den Versuchen mit Sorten (94/95) zu säen. Je Genotyp wurden insgesamt 315 Pflanzen in 5 Parzellen ausgebracht. Die nach Ende der Frostperiode bestimmten Überlebensraten wurden mit verschiedenen Temperaturdaten korreliert.

RAPD-PCR

Die DNA-Isolierung wurde in Anlehnung an die Methoden von SAGHAI-MAROOF (1984) und GEBHARDT & al. (1989) mit SDS-Extraktionspuffer durchgeführt. Die verwendete *Goldstar*[®] Taq-Polymerase wurde von *Eurogentec* (Seraing, Belgien) bezogen. Die Synthese der Primer (Oligonucleotide zum DNAPolymerisationsstart) erfolgte bei *Eurogentec* (Seraing, Belgien), *Pharmacia Biotech* (Freiburg) und bei *MWG-Biotech* (Ebersberg).

Die Amplifikationsprodukte wurden in 1,5%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler *MJ-Research*, *PTC100* durchgeführt.

Tab. 2
Sequenzen der Oligonucleotide zur RAPD-PCR (Deca 1 und Deca 2 nach LORENZ et al. 1994).

Table 2
Oligonucleotide sequence for RAPD-PCR (Deca1 and Deca 2 according to LORENZ et al. 1994).

Bezeichnung	Sequenz
DECA 1	5' CTG CTG GGA G 3'
DECA 2	5' GGC ATC GGC C 3'
DECA 3	5' CCC AAG GTC C 3'
DECA 7	5' CCA CGG GAA G 3'

Tab. 1
Verwendung und Charakterisierung der eingesetzten Pflanzentypen. Die Zuckerrüben-Zuchtlinien und -sorten stammen von KWS, Einbeck, die Wildrübentypen B51421 bis B57735 wurden von der FAL (Braunschweig) zur Verfügung gestellt. Die mit * gekennzeichneten Genotypen sind in Abb. 3 besonders hervorgehoben.

Registrierungs- nummer, Name	Typ	Charakterisierung	Verwendung
2K6481	Zuckerrübe	gentechnisch ver- änderte Zuchtlinie	Pollenspende bei der Produktion von transgenen Versuchshybriden
4B4857	Zuckerrübe, Zuchtlinie	Cms-maintainer, multigerm, 0-Typ	Ausgangslinie zu Transformation Pollenspende aller Kontrollhybriden zu transgenen Kreuzungen
2N1009 (<i>Cult 1</i>)	Zuckerrübe, Zuchtlinie*	multigerm, cms – Typ	Pollenempfänger bei der Produktion von Hybridsaatgut, RAPD-Bandenmuster
<i>Edda</i>	Zuckerrübe, Sorte*	monogerm, diploid	Überwinterversuche, Inokulationsver- such, RAPD-Bandenmuster
<i>Rizor</i>	Zuckerrübe, Sorte	monogerm, diploid, rhizomaniatolerant	Überwinterversuche
<i>KaweTina</i>	Zuckerrübe, Sorte	monogerm, triploid	Überwinterversuche
<i>Glatter Silber</i>	Mangold	Sorte diploid	Überwinterversuche
Ma/2K6481	Beta-Hybrid	Hybrid, diploid, transgen	Überwinterversuche
Ma/4B4857	Beta-Hybrid	Hybrid, diploid	Überwinterversuche
B51421 (<i>GRIE</i>)	Griechenland, Euboea	wild, plagiotrop, einjährig	RAPD-Bandenmuster
B54225 (<i>IRL</i>)	Irland, Waterford	wild variabel	RAPD-Bandenmuster
B54804 (<i>FRA1</i>)	Frankreich, Finistere	wild, orthotrop meist einjährig	RAPD-Bandenmuster
B54809 (<i>FRA2</i>)	Frankreich, Morbihan	wild, orthotrop meist einjährig	RAPD-Bandenmuster
B57735 (<i>PORT</i>)	Portugal, Aveiro	wild, orthotrop einjährig	RAPD-Bandenmuster
NL1	Niederlande, Vlissingen	wild, plagiotrop bienn/perenierend	RAPD-Bandenmuster
Wildpop. (<i>Ital</i>) 1 – (<i>Ital</i>) 6	Italien, Adriaküste	wild, ein – bis zweijährig	Inokulationsversuche
Ital 16 (<i>ITAL</i>)	Italien, Venedig	wild, ein – bis zweijährig	RAPD-Bandenmuster
Weed	Deutschland, Aldorf	verwildert, orthotrop	RAPD-Bandenmuster
Unkrautrübe*			

Table 1
Different plant types and their characterization. The sugar beet breeding lines and cultivars were supplied by KWS, Einbeck/Germany, the wild genotypes B51421 to 57735 were supplied by the FAL, Braunschweig/Germany. (* genotypes, marked especially in the fig 3).

Die Konditionen, unter denen ein optimaler Ablauf der PCR-Reaktion gewährleistet ist, variieren mit den unterschiedlichen Anwendungen und mit den verwendeten Komponenten. Basierend auf Arbeiten von LORENZ & al. (1994), UPHOFF & WRICKE (1992, 1995) sowie EAGEN & GOLDMAN (1996) wurden die Reaktionsbedingungen für die vorliegenden Untersuchungen optimiert. Die in Tabelle 3 dargestellten Konzentrationen sind auf die RAPD-PCR

bei *B. vulgaris*, mit GOLDSTAR® DNA-Polymerasen der Firma EUROGENTEC optimiert.

Es konnten Dendrogramme (*neighbour-joining-tree*, SAITOU & NEI 1987) erstellt und so Verwandtschaftsverhältnisse aufgezeigt werden. Die Berechnung der Ähnlichkeitsmatrix erfolgte nach Jaccard (SNEATH & SOKALL 1973). Bei der Auswahl der Banden und Primer wurde primär auf die sichere Wiederholbarkeit geachtet und im Zweifelsfall eher

Tab 3
Reaktionsbedingungen zur RAPD-PCR in *Beta vulgaris* L.

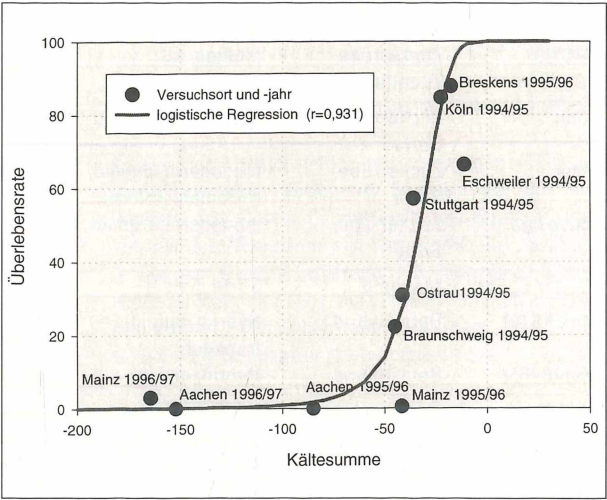
PCR-Konditionen	
Puffer	10mM
MgCl ₂	1,5mM
DNTP's	0,2mM
Taq	1 u
Gelatine	0,001%
H ₂ O _{bidest}	add. bis 50 µl
DNA	ca. 100 ng
Primer	0,5 µM

Table 3
PCR conditions for RAPD analysis in *Beta vulgaris* L.

PCR-Programm
Step 1: 3' 94 °C (Denaturierung)
Step 2: 30" 94 °C (Denaturierung)
Step 3: 1' 35 °C (Primer Annealing)
Step 4: 2' 72 °C (DNA-Snthese)
Step 5: GOTO Step 2, 40x
Step 6: 5' 72 °C (Abschluß-Synthese)
Step 7: 1' 20 °C (Abkühlung)

Abb. 1
Überlebensraten von *Beta vulgaris* L. an verschiedenen Standorten und in verschiedenen Versuchsjahren. Die Überlebensraten der verschiedenen Genotypen an einem Standort sind zu einem Wert gemittelt. Transgene Pflanzen wurden bei den Versuchen in Mainz und Aachen eingesetzt. 1996/97 wurden die Versuche mit Zuckerrüben-Mangoldhybriden durchgeführt.

Fig. 1
Survival rates of *Beta vulgaris* L. at different sites in different test periods (mean over all genotypes). Transgenic plants were used in Mainz and Aachen. The tests in 1996/97 were carried out with hybrids between sugar beet and Swiss chard.



auf die Auswertung einzelner Banden oder ganzer Datensätze zu bestimmten Primern verzichtet.

BNYVV-Befall und ELISA

Die Versuchspflanzen wurden 12 bis 16 Tage nach der Keimung in BNYVV-haltiges Substrat umgesetzt, das zu je 50% aus Einheitserde und aus Erde eines Befallsstandortes bestand. Die Pflanzen, 32 je Behandlung, wurden zweimal wöchentlich mit 0,5%igem bzw. 1%igem Salzwasser gegossen. Falls notwendig wurde zusätzliches Wasser zur Gewährleistung einer Mindestfeuchte im Kultursubstrat gegeben. Die Kontrollgruppe wurde nur mit Wasser gegossen. Nach 95-106 Tagen wurden die Wurzeln der Pflanzen geerntet und auf ihren Virusgehalt hin untersucht (WITHNEY 1989, ALDERLIESTE & VAN EEUWIJK 1992, GEYI & al. 1995). Der Nachweis des Hüllproteins erfolgte mittels ELISA (Enzym Linked Immunosorbent Assay, KÖNIG & al. 1987, KAUFMANN & al. 1992). Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und sonstiger Komponenten des ELISA richtete sich nach der Methode von KÖNIG (1985) mit Modifikationen gemäß der Verwendungs-

anleitung LOEWE Phytodiagnostica, deren Antikörper zum Nachweis verwendet wurden. Proben mit einer Extinktion von mehr als 0,3 nach 60 min Reaktionszeit wurden als infiziert gewertet.

3 Ergebnisse

Überwinterung transgener und konventioneller Zuckerrüben

In den Überwinterungsversuchen zeigte sich eine unterschiedliche Überlebensfähigkeit in Abhängigkeit von den Temperaturbedingungen, wie in Abbildung 1 dargestellt. Als unabhängige Variable wurde die Kältesumme gegen die Überlebensrate aufgetragen. Die Kältesumme ist definiert als die Summe aller negativen Tagesdurchschnittstemperaturen in 2m Höhe. Die Berechnung der Kältesumme aus den Durchschnittstemperaturen unter -4°C ergab eine maximale Korrelation im linearen Bereich der Funktion (graphisch nicht dargestellt). Die logistische Regression folgt der Gleichung: $f(x) = (100)/(1 + (x/c)^b)$ mit den Parametern $b = 4.213$ und $c = -32.461$ mit einem

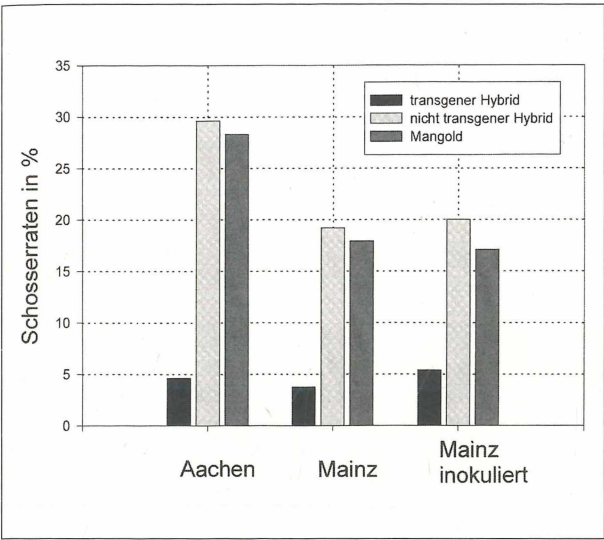


Abb. 2
Schosseraten transgener und nicht transgener Zuckerrüben-Mangold-Hybriden. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus vorgezogen und im April 1996 ausgepflanzt. Der Standort Aachen ist BNYYV-frei. In Mainz kommt das Virus vor, wobei ein Teil der Pflanzen zusätzlich in Befallserde vorgezogen war (Mainz, inokuliert). Die Unterschiede zwischen den Behandlungen sind nicht signifikant.

Fig. 2
Bolting rates of transgenic and non-transgenic hybrids between sugar beet and Swiss chard. The plants were pre-cultivated in the greenhouse and planted in April 1996. The test site in Aachen is free of BNYYV. In Mainz the virus is present and additionally a part of the plants was inoculated (Mainz, inokuliert). The differences between bolting rates were not significant.

Korrelationskoeffizienten von $r=0,931$ und einem Bestimmtheitsmaß von $r^2 = 0,866$ (Abb. 1).

Signifikante Unterschiede in den Überlebensraten der verschiedenen Genotypen eines Standortes konnten nicht nachgewiesen werden, weswegen in Abbildung 1 jeweils die gemittelten Daten aller Genotypen eines Standortes dargestellt sind.

Unter milden Temperaturbedingungen – insbesondere des Winters 94/95 – sind teilweise sehr hohe Überlebensraten zu verzeichnen, die mitunter über 90 Prozent liegen. In den zwei folgenden, wesentlich kälteren Wintern, sind, mit Ausnahme des Küstenstandortes Breskens (Niederlande) kaum Überlebende zu verzeichnen.

Bei Überwinterungsversuchen mit Zuckerrüben-Mangoldhybriden (1996/1997) wurden Aufnahmen zur Häufigkeit schossender (im ersten Jahr blühender) Pflanzen gemacht. Dargestellt als prozentualer Anteil aller ausgepflanzten Individuen eines Genotyps zeigen sie einen deutlich geringeren Schosseranteil unter den transgenen Hybriden im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrollen (Abb. 2). Eine Beeinflussung der Schosserate durch unterschiedlichen BNYYV-Befallsdruck durch die zusätzliche Inokulation eines Teils der Versuchspflanzen konnte nicht beobachtet werden.

Verwandschaftsanalyse mittels RAPD PCR

Vier der getesteten Primer (siehe Tab. 2) ergaben geeignete Amplifikationsmuster, die das Erstellen eines Stammbaumes möglich machten. Bei jedem dieser Primer wurde ein Bereich festgelegt, innerhalb dessen mit einer reproduzierbaren Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente gerechnet werden konnte. Bei den Primern 2 und 3 konnten auch große Fragment

von 1400 bzw. 1600 Basenpaaren Länge in die Auswertung aufgenommen wurden. Primer 1 zeigte ein reproduzierbares Optimum im Bereich zwischen 1000 und 400 Basenpaaren. Mit den vier Primern wurden insgesamt 24 auswertbare Fragmente amplifiziert, wovon 16 diagnostischen Wert hatten, das heißt in ihrem Vorkommen variabel und reproduzierbar waren (Tab 4).

Das erstellte Dendrogramm macht eine klare Abgrenzung der Kulturformen von den Wildformen deutlich. Eine Unterteilung der Wildformen ist nur sehr begrenzt möglich, wobei die atlantischen Formen aus Portugal über die Kanalküste bis nach Irland, zumindest bei Betrachtung der maximal vorkommenden Banden-Konstellation, eine separierte Gruppe bilden. Die Bandenmuster der untersuchten Unkrautrübenpopulation deuten auf eine intermediäre Stellung zwischen Wild- und Kulturrüben hin. In den Bandenmustern können sowohl kulturrüben- als auch wildrübenspezifische DNA-Fragmente nachgewiesen werden. Die italienischen Wildrüben stehen den Kultur- und Unkrautrüben im Dendrogramm am nächsten.

BNYYV-Infektionsdruck unter mesohalinen Bodenbedingungen

Die Bestimmung des Virusgehaltes mittels ELISA ergab durchschnittliche Extinktionswerte zwischen ca. 2,3 bei empfindlichen und weniger als 0,3 bei toleranten Pflanzen. Unter Salzbehandlung konnten auch bei der anfälligen Sorte keine Extinktionswerte von mehr als 0,5 gemessen werden. Die verschiedenen Wildrübenpopulationen zeigten ein unterschiedliches Maß an Infektion mit BNYYV. Population Nummer 6 erwies sich als hoch tolerant, so daß auch bei Be-

Tab. 4
Vorkommen diagnostischer RAPD-Banden in verschiedenen Wildrübenpopulationen und Kulturvarianten von *Beta vulgaris* L. »+« bezeichnet das Vorkommen, »-« die Abwesenheit in allen untersuchten Individuen der Population. Bei heterogenem Vorkommen ist die Rate der Pflanzen angegeben, in deren RAPD Muster die Bande auftritt.

Table 4
Diagnostic bands of different wild beet populations and cultivars of *Beta vulgaris* L. »+« indicates the presence »-« the absence in all investigated plants of the population. If the appearance is heterogeneous, the rate of plants carrying the band is given.

Primertyp		Pflanzentyp									
		Wildrüben							Kulturrüben		
Banden- nummer	Größe in bp	Griechen- land	Nieder- lande	Italien	Portugal	Irland	Frank- reich 1	Frank- reich 2	Sorte (Edda)	Zucht- linie (2N1009)	
Deca1	1	980	+	+	+	+	+	0,66	+	+	+
	2	900	0,5	-	+	+	0,5	0,8	0,5	+	+
	3	750	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	4	500	-	+	-	+	+	0,3	0,66	-	-
	5	400	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Deca2	1	2000	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	1400	+	+	+0,6	+	0,33	0,5	+	-	-
	3	1300	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	1100	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	800	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	6	550	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Deca3	1	1500	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	1250	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	1150	-	-	0,5	-	-	-	-	+	+
	4	1050	+	+	0,3	+	0,6	0,5	0,33	-	-
	5	900	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	6	820	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Deca7	1	1500	+	0,4	+	0,4	+	+	+	+	0,5
	2	1200	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	1100	+	-	+	0,6	0,8	0,4	-	0,5	+

handlung mit reinem Wasser bei den meisten Pflanzen keine Infektion erfolgte. Die Sorte Edda zeigte, wie in Abb. 4 dargestellt, das höchste Infektionsniveau. Die Anzahl infizierter Pflanzen verminderte sich signifikant mit steigender Salzbelastung des Gießwassers. Die Unterschiede bei Population 1 zwischen 0,5%iger und 1%iger Salzkonzentration waren in einer Zwei-Weg-Varianzanalyse nicht signifikant.

Morphologisch zeigte sich bei allen Pflanzen unter erhöhter Salzbelastung ein verminderter Wuchs und eine zunehmende Sukkulenz der Blätter, was auch bei Edda, der untersuchten Sorte, einen wildrübenartigen Habitus hervorrief.

4 Diskussion

Spezifisches Monitoring

Die Frage, ob eine Pollenverbreitung durch überwinterte Zuckerrüben erfolgen kann und ob sich in diesem Zusammenhang Unterschiede zwischen transgene und nicht transgene Pflanzen ergeben, konnte relativ klar beantwortet werden. Die Ergebnisse der Überwinterungsversuche zeigen, daß Zuckerrüben, je nach Härte des Winters, durchaus die Fähigkeit besitzen, die Frostperiode zu überleben. Entgegen früheren Untersuchungen (ANONYMUS 1993) führten auch Minimumtemperaturen von weniger als -5°C nicht zu einem quantitativen sterben. Es konnte festgestellt werden, daß eine Korrelation zwischen Überlebensrate und Temperatur besteht. Schwieriger gestaltet sich die Frage, welche Temperaturparameter besonders gut korrelieren. Neben der Anzahl der Eis-

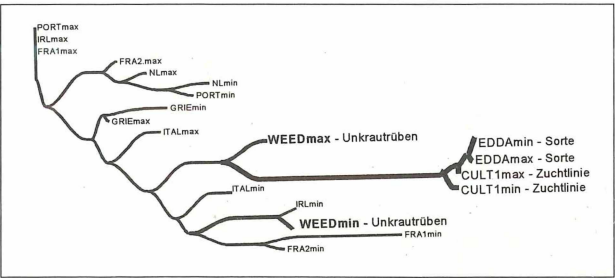


Abb. 3
Verwandtschaftsverhältnisse zwischen verschiedenen Wild- und Kulturvarianten der Art *Beta vulgaris*. Die Darstellung als *neighbor-joining-tree* (SAITOU & NEI 1987) basiert auf einer Ähnlichkeitsmatrix nach JACCARD (SNEATH & SOKALL 1973). Die Bezeichnung min und max hinter den Kennungen stehen jeweils für die minimale bzw. maximale Anzahl an RAPD-Banden innerhalb der jeweiligen Population (Abkürzungen siehe Tab. 1). Bei den nicht weiter spezifizierten Genotypen handelt es sich um Wildrüben verschiedener Herkunft, Kultur und Unkrautrüben sind als solche gekennzeichnet.

Fig. 3
The *neighbor joining tree* (SAITOU & NEI 1987) shows relationships obtained from RAPD analyses using both minimum (min) and maximum (max) number of bands of individuals from each Population of wild- and cultivated varieties of *Beta vulgaris* L. (Abbr. see Tab 1). The tree is based on a JACCARD correlation described by SNEATH & SOKALL (1973). Cultivated beets are especially marked, the other genotypes are wild beets from different origins

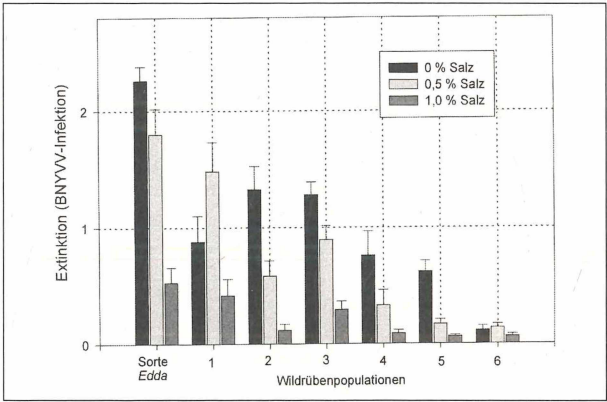


Abb. 4
Infektion verschiedener *Beta vulgaris* L. Wildpopulationen mit BNYVV in Abhängigkeit von der Salzkonzentration im Gießwasser. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes (n=32). Die Wildrübenpopulationen stammen von der italienischen Adriaküste

Fig. 4
Infection of different wild populations of *Beta vulgaris* L. with BNYVV depending on salt concentration in the soil (mean of 32 plants with standard error). The six different wild beet populations originated from the Adriatic coast in Italy.

tage und der absoluten Minimumtemperatur (Ergebnisse hier nicht dargestellt), erwies sich die Kältesumme (Abb. 1) als der Parameter, der die Temperaturverläufe eines Winters am umfassendsten beschreibt. Die Variation der Temperaturgrenze, unterhalb derer die Durchschnittstemperaturen summiert wurden, ergab im negativen Temperaturbereich steigende Korrelationen, was zu der Tatsache paßt, daß Pflanzensäfte aufgrund ihres Gehaltes an gelösten Stoffen einen erniedrigten Gefrierpunkt haben. Die höchste Korrelation ergab sich bei einer Grenztemperatur von -4°C, weswegen die entsprechende Kältesumme als unabhängige Variable zur Darstellung gewählt wurde. Diese Temperatur entspricht auch gleichzeitig etwa dem durchschnittlichen Gefrierpunkt von Pflanzensäften. Da es sich bei den aufsummierten Temperaturwerten allerdings um Durch-

schnittswerte in 2m Höhe handelt und sich die Extremwerte, zumal am Boden, erheblich hiervon unterscheiden, ist diese Übereinstimmung jedoch eher zufällig, wenngleich in der Größenordnung nicht verwunderlich.

Die Vergleichbarkeit verschiedener *B. vulgaris*-Genotypen ist, insbesondere was die Mangold-Zuckerrübenhybride angeht, diskussionswürdig. Mangold zeigt auch als Kulturpflanze eine höhere Tendenz zum Übergang in die generative Phase ohne vorhergehende Winterversalisation, was sich auch in dem hohen Anteil blühenden Mangolds (ca. 25%) in den Überwinterungsversuchen (Abb. 2) widerspiegelt. Zudem ist Mangold als Blattvarietät nicht auf die Ausprägung eines großen Rübenkörpers hin selektioniert. Da größere Rübenkörper einen höheren Wasseranteil besitzen, ist hier auch eine größere Ge-

fahr des Durchfrierens mit irreversiblen Gewebeschäden gegeben. Kleine Wurzelkörper könnten sich durch ihre höhere Osmolarität günstig auf die Überwinterungsfähigkeit auswirken (BAROCKA 1985).

Bei den Überwinterungsversuchen mit konventionellen Zuckerrübensorten gibt es weniger Anlaß, eine Vergleichbarkeit mit den Versuchshybriden in Frage zu stellen. Genau wie bei den transgenen und nicht-transgenen entstammen die Sorten einer Kreuzung einer cms-Zuchtlinie und einer zweiten Linie als Pollenspender. Da die drei verwendeten Sorten eine sehr unterschiedliche Charakteristik haben, gibt es keinen Grund anzunehmen, daß sich das Verhalten der Kreuzungen außerhalb dieses Spektrums befindet.

Der Vergleich der Überlebensraten an verschiedenen Standorten und in verschiedenen Jahren ist durchaus zu vertreten, da ohnehin jeder Versuch nur zusammen mit seinen standortspezifischen Eigenschaften gesehen werden kann und die speziellen Klimabedingungen eines bestimmten Winters lediglich als weitere Standortbesonderheit betrachtet werden müssen.

Neben den Temperaturbedingungen spielt auch die Austrocknung in kalten und zugleich trockenen Perioden des Winters eine Rolle. Entsprechende Symptome konnten an den Versuchspflanzen nicht festgestellt werden, zudem in den Versuchsjahren mit entsprechender Witterung immer auch eine Schneebedeckung während der kalten Phasen vorlag.

Der hohe Schosseranteil in den Überwinterungsversuchen mit transgenen und nicht transgenen Zuckerrüben-Mangoldhybriden im Frühjahr 1996 kann seine Ursache in einer relativ kalten Witterung nach der Auspflanzung haben. Zum anderen spielt die genetische Konstitution der Hybriden eine bedeutende Rolle, da bei bekannt höherer Schossneigung des Mangolds auch dessen Hybriden eine höhere Tendenz zum Schossen haben sollten.

Den beobachteten Unterschied zwischen transgenen und nicht transgenen Pflanzen erklärt dies jedoch nicht. Hier können zwei Hypothesen diskutiert werden, die den Effekt

1. der genetischen Konstitution der klonierten Transformante zuschreiben oder
2. diffuse Nebeneffekte des eigentlichen Transformationsvorganges für das veränderte Schossverhalten verantwortlich machen.

Solche unerwarteten Effekte werden oft der unbestimmten Integration der fremden DNA im Genom zugeschrieben und daher als Positionseffekt (SENIOR & DALE 1996, WEBER 1996) bezeichnet. Durch einen solchen Eingriff können Stoffwechselwege beeinflusst und eine Vielzahl unspezifischer Reaktionen hervorgerufen werden (pleiotrope Effekte).

Die generelle Beobachtung, daß transgene Lini-
enpflanzen ohnehin ein schlechteres Blühverhalten

zeigen, spricht eher für die zweite Hypothese. Die oben angeführte Überlegung, daß durch den gentechnischen Eingriff vielfältige Stoffwechselvorgänge gestört werden können, macht die Annahme plausibel, daß es sich bei den Pflanzen quasi um »Reproduktionskrüppel« handelt.

Des weiteren ist auch der große Unterschied zwischen den Schossraten eher als Indiz gegen eine Abweichung im Rahmen der modifikatorischen Schwan-
kungsbreite zugunsten der zweiten Hypothese zu werten. Je größer die Abweichung, desto geringer wird die Wahrscheinlichkeit, daß die Mittelwerte der gleichen Grundgesamtheit angehören.

Allgemeines Monitoring

Die Mechanismen der genetischen Interaktion zwischen Kultur und Wildrüben sind sehr komplex, so daß die vorliegende Untersuchung nur Teilaspekte zur Klärung beitragen kann. Die Erstellung eines Stammbaumes zur Darstellung phylogenetischer Beziehungen zwischen Wildrüben verschiedener Herkunftsorte ist, aufgrund der großen Heterogenität innerhalb der *maritima* (JUNG & al. 1993), problematisch. Auch in Pflanzen einer Population lassen sich mitunter große Unterschiede im RAPD-Bandenmuster finden. Da deshalb eine klare Definition des Bandenmusters einer bestimmten Population teilweise nicht möglich ist, wird der Vergleich zwischen verschiedenen Standorten schwierig. Es ließen sich kaum Banden finden, die nur für bestimmte Herkunftsgebiete charakteristisch waren und an allen anderen untersuchten Standorten nie vorkamen. Die Häufigkeit, mit der solche Banden vorkamen, variierte stark. Die gewählte Darstellungsform einer minimalen und einer maximalen Bandenkonstellation hat den Vorteil, daß neben der phylogenetischen Nähe der verschiedenen Populationen, auch eine Aussage über deren Homogenität gemacht wird. Während einige Varianten, wie die aus Griechenland oder den Niederlanden, sehr geringe Unterschiede aufweisen, gibt es auch Populationen, deren *max*- und *min*-Varianten im Dendrogramm, aufgrund ihrer Heterogenität, relativ weit entfernte Positionen einnehmen.

Die intermediäre Stellung der Unkrautrüben war zu erwarten, da sie einen Großteil der möglichen Banden, sowohl der kultur- wie auch der wildrübenspezifischen, in den RAPD Bandenmustern vereinen. Diese Tatsache bestätigt die These einer Genese von Unkrautrüben, über die Hybridbildung zwischen Wild- und Kulturrüben, wie sie bereits von BOUDRY & al. (1993) und SANTONI & BERVILLE (1992) an französischen Wildrüben untersucht worden ist. Die relative Nähe der italienischen Population zu den Kulturrüben deutet auf eine Beeinflussung der Wildpopulationen durch die dort betriebene Saatgutproduktion.

Die entscheidende Frage, welchen Einfluß eine erworbene BNYVV-resistenz im Wildhabitat hat, konnte durch die Versuche dahingehend geklärt wer-

den, daß sich mangels Selektionsdruck kein unmittelbarer Vorteil für Pflanzen mit eingekreuzter, transgener Virusresistenz ergibt. Die gemessenen Extinktionswerte in den Inokulationsversuchen mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen zeigen eine deutliche Abhängigkeit des BNYVV-Befalls vom Salzgehalt des Bodens. Da sich die Wildpopulationen von *B. maritima* ARCANG. fast ausschließlich im Meeresspülsaum oder an Salinen befinden, ist diese Abhängigkeit sehr bedeutsam für die Relevanz der Verbreitung einer gentechnisch eingeführten Virusresistenz. Darüber, ob der verminderte Befall auf eine geminderte Infektionsfähigkeit des Virus oder eine Beeinflussung des Überträgerorganismus *Polymyxa betae* KESKIN zurückzuführen ist, kann nur spekuliert werden. Festzuhalten bleibt allerdings, daß eine transgene Virusresistenz in Wildrübenhabitaten wenig bedeutsam wäre, da es unter mesohalinen Bedingungen kaum zu einem Befall kommen kann und Wildrüben zudem eine wesentlich höhere Toleranz dem Erreger gegenüber aufweisen (WHITNEY 1989).

5 Zusammenfassung und Ausblicke

Die vorgestellten Untersuchungen verdeutlichen, welches große Spektrum Untersuchungen zum Monitoring gentechnisch veränderter Pflanzen umfassen müssen. Gerade die Anstrengungen im Bereich des allgemeinen Monitorings sind hervorzuheben, da gerade diese Untersuchungen Aussagen über zu erwartende Konsequenzen des Inverkehrbringens gentechnisch veränderter Pflanzen möglich machen.

In dem Maße, wie die Freisetzung und Inverkehrbringung von gentechnisch veränderten Zuckerrüben zunimmt, wird auch die Bedeutung des spezifischen Monitorings zunehmen (PARKER & BARTSCH 1996), da dann auch Versuche mit transgenen Pflanzen durchgeführt werden können, die im Rahmen des allgemein anerkannten »step-by-step«-Konzeptes vorher als unnötiges Verbreitungsrisiko hätten gewertet werden müssen.

6 Danksagung

Unser Dank gilt denen, die durch ihre Kooperation die Versuche möglich gemacht haben. KWS/PLANTA, Einbeck sowie Hr. Schröter, KWS-Italien, Dr. L. Frese und Hr. Gerken von der FAL, Braunschweig, Dr. Posselt und Hr. Stelz von der Universität Stuttgart Hohenheim, Hr. Urban von der Landhof GmbH, Ostrau, Hr. W. Krüger, Kreislandwirt, Eschweiler und Hr. L. Gerrick am MPI für Züchtungsforschung, Köln und Dr. E. Biancardia, Instituto Sperimentale per le colture, Rovigo. Die Arbeit wurde gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (Fördernummer: 0310532)

Literatur

- ABE, H. & TAMADA, T. 1986: Association of beet necrotic yellow vein virus with isolates of *Polymyxa betae* Keskin. Annals of the Phytopathological Society of Japan. 52: 235–247.
- ALDERLIESTE, M. F. J. AND VAN EEUWIJK, F.A., 1992: Assessment of concentrations of beet necrotic yellow vein virus by enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Virological Methods 37: 163–176.
- ANONYMUS 1993: Report results from frostresistance trials with sugar beet (*Beta vulgaris* L.) transformed with glyphosate resistance genes. Reports to the National Agency for Environmental Protection. Denmark.
- BAROCKA, K.H., 1985: Zucker- und Futterrüben, In: Lehrbuch der Pflanzenzüchtung landwirtschaftlicher Kulturformen, Bd. 2, Spezieller Teil, Paul Parey Verlag, Berlin-Hamburg, 245–287.
- BARTSCH, D. & POHL-ORF, M., 1996: Ecological aspects of transgenic sugar beet: Transfer and expression of herbicide resistance in hybrids with wild beets. Euphytica 91: 55–58.
- BARTSCH, D., SCHMIDT, M., POHL-ORF, M., HAAG, C. & SCHUPHAN, I. (1996) Competitive-ness of transgenic sugar beet resistant to beet necrotic yellow vein virus and potential impact on wild beet populations. Molecular Ecology 5: 199–205.
- BARTSCH, D. & SCHMIDT, M., 1997: Influence of sugar beet breeding on populations of *Beta vulgaris* ssp. *maritima* in Italy. Journal of Vegetation Science 8: 81–84.
- BECK, E., LUDWIG, G., AUERSWALD, E.A., REISS, B. & SCHALLER, H., 1982: Nucleotid sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn 5. Gene 19: 327–336
- BOUDRY, P., MÖRCHEN, M., SAUMITOU-LAPRADE, P., VERNET, P. & VAN DIJK, H. 1993: The origin and evolution of weed beets: consequences for the breeding and release of herbicide-resistant transgenic sugar-beets. Theor Appl Genet 87: 471–478.
- DE VRIES, F.T., VAN DER MEIJDEN, R. & BRANDENBURG, W.A., 1992: Botanical Files – A study of the real chances for spontaneous gene flow from cultivated plants to the wild flora of the Netherlands. Gorteria Supplement 1, 100ff
- EAGEN, K. A. & GOLDMAN, I. L., 1996: Assessment of RAPD marker frequencies over cycles of recurrent selection for pigment concentration and percent solids in red beet (*Beta vulgaris* L.). Molecular Breeding 2: 107–115.
- FRESE, L., 1991: Sammlung, Erhaltung und Nutzarmachung der genetischen Ressourcen von Beta-

- Rüben (*B. vulgaris* L.) und Wurzelzichorien (*Cichorium intybus* L.). Landbauforschung Völkenrode, 41: 65–73.
- GEBHARDT, C., RITTER, E., DEBENER, T., SCHACHTSCHNABEL, U., WALKEMEIER, B., UHRIG, H. & SALAMINI, F., 1989: RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*. Theor. Appl. Genet 78: 65–75.
- GEYL, L., GARCIA HERIZ, M., VALENTIN, P., HEHN, A. & MERDINOGLU, D., 1995: Identification and characterisation of resistance to rhizomania in an ecotype of *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. Plant Pathology 44: 819–828.
- JUNG, C., PILLEN, K., FRESE, L., FÄHR, S. & MELCHINGER, A.E. 1993: Phylogenetic relationship between cultivated and wild species of the genus *Beta* revealed by DNA »fingerprinting«. Theor. Appl. Genet 86: 449–457.
- KAUFMANN, A., KÖNIG, R. & LESEMAN, D.-E. 1992: Tissue print-immunoblotting reveals an uneven distribution of beet necrotic yellow vein and beet soil-born viruses in sugarbeets. Archives of Virology 126: 329–335.
- KÖNIG, R., 1985: Antikörper im Dienste der Pflanzenvirologie. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 37(11): 161–170.
- KÖNIG, R., BURGERMEISTER, W. & LESEMAN, D.-E., 1987: Methods for Detection and identification of Beet Necrotic Yellow Vein Virus. Proc. 50th Winter Congress, I.I.R.B., Brussels, 17–22.
- LORENZ, M., WEIHE, A. & BÖRNER, T., 1994: DNA fragments of organellar origin in random amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Theor. Appl. Genet 88: 775–779.
- MAAS, D. 1996: Möglichkeiten des Biomonitorings bei der Langzeitbeobachtung transgener Organismen. – In: Langzeitmonitoring von Umwelteffekten transgener Organismen. – UBA-Texte, 58/96: 47–60.
- MEULEWAETER F., SOETAERT P. & EMMELO VAN J., 1989: Structural analysis of the coat protein gene in different BNYVV Isolates. Medelingen Faculteit Landbouwwetenschap Rijksuniversiteit Gent 54(2): 465–468.
- PARKER, I.M. & BARTSCH, D., 1996: Recent advances in ecological biosafety research on the risks of transgenic plants: a trans-continental perspective. In: TOMIUK, J., SENTKER, A. and WÖHRMANN, K. (eds) Transgenic Organisms – Biological and Social Implications. Birkhäuser, Basel, 147–161.
- ROTHMALER, W., 1990: Exkursionsflora von Deutschland, Hrsg.: SCHUBERT, V. R., und VENT, W., Kritischer Band, 811 S.
- SAGHAI-MAROOF, M.A., SOLIMAN, K.M., JORGENSEN, R.A. & ALLARD, R.W., 1984: Ribosomal DNA-spacer-length polymorphism in barley Mendelian inheritance chromosomal location and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 8014–8018.
- SENIOR, I.J. & DALE, P.J., 1996: Plant transgene silencing – gremlin or gift? Chemistry and Industry 8: 604–608.
- SNEATH, P.H.A. & SOKAL, R.R., 1973: Numerical Taxonomy, eds.: Kennedy, D. and Park, R. B., W.H. Freeman and Company, San Francisco, 573p.
- SAITOU, N. & NEI, M., 1987: The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees, Mol. Biol. Evol. 4(4): 406–425.
- SANTONI, S. & BERVILLE, A. 1992: Evidence for gene exchange between sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and wild beets: consequences for transgenic sugar beets. Plant Molecular Biology 20: 578–580.
- THOMPSON, C.J., MOVA, N.R., TIZARD, R., CRAMERI, R., DAVIES, J.E., LAUWEREYS, M. & BOTTERMAN, J. 1987: Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Strptomyces hygroscopicus*. EMBO Journal, 3: 2723–2730.
- UPHOFF, H. & WRICKE, G., 1992: Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.): Mapping the Genes for Nematode Resistance and Hypocotyl Color. Plant Breeding 109: 168–171.
- UPHOFF, H. & WRICKE, G., 1995: A genetic map of sugar beet (*Beta vulgaris*) based on RAPD markers. Plant Breeding 114: 355–357.
- VAN DIJK, H. & BOUDRY, P. 1991: Genetic variability for life history in *Beta maritima*. International crop network series IBPGR, Rome. 7: 9–16.
- WEBER, B., 1996: Evolutionsbiologische Argumente in der Risikodiskussion am Beispiel der transgenen herbizidresistenten Pflanzen. – In: W. van den Daele (ed) Grüne Gentechnik im Widerstreit. – VCH, Weinheim: 59–68.
- WHITNEY, E. D., 1989: Identification, distribution, and testing for resistance to rhizomania. *Beta maritima*. Plant Disease 73(4): 287–290.

Adressen

Dipl.-Biol. Matthias Pohl-Orf
 Dipl.-Biol. Ulrike Brand
 Prof. Dr. Ingolf Schuphan
 Dr. Detlef Bartsch
 RWTH Aachen, Lehrstuhl für Biologie V
 Ökologie, Ökotoxikologie, Ökochemie
 Worringerweg
 D-52056 Aachen
 e-mail: pohl-orf@rwth-aachen.de

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie](#)

Jahr/Year: 1997

Band/Volume: [28_1997](#)

Autor(en)/Author(s): Schuphan Ingolf, Bartsch Detlef, Pohl-Orf Matthias,
Brand Ulrike

Artikel/Article: [Untersuchungen zur Verbreitung von Fremdgenen in gentechnisch veränderten Pflanzen der Art Beta vulgaris L - Monitoring in Agrar- und Küstenökosystemen 327-336](#)