

40-6 - Dietz-Pfeilstetter, A.  
Julius Kühn-Institut

### **Einfluss eines S/MAR-Elements aus Petunien auf die Stabilität der Transgen-Expression** A S/MAR element from petunia affects the stability of transgene expression

Bei der Erzeugung gentechnisch veränderter Pflanzen ist das Ziel eine stabile und vorhersagbare Ausprägung der neuen Eigenschaften über mehrere Generationen. Neben den eingeführten regulatorischen Elementen, der Kopienzahl und dem Integrationsort im Pflanzengenom spielen für die Expression von Transgenen auch epigenetische Effekte eine Rolle. Dazu gehören vor allem verschiedene Formen des "gene silencing", also der Abschaltung von Genen. Epigenetisches "gene silencing" ist Teil der normalen Regulation von Genen während der Entwicklung, ist darüber hinaus aber auch ein Mechanismus zur Abwehr gegen Viren und zur Abschaltung von Transgenen (Eamans et al, 2008). Ein großer Teil der Faktoren, die das "Silencing" von Transgenen auslösen bzw. beeinflussen, sind mittlerweile bekannt. So ist bei Transformanten mit Einzelkopie-Insertionen in hypomethylierten Genombereichen die Wahrscheinlichkeit für die Erzeugung stabiler transgener Linien am größten. Aber auch bei diesen Pflanzen wird gelegentlich eine Abschaltung von Transgenen, insbesondere in den Folgegenerationen und bei Kombination mehrerer Transgene mit Sequenzhomologien, beobachtet (Charrier et al., 2000).

Die Genexpression in transgenen Pflanzen sowie deren Stabilität in Folgegenerationen kann durch Flankierung des Transgens mit sogenannten S/MARs (scaffold/matrix attachment regions) erhöht werden (Ülker et al., 1999; Levin et al., 2005). Wir haben ein S/MAR-Element aus Petunien (Petun-SAR) isoliert (Dietz et al., 1994) und in Markergenkonstrukte eingebaut. Mit den Petun-SAR-Konstrukten transformierte Tabakpflanzen zeigten – anders als Transformanten ohne Petun-SAR – bis zu zwei Kopien eine kopienzahlabhängige Expression des Reportergens. Bei transgenen Linien mit vielen Genkopien und Rearrangements wurde unabhängig von der S/MAR-Flankierung spätestens in der F1-Generation "gene silencing" beobachtet, das mit Methylierungen im Promotor- und im Genbereich assoziiert war. Daraus kann geschlossen werden, dass das Petun-SAR nicht gegen Silencing schützt, das durch multiple Transgen-Loci bedingt ist. Petun-SAR-Linien mit nur einer Genkopie exprimierten das Markergen dagegen in den zwei untersuchten Folgegenerationen stabil, während bei vergleichbaren S/MAR-freien Transformanten bei einem großen Teil der F2-Pflanzen das Transgen nicht mehr exprimiert wurde.

Untersucht wurde auch die Robustheit der Expressionsstabilität gegenüber der Einkreuzung von Transgenen aus instabilen Linien. Die Ergebnisse verschiedener Kreuzungsprodukte zwischen transgenen Linien mit und ohne Petun-SAR werden vorgestellt.

#### Literatur

- [1] B. Charrier, C. Scollan, S. Ross, E. Zubko, P. Meyer, Co-silencing of homologous transgenes in tobacco, *Molecular Breeding* 6 (2000) 407-419.
- [2] A. Dietz, V. Kay, T. Schlake, J. Landsmann, J. Bode, A plant scaffold attached region detected close to a T-DNA integration site is active in mammalian cells, *Nucl. Acids Res.* 22 (1994) 2744-2751.
- [3] A. Eamans, M.-B. Wang, N.A. Smith, P.M. Waterhouse, RNA silencing in plants: yesterday, today and tomorrow, *Plant Physiol.* 147 (2008) 456-468.
- [4] J.S. Levin, W.F. Thompson, A.S. Csinos, M.G. Stephenson, A.K. Weissinger, Matrix attachment regions increase the efficiency and stability of RNA-mediated resistance to *Tomato Spotted Wilt Virus* in transgenic tobacco, *Transgenic Res.* 14 (2005) 193-206.
- [5] B. Ülker, G.C. Allen, W.F. Thompson, S. Spiker, A.K. Weissinger, A tobacco MAR increases transgene expression and protects against gene silencing in the progeny of transgenic tobacco plants, *Plant J.* 18 (1999) 253-263.

40-7 - Ziegler, A.; Ulrich, D.; Weiß, K.; Wilhelm, R.  
Julius Kühn-Institut

### **Stir Bar Sorptive Extraction GC-MS für die Charakterisierung von flüchtigen Inhaltsstoffspektren bei Kartoffel**

Stir Bar Sorptive Extraction GC-MS for the characterization of volatile profiles in potato

Flüchtige Inhaltsstoffe bei Pflanzen (volatile organic compounds;VOC) sind ein bedeutender Faktor bei der direkten und indirekten Abwehr von herbivoren Insekten. Unterschiede in Inhaltsstoffspektren zwischen verschiedenen Genotypen einer Pflanzenart können ausreichend sein, um das Verhalten natürlicher Feinde zu beeinflussen. Daher haben die Phenotypisierung und Aufzeichnung der natürlichen Bandbreite von (flüchtigen) Metaboliten in Kulturpflanzen große Bedeutung. Die Analyse dieser Metaboliten kann Informationen über Stoffe liefern, die anziehend oder abweisend auf Insekten wirken. Sie kann so eine Basis bieten für die Beurteilung der

potentiellen Auswirkungen auf den integrierten Pflanzenschutz, durch gentechnische Veränderungen (z. B. Metabolic engineering) oder konventionelle Züchtungsmethoden.

Für Untersuchungen werden jedoch einfache und effiziente Methoden benötigt, um (anbau-) praxisgerechte Unterschiede zwischen verschiedenen Genotypen und innerhalb von Sorten und Populationen erfassen und bewerten zu können. Die sogenannte SBSE (Stir bar sorptive extraction) wird bereits genutzt, um flüchtige Stoffe in wässrigen Proben (z. B. Bier, Wein, Gewässerproben) zu messen. Wir haben nun die SBSE-Methode auf ihre Anwendbarkeit und Reproduzierbarkeit für die schnelle und Lösungsmittel-freie Messung von flüchtigen Inhaltsstoffen getestet, die von Kartoffelblättern emittiert werden.

40-8 - Cai, D.; Wang, Y.; Knecht, K.; Ye, W.Z.; Menkhaus, J.; Thurau, T.  
Christian-Albrechts-Universität Kiel

### **Gentechnische Resistenz gegenüber sedentären Pflanzenparasitären Nematoden mittels des Chitinase-Gens *PjChi-1* aus dem entomopathogenen Pilz *Paecilomyces javanicus***

Genetic engineering of a broad spectrum resistance to sedentary plant parasitic nematodes by use of a novel chitinase gene, *PjChi-1* from the entomopathogenic fungus *Paecilomyces javanicus*

Sedentäre pflanzenparasitäre Nematoden sind weltweit ökonomisch bedeutsame Schädlinge an Kulturpflanzen. Gene, die für Enzyme mit nematizider Wirkung kodieren, können zur Erzeugung von gentechnischer Nematodenresistenz eingesetzt werden.

Im Rahmen dieses Projekts haben wir das pilzliche Chitinase-Gen, *PjChi-1*, in Zuckerrüben-Wurzeln, in Tomaten- und in Kartoffelpflanzen transferiert. Das erzeugte transgene Material wurde hinsichtlich der Wirkung des Transgens auf die Nematodenentwicklung untersucht. Dazu wurden die transgenen Wurzeln und Pflanzen einem Resistenztest gegenüber Zysten- (*Heterodera schachtii* und *Globodera pallida*) und Wurzelgallen- (*Meloidogyne incognita*) nematoden unterzogen. Die transgenen Wurzeln und Pflanzen wiesen dabei eine hohe Endochitinase-Aktivität und eine signifikante Reduktion der Anzahl der entwickelten Weibchen aller Nematodenarten im Vergleich zur Kontrolle auf. Zudem zeigten die Eier einen auffallenden verringerten Chitingehalt und eine verminderte Schlupffähigkeit. Dies zeigt, dass die Expression von *PjChi-1* in Pflanzen zur Verminderung sowohl von Zysten- als auch Gall-Nematoden führt, was sich durch eine verringerte Eimasse und die Unterdrückung der embryonalen Entwicklung von Nematoden auszeichnet. Obwohl die Wirkungsweise des *PjChi-1*-Gens noch nicht aufgeklärt wurde, zeigen unsere Ergebnisse das Potential des Chitinasegens *PjChi-1* bei der Bekämpfung pflanzenparasitärer Nematoden.

## **Sektion 41 – Integrierter Pflanzenschutz II**

41-1 - Leiminger, J.<sup>1)</sup>; Bahnweg, G.<sup>2)</sup>; Hückelhoven, R.<sup>1)</sup>; Hausladen, H.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Technische Universität München; <sup>2)</sup> Helmholtz Zentrum München

### **Charakterisierung und Differenzierung von *Alternaria solani* an Kartoffeln mittels molekulargenetischer Methoden**

Die Dürffleckenkrankheit zählt weltweit zu einer der wichtigsten Pilzkrankheiten im Kartoffelbau. Als Schaderreger der Dürffleckenkrankheit sind die Pilzarten *Alternaria solani* und *Alternaria alternata* zu nennen. Vor dem Hintergrund einer zunehmenden Ausbreitung und Etablierung der Erreger hat im Verlauf der letzten Jahre die Dürffleckenkrankheit stark an Bedeutung gewonnen. Mehrjährige Untersuchungen belegen, dass die Krankheit auch unter deutschen Anbaubedingungen ertragsschädigend auftritt (Hausladen, 2006). So konnten in Praxisflächen mit stärkerem Befallsdruck Ertragsausfälle von mehr als 30 % aufgezeigt werden (Leiminger, 2008). Die Tatsache der Schadrelevanz erfordert für die deutsche Kartoffelproduktion die Notwendigkeit effektiver Bekämpfungsstrategien. Eine effektive und zielorientierte Bekämpfung setzt eine sichere Diagnose der Erreger voraus. Eine eindeutige Charakterisierung der Erreger anhand der im Feld auftretenden Symptomatik ist problematisch und oft unzutreffend. Neben morphologischen Identifikationsmethoden ermöglichen molekulargenetische Nachweisverfahren eine sichere Diagnose der Erreger, die unabhängig von Symptomausbildung und Sporulation angewendet werden können. So unterstützen erregerspezifische Untersuchungen die Prognose einer auftretenden *Alternaria*-Epidemie. Eine Methode der Differenzierung bietet die PCR-Analyse, wodurch die Erreger anhand artspezifischer DNA-Stücke mit Hilfe spezifischer Primer nachgewiesen werden können (Bahnweg, 1998).