

# ARBEITSBERICHT

Untersuchungen zum Hormon- und Kohlenhydrat-Metabolismus  
in *ro/C* transgenen Aspenklonen und deren mögliche  
Auswirkungen auf phytopathologische Eigenschaften

Arbeitsbericht des Instituts für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung

Nr. 2002/2



**Bundesforschungsanstalt  
für Forst- und Holzwirtschaft**

Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft

Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung

Sieker Landstr. 2

D-22927 Großhansdorf

## **Abschlussbericht**

zum

**Forschungsvorhaben 0312176:**

**Untersuchungen zum Hormon- und Kohlenhydrat-  
metabolismus in *ro/C* transgenen Aspenklonen und deren  
mögliche Auswirkungen auf phytopathologische Eigenschaften**

für den Zeitraum

01.07.1999 bis 30.06.2001

verfasst von:

**Matthias Fladung und Werner Gieffers**

## **Zusammenfassung**

Während des Projektzeitraums wurden von transgenen Aspenklonen und ihren nicht-transgenen Kontrollen in einem Freilandversuch in Großhansdorf mehrmals im Jahr Blätter geerntet und die Konzentration verschiedener Blatinhaltsstoffe bestimmt. Folgende Blatinhaltsstoffe wurden berücksichtigt: Glucose, Fructose, Saccharose, Stärke, sowie verschiedene Phytohormone. Für einige Blatinhaltsstoffe konnten Unterschiede zwischen Kontrollen und transgenen Linien gefunden werden. Diese Unterschiede beziehen sich nicht allgemein auf transgene Aspenlinien, sondern es handelte sich hierbei um eine besondere Beziehung zum verwendeten 35S-*ro/C* Genkonstrukt. Die bei der *ro/C*-Aspe gefundenen Beziehungen bestätigten Ergebnisse, die bereits mit *ro/C*-transgenen Kartoffeln erhalten wurden.

Zur selben Zeit, wie die oben beschriebenen Blattbeerntungen für die Bestimmung von Blatinhaltsstoffen erfolgten, wurden an den transgenen Aspenklonen und ihren nicht-transgenen Kontrollen vergleichende Befallserhebungen der Kronenblätter gemacht. Eingeschätzt wurde der Blattbefall, der hauptsächlich durch den Erreger der Triebspitzenkrankheit *Pollaccia radiosa* und den Erreger des Pappelrostes *Melampsora* spp. verursacht wurde. Pappelrost trat im Beobachtungszeitraum etwas stärker als Blattfleckenbefall auf. Die transgenen Linien zeigten unterschiedliche Resistenzreaktionen. Gegen Pappelrost erwiesen sich zwei transgene Linien als resistenter im Vergleich zur nicht-transgenen Ausgangsform. Diese Linien zeigten zunächst auch gegenüber Blattfleckenenerregern eine Resistenzreaktion, die sie aber im Folgejahr nicht aufwiesen sondern nun hoch anfällig waren. Alle anderen Transformanten zeigten kein Resistenzverhalten.

Befallsprüfungen im Labor mit artifizieller Infektion von *P. radiosa* führten zu signifikant korrelativen Übereinstimmungen mit dem Blattfleckenbefall im Freiland.

Wie die Befallsdaten belegen, konnte im Vergleich zu den nicht-transgenen Kontrollpflanzen in den *ro/C* transgenen Aspen eine signifikante Reduzierung der Basisresistenz beobachtet werden. Der größte relative Verlust an Basisresistenz wurde beim Blattfleckenbefall beobachtet.

Die Pathogenanalysen führten zum Nachweis von elf Erregern und zwei saprophytischen Pilzen, die gleichermaßen an originären wie transgenen Aspen auftraten.

Positive korrelative Zusammenhänge konnten hauptsächlich zwischen der Befallshöhe der Blattfleckenenerreger einerseits und der Menge an Inhaltsstoffen wie Glucose, Fructose und Abscisinsäure andererseits nachgewiesen werden. Der Pappelrostbefall korrelierte mit der Abscisinsäure- und Stärkemenge.

Zusätzliche Beobachtungen zum Rußtau zeigten, dass die nicht-transgenen Kontrollen nur geringe, die transgenen Linien dagegen um ein Mehrfaches größere Rußtaubeläge aufwiesen.

### **Einleitung**

Die Untersuchungen zum Hormon- und Kohlenhydratmetabolismus in *35S-ro/C* und *rbcS-ro/C* transgenen Aspen sowie phytopathologische Erhebungen wurden im Rahmen des vom BMBF-finanzierten Forschungsvorhabens an Pflanzen durchgeführt, die in einem Freilandversuch des Instituts für Forstgenetik in Großhansdorf in den Jahren 1999 und 2000 kultiviert wurden. Bei dem Modellsystem *ro/C*-Aspe sind neben morphologischen Eigenschaften auch physiologische sowie chemische Eigenschaften beeinflusst. Bekannt aus vorhergehenden Untersuchungen mit *ro/C*-transgenen Kartoffeln ist, dass neben einer Reihe verschiedener Phytohormone auch Kohlenhydrate wie Stärke oder auch Mono- und Disaccharide (Glucose, Fructose, Saccharose) in ihren Gehalten verändert sind.

Veränderungen der Kohlenhydratgehalte können Auswirkungen auf phytopathologische Eigenschaften haben. Insbesondere veränderte Mono- und Disaccharidgehalte könnten die Ursache für einen gesteigerten oder verminderten Befall durch phytopathogene Erreger zur Folge haben. An den Kronenblättern der Bäume wurde der Blattfleckenbefall eingeschätzt, der hauptsächlich durch die Erreger der Tribspitzenkrankheit (*Pollaccia radiosa* (Lib.) Bald. & Cif.) und des Pappelrostes (*Melampsora* spp.) verursacht wurde. Exakte Befallsprüfungen erfolgten im Labor mit *P. radiosa* an befallsfreien Aspenblättern der Freiland-Aspen. Darüber hinaus wurden die an Blättern und Zweigen auftretenden Pilze bestimmt. Außerdem wurde das Auftreten von

Rußtaupilzen erfaßt. Zwischen der Befallshöhe sowie den Rußtaubelägen einerseits und den Mengen verschiedener Aspeninhaltsstoffe konnten korrelative Zusammenhänge nachgewiesen werden.

### **Zielsetzung des Forschungsvorhabens**

Das Ziel des Forschungsvorhabens war die Beantwortung der beiden Fragen:

- Können in *roIC* transgenen Aspen Unterschiede im Hormon- und Kohlenhydratmetabolismus nachgewiesen werden?
- Sind die phytopathologischen Eigenschaften bei transgenen Pflanzen verändert und welche Konsequenzen können sich daraus bei entsprechend langlebigen transgenen Pflanzen ergeben?

Als Untersuchungsmaterial standen drei- bis fünfjährige Pflanzen verschiedener transgener Linien aus einem Freilandversuch, die damit den natürlichen Infektionsquellen ausgesetzt sind, sowie Gewächshauspflanzen, die für Infektionsversuche angezogen werden, zur Verfügung.

### **Material und Methoden**

#### **Pflanzenmaterial und Versuchsdesign**

Als Ausgangsmaterial wurden drei Klone von Aspen (*Populus tremula* L.) und Hybridaspens (*P. tremula* x *P. tremuloides* Michx.) ausgewählt. Zwei Klone (Brauna11 und W52) sind artreine Aspen und ein Klon (Esch5) ist eine Arthybride. Für die Herstellung der transgenen Pflanzen wurden zwei Konstrukte (*35S-roIC* und *rbcS-roIC*) verwendet. Von den entstandenen unabhängigen Transformanten wurden acht ausgewählt, die jeweils eine Kopie des übertragenen Konstrukts trugen. Die Transformanten wurden *in vitro* vermehrt, so dass von jeder transgenen Linie mindestens 32 transgene Pflanzen erhalten wurden. Eine transgene Linie ist also ein Klon. Die acht transgenen Linien wurden mit Hilfe der folgenden Konstrukte von den folgenden Ausgangsklonen hergestellt.

Insgesamt standen 338 transgene, fünfjährige Aspenpflanzen und 136 Kontrollpflanzen in einer Blockanlage (mit vier Wiederholungen) auf etwa 1500 qm zur Verfügung. Nicht-transformierte Ausgangsklone waren mit gleicher Pflanzenzahl (4x8=32) wie transgene Linien in der Versuchsanlage vorhanden. Bei der Anlage des Versuchs waren die Pflanzen einjährig und hatten Pflanzenhöhen von ca. 20 bis 120 cm. Bedingt durch Mortalität oder Entfernen von Pflanzen aufgrund der Ausbildung von Blütenknospen waren 2000 nur noch etwa 280 transgene Pflanzen vorhanden.

Die transgenen Klone wurden wie folgt benannt: Esch5:35S-*rolC*#1, -#3, -#5, -#16 = E2-1, E2-3, E2-5, E2-16; Esch5:rbcS-*rolC*#4, -#18 = E14-4, E14-18; Brauna11:35S-*rolC*#2 = B2-2; W52:35S-*rolC*#2 = W+2-2.

#### Beerntung und Analyse der transgenen Pflanzen

Für die Zucker- und Stärkeanalysen wurden Blätter von transgenen Aspen und Kontrollpflanzen im Juli und August 1999 sowie im Juni, Juli und September 2000 abgenommen und direkt in flüssigem Stickstoff überführt. Eine Einschätzung des Krankheitsbefalls der Pflanzen wurde zu den gleichen Zeitpunkten vorgenommen. Dabei wurde im wesentlichen der Pappelrost (*Melampsora* spp.) und der Erreger der Blattfleckenkrankheit (*Pollacia radiosa*) festgestellt. Nach Ausbildung der Abschlussknospen Anfang bis Mitte August 1999 wurde am 26.08.1999 ein vorzeitiger Neuaustrieb bei nur 35S-*rolC* transgenen Pflanzen beobachtet. Da die Blätter keine Pilzinfektionen aufwiesen, war eine gute Gelegenheit gegeben, infektionsfreies Blattmaterial für die Zuckeranalysen zu gewinnen. Weitere Beerntungen zu einem späteren Zeitpunkt waren im Jahr 1999 und 2000 aufgrund des teilweise sehr hohen Pilzbefalls nicht mehr möglich. Ebenfalls wurde Blattmaterial für Hormonuntersuchungen geerntet.

Da 35S-*rolC* transgene Aspen zu kleine Blätter haben, war es leider nicht möglich, wie ursprünglich vorgesehen, von jeder Pflanze ein Blatt zu ernten und jeweils ein Drittel für Untersuchungen des Hormon- und Kohlenhydratgehalts sowie für Inokulationsexperimente mit pilzlichen Erregern zu verwenden. Daher wurde von den 35S-*rolC* transgenen Aspen etwa zwölf Blätter pro Baum

geerntet, während von den *rbcS-roC* und Kontrollpflanzen zwei Blätter ausreichten.

### Bestimmung von Blattinhaltsstoffen

#### *Mono- und Disaccharide*

Die geernteten Blattproben wurden lyophilisiert und gemörsert. Genau 0,05 g dieser Probe wurde mit 5 ml bidestilliertem Wasser versetzt und gründlich vermischt. Nach Extraktion der Zucker in einem 58°C heißen Wasserbad und nach Zentrifugation wurde der wässrige Überstand abgenommen. Mit Hilfe eines enzymatischen Tests (Boehringer Mannheim) wurden die Gehalte der Saccharose, Glucose und Fructose bestimmt.

#### *Stärke*

Die Proben für die Stärkebestimmung wurden wie die für die Mono- und Disaccharidbestimmungen geerntet, lyophilisiert und mit Hilfe eines enzymatischen Tests (Boehringer Mannheim) untersucht.

#### *Phytohormone*

Folgende Phytohormone wurden bestimmt: Abscisinsäure (ABA), Isopentenyladenosin (IPA), Dihydrozeatinribosid (DHZR), *trans*-zeatin (ZR), Indolessigsäure (IES), Gibberellinsäure (GA1). Die Bestimmung der Hormone wurde freundlicherweise von Dr. K. Großmann (BASF Limburgerhof) durchgeführt. Für die Bestimmung des ABA-Gehalts wurde zusätzlich das Abscisinsäure-Bestimmungs-Kit von der Firma Sigma verwendet.

### Phytopathologische Untersuchungen

#### *Freilandbonituren*

Bonitiert wurde der Blattbefall der Baumkronen. Die Triebspitzenkrankheit befällt sowohl Zweige als auch Blätter und bildet an Blättern Befallssymptome, die sich vom Pappelrost klar unterscheiden. Während *P.radiosa* nekrotische Blattflecken von schwarzbrauner Farbe hervorruft, sind Blätter vom Pappelrostbefall gelb bis orange-gelb verfärbt. Das Auftreten beider

Befallsbilder wurde für die Laubkrone eines jeden Baumes prozentual eingeschätzt.

Die unteren Kronenblättern der Aspen des Freilandversuchs wurden für den Befallstest im Labor verwendet. Von allen Linien wurden an befallenen Blatt- und Zweigproben Pathogene isoliert und bestimmt.

### *Laboruntersuchungen*

**Isolate:** Für die Befallsprüfungen im Labor standen vier Isolate von *P. radiosa* zur Verfügung. Herkunft und Eigenschaften dieser Isolate sind in Tab. 1 zusammengestellt. Zwei Isolate (Pol0 und PolB) konnten für Infektionszwecke nicht genutzt werden, weil eine Konidienbildung bei ihnen nicht beobachtet werden konnte. Dagegen bildeten die Isolate PolA und PolC Konidien und erwiesen sich als pathogen. Unterschiede in der Pathogenität waren nicht erkennbar.

Tab. 1: Isolate von *Pollaccia radiosa*

Bezeichnung	Herkunft	radiales Myzelwachstum mm/d	Konidienbildung
Pol0	DSMZ Braunschweig 1999	1,14	nein
PolA	Kahler Asten, 09. 06.1999	1,57	ja
PolB	Kahler Asten, 09. 06.1999	1,43	nein
PolC	Kahler Asten, 09. 06.1999	2,43	ja

Auf Grund des stärkeren Myzelwachstums wurde das Isolat PolC für die Befallsprüfungen im Labor verwendet.

**Konidienbildung:** Die Konidienbildung von *Pollaccia radiosa* für die beabsichtigten Befallsprüfungen im Labor konnte methodisch etabliert werden. Unter den getesteten Medien gelang die Konidienbildung nur mit SN-Agar (SNA, Nierenberg 1976). Allerdings wurden die Konidien innerhalb der Agarschicht gebildet, was für den Erregernachweis ausreichend aber für die Gewinnung eines Inokulums kaum brauchbar war. Die Erzeugung von Konidien



gelang schließlich auch außerhalb des SNA-Mediums, wenn die Medienoberfläche ständig mit einer dünnen Wasserschicht für drei- bis vier Wochen bedeckt blieb. Nach dieser Zeitdauer hatten sich Konidien gebildet, die sich in der Wasserschicht befanden. Mit dieser Methode konnten aber nicht mehr als 50 000 Konidien/ml erreicht werden, was für Infektionszwecke nicht ausreichte. Wesentlich höhere Konidienmengen wurden in einer SN-Lösung nach folgendem Verfahren erzielt. Ein sporulierendes Agarstück von wasserbeschichteten SNA-Platten wurde als Inokulum für die SN-Lösung benutzt. Nach drei bis vier Wochen hatte sich auf der Oberfläche der SN-Lösung eine Myzelschicht mit hoher Konidiendichte gebildet. Jetzt konnten Inokulationssuspensionen mit 500 000 Konidien/ml erzeugt werden. Die Herstellung ausreichender Konidienmengen dauerte somit sechs bis acht Wochen.

**Inokulation:** Da von den sporulierenden Isolaten zunächst nur ungenügende Konidienmengen gewonnen werden konnten, wurde eine Infektion von Aspenblättern mit zerkleinertem und in Wasser suspendiertem Myzel aller Isolate versucht. Myzelsuspensionen erwiesen sich aber in allen Tests als nicht wirksames Inokulum; es konnte in keinem Fall eine Blattinfektion beobachtet werden. Die Verwendung von Konidien-Wassersuspensionen führte dann zu erfolgreichen Infektionen.

Methodische Befallsprüfungen wurden mit Konidiensuspensionen von 1000, 2000, 3000 und 5000 Konidien/20µl gemacht. Mit allen Konidiendichten gelang die Infektion von Aspenblättern, aber nach einer leichten Befallszunahme innerhalb der ersten 14 Tage Inkubation stagnierte die weitere Symptomentwicklung. Beziehungen zwischen inokulierter Konidienmenge und der Befallshöhe waren unter diesen Bedingungen nicht erkennbar.

Um ein Fortschreiten der Krankheitsentwicklung auf den Blättern zu erreichen, wurden, orientiert nach dem Befallsgeschehen unter natürlichen Bedingungen, die inokulierten Aspenblätter in zweitägigem Abstand mit einer definierten Menge Wasser besprüht, so dass auf der Blattoberfläche ein ständiger Wasserfilm realisiert wurde. Unter diesen Bedingungen konnte nun eine fortschreitende Syptomausprägung beobachtet werden. Die Verwendung einer

Inokulumsdichte von ca. 10 000 Konidien/20µl, eine Inkubationszeit von 34 Tagen, die Aufrechterhaltung eines Wasserfilms auf Blättern und Blattscheiben und eine Temperatur von 10°C führte zu einer praktikablen und zuverlässigen Infektionsmethode im Labor. Unter dieser Temperatur blieben die Blätter während der Inkubation bis zur Bonitur grün. Höhere Temperaturen bedingten ein baldiges Vergilben der Blätter und Blattscheiben und beeinträchtigte die Bonitur. An vergilbtem Material war eine Einschätzung der Resistenzwirkung nicht mehr eindeutig. Temperaturen unter 10°C verzögerten die Symptomentwicklung.

**Befallstests:** Für die erforderlichen Blattbefallsprüfungen im Labor wurden vom Aspenfreilandversuch in Großhansdorf befallsarme Laubzweige aus dem unteren Kronenbereich entnommen, deren Blätter für den Test verwendet wurden. Da die transgenen Aspen im Feldversuch nur wenige Zweige im Vergleich zu den nicht-transgenen Aspen gebildet hatten und etliche Transformanten bereits abgestorben waren, war die Entnahme von Pflanzenmaterial limitiert. Von jeder Parzellenummer wurden daher von einem Baum nur ein bis zwei Zweige entnommen, von dem acht grüne, symptomlose Blätter für die Pilzbefallsprüfungen verwendet wurden. Die Befallsprüfungen wurden im Labor mit der Methodik der Quantitativen Resistenzprüfung an 8x8 Blattscheiben je Linie durchgeführt (Gieffers et al. 1999). Die Blattscheiben wurden in transparenten Infektionsschalen mit einer Einrichtung zur Dauerbewässerung unter definierten Bedingungen inokuliert und inkubiert.

**Biometrie:** Die Befallsdaten im Freiland wurden durch prozentuale Einschätzung von Blattbefallssymptomen der Baumkronen gewonnen. Die Einschätzung erfolgte mit der Iterativen Bonitur (Gieffers et al. 1999). Mit diesem Verfahren kann eine große Bandbreite von Merkmalen unter ganz unterschiedlichen Bedingungen eingeschätzt werden. Nach der Festlegung des zu bonitierenden Merkmals und der Festsetzung der Krone mit 100% als Vergleichsbasis wird zunächst ermittelt, ob das Auftreten des Merkmals größer oder kleiner 50% ist. In Abhängigkeit von diesem Ergebnis wird weiter gefragt, ob das Merkmal mit größer oder kleiner 25 oder 75% eingeschätzt werden

kann. Dieser iterative Boniturvorgang wird bis zur definitiven Befallseinschätzung fortgesetzt und ermöglicht eine zutreffende Befallsermittlung mit einem Boniturfehler  $< 5\%$ .

Ebenfalls wurden die durch Inokulation induzierten Befallsmerkmale der Laborprüfungen mit der o.g. Iterativen Bonitur eingeschätzt.

Die Kalkulation der Befallsdaten wurde mit dem Statistikprogramm SPSS durchgeführt. Von allen angegebenen Mittelwerten von Blattinhaltsstoffen und Blattbefall wurden die Signifikanzen der Mittelwerte ( $p < 0,05$ ) berechnet. In die Abbildungen wurden die Signifikanzen nicht mit aufgenommen, können aber bei Bedarf angefordert werden.

## **Durchführung und Ergebnisse**

### **(I) Bestimmung von Blattinhaltsstoffen**

Die Ergebnisse zu Saccharose-, Fructose- und Glucose- sowie Stärkegehalt der Blätter von *35S-ro/C* und *rbcS-ro/C* transgenen Zitterpappeln und deren Kontrollen wurden für die verschiedenen Erntetermine 1999 (22./28.07., 05.08., 26.08.) und 2000 (05.06., 24.07., 25.09.) erhalten. Es wird versucht, für die verschiedenen Zuckerkomponenten (1) einen Jahreszyklus zu erstellen, und (2) einen Vergleich zwischen zwei Jahren zu ziehen. Für die angegebenen Mittelwerte ist ein Standardfehler (S.E.) errechnet worden. Eine statistische Verrechnung der Ergebnisse hinsichtlich Korrelationen und Varianzen wurde durchgeführt.

#### **1. Mono- und Disaccharide**

Insgesamt wurden mehrere Tausend Einzelproben für die Untersuchungen zu den Mono- und Disaccharidgehalten in den Blättern geerntet. Für jede Blattprobe wurden zwei bis fünf Einzelmessungen durchgeführt. Die erhaltenen Werte der Einzelmessungen schwankten um etwa 10 bis 60%. Von allen Wiederholungen der Messungen pro Baum wurde ein Mittelwert gebildet. Jeder Mittelwert fließt als Einzelwert in die Berechnung des Mittelwertes für die transgene Linie insgesamt pro Messtermin ein. Unterschiede im Mono- und Disaccharidgehalt in Blättern zwischen *35S-ro/C* transgenen Pflanzen einerseits und *rbcS-ro/C* transgenen und Kontrollpflanzen andererseits konnten

festgestellt werden. Bei den *35S-ro/C* transgenen Aspen ist zwischen den *Esch5*-transgenen und den *Brauna11*- sowie *W52*-transgenen zu unterscheiden.

### *Esch5-transgene Zitterpappeln*

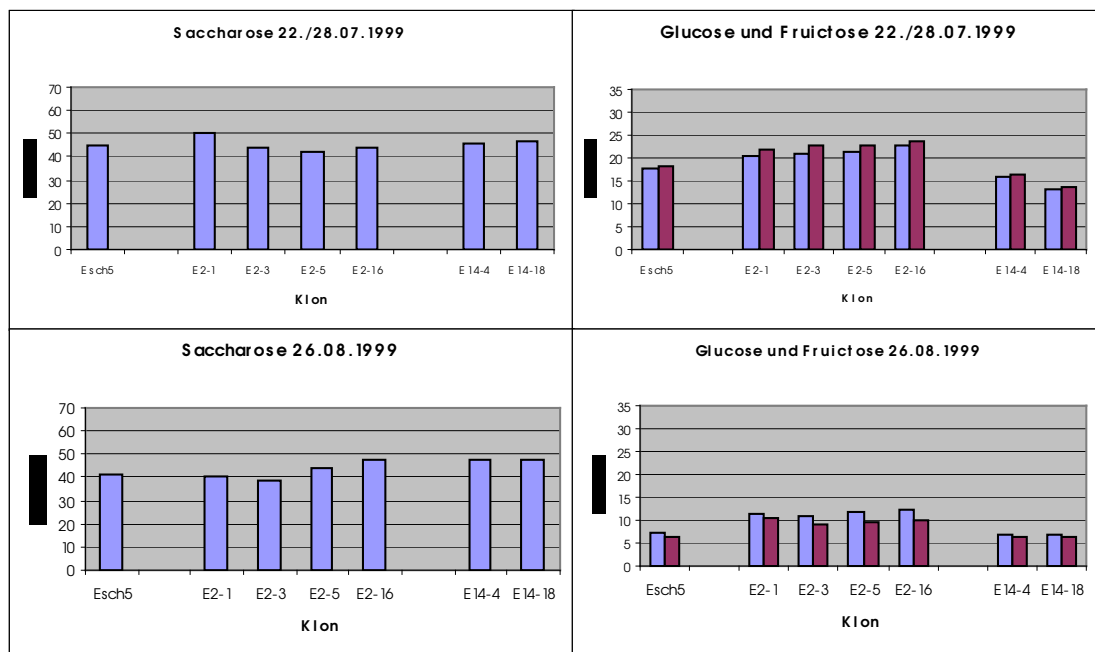
#### **1999 (Abb. 1)**

Eine erste Ernte von Blattmaterial wurde Ende Juli vorgenommen. Eine Bestimmung der Saccharosegehalte ergab, dass bei allen untersuchten Linien (*Kontrolllinie Esch5*, *35S-ro/C* und *rbcS-ro/C* transgene Aspenlinien) Werte erhalten wurden, die zwischen 42 und 50 mg/gTG schwanken. Eine Bestimmung der Saccharosegehalte bei Blättern Ende August ergab, dass auch zu diesem Erntezeitpunkt alle Linien gleich hohe Saccharosegehalte aufwiesen, die zwischen 36 und 60 mg/gTG variieren.

Dagegen fanden sich zu beiden Ernteterminen für *35S-ro/C* transgene Aspen hinsichtlich der Glucose und Fructosegehalte höhere Werte im Vergleich zur nicht-transgenen *Kontrolllinie*. Auffällig ist, dass Ende August bei allen Linien eine Abnahme der Monosaccharidgehalte verglichen mit der Juli-Messung zu beobachten war. Die *rbcS-ro/C* transgenen Aspen dagegen wiesen zu beiden Ernteterminen gleiche bzw. leicht erniedrigte Monosaccharidgehalte im Vergleich zur nicht-transgenen *Kontrolllinie* auf.

Zusätzlich wurde Ende August 1999 nur bei den *35S-ro/C* transgenen Linien ein verfrühter Neuaustrieb aus bereits angelegten Ruheknospen beobachtet. Von diesen Trieben wurden auch Blätter geerntet und Bestimmungen der Saccharose-, Glucose- und Fructosegehalte durchgeführt. Hierbei ist somit nur ein Vergleich zu den zum selben Zeitpunkt geernteten Blättern der *35S-ro/C* transgenen Linien möglich. Erstaunlicherweise wurden Saccharosekonzentrationen gefunden, die bei allen untersuchten Blättern niedriger als die der Monosaccharidgehalte Glucose und Fructose waren.

Abb. 1: Bestimmungen von Saccharose, Glucose und Fructose in Blättern des Klons Esch5 und von aus diesem abgeleiteten Transformanten zu zwei Ernteterminen in 1999



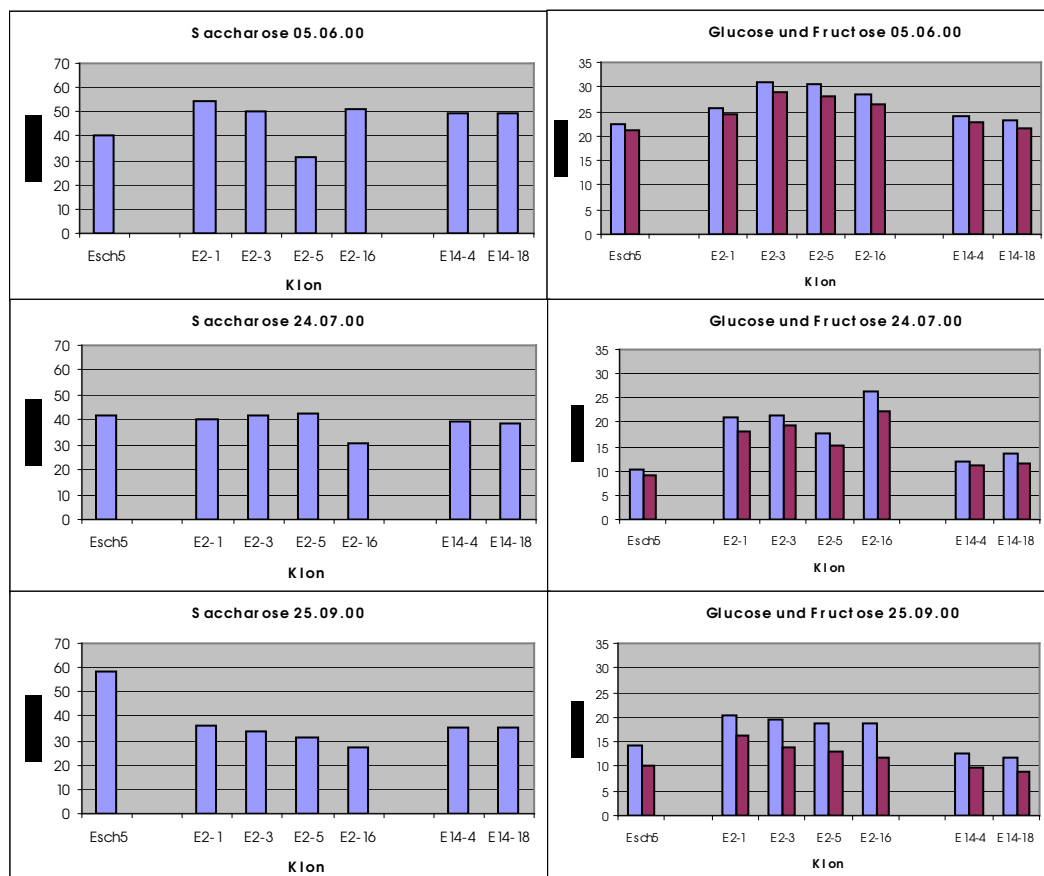
## 2000 (Abb. 2)

Bei den *35S-ro/C* transgenen Aspen wurden verglichen mit der Kontrolllinie Esch5 Anfang Juni mit Ausnahme von E2-1 erhöhte Saccharosegehalte zu beobachtet, während Ende Juli etwa gleiche und Ende September niedrigere Werte gefunden wurden. Ähnlich stellte sich die Situation für beide *rbcS-ro/C* transgenen Aspenlinien dar. Im Jahresverlauf verringerte sich bei *35S-ro/C* transgenen Aspen der Saccharosegehalt von etwa 50 mg/gTG Anfang Juni über 40 mg/gTG Ende Juli auf 30 mg/gTG Ende September. Dagegen zeigte die Kontrolllinie in den Blättern im Jahresverlauf zunächst einen gleichbleibenden Saccharosegehalt von etwa 40 mg/gTG Anfang Juni und Ende Juli, stieg aber auf etwa 58 mg/gTG Ende September an.

Bei den *35S-ro/C* transgenen Aspen wurden verglichen mit der Kontrolllinie zu allen drei Messzeitpunkten erhöhte Glucose und Fructosegehalte gefunden. Dagegen zeigten die *rbcS-ro/C* transgenen Zitterpappeln zu allen drei Ernteterminen gleiche Monosaccharidgehalte, wie sie bei den Kontrollpflanzen gefunden wurden. Im Verlauf des Jahres 2000 wurde ebenfalls wie bereits für 1999 berichtet eine absolute Abnahme des Monosaccharidgehalts in allen Linien gefunden.

Interessant ist innerhalb eines Jahres der zwischen nicht-transgenen Kontrolllinien und den *35S-ro/C* transgenen Aspen gefundene unterschiedliche Verlauf des Saccharosegehalts auf der einen und der Monosaccharide Glucose und Fructose auf der anderen Seite.

Abb. 2: Bestimmungen von Saccharose, Glucose und Fructose in Blättern des Klons Esch5 und von aus diesem abgeleiteten Transformanten zu drei Ernteterminen in 2000



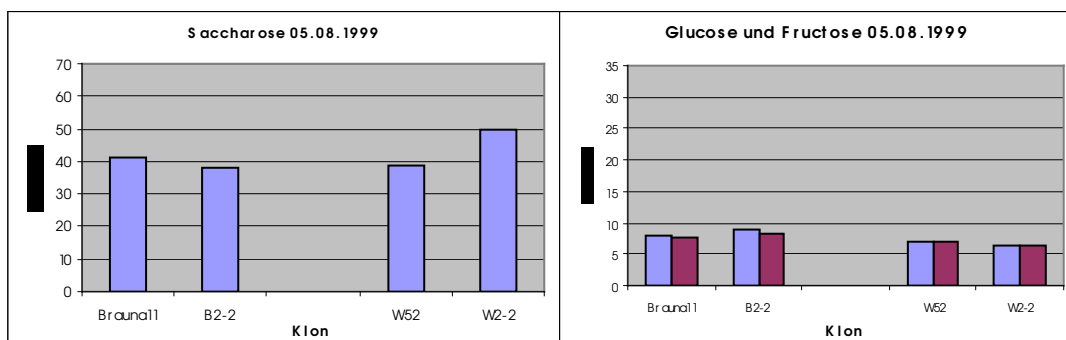
### *W52 und Brauna11-transgene Zitterpappeln (Abb. 3, 4)*

Im Jahr 1999 wurde aus Kapazitätsgründen nur einmal Blattmaterial (05.08.) für Mono- und Disaccharidmessungen geerntet, während im Jahr 2000 zu den gleichen Zeitpunkten (05.06., 24.07., 25.09.) wie bei den Esch-transgenen Linien Blattmaterial geerntet wurde. Für die Bewertung der *35S-ro/C* transgenen Linien der beiden Genotypen muss beachtet werden, dass zum Zeitpunkt der Probenahmen bei W52 nur noch zwei (1999) bzw. eine (2000) kleinblättrige W2-2 Pflanze existierte, während bei der *35S-ro/C* transgenen Linie B2-2 phänotypisch zwei unterschiedliche Gruppen (acht kleinblättrige

Pflanzen sowie 24 Pflanzen mit größeren Blättern) unterschieden werden konnte. Zum Zeitpunkt der Probennahmen waren jedoch keine kleinblättrigen *35S-ro/C* transgenen Pflanzen mehr vorhanden.

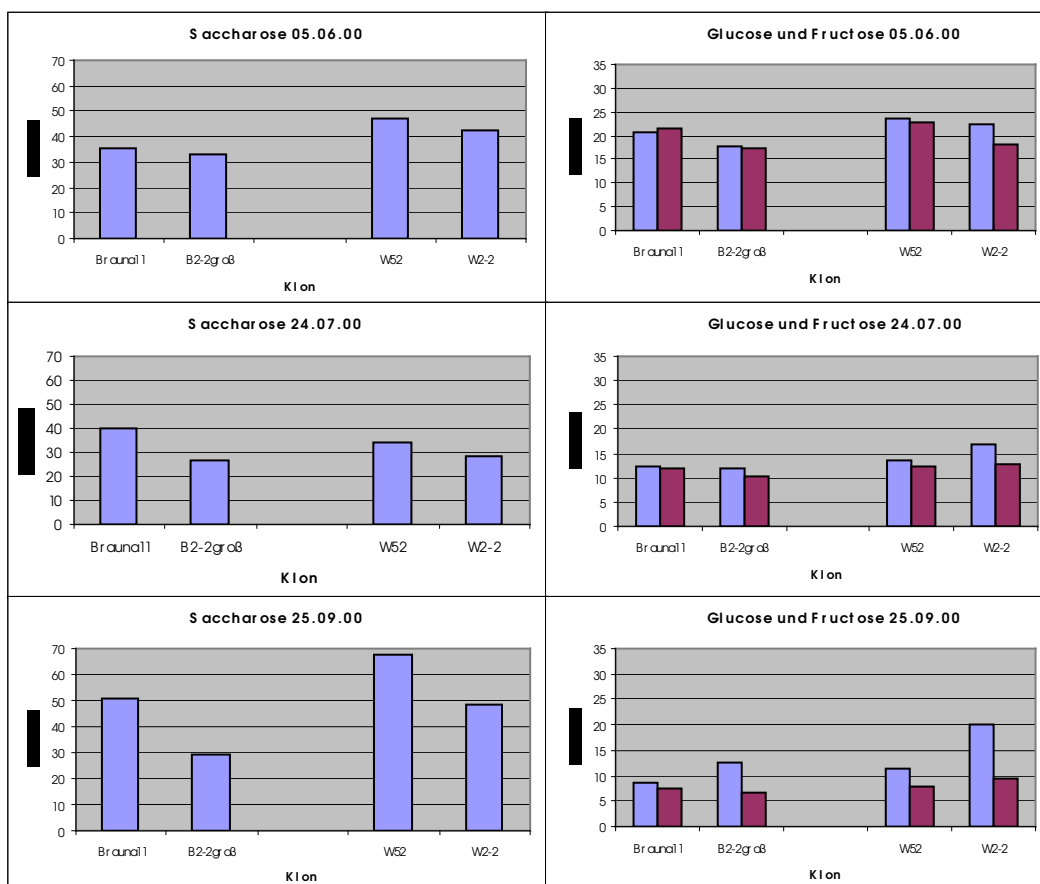
Die Saccharose- sowie Glucose- und Fructosegehalte der transgenen Linien Anfang August 1999 ist vergleichbar mit denen der Kontrolllinien, auch wenn für W2-2 ein höherer Saccharosegehalt vermutet werden kann (Abb. 3). Dieses Ergebnis kann auch für Anfang Juni 2000 bestätigt werden (Abb. 4). Dagegen war Ende Juli sowie Ende September 2000 bei den Kontrolllinien ein steigender Saccharosegehalt, bei den *35S-ro/C* transgenen Linien von Brauna11 (B2-2) und W52 (W2-2) ein gleichbleibender Saccharosegehalt zu bemerken. Als Konsequenz divergieren die Gehalte zwischen Kontrolllinie und *35S-ro/C* transgener Linie zunehmend (Abb. 4).

Abb. 3: Bestimmungen von Saccharose, Glucose und Fructose in Blättern der Klone Brauna11 und W52 und von aus diesen abgeleiteten Transformanten zu einem Erntetermin in 1999



Für die Glucose- und Fructosegehalte lassen sich für das Jahr 2000 folgende Ergebnisse zusammenfassen. Anfang Juni fanden sich relativ hohe Monosaccharidgehalte, die zwischen Kontrolllinie und *35S-ro/C* transgener Linie gleich waren. Die Gehalte beider Monosaccharide sanken im Verlauf des Jahres (siehe Messwerte für Ende Juli und Ende September 2000). Die Abnahme war bei den *35S-ro/C* transgener Linien stärker als bei den nicht-transgenen Kontrolllinien.

Abb. 4: Bestimmungen von Saccharose, Glucose und Fructose in Blättern der Klone Brauna11 und W52 und von aus diesen abgeleiteten Transformanden zu drei Ernteterminen in 2000



## 2. Stärke

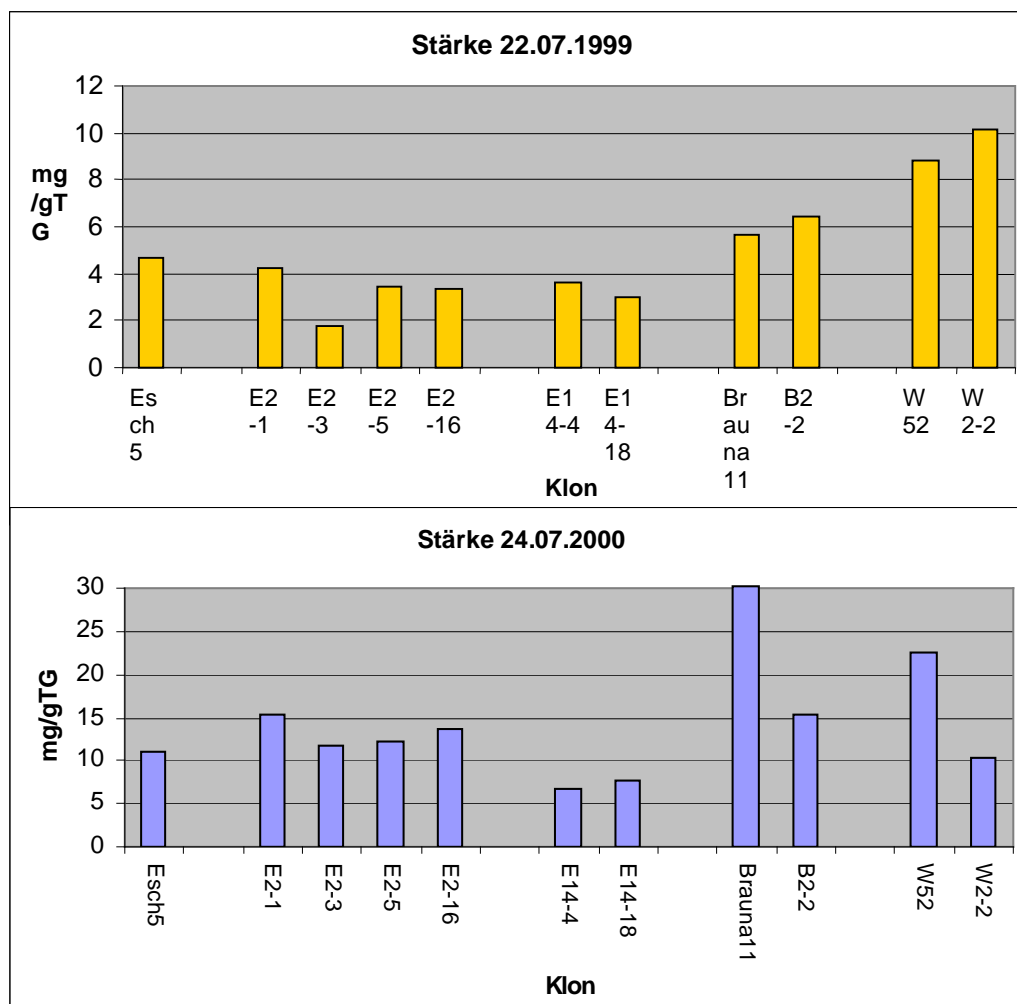
Wie für die Mono- und Disaccharidbestimmungen wurde für die Bestimmung des Stärkegehalts Blattmaterial geerntet und lyophilisiert. Jede Probe wurde separat aufgeschlossen, und jede Messung pro Einzelprobe wurde zwei bis viermal wiederholt und zu einem Mittelwert zusammengezogen. Jeder Mittelwert fließt als Einzelwert in die Berechnung des Mittelwertes für die transgene Linie insgesamt pro Messtermin ein.

Im Jahr 1999 wurden am 22.07. Proben für die Stärkebestimmung gewonnen. Die nicht transformierte Linie Esch5 wies einen Blattstärkegehalt von 4,6 mg/gTG auf, während die 35S-*ro/C* transgenen Esch5-Linien durchweg einen geringeren Stärkegehalt zeigten (Abb. 5). Ein gleiches Ergebnis ist für die *rbcS-ro/C*-transgenen Esch5-Linien festzustellen. Dagegen wiesen die nicht-transgenen Brauna11- und W52-Klone höhere Stärkegehalte in den Blättern



auf. Interessant ist, das die 35S-*ro/C*-transgenen Linien dieser Klone entgegen der Ergebnisse bei den 35S-*ro/C* transgenen Esch5-Linien höhere Stärkegehalte als die entsprechenden Kontrollen zeigten.

Abb. 5: Bestimmungen der Stärke in Blättern der Klone Esch5, Brauna11 und W52 und von aus diesen abgeleiteten Transformanten zu je einem Erntetermin in 1999 und 2000



Die Ergebnisse der Stärkemessungen im Jahr 2000 unterscheiden sich von denen aus dem Jahr 1999 (Abb. 5). Dabei wiesen die 35S-*ro/C*-transgenen Linien höhere Stärkegehalte als die nicht transformierte Kontrolle Esch5 auf, während die *rbcS-ro/C* transgenen Linien genau wie 1999 niedrigere Werte zeigten. Umgedreht hat sich das Bild auch für die Brauna11- und W52-Linien. Im Jahr 2000 zeigten beide 35S-*ro/C* transgene Linien niedrigere Stärkegehalte

als die entsprechenden Kontrollen. Anzumerken ist auch, dass alle Linien im Jahr 2000 über höhere Stärkegehalte als 1999 in den Blättern verfügten.

Für eine Beurteilung der Ergebnisse hinsichtlich klimatischer Begebenheiten sind in Tabelle 2 Wetterdaten aus der gesamten Projektlaufzeit zusammengestellt. Aus stündlich erhobenen Daten wurden Tagesmittelwerte gebildet, aus denen wiederum die Mittelwerte für jeden Monat errechnet wurden.

Tab. 3: Monatsmittelwerte von stündlich erhobenen Wetterdaten [Niederschlag (mm), relative Luftfeuchte (%), Lufttemperatur in 2 Meter Höhe (°C), die Bodentemperatur in 5 cm sowie in 20 cm Tiefe (°C) sowie Strahlungswerte (W/m<sup>2</sup>)] während der gesamten Projektlaufzeit (01.07.1999 bis 30.06.2001) gemessen im Arboretum des Instituts für Forstgenetik, Großhansdorf. Werte vom Februar beider Jahre fehlen.

Jahr	Monat	Niederschlag mm	Luftfeuchte RH%	Lufttemp2m °C	Bodtemp5c m °C	Bodtemp20cm °C	Strahlung W/m <sup>2</sup>
1999	Juli	0,69	69,06	19,09	19,08	18,30	118,45
	August	2,18	72,13	17,54	18,13	17,82	89,43
	September	1,16	73,67	17,52	16,99	16,82	84,47
	Oktober	1,33	83,61	9,52	11,12	11,54	39,15
	November	1,23	88,80	4,79	6,47	6,96	17,49
	Dezember	6,81	89,16	3,05	3,76	4,06	7,11
2000	Januar	1,33	91,73	4,10	3,85	3,89	6,76
	Februar	-	-	-	-	-	-
	März	0,95	83,38	5,18	6,53	6,40	31,66
	April	1,02	74,03	10,00	9,13	8,62	71,25
	Mai	1,18	67,97	14,45	14,07	13,56	111,89
	Juni	2,19	71,30	15,97	16,27	15,62	101,33
	Juli	1,81	76,61	15,64	16,88	16,34	78,12
	August	2,35	75,06	16,85	17,19	16,97	76,82
	September	2,14	82,40	13,65	14,56	14,64	40,54
	Oktober	1,37	85,03	10,80	11,68	11,90	23,76
	November	1,17	86,00	6,63	7,83	8,21	9,46
	Dezember	1,84	88,16	3,40	5,25	5,74	4,27
2001	Januar	1,08	92,23	1,04	2,38	2,77	4,20
	Februar	-	-	-	-	-	-
	März	2,15	80,69	3,35	3,60	3,59	22,95
	April	2,08	77,43	7,15	7,15	6,79	39,36
	Mai	0,20	69,68	13,62	12,82	12,02	77,73
	Juni	0,85	74,37	14,10	14,95	14,28	78,69

Beispielhaft für den gesamten Versuchszeitraum sind Tagesmittelwerte von den Wetterdaten, die im Juli 1999 und 2000 erhoben wurden, in Tabelle 3 zu

finden. Für jeden Tag sind Tagesmittelwerte für Niederschlag (mm), relative Luftfeuchte (%), Lufttemperatur in 2 Meter Höhe (°C), die Bodentemperatur in 5 cm sowie in 20 cm Tiefe (°C) sowie Strahlungswerte (W/m<sup>2</sup>) ausgewiesen.

Tab. 3: Mittelwerte von stündlich erhobenen Wetterdaten [siehe Tab. 2] aus dem Juli 1999 und Juli 2000 gemessen im Arboretum des Instituts für Forstgenetik, Großhansdorf.

Juli 1999						
	mm	RH%	°C	°C	°C	W/m <sup>2</sup>
Datum	Niederschlag	Luftfeuchte	Lufttemp2m	Bodtemp5cm	Bodtemp20cm	Strahlung
01.07.99	0,4	75	14,9	17,3	16,2	90,2
02.07.99	0	74	15,2	17,3	16,3	82,7
03.07.99	0	77	15,3	17,2	16,4	134,1
04.07.99	0	69	16,2	19,4	17,4	147
05.07.99	0	72	16,4	20,1	18,2	130,1
06.07.99	0	73	16,6	20,5	18,9	97,1
07.07.99	0	77	17	18,9	18,4	57,7
08.07.99	0	75	17	18,4	18	108,3
09.07.99	0,5	65	17	18,5	17,9	163,6
10.07.99	0	62	17,3	18,8	18,1	170,3
11.07.99	0	65	17,4	19,7	18,5	172
12.07.99	0	65	17,9	20,5	19	151,4
13.07.99	0	65	18	21,3	19,6	127,2
14.07.99	7,9	86	18,1	20,9	19,8	71,5
15.07.99	0,2	68	18,2	18,9	19	94,8
16.07.99	4,4	77	18,7	18,2	18,3	111,3
17.07.99	0,1	72	19,2	18,6	18,1	102
18.07.99	0	70	19,3	19,4	18,5	135,5
19.07.99	0	61	19,8	20,6	19,2	147,4
20.07.99	3,9	69	20,3	21,1	19,7	110,9
21.07.99	1,6	73	20,3	20,7	19,8	95,6
22.07.99	0,4	64	20,4	18,8	19,1	57,4
23.07.99	1,9	81	20,4	17,6	18	57,4
24.07.99	0	71	21,3	17,9	17,8	98,5
25.07.99	0	71	22	19,2	18,3	123,1
26.07.99	0	66	22,2	19,2	18,5	102,2
27.07.99	0	67	22,2	17,9	18	135,2
28.07.99	0	65	22,6	17,9	17,8	160,9
29.07.99	0	60	22,8	18,4	17,9	160,4
30.07.99	0	56	23,6	18,9	18,1	145,7
31.07.99	0	50	24,1	19,3	18,4	130,6
<b>Juli-Mittelwerte</b>	<b>0,69</b>	<b>69,06</b>	<b>19,09</b>	<b>19,08</b>	<b>18,30</b>	<b>118,45</b>

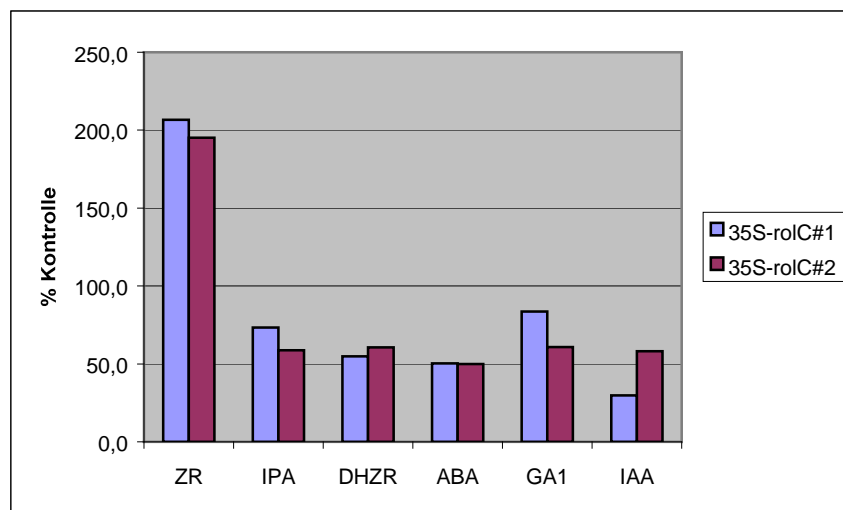
Juli 2000						
	mm	RH%	°C	°C	°C	W/m <sup>2</sup>
Datum	Niederschlag	Luftfeuchte	Lufttemp2m	Bodtemp5cm	Bodtemp20cm	Strahlung
01.07.00	0	69	12,4	15,1	14,7	106,4
02.07.00	0	65	12,8	16,8	15,5	145,8
03.07.00	0	68	13,1	17,9	16,5	137
04.07.00	0	67	13,5	18,7	17,3	141,6
05.07.00	4,7	75	13,5	18,7	17,6	89,6
06.07.00	0	72	13,7	18	17,5	69,6
07.07.00	0	66	13,8	17	16,8	80,5
08.07.00	2,1	82	14,1	16,2	16,3	79,1
09.07.00	2,2	84	14,2	16,1	16,1	47,9
10.07.00	3,6	79	14,3	16,3	16	74
11.07.00	2,3	80	14,3	16,4	16	73,9
12.07.00	8,7	87	14,4	16,1	15,9	44
13.07.00	0	70	14,6	16,2	15,8	99,1
14.07.00	2,4	83	14,7	16,7	16,1	65,8
15.07.00	0	74	15,1	16,3	15,9	90,2
16.07.00	0	70	15,1	16,5	16	122,6
17.07.00	0	80	15,1	16,2	16,1	40,9
18.07.00	1,6	81	15,5	16	15,8	37,7
19.07.00	0,5	81	15,9	15,8	15,6	43,6
20.07.00	0	75	16	15,7	15,5	48
21.07.00	0,1	80	16,6	16,1	15,6	72,2
22.07.00	0,2	75	16,8	17	16	86,6
23.07.00	0	78	17	16,8	16,2	84,4
24.07.00	0	67	17,1	17,1	16,3	117,2
25.07.00	11,3	82	17,7	17,6	16,7	49,5
26.07.00	0	73	18	18,1	17,1	105,7
27.07.00	0	81	18,5	18,1	17,4	56,7
28.07.00	13,4	94	18,6	17,5	17,1	27,1
29.07.00	2,6	81	18,8	17,5	17	67,2
30.07.00	0	78	19,5	17,4	17	42,8
31.07.00	0,4	78	20	17,4	17	75,1
<b>Juli-Mittelwerte</b>	<b>1,81</b>	<b>76,61</b>	<b>15,64</b>	<b>16,88</b>	<b>16,34</b>	<b>78,12</b>

Ein Vergleich der Monatsmittelwerte zeigt, dass der Juli im Jahr 2000 feuchter und kühler sowie mit einer geringeren Einstrahlungsintensität ausfiel als im Vorjahr. Inwieweit die gefundenen klimatischen Unterschiede zum Beispiel die erhaltenen gegensätzlichen Stärkegehalte erklären können, kann hier nicht entschieden werden.

### 3. Hormonmessungen

Zunächst wurden die Gehalte mehrerer Hormone (Cytokinine, ABA, IAA, GA1) in Blättern bestimmt, die im Frühsommer geerntet wurden (Abb. 6). Für die Cytokinine war kein einheitliches Bild bei den untersuchten 35S-*ro/C* transgenen Linien festzustellen, während für ABA, GA1 und IAA niedrigere Gehalte in Blättern von 35S-*ro/C* transgenen Pflanzen gefunden wurden.

Abb. 6: Gehalte an Phytohormonen in Blättern von 35S-*ro/C* transgenen Linien im %-Verhältnis zur Kontrolle. Die absoluten Mengen der Hormone wurden in pMol/gFG gemessen.



Im Jahr 2000 wurden nur von den Ende September geernteten Blättern Bestimmungen des ABA-Gehaltes durchgeführt (Abb. 7). Interessanterweise waren nun höhere ABA-Gehalte in Blättern von den 35S-*ro/C* transgenen als in den Blättern von nicht-transgenen Kontrollpflanzen zu finden.

Ruheknospen von 35S-*ro/C* transgenen Linien und der Kontrolllinie Esch5 wurden während der ersten Winterperiode an drei unterschiedlichen Terminen geerntet und die Gehalte von sechs verschiedenen Hormonen bestimmt (Abb. 8). ABA zeigte zu allen Ernteterminen in den untersuchten 35S-*ro/C* transgenen Linien deutlich reduzierte Gehalte, während GA1 nahezu unverändert bleibt. Die Werte für IAA waren im November reduziert, im Januar und im Februar etwa gleich oder höher als die der Kontrolllinie Esch5. Die Cytokinin-Gehalte (IPA, DHZR, ZR) lagen mit wenigen Ausnahme im Bereich der Kontrolllinie oder waren leicht erhöht.

Abb. 7: Gehalte an ABA in Blättern von 35S-*ro/C* transgenen Linien im %-Verhältnis zur Kontrolle. Die absoluten Mengen der Hormone wurden in pMol/gFG gemessen.

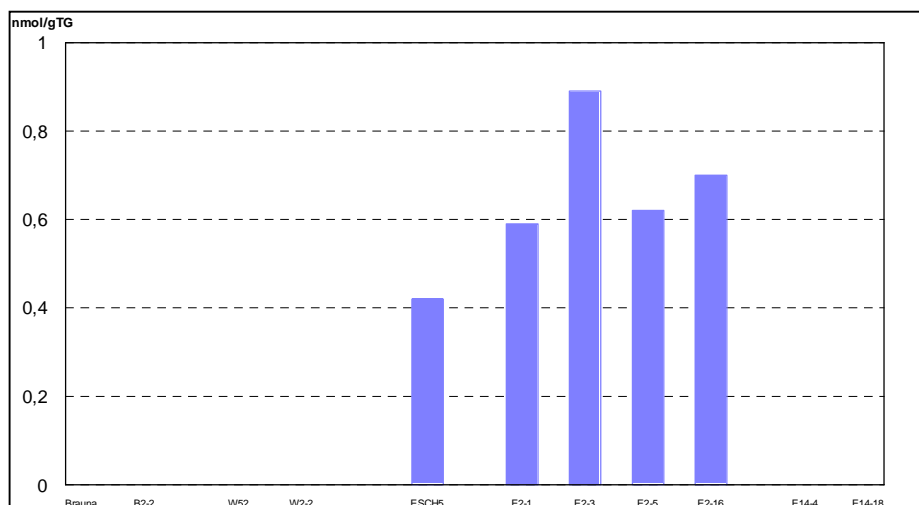
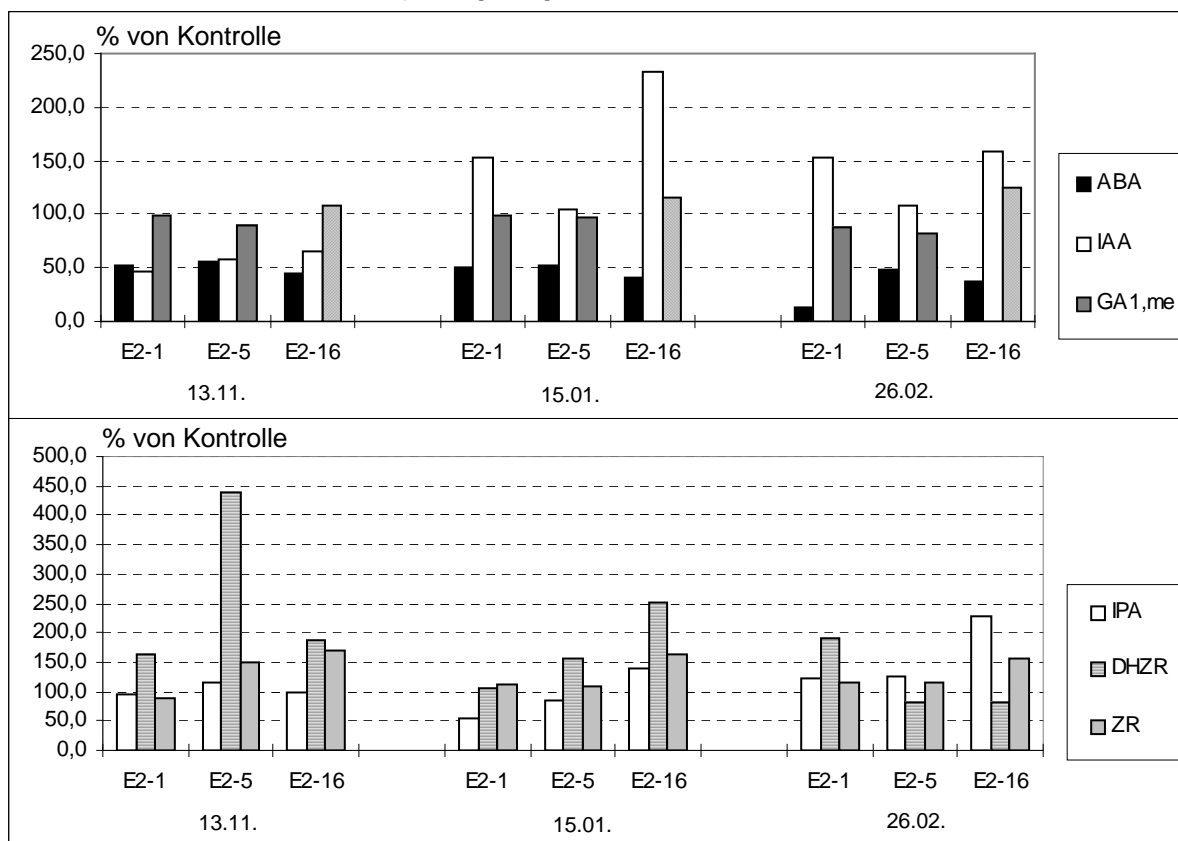


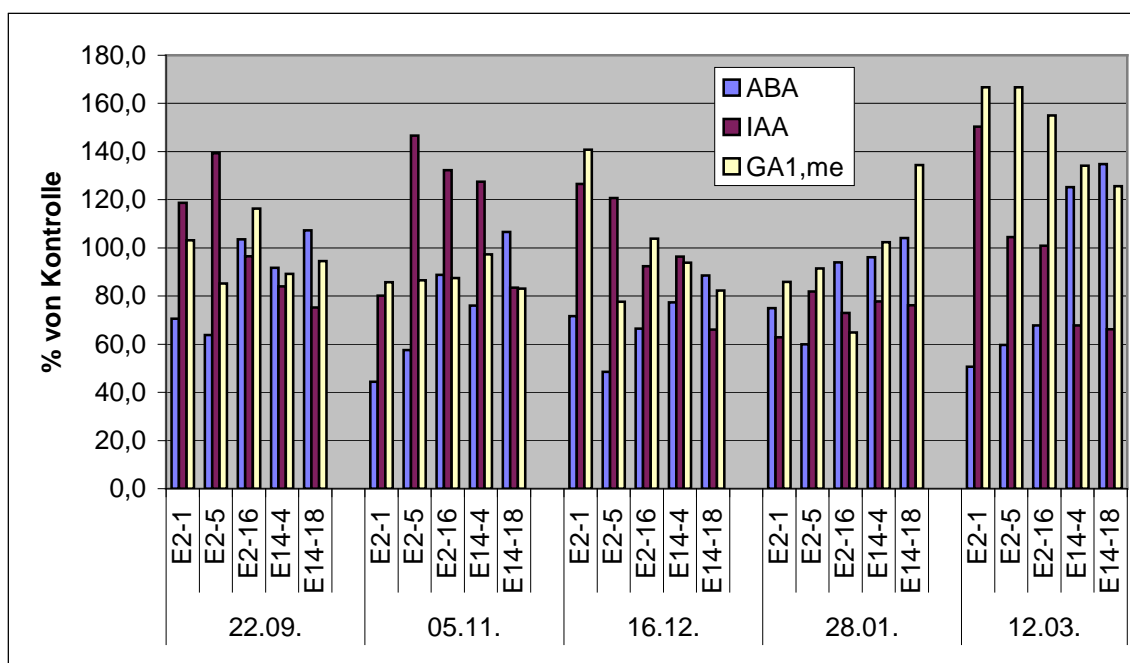
Abb. 8: Gehalte an Phytohormonen in Ruheknochen im 1. Winter von 35S-*ro/C* transgenen Linien im %-Verhältnis zur Kontrolle. Die absoluten Mengen der Hormone wurden in pMol/gFG gemessen.



Während der zweiten Winterperiode wurden die Hormonmessungen an Ruheknochen wiederholt (Abb. 9). Hierzu wurden fünf Beerntungen durchgeführt sowie die *rbcS-ro/C* transgenen Linien mit aufgenommen, aber die

Bestimmungen aus Kapazitätsgründen auf die Hormone ABA, IES und GA1 begrenzt. Für die ABA-Gehalte wurden die Messungen des Vorjahrs bestätigt: wieder zeigten 35S-*ro/C* transgene Linien niedrigere ABA-Gehalte. Die *rbcS-ro/C* transgenen Linien wiesen gleich hohe ABA-Gehalte wie die nicht-transgenen Kontrolllinien auf. Die GA1- und IES-Gehalte der 35S-*ro/C* und *rbcS-ro/C* transgenen Linien lagen etwa in der gleichen Höhe wie die der Kontrolllinie.

Abb. 9: Gehalte an Phytohormonen in Ruheknospen im 2. Winter von 35S-*ro/C* transgenen Linien im %-Verhältnis zur Kontrolle. Die absoluten Mengen der Hormone wurden in pMol/gFG gemessen.

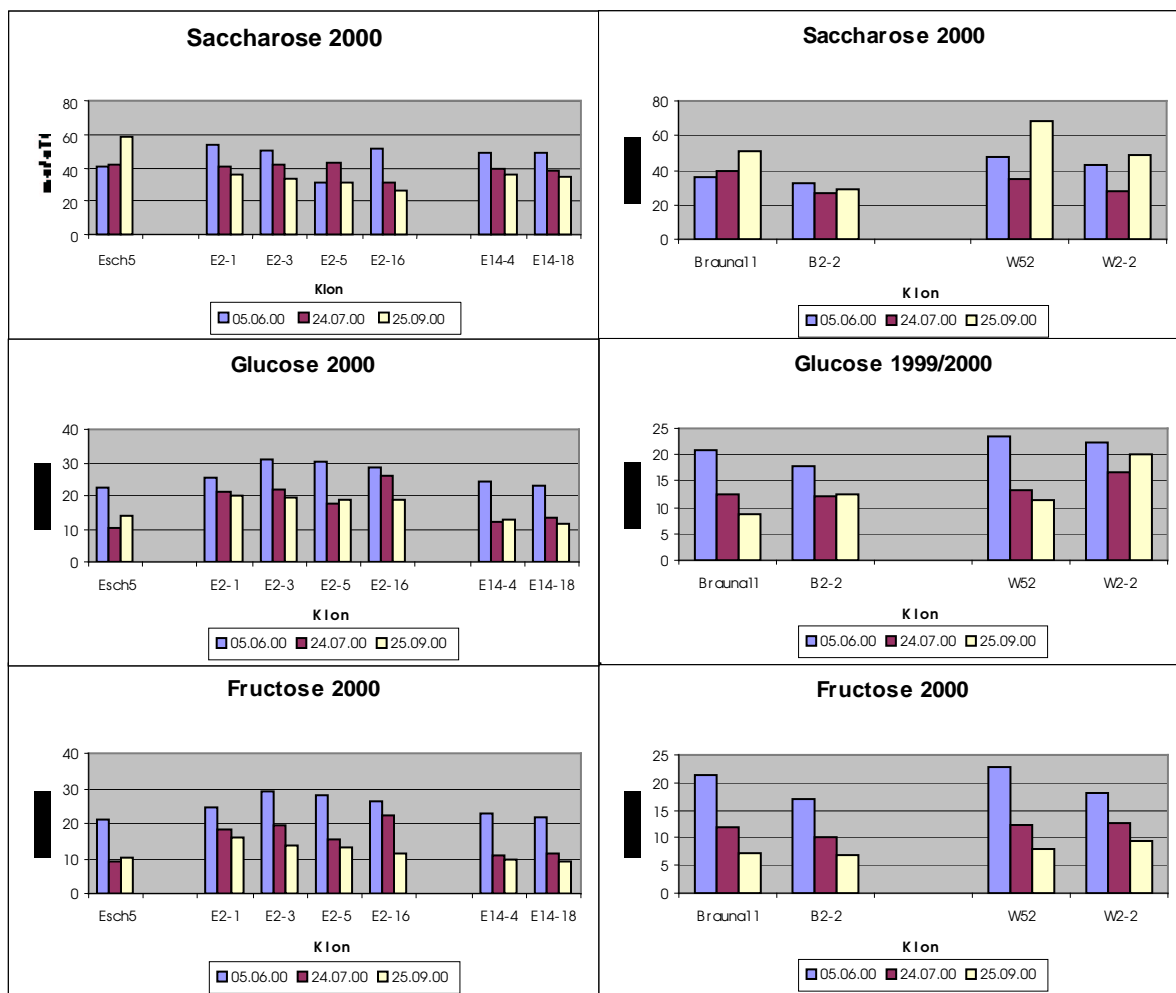


## (II) Vergleich der Gehalte an Blattinhaltsstoffe zwischen 1999 und 2000

Die Messungen der Mono- und Disaccharidgehalte in Blättern von 35S-*ro/C* und *rbcS-ro/C* transgenen sowie Kontrollaspen in 1999 und 2000 zeigten sich in der Tendenz einheitlich. Dagegen waren die Stärkemessungen bei allen 35S-*ro/C* transgenen Linien verglichen mit den entsprechenden Kontrolllinien zwischen beiden Jahren eher gegensätzlich, während die *rbcS-ro/C* transgenen Aspen in beiden Jahren niedrigere Stärkegehalte in den Blättern als die Kontrollen aufwiesen.

Während in 1999 für die Bestimmung der Mono- und Disaccharidgehalte in Blättern nur zwei Beerntungen (Ende Juli, Ende August) durchgeführt wurden, konnten in 2000 dreimal Blätter geerntet werden (Anfang Juni, Ende Juli, Ende September). Die Ergebnisse aus dem Juli beider Jahre sind ähnlich. Die Abb. 10 zeigt die Entwicklung der Gehalte an Blatinhaltsstoffen bei den verschiedenen *35S-ro/C* und *rbcS-ro/C* sowie den nicht-transgenen Kontrollen über einen Zeitraum von vier Monaten exemplarisch für das Jahr 2000.

Abb. 10: Saccharose-, Glucose- und Fructosegehalte der Klone Esch5, Brauna11 und W52 und von diesen abgeleiteten Transformanten von Juni bis September 2000



Für den Saccharosegehalt zeigte es sich, dass zwischen *35S-ro/C* transgenen und Kontrollaspen einen prinzipiellen Unterschied zwischen den Monaten Juni bis September 2000 existiert (Abb. 10). Während bei den Kontrollaspen Esch5,



W52 und Brauna11 bis Ende Juli etwa gleichbleibende und anschließend Ende September stark ansteigende Saccharosegehalte in Blättern zu verzeichnen waren, wurde bei 35S-*ro/C* transgenen Aspen jedoch eine gegenläufige Tendenz gefunden. Hier fanden sich im Juni sehr hohe Saccharosegehalte, die bis Ende September kontinuierlich absanken. Die *rbcS-ro/C* transgenen Aspen zeigten im Saccharosegehalt prinzipiell einen ähnlichen Jahresverlauf wie 35S-*ro/C* transgene Aspen.

Im Gegensatz zu den Befunden zum Saccharosegehalt stehen die Ergebnisse zu den Glucose- und Fructosegehalten in Blättern zwischen den Monaten Juni bis September 2000 (Abb. 10). Sowohl die Glucose- als auch Fructosegehalte verringerten sich im Verlauf des Jahres bei allen nicht transformierten Kontrollklonen sowie deren 35S-*ro/C* und *rbcS-ro/C* transgenen Linien. Das gleiche Ergebnis wird erhalten, wenn die Daten aus dem Jahr 1999 betrachtet werden.

Die Ergebnisse von 1999 und 2000 zu den *rbcS-ro/C* transgenen Aspen zeigten, dass die *ro/C*-Expression auch in Blättern dieser transgenen Linien zu metabolischen Veränderungen führt, wie sie bei den transgenen Linien zu beobachten war, die eine konstitutive *ro/C*-Expression aufweisen. Es ist zu erwarten, dass in anderen Geweben der *rbcS-ro/C* transgenen Aspen, in denen keine Expression des *ro/C*-Gens vorliegt, die Mono- und Disaccharidgehalte mit denen von Kontrollpflanzen vergleichbar sind.

Zusammenfassend ist noch einmal festzuhalten, dass die in dieser Studie gefundenen Veränderungen an Gehalten von Mono- und Disacchariden sowie an Phytohormonen in Blättern von 35S-*ro/C* und *rbcS-ro/C* transgenen Aspen spezifische Effekte darstellen, die auf die Expression des *ro/C*-Gens zurückzuführen sind. Es handelt sich nicht um Effekte, die mit dem Status „gentechnisch verändert“ in Verbindung stehen.

### (III) Phytopathologische Untersuchungen

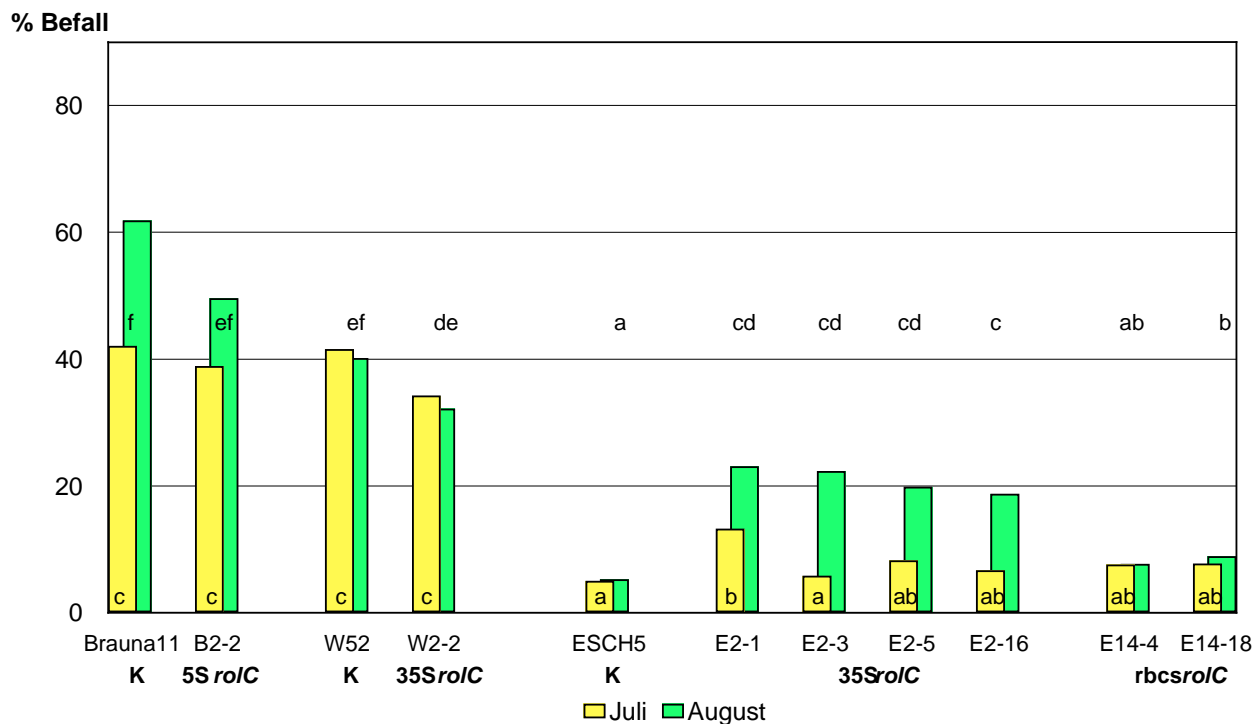
#### **Befallsergebnisse im Freiland**

##### *Pappelrost*

Ein bonitierbarer Befall mit Pappelrost (*Melampsora* sp.) konnte 1999 erst im Juli beobachtet werden. Eine zweite Befallsbonitur erfolgte Ende August. Die

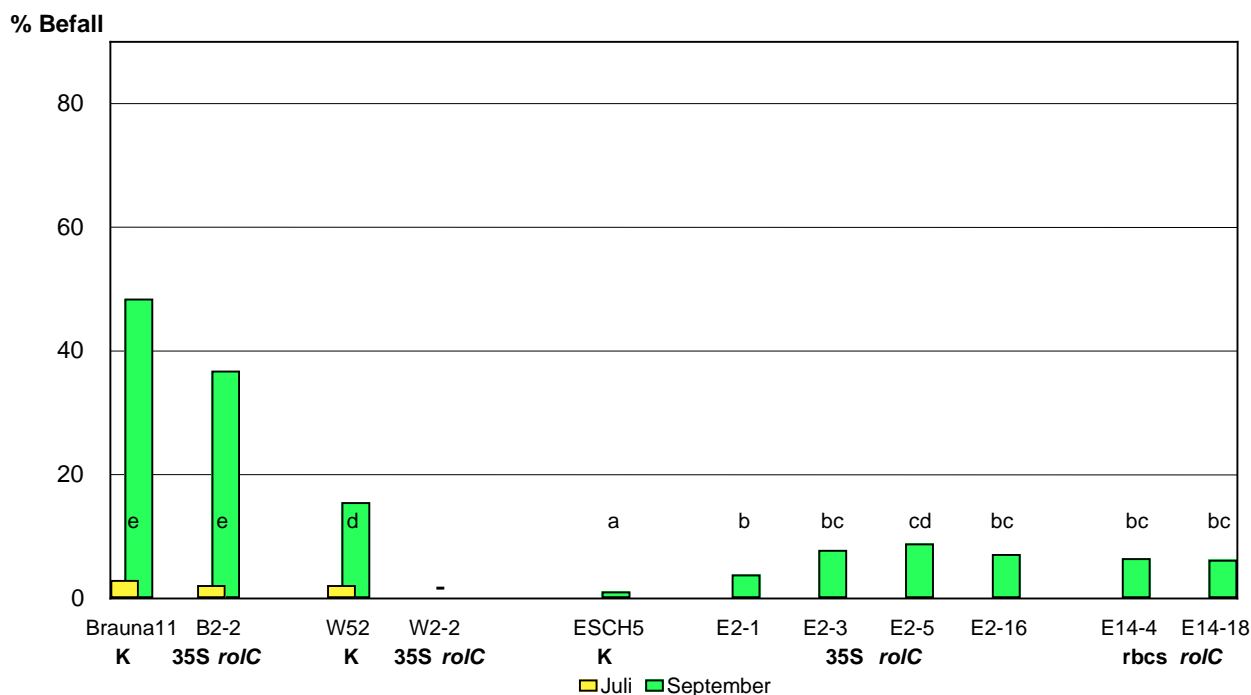
Befallsergebnisse beider Erhebungen sind in Abb. 11 zusammengestellt. Alle Aspenlinien wurden vom Pappelrost befallen. Die meisten Linien reagierten mit fortschreitendem Befall, so dass die Befallsunterschiede zwischen beiden Erhebungen größer wurden. Die Transformanden von Brauna11 und W52 zeigten geringeren Befall als ihre Ausgangsformen. Dagegen war die Linie Esch5 stets geringer als ihre Transformanden befallen. Die Unterschiede näherten sich dem Signifikanzbereich. Im Vergleich zum Befallsjahr 1999 trat der Rostbefall im Jahre 2000 deutlich geringer auf (Abb. 12). So konnte im Juli 2000 lediglich ein schwacher Anfangsbefall an nur drei Aspenlinien gefunden werden. Selbst der Befall im September dieses Jahres war geringer als der Befall im August 1999. Auch im Jahr 2000 zeigte sich, dass Brauna11 höher

Abb. 11: Pappelrost-Befall, Bonitur der Aspenkronen, Großhansdorf 1999. Säulen mit ungleichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant bei  $P < 0,05$ .



befallen war als die transgene Linie B2-2, wenn auch der Unterschied nicht signifikant war. Dagegen war der Rostbefall bei Esch5 stets signifikant geringer als bei den transgenen Aspenlinien. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass alle Aspenlinien im Jahr 2000 deutlich geringer als im Vorjahr befallen waren.

Abb. 12: Pappelrost-Befall, Bonitur der Aspenkronen, Großhansdorf 2000. Die W2-2 Pflanzen sind abgestorben. Esch-Linien im Juli ohne Befall. Säulen mit ungleichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant bei  $P < 0,05$ .



### Blattfleckenbefall

Erste bonitierbare Blattflecken traten 1999 im Juli auf. Während des Sommers nahm dieser Befall bei den meisten Linien deutlich zu (Abb. 13). Ende August zeigte sich zum Juli ein ähnliches Befallsbild. Die nicht-transgenen Kontrollen Brauna11 und W52 zeigten einen etwas höheren Befall als ihre transgenen Linien. Dagegen war Esch5 stets geringer befallen als die transgenen Linien. Der Befall erreichte allgemein keine hohen Werte und zeigte nur bei Brauna11 ein Maximum von lediglich 41,4%. In Jahre 2000 konnte ein anderes Befallsmuster beobachtet werden (Abb. 14). Erster schwacher Befall trat schon im Juni auf. Im Juli hatte der Befall zugenommen, blieb aber allgemein sehr gering und überschritt nur in einem Fall die 5%-Grenze. Anders als im Vorjahr waren die transgenen Linien B2-2 und W2-2 höher als ihre Kontrollen befallen. Esch-transgene Linien zeigten bis Juli eine höhere Befallsausprägung als Brauna11, W52 und ihre transgenen Linien. Obwohl im Jahr 2000 im Vergleich zum Vorjahr ein geringerer Anfangsbefall vorlag, nahm bei den transgenen Aspen der Befall während des Sommer sehr stark zu (Abb. 15) und erreichte im September maximale Werte. Diese Befallszunahme konnte bei den nicht-

transgenen Kontrollen dagegen nicht beobachtet werden; sie zeigten Befallswerte in ähnlicher Größenordnung wie 1999. Von der transgenen Linie W2-2 überlebte zu diesem Zeitpunkt nur noch eine Pflanze, so dass diese Linie nicht weiter untersucht werden konnte.

Abb. 13: Blattflecken-Befall, Bonitur der Aspenkronen, Großhansdorf 1999. Säulen mit ungleichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant bei  $P < 0,05$ .

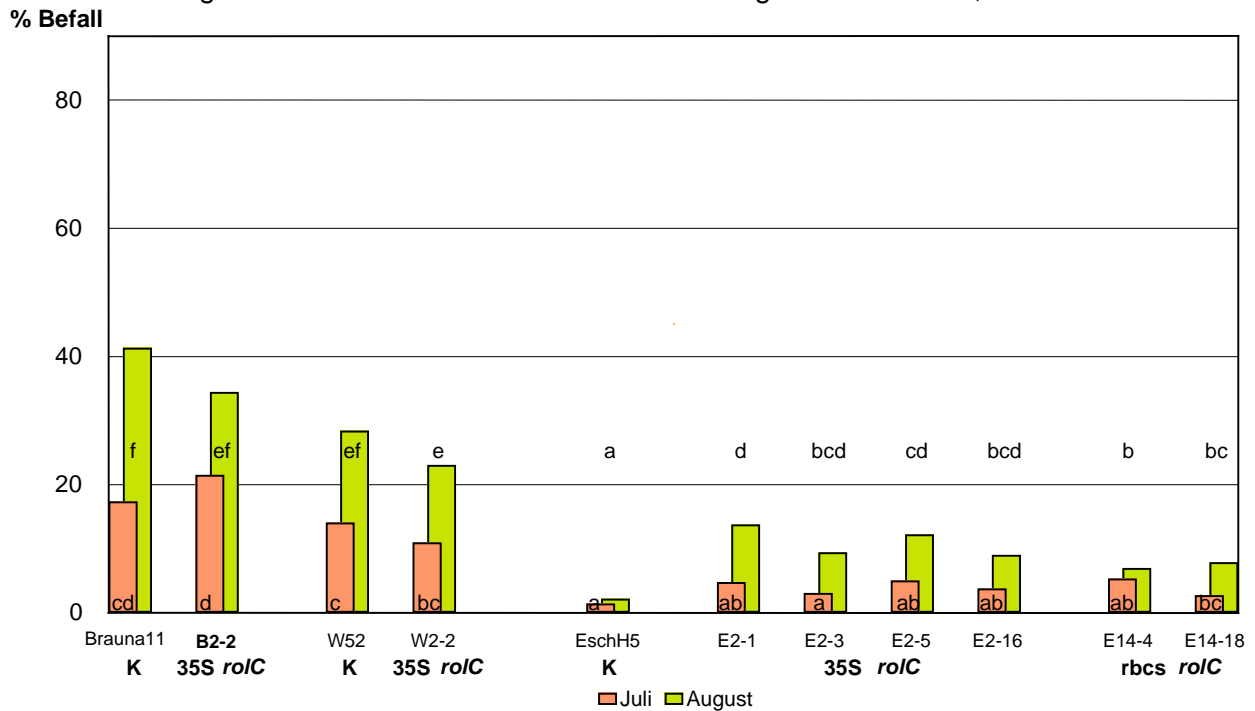
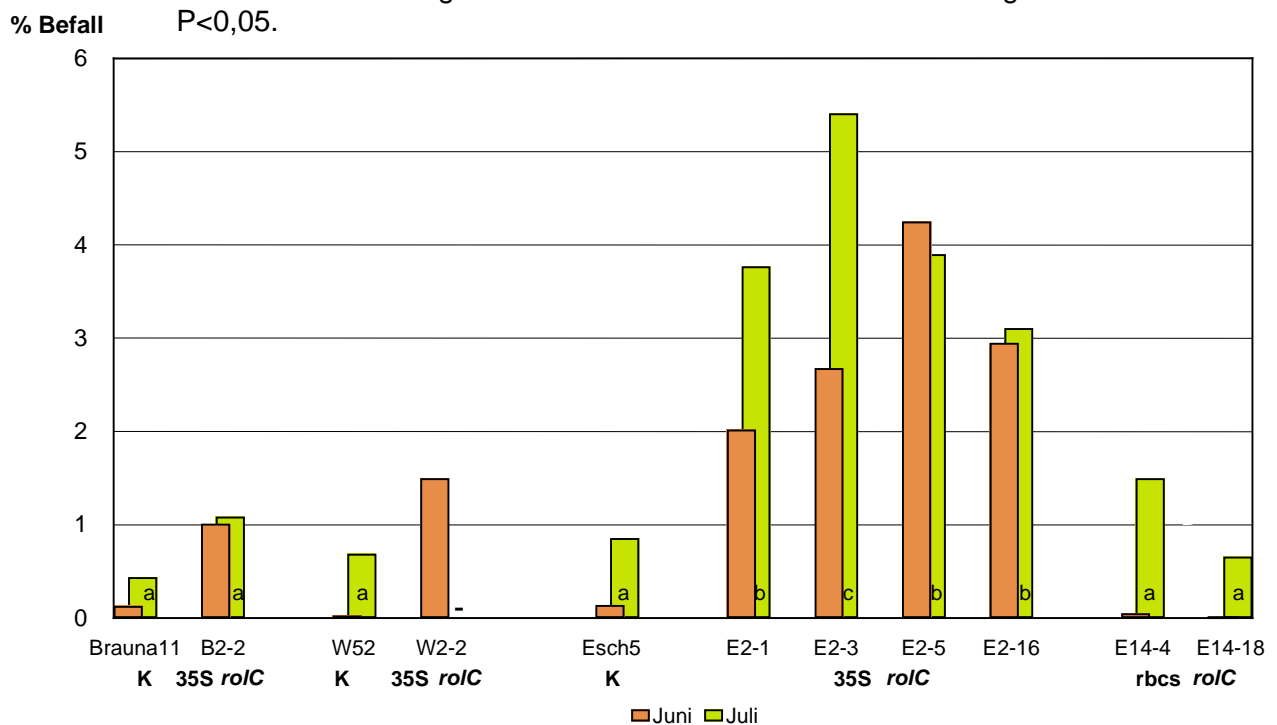
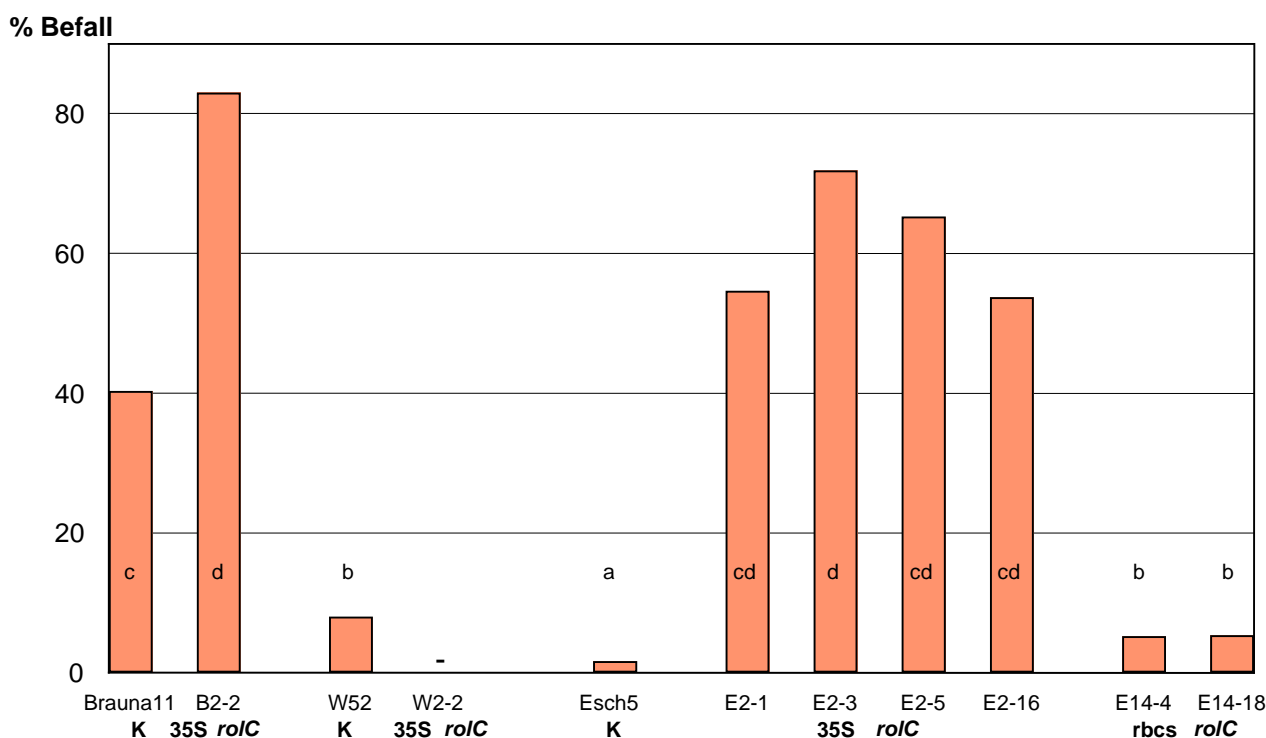


Abb. 14: Blattflecken-Befall im Sommer, Bonitur der Aspenkronen, Großhansdorf 2000. Säulen mit ungleichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant bei  $P < 0,05$ .



Zusammenfassend belegen die Daten für den Blattfleckenbefall, dass die Befallssituation für die nicht-transgenen Aspen in den Jahren 1999 und 2000 ähnlich war. Die nicht-transgenen Kontrollen waren 2000 etwas geringer als im Vorjahr befallen, die transgenen Aspen aber im Jahr 2000 wesentlich stärker befallen waren als im Vorjahr.

Abb. 15: Blattflecken-Befall im September, Bonitur der Aspenkronen, Großhansdorf 2000. Säulen mit ungleichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant bei  $P < 0,05$ . W2-2 ist abgestorben.



### Laborbefallstests

Befallsprüfungen im Labor wurden an Blattmaterial und Zweigen vom Juni und Juli 2000 mit *P. radiosa* und *Botrytis cinerea* durchgeführt. Mit *B. cinerea* konnte am Blattmaterial beider Termine keine künstliche Infektion erreicht werden. Die Blattinfektion mit *P. radiosa* war erfolgreich.

Mit beiden Pilzen wurde versucht, Zweigstücken zu infizieren. Natürlicher Befall an Triebspitzen junger Aspen kann in der Natur häufig beobachtet werden, besonders in feuchten und kühlen Gebirgslagen. *Botrytis*-Befall an Zweigen von originären und transgenen Aspen konnte an Gewächshausmaterial in

Großhansdorf nachgewiesen werden. In einem neu entwickelten Befallsprüfverfahren für Pflanzenstengel konnten die verwendeten Zweigstücke durch ein sicheres Wasserversorgungssystem über Wochen lebend erhalten werden, was sich z.B. durch Knospenausbruch und Blattbildungen bestätigte. Eine Infektion durch Symptomausprägung nach Inokulation mit *P. radiosa* und *B. cinerea* konnte aber nicht beobachtet werden. Wahrscheinlich war das verwendete Zweigmaterial im Juni schon nicht mehr in einem infektionsfähigen Stadium. Im Freiland wird der Zweigbefall durch *P. radiosa* nur an den Triebspitzen des Neuaustriebs hauptsächlich im Juni beobachtet. Der Infektionszeitpunkt dürfte bei diesem langsam wachsenden Pathogen dann schon zwei bis drei Monate zurückliegen. Eine künstliche Infektion am physiologisch jüngerem Neuaustrieb könnte einen Befallserfolg im Labor begründen.

Als Haupterreger für den Blattfleckenbefall bei Aspen konnte *P. radiosa* ermittelt werden. Insofern sind die Befallsergebnisse im Labor mit dem Blattfleckenbefall im Freiland vergleichbar. Befallstest im Labor konnten im Juni und Juli 2000 durchgeführt werden. In beiden Tests wurde eine sichere Infektion erreicht. Verglichen zum natürlichen Befall kann eingeschätzt werden, dass der Infektionsdruck im Labor auf Grund der applizierten Inokulationsmenge höher als der des Freilands war.

Die Befallsergebnisse vom Juni sind in Abb. 16 dargestellt. Zum Freilandbefall vom Juni 2000 bestehen Ähnlichkeiten. So ist das Befallsniveau auch im Labortest noch niedrig. Ebenfalls sind die Kontrollaspen Brauna11 und Esch5 geringer als die transgenen Linien befallen, ausgenommen die Linie W52, die zu diesem Vegetationszeitpunkt mit einer unverhältnismäßig starken Infektion höher als die transgene Linie W2-2 befallen war.

Ein zweiter Laborbefallstest wurde an Aspenblättern im Juli durchgeführt (Abb. 17). An diesem Material konnte hoher Befall erreicht werden. Alle Kontrollaspen waren geringer als die transgenen Linien befallen. Trotz unterschiedlichen Infektionsniveaus besteht zwischen diesem Labortest an Blättern vom Juli und dem der Kronen im Juli eine korrelative Übereinstimmung.

Abb. 16: *Pollaccia radios*a-Laborbefallstest, Aspenblätter Großhansdorf Juni 2000. Säulen mit ungleichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant bei  $P < 0,05$ .

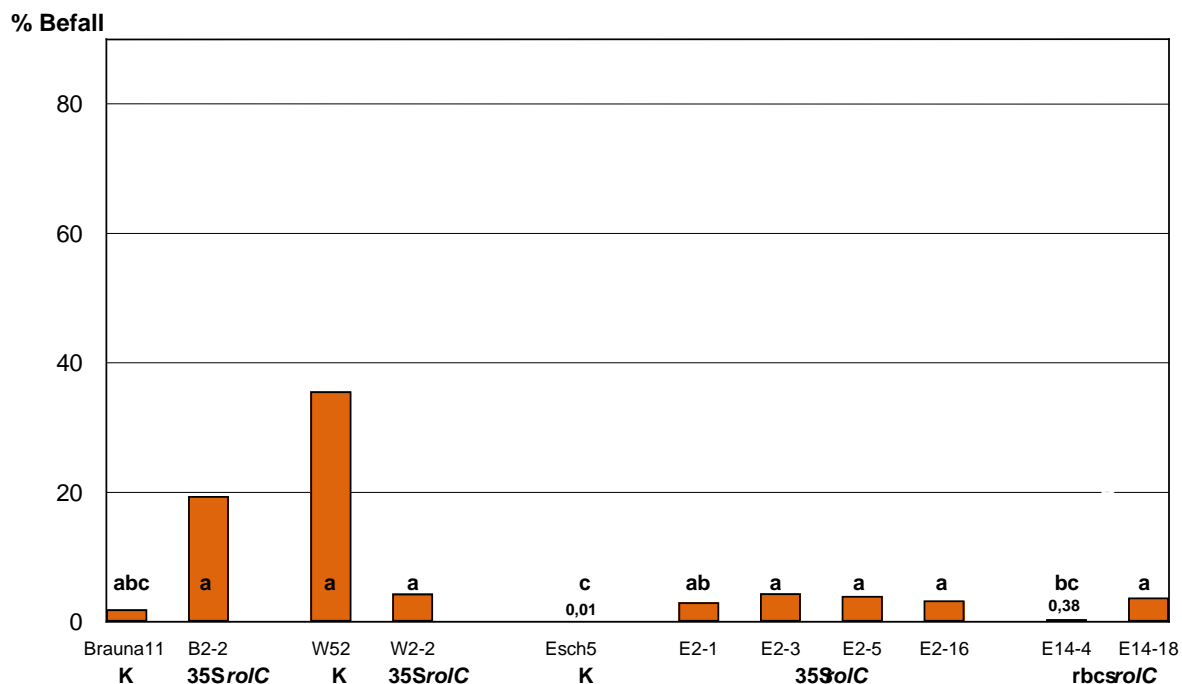
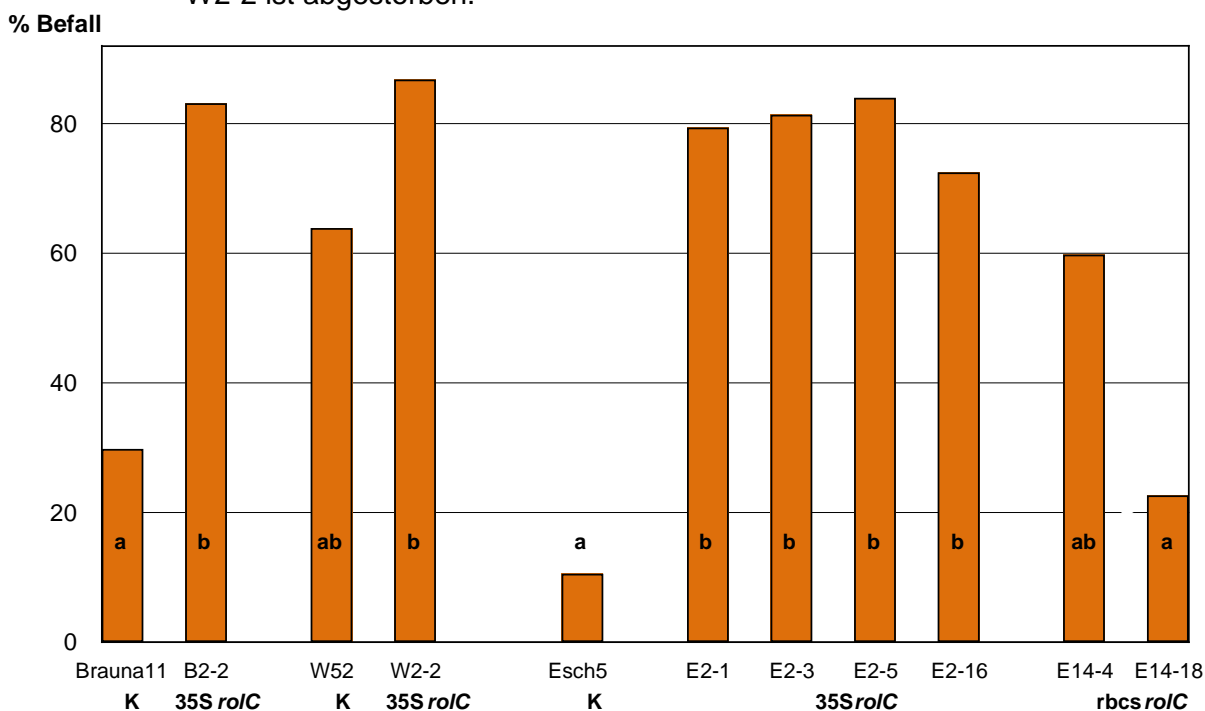


Abb. 17: *Pollaccia radios*a-Laborbefallstest, Aspenblätter Großhansdorf Juli 2000. Säulen mit ungleichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant bei  $P < 0,05$ . W2-2 ist abgestorben.



## Pilzarten auf Aspen

An Blättern und Rinde wurden verschiedene Pilze nachgewiesen, die in Tab.4 zusammengestellt worden sind. Die Arten wurden gleichermaßen an originären wie transgenen Aspen gefunden.

Während der Befallsbonitur im Juni 2000 wurde das Auftreten von Rußtau beobachtet, wobei die hohen Unterschiede der Rußtatauprägungen auffielen. Aus diesem Grund wurde eine Erhebung dieses Merkmals durchgeführt.

Rußtau ist allgemein erkennbar an den schwarzen Myzelbelägen auf Blättern oder Früchten. Diese Myzelpolster entstehen, wenn auf der Pflanzenoberfläche Beläge von Aminosäuren und Kohlenhydraten entstehen, auf denen dann verschiedene Schwärzepilze wachsen können. Solche Beläge entstehen in der Regel durch Ausscheidungen von Insekten, die sich von der betreffenden Pflanze ernähren. Die besiedelnden Pilzarten gehören sehr unterschiedlichen Gattungen an.

Tab. 4: Erreger an Aspen 1990 und 2000, Großhansdorf

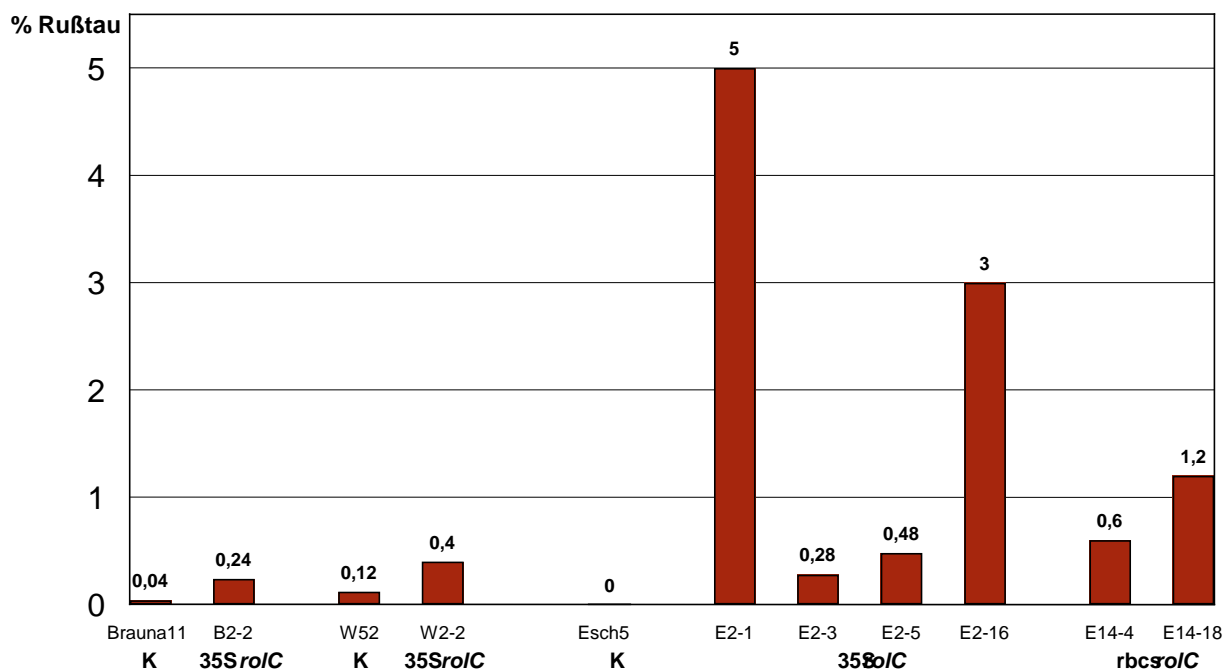
Pathogene			Saprophyten
am Blatt	an Blatt und Rinde	auf der Rinde	auf der Rinde
<i>Marssonina brunnea</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Acrodictus fuliginosa</i>
<i>Melampsora</i> spp.	<i>Botrytis cinerea</i> (Gewächshausnachweis)	<i>Ceratocystis moniliformis</i>	<i>Melanopsamma pomiformis</i>
<i>Pollaccia radiosa</i>	<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Verticillium</i> sp. (Gewächshausnachweis)	
<b><i>Stemphylium</i> sp.</b>	<i>Fusarium</i> spp.		



Häufig kommen Arten der Gattungen *Alternaria*, *Aureobasidium* und *Cladosporium* vor. Das Vorkommen von Rußtau wurde für die Gattung *Populus* (Bao et al. 1992) und für viele andere Gattungen beschrieben.

Rußtauflecken wurden hauptsächlich auf der Blattoberseite nahe des Stielansatzes gefunden. Der Rußtaubelag wurde für alle Aspenlinien eingeschätzt. Von den Wiederholungen einer Linie im Feldversuch wurden insgesamt 50 Blätter zufällig aus dem unteren Kronenbereich entnommen und iterativ bonitiert. Abb.18 zeigt die Ergebnisse. Das geringe Rußtauvorkommen auf den nicht-transgenen Kontrollen differenzierte sich deutlich vom wesentlich stärkeren Rußtauauftreten auf allen transgenen Linien. Die Rußtaubeläge auf den transgenen Aspenblättern waren um ein Mehrfaches größer als auf den Blättern der Kontrollaspen.

Abb. 18: Rußtauvorkommen auf Aspenblättern, Großhansdorf Juni 2000.



#### (IV) Korrelative Beziehungen

Für alle Bestimmungen der Gehalte von Pflanzeninhaltsstoffen sowie für den Pilzbefall wurden statistisch verrechnet. Dabei wurden sowohl die Signifikanzen der Mittelwerte ( $P < 0,05$ ) als auch Korrelationen zwischen den einzelnen Bestimmungen berechnet. Im folgenden finden sich nur Angaben über die

korrelativen Zusammenhänge aller Bestimmungen eines jeweiligen Erntetermins. Die Signifikanzen der Mittelwerte sind nicht angegeben, können aber bei Bedarf angefordert werden.

### Pappelrost

Der Rostbefall zeigte bei allen Aspenlinien in den Jahren 1999 und 2000 sehr ähnliche Befallsmuster, wie die Abb.11 und 12 erkennen lassen. Das wird auch durch die hohe korrelative Übereinstimmung des Rostbefalls sowohl zwischen den Bonituren eines Jahre als auch zwischen allen Bonituren beider Jahre belegt. Die Korrelationskoeffizienten  $r$  sind in Tab.5 zusammengestellt.

Tab. 5: Korrelativer Zusammenhang des Rostbefalls an Aspen in Großhansdorf 1999 und 2000

Jahr	Befallsmonat	1999		2000	
		Juli	August	Juli	September
<b>1999</b>	Juli	-	0,902**	0,979**	0,843**
	August		-	0,943**	0,927**
<b>200</b>	Juli			-	0,909**
	September				-

Als Maßstab für den Blattbefall kommen die Befallsdaten der nichttransgenen Kontrollaspen in Betracht. Für einen Vergleich wurden in Abb.19 die Befallsdaten mit Pappelrost und Blattflecken beider Jahre zusammengestellt.

Die Resistenzreaktionen der nichttransgenen Aspen sind gegen beide Pathogengruppen sehr ähnlich. Diese Übereinstimmung ist besonders zur zweiten Bonitur in jedem Jahr hoch. Im Jahr 2000 traten Rost und Blattflecken geringer als 1999 auf. Der Pappelrostbefall war stärker als der Blattfleckenbefall ausgeprägt. Der Befallszusammenhang zwischen den nichttransgenen Aspenkontrollen und ihren transgenen Linien war unterschiedlich, wie in den Abb. 20 und 21 zu sehen ist.

Abb. 19: Aspen-Blattbefall der nichttransgenen Kontrollen, Großhansdorf 1999 und 2000

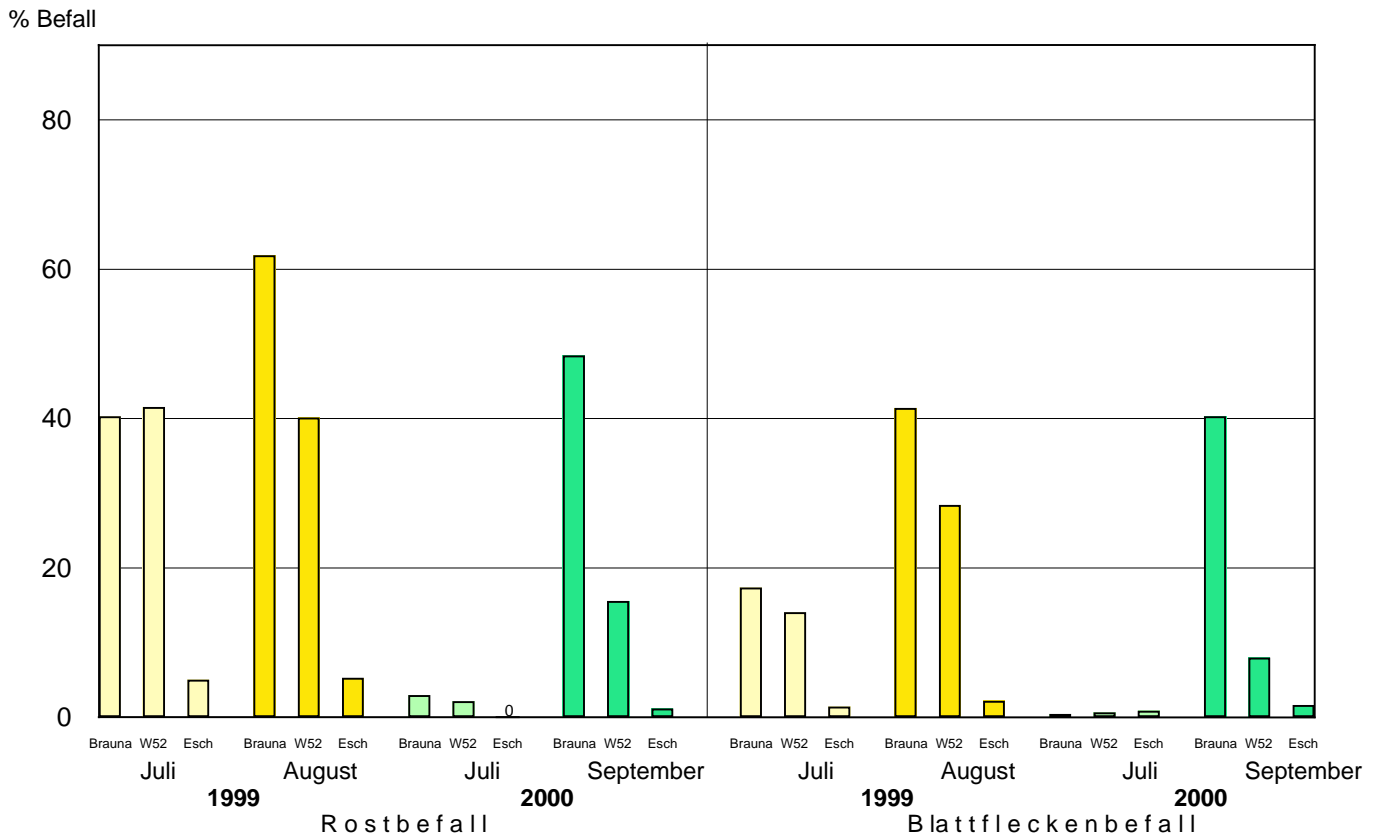
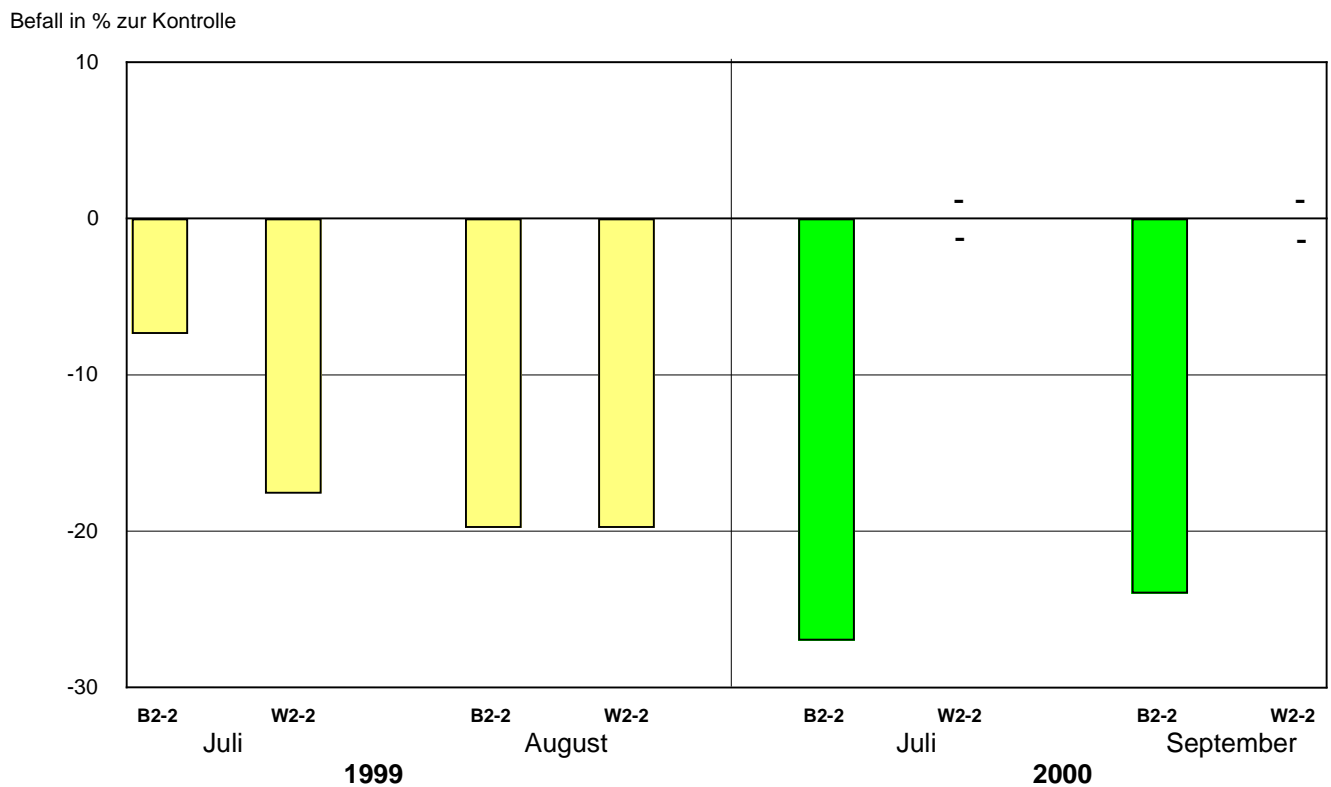


Abb. 20: Aspen-Rostbefall der transgenen Linien relativ zum Befall der Kontrollen Brauna11 und W52, Großhansdorf 1999 und 2000.

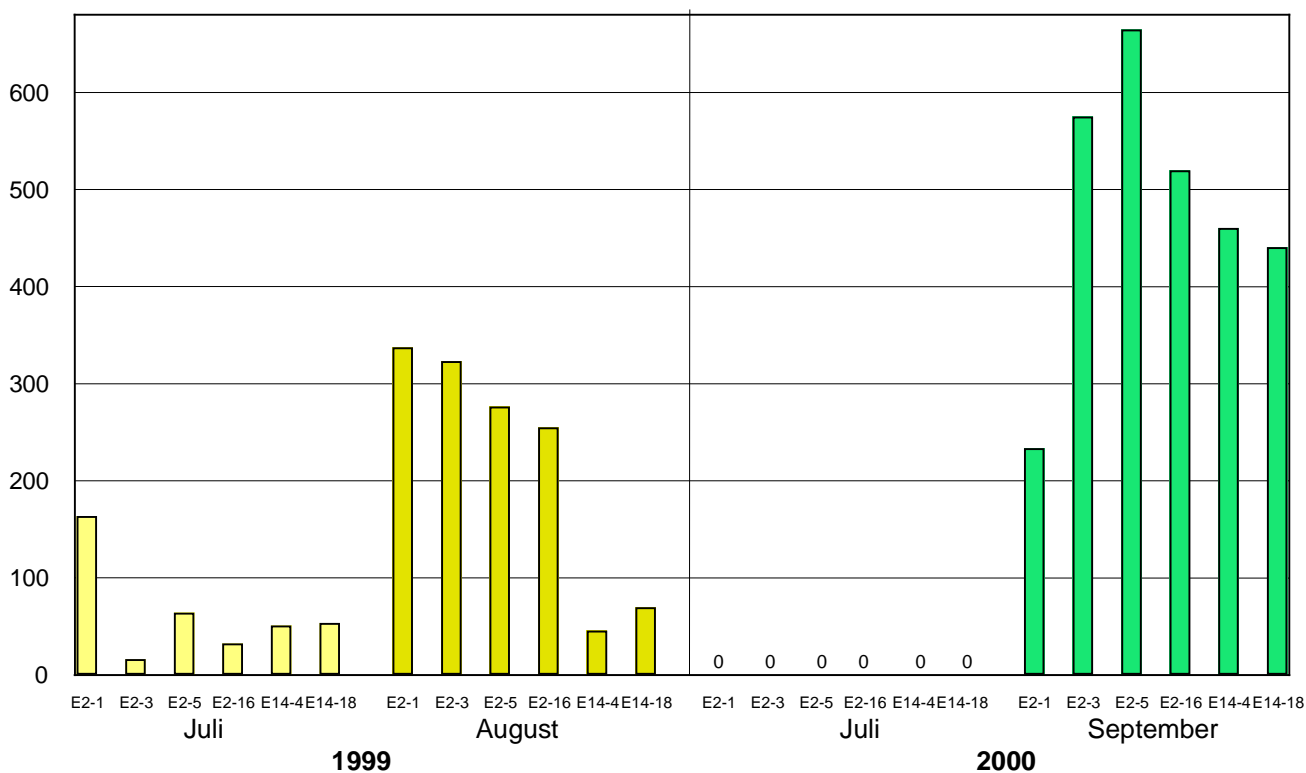


In beiden Jahren waren die Linien Brauna11 und W52 höher als ihre transgenen Linien befallen. Diese Resistenzreaktion der transgenen Linien wurde aber nicht an den Esch-transgenen Linien beobachtet, wie Abb.21 zeigt. In allen Fällen war die Linie Esch5 geringer befallen als die transgenen Linien. Diese Unterschiede waren in der Mehrzahl signifikant.

Die Ergebnisse führen zum Befund, dass die transgenen Linien B2-2 und W2-2 eine Resistenz aufwiesen, die bei den nicht-transgenen Ausgangsformen Brauna11 und W52 nicht zu beobachten war. Dagegen war Esch5 stets resistenter als die *ro/C* transgenen Linien. Transgene Linien von Esch5 zeigten somit den größten relativen Verlust an Basisresistenz. Ein Hinweis auf instabile Resistenzen gegen Pappelrost konnte zwar nicht festgestellt werden, aber im Vergleich zur unten genannten Befallsreaktion gegenüber Blattfleckenerregern erscheint ein zweijähriges Ergebnis für eine sichere Aussage zur Stabilität der Resistenz unzureichend.

Abb. 21: Aspen-Rostbefall der transgenen Linien relativ zum Befall der Kontrolle Esch5, Großhansdorf 1999 und 2000.

Befall in % zur Kontrolle



## Blattfleckenbefall

Auch gegenüber dem Befall mit Blattfleckenerregern konnte bei den transgenen Linien B2-2 und W2-2 gleichermaßen Resistenz wie gegenüber dem Rostbefall beobachtet werden (Abb. 22). Diese Resistenz trat aber im Gegensatz zur Pappelrost-Resistenz ein Jahr später schon nicht mehr auf. Der Befall lag im Jahr 2000 weit über dem der Kontrollen. Die Daten belegen, dass eine anfängliche Resistenzreaktion gegen Blattfleckenerreger offensichtlich verloren ging. Die weiteren Daten in Abb. 23 lassen erkennen, dass der Verlust an Basisresistenz der Esch-transgenen Linien gegen Blattfleckenerreger weitaus höher war als der gegen den Pappelrost.

Die zu beobachtende Instabilität der Resistenz und ihr Verlust lassen erwarten, dass auch gegenüber einem späteren Rostbefall die bisher beobachtete Resistenz nicht sicher ist.

Nach diesen Befunden haben die transgenen Linien B2-2 und W2-2 im Jahr 1999 über eine Resistenzreaktion verfügt, die sie ein Jahr später nicht mehr hatten. Die Klärung dieses Phänomens ist aus den vorliegenden Daten nicht möglich.

Abb. 22: Aspen-Blattfleckenbefall der transgenen Linien relativ zum Befall der Kontrollen Brauna11 und W52, Großhansdorf 1999 und 2000.

Befall in % zur Kontrolle

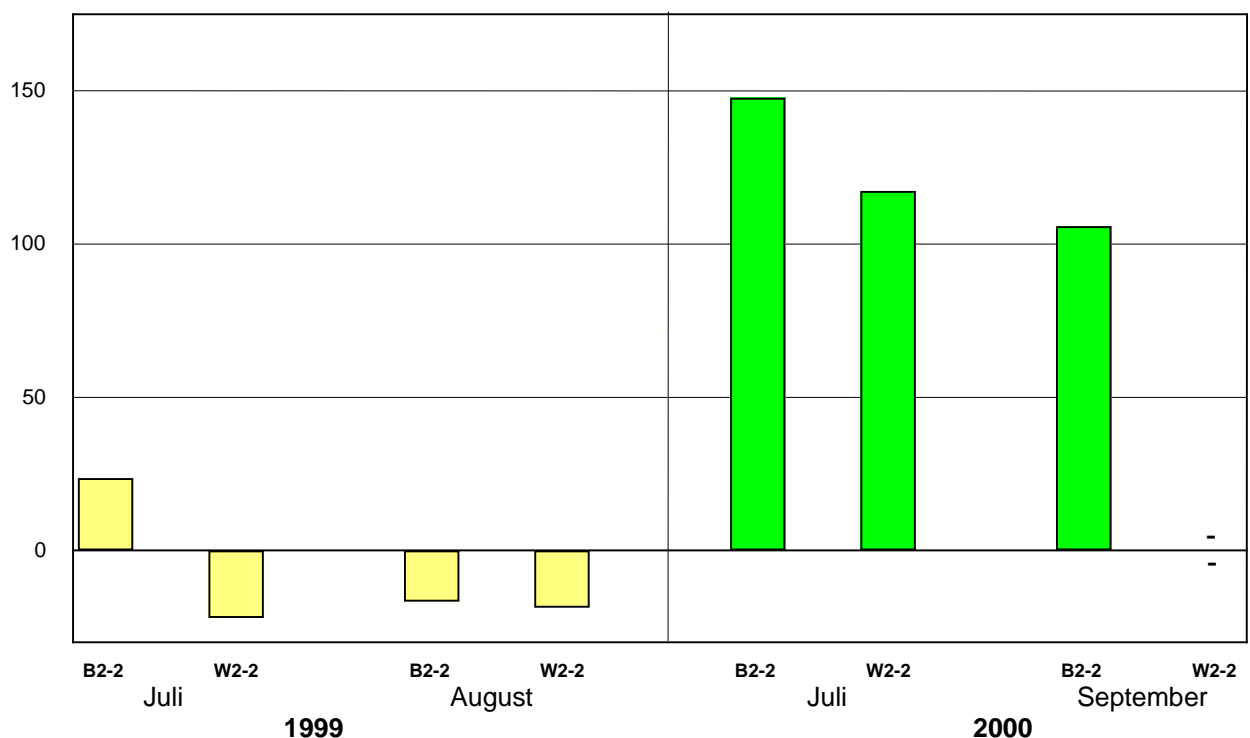
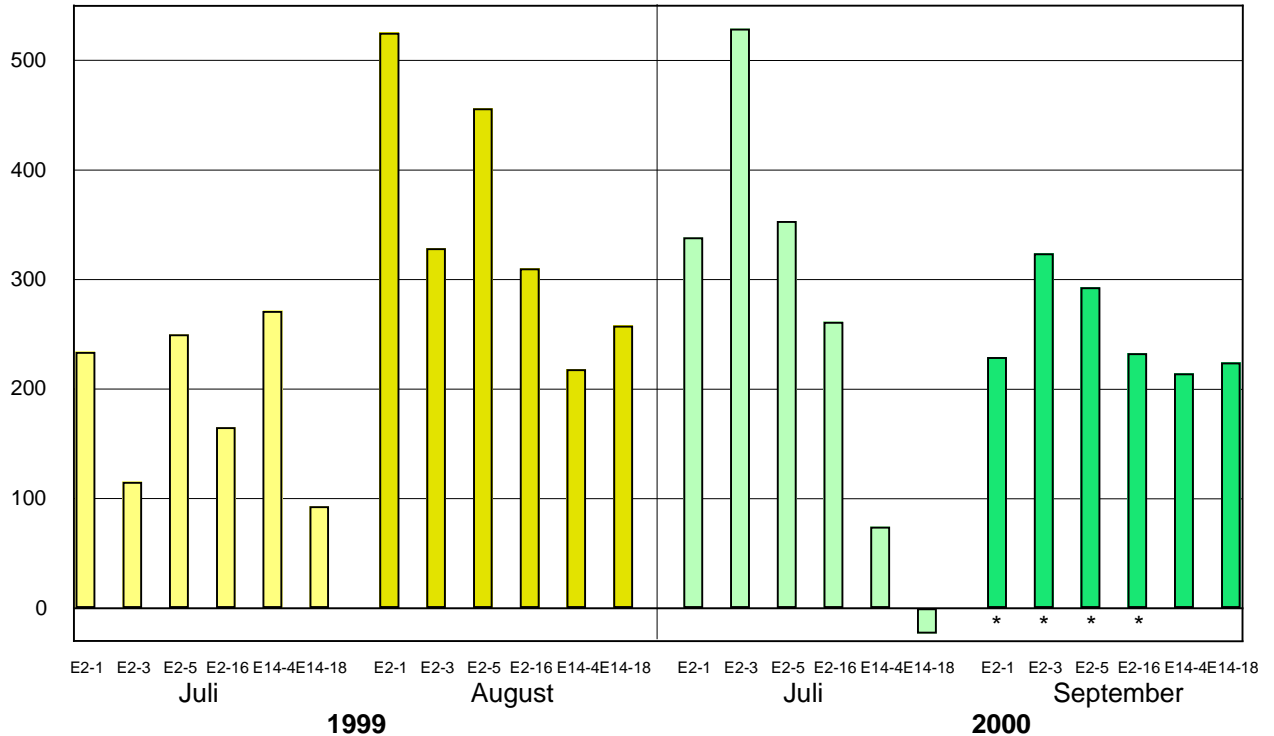


Abb. 23: Aspen-Blattfleckenbefall der transgenen Linien relativ zum Befall der Kontrolle Esch5, Großhansdorf 1999 und 2000.

Befall in % zur Kontrolle



\* = Wert x 10

Im Jahr 1999 zeigte der Blattfleckenbefall große Ähnlichkeit zum Befall mit Pappelrost, was ein signifikanter Korrelationskoeffizient von  $r=0,913$  belegte. Die weiteren Korrelationen innerhalb der Blattfleckenbonituren von 1999 und 2000 sind in Tab. 6 aufgeführt. Innerhalb der Jahre korrelierten die Bonituren, zwischen den Jahren aber kaum. Grund ist der abweichende Befall der Linien Brauna11 und W52 sowie ihrer Transformanden (Abb. 14 und 15). Besonders auffällig ist der höhere Befall der transgenen Linien B2-2 und W2-2, die erst 2000 ein ähnliches Befallsverhalten wie die übrigen transgenen Linien zeigten.

Diese Befallsunterschiede traten aber nicht bei Esch5 und ihren transgenen Linien auf. Sie verhielten sich in beiden Jahren korrelativ, was die Koeffizienten aus Tab. 7 bestätigen. Der Verlust an Basisresistenz der Esch-transgenen Linien trat also gleichermaßen in beiden Jahren auf.

Tab. 6: Korrelativer Zusammenhang des Blattfleckenbefalls der Kronen aller Aspenlinien in Großhansdorf 1999 und 2000

Jahr	Befallsmonat	1999		2000		
		Juli	August	Juni	Juli	September
1999	Juli	-	0,953**		-0,464	0,292
	August		-		-0,398	0,295
2000	Juni			-	0,853**	0,719*
	Juli				-	0,626
	September					-

Tab. 7: Korrelativer Zusammenhang des Blattfleckenbefalls der Kronen der Esch-Linien in Großhansdorf 1999 und 2000

Jahr	Befallsmonat	1999		2000		
		Juli	August	Juni	Juli	September
1999	Juli	-	0,708		0,347	0,357
	August		-		0,684	0,753
2000	Juni			-	0,822*	0,927**
	Juli				-	0,962**
	September					-

### Laborbefall

Der geringe Befall nach artifizierlicher Infektion an Blättern vom Juni 2000 ergab zum starken Laborbefall an Blättern vom Juli keinen korrelativen Zusammenhang (Tab. 8). Offensichtlich besitzen junge Aspenblätter eine höhere Resistenz, die nur zu geringem und untypischen Befall führt. Hoher Befall im Labor wurde erst an Blättern vom Juli erzielt. Wie bei vielen Pflanzen der gemäßigten Klimate würde dies einen Resistenzverlust mit zunehmendem Blattalter anzeigen. Der erzielte Befall an den Blättern vom Juli ergab dann signifikante Korrelationen zum Blattfleckenbefall der Aspenkronen im Juli. Die Übereinstimmung trotz deutlicher Unterschiede im Befallsniveau der Befallsprüfungen im Freiland und Labor zeigt, dass im Labortest durch Infektion

mit dem Haupterreger des Blattfleckenbefalls zutreffende Resistenzergebnisse ermittelt werden können.

Tab. 8: Korrelativer Zusammenhang des *Pollaccia radiosa* - Befalls an Aspenblättern und des Blattfleckenbefalls der Aspenkronen, Großhansdorf 2000

Befall	Befallsmonat	<i>Pollaccia radiosa</i> , Labor	
		Juni	Juli
<i>Pollaccia radiosa</i> , Labor	Juni	-	0,235
Blattflecken	Juni	-0,225	0,667*
	Juli	0,291	0,680*
	Sept.	-0,011	0,745*

Die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der durch Einschätzungen gewonnenen Daten zeigt für Freilandbonituren sowie für Labortests die Zuverlässigkeit der Iterativen Boniturmethode.

Zusammenfassend ergibt sich aus den ermittelten Befallsdaten, dass in den *ro/C* transgenen Aspenklonen im Vergleich zu den nichttransgenen Kontrollpflanzen die Basisresistenz gegenüber pilzlichen Pathogen der Phyllosphäre signifikant reduziert wurde. Die 1999 beobachtete Resistenz der transgenen Linien W2-2 und W2-2 gegenüber Blattfleckenbefall trat ein Jahr später nicht mehr auf. Diese Linien waren nunmehr höher als die Kontrollaspen befallen und glichen damit dem Befallsmuster der übrigen transgenen Linien. Den größten relativen Verlust an Basisresistenz gegenüber Blattflecken und Pappelrost zeigten die transgenen Linien von Esch5. Die Laborbefallsergebnisse spiegelten den natürlichen Befall im Freiland wider.

### Rußtau

Rußtau ist für Aspen nicht pathogen. Dennoch könnte die verminderte Assimilationsfläche physiologische Auswirkungen haben. Zwischen den Rußtaubelägen und dem Blattfleckenbefall ergab sich im Juni 2000 nur ein geringer Korrelationskoeffizient von  $r=0,321$  (Tab. 9), der Zusammenhänge



zwischen beiden Phänomenen nicht erkennen ließ. Eine mittlere Korrelation ergab sich zum Saccharosegehalt der Aspen (Tab. 9).

Wenn auch die Ausscheidungen von Insekten als wichtigste Voraussetzung für das Auftreten von Rußtau gilt, so könnten aber auch Blatinhaltsstoffe, die möglicherweise durch Niederschlagsbeläge auf die Blattoberfläche diffundieren, was schon Gaeumann (1951) beschrieb, für die Ansiedlung von Rußtaupilzen von Bedeutung sein. So fiel auf, dass der stärkere Rußtaubelag stets bei transgenen Linien auftrat, bei denen auch höhere Mengen von Glucose und Fructose gefunden wurden (siehe Abb. 2). Inwieweit das Auftreten von Rußtau bei Aspen mit mutmaßlichen Stoffen auf der Blattoberseite zutun haben könnte, müsste aber erst näher untersucht werden.

### **Korrelationen zwischen Aspeninhaltsstoffen zum Befall**

In Tab. 9 sind die Korrelationskoeffizienten der Untersuchungen von 1999 dargestellt, die die statistischen Zusammenhänge zwischen den Mengen verschiedener Inhaltsstoffen von Aspenblättern und der Befallshöhe von pilzlichen Blattpathogenen zeigen.

Saccharose zeigte positive und negative korrelative Bezüge zum Befall und ließ keine einheitlichen Zusammenhänge erkennen. Diese gegensätzlichen Wirkungen waren beim Pappelrost stärker ausgeprägt als bei den Blattfleckererregern. Tendenzielle Zusammenhänge zwischen Saccharose und Krankheitsbefall der Aspe lassen sich aus diesen Daten nicht ableiten.

Zwischen dem Glucosegehalt und dem Blattfleckenbefall ergaben sich positive Korrelationen, die Ende Juli/Anfang August hoch und signifikant waren. Für Pappelrost waren diese Korrelationen erst Ende August hoch und signifikant. Sehr ähnliche Korrelationen wurden zwischen den Fructosegehalten und dem Krankheitsbefall gefunden. Die Werte zeigen, daß mit steigenden Glucose- und Fructosegehalten in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Blätter ein steigender Blattbefall verbunden war.

Ende August war 1999 ein verfrühter Blattneuaustrieb zu beobachten, der in diese vergleichenden Untersuchungen miteinbezogen wurde. Zwischen Inhaltsstoffen und Blattfleckenbefall ergaben sich negative und geringe

Korrelationswerte, die eine nähere Einschätzung nicht zulassen. Zum Pappelrost lagen diese Werte höher und deuten auf korrelative Beziehungen hin. Zwischen Saccharose und Pappelrost zeigten neuausgetriebene Blätter eine negative Korrelation, während Glucose und Fructose positiv korrelierten. Diese Daten bestätigten die Ergebnisse an normal gebildeten Blättern.

Tab. 9: Korrelationen zwischen Befall und Aspeninhaltsstoffen, 1999

Befall	Inhaltsstoffe	Blattflecken - Befall		Pappelrost - Befall	
		29. Juli	26. August	29. Juli	26. August
Saccharose	22. Juli	0,241		0,842*	
	5. August	-0,765		-0,794	
	26. August.		-0,050		-0,416
Glucose	22. Juli	0,209		0,078	
	5. August	0,998**		0,502	
	26. August.		0,743		0,931**
Fructose	22. Juli	0,224		0,113	
	5. August	0,982*		0,628	
	26. August.		0,794*		0,935**
Chlorophyll	9. August	-0,590	-0,996	-0,981	-0,995
verfrühter Neuaustrieb					
Saccharose	26. August		-0,423		-0,792
Glucose	26. August		-0,143		0,554
Fructose	26. August		-0,318		0,664

Tab. 10 zeigt die Korrelationskoeffizienten zwischen Inhaltsstoffen und Befall für das Jahr 2000.

Saccharose zeigte zu allen Erregern keine korrelativen Bezüge. Nur zum Rußtau könnte sich eine gewisse Korrelation abzeichnen. Zu anderen Zuckern zeigte Rußtau kaum korrelative Beziehungen.

Andererseits sei auf die schon o. g. Beobachtung verwiesen, daß stärkerer Rußtaubelag stets bei transgenen Linien auftraten, bei denen auch höhere Mengen von Glucose und Fructose gefunden wurden.

Zwischen Pappelrostbefall und den Glucose- sowie Fructosegehalten könnten gewisse korrelative Zusammenhänge bestehen, wogegen zur Stärke und Abscisinsäure positive Korrelationen nachgewiesen werden konnten. Zwischen dem Befall mit *P. radiosa* im Labor und den Glucose- sowie Fructosemengen deutete sich ein korrelativer Zusammenhang an. Die hohen

Korrelationskoeffizienten vom Jahr 1999 zwischen Pappelrost und den Zuckern Glucose sowie Fructose konnten im Jahr 2000 nicht beobachtet werden. Dagegen konnten auch 2000 eindeutige korrelative Beziehungen zwischen Glucose- und Fructosegehalt zum Blattfleckenbefall festgestellt werden.

Die Korrelationen zwischen Zuckern und Laborbefall widerspiegeln tendenziell die Freilandergebnisse.

Tab. 10: Korrelationen zwischen Befall und Aspeninhaltsstoffen, 2000

Befall		Blattflecken-Befall			Pappelrost-Befall		<i>Pollaccia radiosa</i> Laborbefall		Rußtau
		5. Juni	24. Juli	25. Sept.	24. Juli	25. Sept.	5. Juni	24. Juli	
<b>Saccharose</b>	5. Juni	-0,101					-0,060		0,572
	24. Juli		0,232		-0,413			-0,430	
	25. Sept.			-0,469		0,078			
<b>Glucose</b>	5. Juni	0,761**					-0,281		0,276
	24. Juli		0,809**		-0,436			0,569	
	25. Sept.			0,633*		-0,513			
<b>Fructose</b>	5. Juni	0,669*					-0,224		0,263
	24. Juli		0,815**		-0,387			0,515	
	25. Sept.			0,437		0,586			
<b>Stärke</b>	24. Juli		-0,328		0,872**			-0,121	
<b>Abscisinsäure</b>	25. Sept.			0,831		0,756			

Glucose wie Fructose bilden für Pilze eine der wichtigsten Nahrungsgrundlagen, die diese positiven Korrelationen für die Blattfleckenerreger erklären könnten. Die wenigen Korrelationen zwischen dem Befall einerseits und den Stärke- wie Abscisinsgehalten andererseits erlauben noch keine zutreffende Einschätzung. Die negativen Korrelationen zwischen Zuckern und Pappelrost deuten darauf hin, daß sie für den Rost nicht in allen Entwicklungsstadien des Blattes als Nahrungsquelle dienen.

Stärke und Abscisinsäure scheinen vom Rost eher genutzt werden zu können als von Blatterregern. Beide Verbindungen kommen als Nahrungsquelle offenbar noch vor der Nutzung von Saccharose für den Pappelrost in Frage. Für den Rußtau zeichnet sich eine gewisse Abhängigkeit vom Zuckergehalt der Blätter ab, was durch weitere Untersuchungen noch zu stützen wäre.

In Tab. 11 finden Korrelationen zwischen Aspeninhaltsstoffen 1999 und 2000 sowie in Tab. 12 die zwischen dem Befall 1999 und 2000.

Tab. 11: Korrelationen zwischen Aspeninhaltsstoffen 1999 und 2000

Inhaltsstoffe	2000	Saccharose			Glucose			Fructose			Stärke
		5.Juni	24.Juli	25.Sept.	5.Juni	24.Juli	25.Sept.	5.Juni	24.Juli	25.Sept.	
<b>1999</b>											
<b>Saccharose</b>	22. Juli	0,561	0,035								0,203
	5. Aug.		-0,140								-0,504
	26. Aug.			-0,559							
<b>Glucose</b>	22. Juli				-0,346	0,826*					0,832*
	5. Aug.					-0,888					0,352
	26. Aug.						0,925*				
<b>Fructose</b>	22. Juli							-0,308	0,841*		0,827*
	5. Aug.								-0,871		0,453
	26. Aug.									0,835*	
<b>Chlorophyll</b>	9. Aug.										0,911
<b>verfrühter Neuaustrieb</b>											
<b>Saccharose</b>	26. Aug.		-0,874	-0,721							
<b>Glucose</b>	26. Aug.					0,639	0,715				
<b>Fructose</b>	26. Aug.								0,305	0,600	

Tab. 12: Korrelationen zwischen dem Befall 1999 und 2000

		Blattflecken - Befall					Pappelrost - Befall				<i>Pollaccia radiosa</i> Laborbefall	Rußtau	
		1999		2000			1999		2000		2000		2000
		Juli	Aug.	Juni	Juli	Sept.	Juli	Aug.	Juli	Sept.	Juni	Juli	Juni
<b>Blattflecken</b>	Juli		0,953*										
<b>1999</b>	Aug.												
<b>Blattflecken 2000</b>	Juni				0,853**	0,719*					-0,225	0,667*	0,321
	Juli					0,626					0,291	0,680*	
	Sept.										-0,011	0,745*	
<b>Pappelrost</b>	Juli							0,902**					
<b>1999</b>	Aug.												
<b>Pappelrost</b>	Juli									0,909**			
<b>2000</b>	Sept.												
<b><i>P. radiosa</i>-Befall 2000</b>	Juni											0,235	-0,232
	Juli												0,251

## Literatur

- Bao, X., Zheng, S. and Jiang, G., 1992:** An investigation on phyllosphere sooty moulds of China II. Phyllosphere sooty moulds of *Populus-tomentosa* Carr.
- Gieffers, W. und Matthias Fladung, 1999.** Zur Methodik der Befallsprüfung pathogener Pilze an der Aspe. Texte Umweltbundesamt, Freisetzung transgener Gehölze – Stand, Probleme, Perspektiven, Berlin, 92-97
- Gaeumann, E. 1951:** Pflanzliche Infektionslehre, Birkhäuser, Basel, 681 S.
- Nirenberg, H.I., 1976:** Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der Fusarium-Sektion *Liseola*. Mitt. Biol. BundAnst. Land- u. Fortsw., Berlin, Heft 169

## Dissemination

Die Ergebnisse, die in diesem Abschlußbericht beschrieben sind, wurden bisher nur teilweise veröffentlicht bzw. im Rahmen von Tagungen in Vorträgen oder Postern präsentiert (siehe nachfolgende Auflistung).

## Veröffentlichungen nach Reviewverfahren 2000:

- Fladung, M. (2000) Aufbruch durch Gentechnik. Wochenblatt für Papierfabrikation, Frankfurt am Main 128 (5), 248-250.
- Grünwald, C., Deutsch, F., Eckstein, D., Fladung, M. (2000) Wood formation in *rolC* transgenic trees. *Trees*, 14, 297-304.
- Grünwald, C., Ruel K., Fladung M. (2001) Morphology, wood structure and cell wall chemistry of *rolC* transgenic and non-transformed aspen trees. *Trees* 15, 503-517.

## Veröffentlichungen ohne Reviewverfahren 2000:

- Fladung, M. (2000) Transgenic trees for a better world? In: Proc. of the Intern. Congress "Application of Biotechnology to Forest Genetics" (Biofor-99), 22.-25. September 1999, Hrsg. S. Espinel; E. Ritter, Vitoria-Gasteiz, Spain, 2000, S. 339-345.
- Fladung, M.; Muhs, H.J. (2000) Field release with *Populus tremula* (*rolC*-gene) in Großhansdorf. In: "Release of transgenic trees – Present achievements, problems, future prospects", Tagungsband zum Fachgespräch am 20. und 21.9.1999, Humboldt-Universität zu Berlin, S. 40-45.

- Fladung, M.; Gieffers, W.; Muhs, H.-J. (2000) Untersuchungen zum Hormon- und Kohlenhydratmetabolismus in *rolC*-transgenen Aspenklonen (*Populus tremula* und *P. tremula x P. tremuloides*) und deren Auswirkungen auf phytopathologische Eigenschaften. In: Biologische Sicherheitsforschung bei Freilandversuchen mit transgenen Organismen und anbaubegleitendes Monitoring, Hrsg. J. Schiemann. Proc. zum BMBF-Statusseminar am 29. und 30. Juni 1999, Braunschweig, Maul Druck Verlag, Braunschweig, S. 37-42.
- Fladung, M.; Muhs, H.J.: Transgene Bäume in Schleswig-Holstein. In: Biotechnologie. Oesser, M.; Jacobs, H.; Kubbutat, K. (Eds.), Schmidt Römhild, Lübeck, (1999), S. 24-26.
- Gieffers, W., Fladung, M. (1999) Zur Methodik der Befallsprüfung pathogener Pilze an der Aspe. Texte Umweltbundesamt, Freisetzung transgener Gehölze – Stand, Probleme, Perspektiven, Berlin, 92-97
- Grünwald, C., Fladung, M. (2000) Molekulare Regulation der Holzbildung – Sind Holz- und Fasereigenschaften genetisch modifizierbar?-. In: Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Nr. 200, Kommissionsverlag Hamburg, 69-76.

### **Vorträge und Vortragsabstracts**

- Fladung, M. Hilft die Gentechnik der Forstpflanzenzüchtung? 24. Internationale Arbeitstagung der Arbeitsgemeinschaft für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung: "Nachhaltige Nutzung forstgenetischer Ressourcen". Pirna, 14. bis 16.03.2000.
- Fladung, M.: Aus dem Labor auf das Feld: Erfahrungen aus einem Freilandversuch mit gentechnisch veränderten Bäumen. Jährliches Treffen der Deutschen Gesellschaft für Ökologie, Kiel, 12.9.2000.
- Fladung, M.: Genetische Modifizierung von Organismen. Sitzung des Verbands Deutscher Papierfabriken, Arbeitskreis Zellstoffverbraucher, in Baden-Baden am 27.6.2000.
- Fladung, M. Möglichkeiten und Grenzen der Gentechnik in der Forstwirtschaft. Holzchemisches Kolloquium am Institut für Holzchemie der BFH, Hamburg, am 06.05.1999.

- Fladung, M. Bäume und Gentechnik. 5. Sitzung des APV-Arbeitskreises "Rationelle Nutzung nachwachsender Rohstoffe", bei Stora Kabel, Hagen, vom 24.-25.3.1999. 25.3.1999.
- Fladung, M. Aufbruch durch Gentechnik. APV-Jahrestreffen 1999, in Darmstadt am 29. und 30.10.1999.
- Fladung, M. Transgene Bäume – Perspektiven und Grenzen. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Tage im Landesinstitut für Schule, in Bremen am 3.2.1999.
- Fladung, M. Transgenic trees for a better world? Biofor 99 "Applications of Biotechnology to Forest Genetics, Vitoria-Gasteiz, Spanien, 22.-25.9.1999.
- Fladung, M.: Gentechnik in der Forstwirtschaft: Verein der Deutschen Papierfabriken, Axel-Springer-Haus, in Berlin am 22.11.2001.
- Fladung, M.; Kumar, S.; Kaldorf, M.; Grünwald, C.; Deutsch, F.; Muhs, H.-J.: Integration und Expression von fremden Genen in Zitterpappeln. 14. Tagung "Molekularbiologie der Pflanzen", Dabringhausen vom 28.2. bis 3.3.2001.
- Fladung, M., Kaldorf, M., Gieffers, W., Kumar, S., Buscot, F., Muhs, H.-J. Risk assessment studies on transgenic aspen trees grown in the field. Workshop on Biosafety Research, Braunschweig, Germany, October 21-24, 2001.
- Gieffers, W., Fladung, M. Zur Methodik der Befallsprüfung pathogener Pilze an der Aspe. Fachgespräch "Freisetzung transgener Gehölze – Stand, Probleme, Perspektiven", in Berlin am 20. und 21.9.1999.

### **Posterpräsentationen**

- Deutsch, F.; Muhs, H. J.; Fladung, M.: Ausbildung von Blütenknospen bei *rolC*-transgenen Zitterpappeln unter Freilandbedingungen. Botaniker-Tagung 2000, Jena, 19. bis 21.9.2000. Poster
- Fladung, M., Kumar, S., Kaldorf, M., Gieffers, W., Buscot, F., Muhs, H.-J. Field release of *rolC* transgenic aspen-*Populus*. MCC-2000 – Mendel Centenary Congress", Brno/Tschechien, 7. bis 9. 3.2000.
- Fladung, M., Nowitzki, O., Ebbinghaus, D., Schellhorn, A., Bentien, G., Ahuja, M.R., Muhs, H.-J. Field release of *rolC* transgenic aspen-*Populus*. Forest Biotechnology'99, Oxford, Großbritannien, 11.-16.7.1999.

Fladung, M., Nowitzki, O., Ebbinghaus, D., Schellhorn, A., Bentien, G., Ahuja, M.R., Muhs, H.-J. Field release of *rolC* transgenic aspen-*Populus*. Biofor 99 "Applications of Biotechnology to Forest Genetics, Vitoria-Gasteiz, Spanien, 22.-25.9.1999.

Fladung, M., Kaldorf, M., Gieffers, W., KumaR, S., Buscot, F., MuhS, H.-J. Investigations of *rolC*-transgenic aspen trees under field conditions. IUFRO Meeting "Molecular Biology of Forest Trees". Stevenson, Washington/USA, 22.-27.7.2001.

Grünwald, C., Schmitt, U., Deutsch, F., Eckstein, D., Fladung, M. 35S-*rolC* transgenic aspen – a useful system for in vivo wood formation research. Biofor 99 "Applications of Biotechnology to Forest Genetics, Vitoria-Gasteiz, Spanien, 22.-25.9.1999.