

ARBEITSBERICHT

Vergleichende Untersuchungen zur Stabilität und Expression von fremden Genen in krautigen und verholzenden Pflanzen am Beispiel von Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) und Aspe (*Populus tremula* L.)

und

Ergänzende Untersuchungen zur Stabilität und Expression von *rolC* und *iaaL* in verholzenden Pflanzen am Beispiel von Aspe (*Populus tremula* L.) und Hybridaspn (*P. tremula* X *tremuloides*)

Arbeitsbericht des Instituts für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung

Nr. 1999/1



**Bundesforschungsanstalt
für Forst- und Holzwirtschaft**

Abschlußbericht zum DFG-Vorhaben

FL263/1-1

Vergleichende Untersuchungen zur Stabilität und Expression von fremden Genen in krautigen und verholzenden Pflanzen am Beispiel von Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) und Aspe (*Populus tremula* L.)

und

FL263/1-2

Ergänzende Untersuchungen zur Stabilität und Expression von *rolC* und *iaaL* in verholzenden Pflanzen am Beispiel von Aspe (*Populus tremula* L.) und Hybridaspn (*P. tremula* X *tremuloides*)

Dr. Matthias Fladung

Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft

Institut für Forstgenetik

Sieker Landstr. 2

22927 Grosshansdorf

August 1999

Einleitung

Bei Pflanzen ist Gentransfer oder genetische Transformation in größerem Umfang erst seit Beginn der achtziger Jahre mit der Entwicklung eines Genübertragungssystem mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* möglich. *A. tumefaciens* ist ein gram-negatives Bakterium, das zur Familie der Rhizobiaceae gerechnet wird. Inzwischen sind Vertreter einer ganzen Reihe verschiedener Pflanzenarten gentechnisch verändert worden.

Viele gentechnische Arbeiten wurden an annualen Pflanzenarten durchgeführt, von denen einige bereits bis zur Marktreife entwickelt wurden (z.B. Baumwolle, Mais, Brandt 1996). Gentechnisch veränderte Linien anderer Pflanzenarten jedoch sind einer praxisrelevanten Nutzung weiter entfernt, da bei ihnen entweder die genomische Situation komplexer ist oder sie nicht einjährig, sondern langlebig sind (z.B. Bäume).

In dem vorliegenden Bericht werden Arbeiten zur Transformation von Bäumen am Beispiel der Zitterpappel (*Populus tremula*) beschrieben und, wenn möglich, mit bereits publizierten Ergebnissen zur Transformation der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) verglichen. Für den Gentransfer an beiden Arten standen zwei Gene zur Verfügung, die es erlaubten, die in den transgenen Pflanzen induzierten Veränderungen phänotypisch zu erkennen und bevorzugt zu untersuchen. Die dabei verwendeten Gene stammen jeweils aus Bodenbakterien.

Aus dem Bakterium *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* stammt das *iaaL* Gen, das für eine Indolacetat-Lysin-Synthetase kodiert (Glass und Kosuge 1986, Roberto et al. 1990). Das Enzym konjugiert das Hormon Indol-3-Acetat (IAA) mit Lysin und inaktiviert Auxin somit weitgehend in seiner Wirkung. Die Indolacetat-Lysin-Synthetase ist nicht nur für L-Lysin spezifisch, sondern kann auch andere Aminosäuren wie Ornithin konjugieren (Kosuge et al. 1983). Die biologische Rolle der Auxin-Konjugate ist bisher noch weitgehend unbekannt. So ist es interessant zu prüfen, inwieweit die Indolacetat-Lysin-Synthetase auf direktem oder indirektem Weg eine phänotypische Reaktion in den transgenen Pflanzen hervorruft. Bisher sind in der Literatur Berichte zur Übertragung des *iaaL* Gens aus *P. syringae* in Tabak und Kartoffel (Fladung 1993, Spena et al. 1991) bekannt.

Aus dem Bakterium *Agrobacterium rhizogenes*, das ein dem bereits erwähnten *A. tumefaciens* verwandtes, phytopathogenes Bodenbakterium darstellt, wurde das zweite, für diese Arbeit relevante Gen isoliert, das sogenannte *rolC* („root-locus“ C) Gen. *A. rhizogenes* bildet nach Infektion von pflanzlichen Geweben ähnlich wie *A. tumefaciens* an der Infektionsstelle charakteristische Auswüchse (De Cleene und De Ley 1976, 1981). Während jedoch *A. tumefaciens* knollenartige Verdickungen am Wurzelhals („Crown-Gall Tumour“ oder Wurzelhals-Tumor) induziert, werden bei *A. rhizogenes* sogenannte Wurzelhaare („Hairy-

Roots') gebildet (Smith and Townsend 1907, Riker et al. 1930).

Die T-DNA des Ri-Plasmids beinhaltet eine Reihe wichtiger Gene, die für die Bildung und Etablierung der Wurzelhaare verantwortlich sind (Costantino et al. 1994, Nilsson et al. 1997). Die bekanntesten Gene neben *rolC* sind weitere *rol*-Gene (*rolA*, *rolB* und *rolD*). Die Gene sind isoliert und in ihrer biologischen Wirkung einzeln oder in verschiedenen Kombinationen in transgenen Pflanzen getestet worden (Nilsson et al. 1993b, Schmülling et al. 1988, Spena et al. 1987).

Von den verschiedenen *rol*-Genen ist insbesondere das *rolC* Gen dadurch gekennzeichnet, daß das von diesem Gen gebildete Protein ein hormonautotrophes Wurzelwachstum auslöst. Berichte zur Übertragung von *rolC* in Pflanzen sind von Tabak (Nilsson et al. 1993a, Schmülling et al. 1988, 1993a, Scorza et al. 1994, Spena et al. 1987), Kalanchoe (Spena et al. 1987), Tomate (van Altvorst et al. 1992), Tollkirsche (Kurioka et al. 1992), Alfalfa (Frugis et al. 1995), Rose (van der Salm et al. 1997), Kartoffel (Fladung 1990, Fladung und Ballvora 1992, Fladung et al. 1993) und Pappel (Fladung und Ahuja 1996, Fladung et al. 1996, Fladung et al. 1997a, Nilsson et al. 1996b) veröffentlicht worden.

In diesem Abschlußbericht sollen Untersuchungen von *rolC*- und *iaaL*-transgenen Zitterpappeln vorgestellt sowie Analysen und Schlußfolgerungen zur Stabilität fremder in langlebigen Organismen aufgezeigt werden. Insgesamt wurden vier Aspenklone mit verschiedenen Genkonstrukten (*35S-rolC*, *rbcS-rolC*, *35S-iaaL*) sowie mit den gleichen Konstrukten, die aber zusätzlich *Ac* beinhalten, (*35S-Ac-rolC*, *rbcS-Ac-rolC*, *35S-Ac-iaaL*), transformiert. Abschließend soll versucht werden, einen Vergleich der Expression und der Stabilität/Instabilität der fremden Gene in Kartoffel und Zitterpappel zu ziehen.

Material und Methoden

Transformation von Aspen:

Verschiedene Klone der Europäischen Aspe (*Populus tremula* L.) und ein Hybridaskenklon (*P. tremula* L. X *P. tremuloides* Michx.) wurden mit Hilfe einer Methode zur Regeneration von Pflanzen aus Aspenblattstücken und der Methode der *Agrobacterium*-Kokultivierung von Aspen-'leaf-discs' transformiert (Fladung et al. 1996, 1997a). Die transgenen Pflanzen wurden nach Isolierung der DNA und RNA aus Blättern über PCR, Southern und Northern Experimente analysiert (Fladung und Ahuja 1995, Fladung et al. 1997a).

Morphologische Evaluierung:

Eine Evaluierung des Phänotyps der transformierten Aspen wurde im Vergleich mit gleichaltrigen nicht-transformierten Kontrollpflanzen erhoben. Bei den *rolC* transgenen Aspenpflanzen war eine visuelle Bonitur der *Ac*-Excision auf Blattebene aufgrund der hellgrünen Färbung der Blätter möglich.

Die Zeitpunkte des Abschlusses der Vegetationsperiode und des Austriebs wurden an drei aufeinander folgenden Jahren an Pflanzen erhoben, die unter Gewächshausbedingungen kultiviert wurden (ohne Zusatzbeleuchtung, Temperaturen zwischen 4 und 10°C im Winter und 15 und 35°C im Sommer). Insgesamt wurden zwischen 40 und 90 Pflanzen eines transformierten Klons untersucht.

Der Austrieb wurde anhand eines Boniturschlüssel (1=vollständig unentwickelte Knospe bis 5= vollständig ausgetriebene Knospe) nach Kleinschmidt und Svolba (1979) erhoben. Stadium 2 zeigt eine teilweise grüne Knospe an, die anzuschwellen beginnt, während Stadium 3 eine Knospe beschreibt, die gerade aufgebrochen ist und nur die Blattränder der sich neu entwickelnden Blätter sichtbar sind.

Sequenzierung:

Die Sequenzierung wurde mit Hilfe des BigDye[®]-Terminator Systems und einem ABI-310 Sequencer durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

1. Transgene Zitterpappeln im Gewächshaus

35S-*iaaL*-transgene Zitterpappeln

Habitus und Blattmerkmale von transgenen Pflanzen

Transgene Zitterpappeln mit dem 35S-*iaaL* Konstrukt weisen phänotypisch nur geringfügige Veränderungen auf (Abb. 1), wobei im Vergleich zur Kontrolle nur leicht nach unten gerichtete Blätter festgestellt werden konnten (Fladung und Ahuja 1996a, 1998, Fladung *et al.* 1999). Dagegen wiesen 35S-*iaaL*-transgene Tabakpflanzen eine Epinastie von Blättern auf, die bevorzugt in älteren Blättern zu beobachten war (Spena *et al.* 1991). Transgene Kartoffelpflanzen zeigten diese Epinastie bereits in vier Wochen alten Pflanzen, wobei auch hier ein verstärkter phänotypischer Effekt an älteren Blättern auftrat (Spena *et al.* 1991).

Der Effekt des 35S-*iaaL*-Genkonstrukts auf Habitus und Blattmerkmale ist somit bei transgenen Zitterpappeln viel schwächer ausgeprägt als bei Kartoffel und Tabak. Eine Beobachtung, die bei Tabak und Kartoffel gemacht wurde, kann helfen, den Sachverhalt bei der Zitterpappel zu verstehen. Beim Tabak trat eine stärkere Ausprägung der durch *iaaL*

hervorgerufenen Effekte während der individuellen Entwicklung erst spät mit Ausbildung der Blüten auf (Spena *et al.* 1991). Diese Beobachtung wurde auch bei Kartoffel gemacht, war aber hier weit schwächer ausgeprägt. Bei einem Baum, der in der Regel erst nach sieben bis 14 Jahren blüht, ist es somit durchaus möglich, daß die durch *iaaL* hervorgerufenen Effekte erst nach mehreren Jahren kurz vor Beginn der Blühreife auftreten.

Abb. 1: 35S-*iaaL*-transgene Zitterpappelpflanze (links) verglichen mit einer nicht-transgenen Kontrollpflanze (rechts). Deutlich sind die leicht abwärts geneigten Blätter an der transgenen Pflanze zu erkennen.



Während in 35S-*iaaL*-transgenen Kartoffeln und Tabak ein reduziertes Wurzelwachstum sowie eine erhöhte Anzahl von Seitensprossen und Stolonen gefunden wurde (Spena *et al.* 1991, Fladung 1993), ist eine Veränderung des Wurzelwachstums und des Verzweigungsgrads bei 35S-*iaaL*-transgenen Zitterpappeln nicht festzustellen.

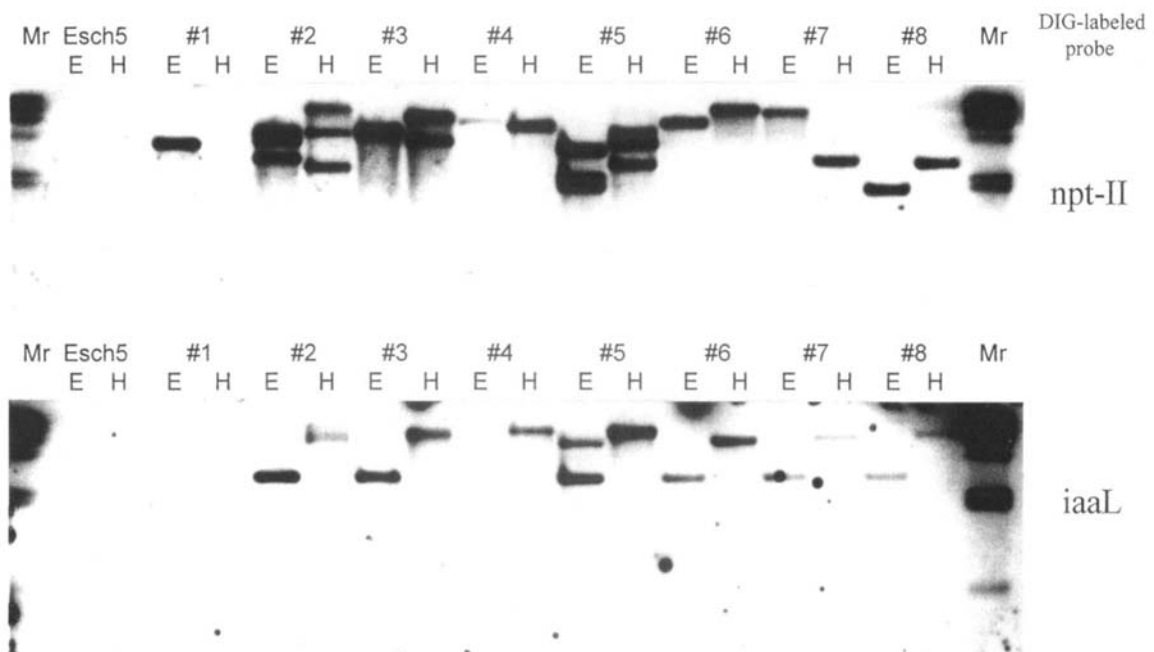
Bestimmungen des Gehalts an Auxinen in Blättern von transgenen Pflanzen zeigen reduzierte Gehalte freier Indolelessigsäure (IAA) und erhöhte Anteile konjugierter Formen (Spena *et al.* 1991). Ebenfalls signifikant erhöhte Gehalte an Auxinkonjugaten und nur leicht erhöhte freie IAA-Konzentrationen haben Sitbon *et al.* (1991) in transgenem Tabak gefunden, der das *iaaH*- und das *iaaM*-Gen unter Kontrolle ihrer natürlichen Promotoren beinhaltet. Bei *iaaM*- und *iaaH*-transgenen Tabak und Zitterpappeln jedoch konnte eindeutig gezeigt werden, daß Veränderungen der IAA-Konzentration und -Verteilung einen Einfluß auf den Habitus der

transgenen Pflanzen sowie auf holzanatomische Merkmale haben (Sitbon *et al.* 1992, Tuominen *et al.* 1995). Effekte nach einer Überexpression von T-DNA Auxin-Genen sind auch von Klee *et al.* (1987) in transgenen Petunien beobachtet worden. In der Regel stimulieren Auxine die vermehrte Bildung von Wurzelprimordien (Burström 1969), was weder für *iaaL*-transgene Kartoffel- noch Zitterpappelpflanzen gefunden werden konnte.

Molekulare Untersuchungen

Eine molekulare Analyse der 35S-*iaaL*-transgenen Zitterpappeln mit Hilfe der PCR bestätigte das Vorhandensein der Gene *npt-II* und *iaaL* (Fladung *et al.* 1999, Fladung, im Druck). Southern-Untersuchungen offenbarten die Integration von ein bis drei Kopien des *iaaL*-Gens im Genom von transgenen Zitterpappeln (Abb. 2; Fladung, im Druck), wie es auch für *iaaL*-transgene Tabak- und Kartoffelpflanzen gefunden wurde (Spena *et al.* 1991).

Abb. 2: Southern-Blot Analyse von verschiedenen Linien von 35S-*iaaL*-transgenen Zitterpappeln (#1 bis #8). 10 µg DNA aus Blättern wurden mit *EcoRI* (E) und *HindIII* (H) verdaut und dieselbe Membran hintereinander mit zwei DIG-markierten Sonden hybridisiert. A. DIG-markierte Sonde *npt-II*. B. DIG-markierte Sonde *iaaL*. Mr = Molekulargewichtsmarker



35S-*rolC*- und *rbcS-rolC*-transgene Zitterpappeln

Habitus, Chlorophyllgehalt und anatomische Untersuchungen

35S-rolC-transgene Zitterpappeln

Die Transformation von drei verschiedenen Genotypen der Zitterpappel mit dem 35S-*rolC*-Konstrukt resultierte in transgenen Pflanzen, die einen charakteristischen Habitus aufweisen. Die Pflanzen sind kleinwüchsig mit verkürzten Internodien und besitzen kleinere, hellgrüne Blätter (Fladung *et al.* 1996, 1997a, 1997b, Nilsson *et al.* 1996b). Die gleiche Beschreibung 35S-*rolC*-transgener Pflanzen wird auch für Tabak (Spena *et al.* 1987, Schmülling *et al.* 1988, Nilsson *et al.* 1993a) und Kartoffel (Fladung 1990, Fladung und Gieffers 1993) gegeben. Eine umfangreiche Charakterisierung des Habitus der erhaltenen transgenen Pflanzen belegt die sichtbaren Unterschiede der 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln im Vergleich zu entsprechenden Kontrollpflanzen (Fladung *et al.* 1996).

Bei 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln wird während der *in vitro*-Kultur eine stärkere Ausbildung des Wurzelsystems als bei Kontrollpflanzen gefunden (Fladung *et al.* 1997a). Demgegenüber wird im Gewächshaus ein stärkeres Wurzelwachstum bei den Kontrollpflanzen beobachtet (Deutsch 1998).

Bestimmungen der Chlorophyllgehalts offenbaren, daß der Gesamtchlorophyllgehalt von einjährigen 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln reduziert ist (Fladung und Muhs, unveröff.). Ähnliche Beobachtungen wurden auch von 35S-*rolC*-transgenen Tabak- (Spena *et al.* 1987, Schmülling *et al.* 1988), Kartoffel- (Fladung 1990, Fladung und Gieffers 1993), Tollkirschen- (Kurioka *et al.* 1992) und Tomatenpflanzen (van Althorst *et al.* 1992) gemacht. Wie für die Kartoffel (Fladung 1990) beschrieben, konnte auch für die Zitterpappel gezeigt werden, daß die Gehalte an Chlorophyll a und Chlorophyll b gleichermaßen reduziert waren, so daß ein unveränderter Quotient a/b erhalten wurde (Fladung, unveröff.).

Nach Blattfall im Herbst und Neuaustrieb im nächsten Frühjahr ist die hellgrüne Färbung der Blätter, wie sie bei den einjährigen 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln sichtbar ist, an den nun zweijährigen Pflanzen nur noch während des Austriebs deutlich erkennbar. Im Zuge der Reifung der Blätter verliert sich die hellgrüne Färbung, und die Blätter erscheinen häufig sogar dunkler grün als die der Kontrollpflanzen (Fladung, unveröff.).

Anatomische Untersuchungen von Zellen der unteren und oberen Blattepidermis von 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln zeigen keine Größenunterschiede zu nicht transformierten Kontrollen (Fladung und Ahuja 1996a), wie es auch für *rolC*-exprimierende Blattzellen nach *Ac*-Transposition beim Tabak beobachtet wurde (Spena *et al.* 1989).

Umfangreiche quantitative Untersuchungen zur Holzstruktur von 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln zeigten keine signifikanten Unterschiede der Faserlängen und des Durchmessers der Gefäßlumina verglichen mit nicht-transgenen Kontrollpflanzen (Deutsch 1998, Grünwald *et al.* eingereicht). Aus diesem Ergebnis und den bereits beschriebenen Zellgrößen von Blattepidermiszellen kann geschlossen werden, daß der Zwergwuchs der 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln nicht auf geringeren Zellgrößen, sondern auf einer geringeren Zellzahl beruht. Somit haben die zwergwüchsigen Zitterpappeln eine gleiche anatomische Grundlage wie natürliche Zwergmutanten, bei denen ebenfalls eine geringere Zellzahl als Ursache für den Zwergwuchs festgestellt wurde (Brown *et al.* 1994).

rbcS-rolC-transgene Zitterpappeln

Wird das *rolC*-Gen unter Kontrolle des lichtinduzierbaren Promotors *rbcS* für eine Transformation der Zitterpappel verwendet, zeigen transgene Pflanzen eine deutlich geringere Neigung zum Zwergwuchs als 35S-*rolC*-transgene Pflanzen (Fladung *et al.* 1996, 1997a). Dieses äußert sich in einem zum Wildtyp vergleichbaren Habitus, wie es auch für *rbcS-rolC*-transgene Kartoffel- und Tabakpflanzen berichtet wurde (Fladung *et al.* 1993, Schmülling *et al.* 1993b).

Auch die Blätter der *rbcS-rolC*-transgenen Zitterpappeln sind verglichen mit nicht-transgenen Kontrollen hellgrün gefärbt (Fladung *et al.* 1996, 1997a). *RbcS-rolC*-transgene Zitterpappeln weisen eine leicht erhöhte Blattzahl pro Einzelpflanze sowie einen geringfügig geringeren Stammdurchmesser auf (Fladung *et al.* 1996).

Molekulare Analysen

35S-rolC-transgene Zitterpappeln

Nachdem zunächst in PCR-Untersuchungen die Anwesenheit des *rolC*-Konstrukts in den transgenen Pflanzen gezeigt wurde, haben Southern-Analysen zur Integration von 35S-*rolC* in transgenen Zitterpappeln offenbart, daß bis zu drei Kopien des Konstrukts im Genom der transgenen Pflanzen integriert sind (Fladung *et al.* 1997a). Northern- und Western-Untersuchungen haben die Anwesenheit von *rolC*-spezifischer RNA und Protein in 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln bestätigt.

Deutlich ist der Einfluß der Kopienzahl auf die Expression von *rolC*-typischen Merkmalen zu erkennen. Diese Ergebnisse stehen in Koinkidenz zu Untersuchungen, die für 35S-*rolC*-transgene Kartoffeln durchgeführt wurden (Fladung und Ballvora 1992). Auch bei diesen Pflanzen fand sich ein Einfluß der Kopienzahl des 35S-*rolC*-Konstrukts im Genom der

transgenen Pflanzen auf die Expression von *rolC*-typischen Merkmalen, die mit der Stärke des *rolC*-spezifischen Signals in Northern-Untersuchungen übereinstimmte.

Die erhaltenen 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln mit bis zu drei Kopien ließen sich *in vitro* bewurzeln und ins Gewächshaus überführen (Fladung *et al.* 1997a). Gegen Ende der Vegetationsperiode warfen alle Linien die Blätter ab. Im nächsten Frühjahr jedoch trieben nur Linien mit einer Kopie des 35S-*rolC*-Konstrukts neu aus, während die Linien mit zwei und drei Kopien nicht mehr in der Lage waren, aus den noch grünen Knospen auszutreiben. Für 35S-*rolC*-transgene Kartoffelpflanzen wurde beschrieben, daß Pflanzen mit bis zu zwei Kopien des 35S-*rolC*-Konstrukts in das Gewächshaus überführt werden konnten, während transgene Linien mit vier und fünf Kopien nur in Gewebekultur zu kultivieren waren (Fladung und Ballvora 1992, Fladung 1996).

rbcS-rolC-transgene Zitterpappeln

PCR- und Southern-Blot-Analysen von *rbcS-rolC*-transgenen Zitterpappelpflanzen bestätigten die Integration des Genkonstrukts (Fladung *et al.* 1993, 1997a). In Southern-Blots konnten einzelne Banden unterschieden werden, die für das Konstrukt auf eine Anzahl von bis zu drei Integrationsorten hindeuteten (Fladung *et al.* 1997a). Bei der Kartoffel hingegen war, bedingt durch die Intensität einiger Signale in Southern-Blots, die Vermutung aufgekommen, daß eine multiple Integration von *rbcS-rolC* an jedem Integrationsort stattgefunden hatte (Fladung *et al.* 1993).

Das Vorhandensein von *rolC*-spezifischer RNA in verschiedenen Geweben von *rbcS-rolC*-transgenen Zitterpappeln wurde in Northern-Blot-Untersuchungen geprüft. Für *rbcS-rolC*-transgene Zitterpappeln wurde in Blättern Hybridisierungssignale erhalten, die in der Intensität mit denen von 35S-*rolC*-transgenen Pflanzen vergleichbar waren. Dagegen konnte im Sproß von *rbcS-rolC*-transgenen Pflanzen keine *rolC*-spezifische RNA nachgewiesen werden (Fladung *et al.* 1997a). Auch bei *rbcS-rolC*-transgenen Kartoffeln wurden *rolC*-spezifische Transkripte nur in den Blättern der transgenen Pflanzen gefunden (Fladung *et al.* 1993), während bei 35S-*rolC*-transgenen Kartoffeln sich ein *rolC*-spezifisches Signal sowohl im Sproß als auch in den Wurzeln offenbarte.

Bestimmung von Phytohormongehalten

35S-rolC-transgene Zitterpappeln

Die Bestimmungen der Gehalte von endogenen Phytohormonen sollten dazu beitragen, die bei 35S-*rolC*-transgenen Pflanzen gefundenen Veränderungen zu erklären. Da ursprünglich für das *rolC*-Gen eine Beteiligung in der Freisetzung von physiologisch-aktivem Cytokinin aus inaktiven Vorstufen postuliert wurde (Estruch *et al.* 1991), wurden zunächst die Gehalte von verschiedenen Cytokinen in Geweben von 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln bestimmt (Fladung *et al.* 1997a).

Die Messungen von Zeatinribosid- (ZR-) ähnlichen Cytokinen in reifen Blättern, im Sproß sowie im apikalen Teil der Sproßachse von 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln zeigen einen doppelten Gehalt verglichen mit entsprechenden Geweben von nicht-transgenen Kontrollpflanzen (Fladung *et al.* 1997b). Dagegen resultierte die Überexpression von *rolC* in transgenen Kartoffeln in einem etwa vierfachen Gehalt an verschiedenen Cytokinen wie Isopentenyladenosin, Dihydrozeatinribosid und *trans*-Zeatinribosid (Schmülling *et al.* 1993a). In 35S-*rolC*-transgenen Tabakpflanzen hingegen fanden Nilsson *et al.* (1993) in jungen Blättern eine drastische Reduktion von verschiedenen Cytokinen, während sie im apikalen Teil des Sprosses von 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln eine Zunahme an freien Cytokinen beobachteten (Nilsson *et al.* 1996b).

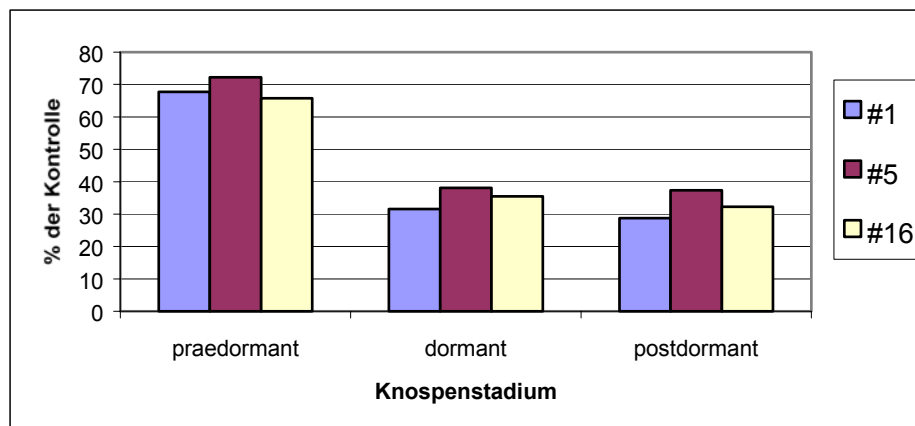
Der Zwergwuchs in 35S-*rolC*-transgenen Tabak-, Kartoffel- und Zitterpappelpflanzen ist mit einer bis zu 60%-igen Reduktion der Gibberellinsäure im apikalen Sproß korreliert (Fladung *et al.* 1997b, Nilsson *et al.* 1993a, 1996, Schmülling *et al.* 1993a). Nach Bestimmung der Gehalte verschiedener Intermediate des Gibberellinsäure-Biosynthesewegs scheint der beschriebene Effekt auf die Gibberellinsäure auf eine Hemmung der Konversion von GA₁₉ zu GA₂₀ zu basieren (Nilsson *et al.* 1993a, 1996). Reduzierte Gibberellinsäuregehalte finden sich auch in den Blättern von 35S-*rolC*-transgenen Kartoffeln, während in Wurzeln erhöhte Gehalte gemessen wurden (Schmülling *et al.* 1993a).

Eine exogene Applikation von Gibberellinsäure allein kann zwar die Internodienlänge bei den 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappel-, Tabak- und Kartoffelpflanzen wieder normalisieren, die Kleinblättrigkeit aber nicht aufheben (Fladung 1990, Schmülling *et al.* 1993a, Fladung, unveröff.). Appliziert man zusätzlich zur Gibberellinsäure die Hormone Auxin oder Cytokinin in steigenden Dosen, wird die Wirkung der Gibberellinsäure auf die Internodienlänge schrittweise wieder aufgehoben (Fladung 1990).

Die molaren Verhältnisse der Hormone Gibberellinsäure (GA) und Abscisinsäure (ABA) zeigen charakteristische Unterschiede zwischen Kontrollen und transgenen Pflanzen (Fladung

et al. 1997b, Schmülling *et al.* 1993a). Während das Verhältnis GA zu ABA in den untersuchten Geweben von Kontrollen zwischen 1:50 und 1:100 liegt, wurden in den

Abb. 3: Relative Gehalte der Abscisinsäure (ABA) in praedormanten, dormanten und postdormanten Knospen von 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln (Esch5:35S-*rolC*-#1, -#5, -#16). Die Knospen wurden zu unterschiedlichen Zeiten während der Winterruhe (Saison 1995/1996) geerntet.



entsprechenden Geweben von 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappel Werte zwischen 1:10 und 1:70 gefunden (Fladung *et al.* 1997b). Diese Veränderungen können zusätzlich zu der bereits geschilderten Veränderung des Gibberellinsäuregehalts auf eine drastische Reduktion der Abscisinsäure zurückgeführt werden. Eine ähnliche Situation ist für die Kartoffel beschrieben worden (Schmülling *et al.* 1993a).

Messungen von Hormonen in Knospen von 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln, die sich in unterschiedlichen Entwicklungsstufen befanden (prädomant, dormant, postdormant), ergaben in allen untersuchten Fällen reduzierte Gehalte der ABA (Abb. 3; Fladung *et al.* 1997b, Fladung *et al.*, unveröff. Ergebnisse).

rbcS-rolC-transgene Zitterpappeln

Für *rbcS-rolC*-transgene Zitterpappeln, die das *rolC*-Gen vornehmlich in den Blättern exprimieren (Fladung *et al.* 1997a), kann die bereits für 35S-*rolC* beschriebene Erhöhung der ZR-ähnlichen Cytokinine in den Blättern ebenfalls gefunden werden, jedoch nicht im Sproß und nicht im apikalen Teil der Sproßachse (Fladung *et al.* 1997b). In diesen Teilen von *rbcS-rolC*-transgenen Pflanzen sind GA/ABA-Verhältnisse gefunden worden, die ähnlich wie die von Kontrollen liegen. In Blättern von *rbcS-rolC*-transgenen Zitterpappeln, in denen eine

hohe Expression von *rolC* zu beobachten ist, findet sich ein GA/ABA-Verhältnis wie bei 35S-*rolC*-transgenen Pflanzen beschrieben (Fladung *et al.* 1997b).

Austrieb aus Ruheknospen

Unterschiede im Gehalt von Phytohormonen können auch das Austriebsverhalten aus Knospen beeinflussen. Bei Bäumen sind der Zeitpunkt des im Spätsommer zu beobachtenden Wachstumsabschlusses, der von der Ausbildung einer terminalen Knospe begleitet wird, und der des Neuaustriebs im nächsten Frühjahr von besonderem Interesse (Fladung *et al.* 1996, 1997b). Tatsächlich werden bereits im Gewächshaus deutliche Unterschiede des Zeitpunkts der Ausbildung einer terminalen Knospe (Fladung *et al.* 1996, 1997b) sowie des Austriebs beobachtet. Alle 35S-*rolC*-transgenen Linien treiben bis zu zwei Wochen früher als nicht-transgene Kontrollen oder als transgene Linien, die andere Konstrukte tragen. Diese Ergebnisse bestätigen bereits frühere Beobachtungen an Knollen von 35S-*rolC*-transgenen Kartoffeln, bei denen während der Lagerung eine Keimung der Knollen etwa ein bis zwei Monate früher als bei den nicht-transgenen Kontrollen zu beobachten war (Fladung, unveröff.). Dagegen verhalten sich die *rbcS-rolC*-transgenen Zitterpappeln im Austrieb wie die nicht-transgenen Kontrollen (Fladung *et al.* 1997b, Fladung und Muhs, unveröff.). Auch bei Knollen von *rbcS-rolC*-transgenen Kartoffeln wurde kein verfrühtes Austreiben beobachtet (Fladung, unveröff.).

Der verfrühte Austrieb der 35S-*rolC*-transgenen Pflanzen korreliert mit den bereits beschriebenen, reduzierten ABA-Gehalten und läßt einen Einfluß der ABA im Prozeß der Aufrechterhaltung bzw. der Brechung der Dormanz von Knospen vermuten (Fladung *et al.* 1997b). Bisher sind jedoch die Zusammenhänge dieser Prozesse und in Verbindung zur Temperatur, die ebenfalls eine wichtige Rolle für den Prozeß des Austriebs spielt (von Wühlisch *et al.* 1995), auf molekularer Ebene noch nicht analysiert.

Desweiteren ist ein möglicher Zusammenhang des Austriebs mit dem Beginn der Kambiumaktivität interessant. Im Vergleich zwischen 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln und nicht-transgenen Kontrollpflanzen wird deutlich, daß die normalerweise mit dem Austrieb bei Pappeln einhergehende Initiierung der Kambiumaktivität bei den 35S-*rolC*-transgenen Pflanzen nicht zu beobachten ist (Deutsch 1998). Vielmehr stehen die 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln bereits in voller Beblätterung, bevor das Kambium aktiviert wird. Dieses Ergebnis beweist, daß nicht, wie vermutet, eine zeitliche Koinzidenz zwischen Austrieb und Kambiumaktivität besteht, sondern daß ein Austrieb stattfinden kann, ohne daß eine Holzbildung induziert wird (Grünwald *et al.* eingereicht).

Gemäß der Auxin-Hypothese wird eine Induktion der Kambiumaktivität auf die in brechenden Knospen und sich entfaltenden Blättern gebildeten Auxine zurückgeführt, die im Stamm basipetal transportiert werden (Aloni 1991). Bei 35S-*rolC*-transgenen Kartoffeln hat eine exogene Applikation von Auxin vergleichbar geringere Effekte hervorgerufen als bei den Kontrollpflanzen (Fladung 1990), was auf eine geringere Sensitivität von 35S-*rolC*-transgenen Pflanzen gegenüber Auxinen hindeuten würde. Somit könnte die verzögerte Initiierung der Kambiumaktivität bei 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln auf einer geringeren Sensitivität des Kambiums für Auxin basieren (Grünwald *et al.* eingereicht).

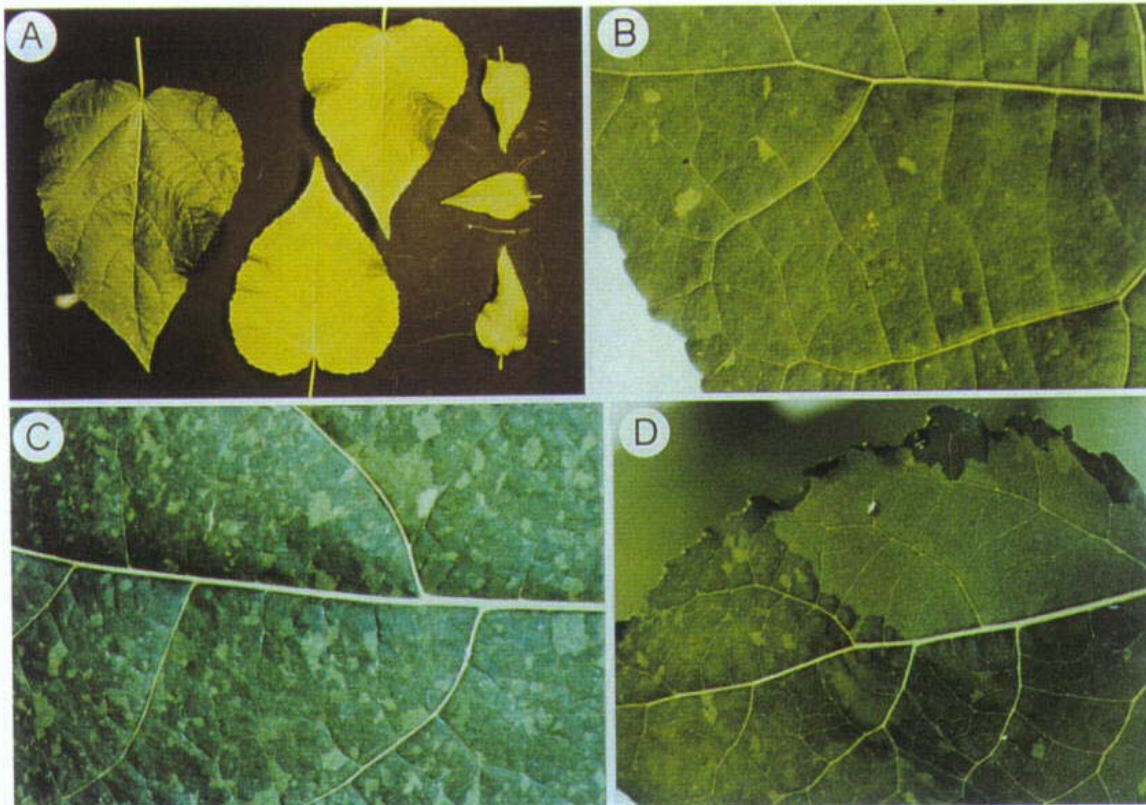
Transgene Zitterpappeln mit dem Transposon *Ac*

Habitus und Blattmerkmale

In unseren Arbeiten wurde zum ersten Mal die gentechnische Übertragung eines Transposons in einen Baum durchgeführt und die Fähigkeit zur Transposition des *Ac*-Elements in Bäumen gezeigt. Es standen Genkonstrukte zur Verfügung, die bereits bei Tabak-, Kartoffel- und Tomatenpflanzen für Transformationen verwendet wurden und *iaaL* oder *rolC* als Reportergene beinhalten (Spena *et al.* 1989, Jones *et al.* 1992, Spena, unveröff., Ballvora, unveröff.). Dabei verursacht die Insertion des Transposons (*Ac* aus Mais) zwischen dem Promotor und der kodierenden Region der Gene *iaaL* bzw. *rolC* eine Inaktivierung der Gene (Walbot 1992).

Während eine Expression von *rolC* in Blättern von 35S-*rolC*- und *rbcS-rolC*-transgenen Zitterpappeln in einer hellgrünen Färbung der Blätter resultiert (Abb. 4A), sind transgene Zitterpappeln, die das 35S-*Ac-rolC*- bzw. *rbcS-Ac-rolC*-Konstrukt tragen, im Habitus und in Blattmerkmalen im Vergleich zu Kontrollpflanzen nicht zu unterscheiden. An den Blättern von insgesamt 54 erhaltenen, unabhängig transformierten 35S-*Ac-rolC*-Linien der Zitterpappel waren aber bei 30 Linien hellgrüne und dunkelgrüne Sektoren zu finden. Dagegen offenbarten nur zwei von insgesamt 18 unabhängig transgenen Linien mit dem *rbcS-Ac-rolC*-Konstrukt variierte Blätter. Die Linien, die variierte Blättern hatten, zeigten entweder Blätter mit nur wenigen oder mit vielen kleinen, hellgrünen Sektoren (Abb. 4B, C). Vereinzelt wurden auch große hellgrüne Sektoren gefunden (Abb. 4D). Bei allen 35S-*Ac-iaaL*-transgenen Linien waren keine Veränderungen der Blätter festzustellen.

Abb. 4: Phänotypisch sichtbare Aktivität des Transposons *Ac* in Blättern von *rolC*-transgenen Zitterpappeln. A. Einfluß des *rolC*-Gens (ohne *Ac*) auf die Blattfarbe. Links: Blatt einer nicht-transgenen Kontrolle, Mitte und rechts: zwei bzw. drei Blätter von zwei *rbcS-rolC*- bzw. drei *35S-rolC*-transgenen Linien. B-D. Blätter von *35S-Ac-rolC*-transgenen Zitterpappeln, die hellgrüne Sektoren in dunkelgrünem Blattgewebe aufweisen. Das Auftreten der hellgrünen Sektoren zeigt eine Wiederherstellung der *rolC*-Expression in diesen Blattbereichen an, was ein Herausspringen des transposablen Elements *Ac* aus dem *35S-Ac-rolC*-Konstrukt vermuten läßt.



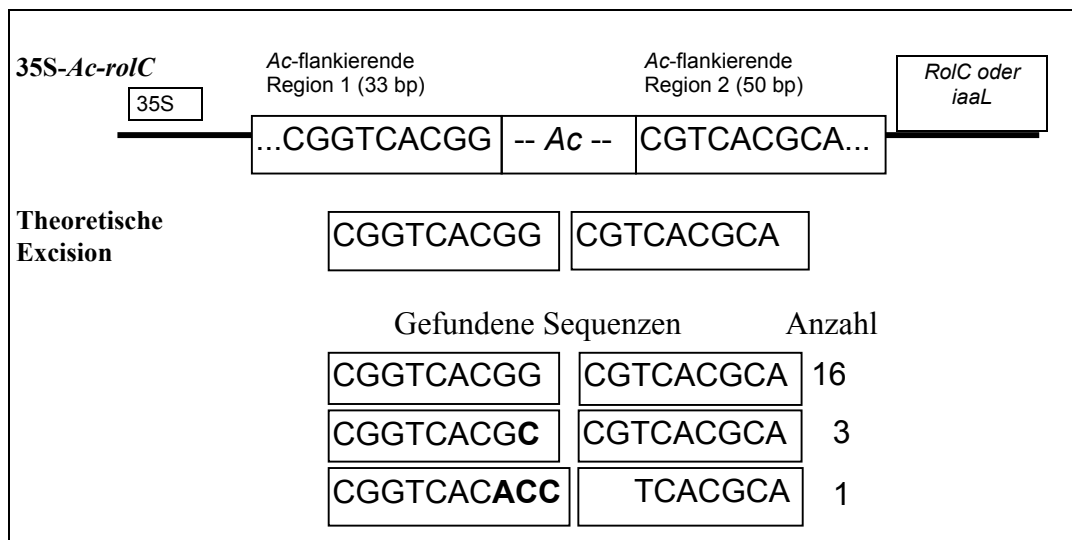
Molekulare Analysen

In PCR-Analysen waren mit Ausnahme von zwei Linien bei allen anderen getesteten Linien sowohl *Ac* als auch *rolC* nachzuweisen (Fladung *et al.* 1997a). Eine Southern-Analyse bestätigte das Vorhandensein beider Sequenzen, wobei bei den bisher untersuchten Klonen überwiegend jeweils eine Kopie von *rolC* und *Ac* gefunden wurde. Der molekulare Nachweis für *Ac*-Transposition wurde sowohl nach PCR als auch nach Southern- und Northern-Analyse erbracht (Fladung *et al.* 1999). Eine PCR-Amplifizierung des *35S-rolC*-Gens unter Verwendung geeigneter Primer, die jeweils am 5'- und 3'-Ende der Sequenzen liegen, ergab PCR-Produkte mit einer Länge von etwa 1,5 kb. Diese Amplifikationsprodukte von 1,5 kb Länge wurden nur in den hellgrünen Sektoren gefunden. Für die dunkelgrünen Sektoren wurden auch nach Southern-Transfer der PCR-Gele und anschließender nicht-radioaktiver

Hybridisierung keine *rolC*-spezifischen Signale detektiert (Länge von 35S-*Ac-rolC*: etwa 6 kb). In Northern-Experimenten wurde ein *rolC*-spezifisches Transkript nur in den hellgrünen Sektoren von variierten Blättern nachgewiesen, während in den dunkelgrünen Sektoren kein Signal gefunden wurde.

Der Übergang vom Promotor zum *iaaL*- bzw. *rolC*-Gen wurde nach Herausspringen des

Abb. 5: Das Transposon *Ac* mit seinen flankierenden Regionen ist zwischen 35S-Promotor und *rolC*- oder *iaaL*-kodierender Region integriert. Nach Herausspringen des *Ac*-Elements sind drei verschiedene Sequenzen des ursprünglichen Genorts gefunden worden.



Ac-Elements sequenziert (Abb. 5; Fladung 1999). Von 20 untersuchten Transpositions-Ereignissen bei 35S-*Ac-rolC*-transgenen Zitterpappeln wurde in 16 Fällen ein Herausspringen des *Ac*-Elements gefunden, wie es theoretisch zu erwarten war, während in vier Fällen Modifikationen der Nukleotidsequenz am Übergang Promotor/*rolC*- oder *iaaL*-Gen gefunden wurde (Abb. 5).

Der Nachweis der genomischen Re-Integration des *Ac*-Elements nach Herausspringen aus seiner ursprünglichen Position zwischen Promotor und *rolC*- bzw. *iaaL*-Gen wurde durch Southern-Experimente erbracht. Bei der Verwendung geeigneter Restriktionsenzyme, die im *Ac*-Element keine Restriktionsschnittstelle aufweisen, werden nach Hybridisierung mit *rolC*- bzw. *iaaL*- und *Ac*-spezifischen Sonden unterschiedliche Banden erhalten, die anzeigen, ob *Ac* gesprungen ist oder nicht (Fladung 1999).

Dieses System der Instabilität kann sowohl für das Studium von Zelllinien-Mustern während der Blatthistogenese als auch für ‚Gene-tagging‘-Experimente innerhalb der Baumart *P. tremula* verwendet werden. Da Bäume durch eine Vielzahl spezieller Merkmale wie

Langlebigkeit und Holzbildung charakterisiert sind, ist eine molekulare Analyse dieser genannten Prozesse bevorzugt in Bäumen möglich. Die Anwendung eines ‚Gene-tagging‘-Systems zur Isolierung von ‚baum-spezifischen‘ Genen und regulatorischen Sequenzen ist in langlebigen Organismen wie Bäumen nur eingeschränkt möglich. Da bei Bäumen die generative Phase erst nach einigen bis vielen Jahren vegetativer Entwicklung beginnt, kann erst dann durch Selbstungen erreicht werden, die hemizygot *Ac*-markierten Gene an allelischen Positionen auf den Chromosomen zu erhalten. Zusätzlich sind Zitterpappeln diözisch, d.h. männliche und weibliche Blütenorgane finden sich an verschiedenen Pflanzen. Für die Transformationsexperimente mit *Ac*-enthaltenden Konstrukten sollen daher haploide Linien von *P. tremula* zur Anwendung kommen.

Untersuchungen zur Stabilität fremder Gene in der Zitterpappel

Eine stabile Expression fremder Gene in transgenen Pflanzen ist für eine weitere Verwendung dieser Pflanzen in Züchtungsprogrammen unbedingt notwendig. Diese Forderung gilt sowohl für krautige Nutzpflanzen, die als Sorten großflächig angebaut werden und die neuen, gentechnisch übertragenen Eigenschaften über viele Generationen beibehalten müssen, als auch für Forstpflanzen, die sehr groß werden und lange Generationszeiten von vielen Dekaden haben können (Ahuja 1988, Fladung 1998a). Bei den häufig als Ziergehölze verwendeten Mutanten von Bäumen, die einen besonderen Habitus aufweisen (Panaschierung der Blätter, Zwergwuchs), können während der langen vegetativen Wachstumsphase Seitenzweige auftreten, die dem nicht-mutierten Pflanzenhabitus entsprechen (Pomeroy 1921, Schwanitz 1952/53, Langner 1954). An ausgewählten Beispielen dieser Formen wurden genetische Veränderungen beobachtet, die sich nach molekularbiologischen Untersuchungen als Reversionen darstellten (Fladung und Ziegenhagen 1998).

In unseren Arbeiten sind für eine schnelle Evaluierung der Wirkung des Transgens Markergene ausgewählt worden, die in den transgenen Pflanzen eine Veränderung des Habitus oder anderer Merkmale hervorrufen (*iaaL* aus *P. syringae* und *rolC* aus *A. rhizogenes*). Im Rahmen der Arbeiten hat es sich jedoch gezeigt, daß das *iaaL*-Gen in transgenen Zitterpappeln keine wesentlichen phänotypischen Veränderungen induziert, während das *rolC*-Gen unter Kontrolle des 35S-Promotors des Blumenkohl-Mosaik-Virus deutlich sichtbare Unterschiede zwischen Kontrollen und transgenen Pflanzen erzeugt. Die Eignung dieses Konstrukts für eine Verwendung als morphologischer Marker wurde bereits in 35S-*rolC*-transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen gezeigt (Schmülling und Schell 1993, Fladung 1996). In diesen Pflanzen wurden Beispiele von Chimären erhalten, die auf eine

Inaktivierung des *rolC*-Gens zurückzuführen waren (Fladung 1996). Aber auch nach Protoplastenfusion einer *rolC*-transgenen *Solanum papita* und einer *S. tuberosum* konnte die Eignung des 35S-*rolC*-Systems als morphologischer Marker gezeigt werden (Kaendler *et al.* 1996). Bereits auf Gewebekulturebene waren deutlich kleinwüchsige Hybride identifiziert worden, die von Pflanzen aus Kontrollfusionen unterschieden werden konnten.

Neben der Anwendbarkeit des Systems auf Tabak und Kartoffel kann dieses Konstrukt als ein Beispiel für Untersuchungen zur Stabilität fremder Gene im Genom von Forstpflanzen sowie zur stabilen Expression von Genen herangezogen werden. Während für krautige Pflanzen bereits umfangreiche Ergebnisse zum ‚Gene-silencing‘ auf transkriptioneller sowie auf post-transkriptioneller Ebene vorliegen (zusammengefaßt in Meyer 1995, Paszkowski 1994, Stam *et al.* 1997), sind zu dieser Thematik bei Forstpflanzen bisher nur von unserer Arbeitsgruppe Arbeiten veröffentlicht worden (Ahuja und Fladung 1996, Fladung und Ahuja 1996a, 1996b, Fladung *et al.* 1997c, Fladung und Muhs 1999, Fladung 1999).

Wie gentechnisch veränderte 35S-*rolC*-transgene Kartoffellinien (Fladung 1996) weisen auch 35S-*rolC*-transgene Zitterpappeln eine hohe genetische Stabilität der Konstrukte auf (Fladung und Ahuja 1996a, Fladung 1999, Fladung und Muhs, im Druck). Dennoch wurden auch bei 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln Variationen in der Expression von *rolC* gefunden. Von diesen sind saisonale und entwicklungsabhängige Variationen der Expression klar zu unterscheiden (Fladung, unveröff.). Solche nicht durch Reversionen verursachten Unterschiede wurden bereits für 35S-*uidA*-transgene Bäume beschrieben (Nilsson *et al.* 1996a).

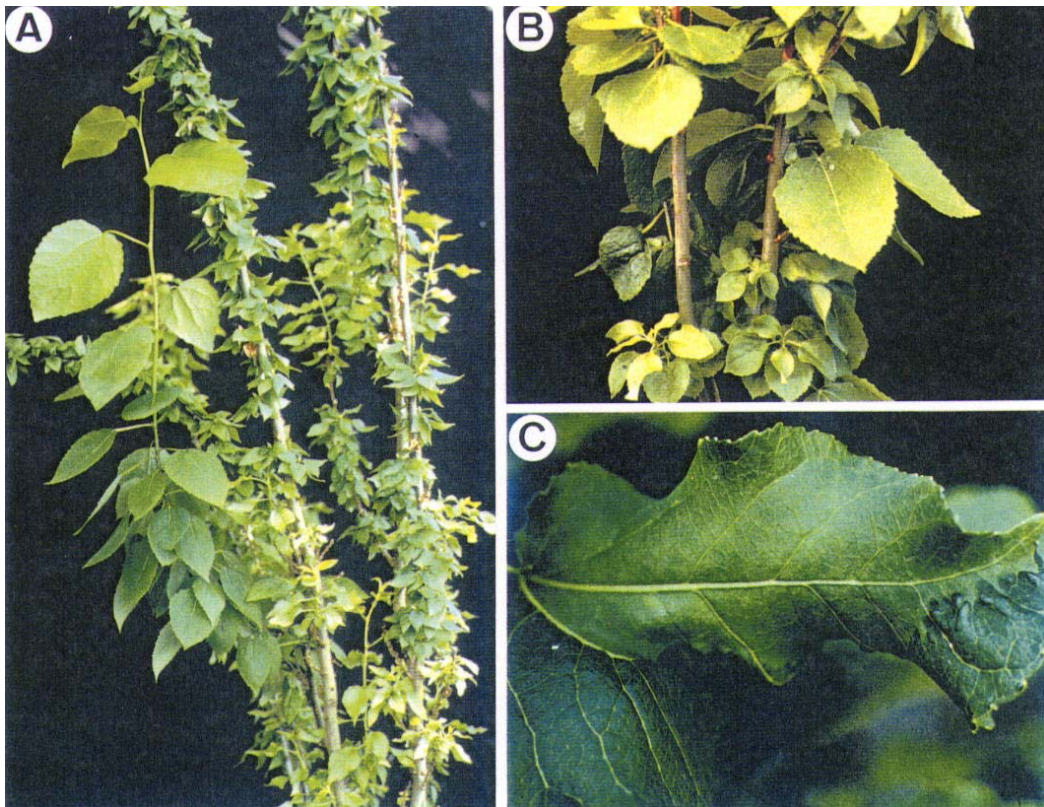
Reversionen, die auf eine *rolC*-Inaktivierung hinweisen, können durch den Habitus der Pflanzen sowie an veränderten Blattmerkmalen erkannt werden. Anstelle der typischen *rolC*-Charakteristika wie Kleinwüchsigkeit und Hellblättrigkeit wurden Merkmale des Wildtyps wie lange Internodien sowie große und grüne Blätter gefunden. In 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln wurden revertierte Sprosse in Linien gefunden, die nur eine Kopie von 35S-*rolC* trugen. Dagegen waren bei 35S-*rolC*-transgenen Kartoffeln die Reversionen nur in transgenen Linien beobachtet worden, die mehrere Kopien des *rolC*-Konstrukts trugen (Fladung 1996).

Diese revertierten Sprosse an 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln waren durch die längeren Internodien und größeren, dunkelgrünen Blätter zu erkennen (Abb. 6A). An den revertierten Sprosse waren teilweise auch chimäre Blätter zu finden (Abb. 6B), wobei der chimäre Charakter als hellgrünes Blattgewebe transgenen Ursprungs neben dunkelgrünen Wildtyp-Sektoren innerhalb desselben Blattes identifiziert wurde (Abb. 6C). Eine molekulare Analyse

der revertierten Triebe offenbarte das Fehlen des *rolC*-Gens sowohl auf DNA- als auch auf RNA-Ebene, obwohl es in den *rolC*-exprimierenden Geweben an derselben Pflanze in einer Kopie vorhanden war (Fladung 1999).

Eine molekulare Untersuchung des Integrationsorts des gesamten Konstrukts in verschiedenen transgenen Zitterpappel-Linien offenbarte Unterschiede sowohl in der Struktur der rechten und linken Border als auch in der Größe der eliminierten genomischen DNA nach Transgen-Insertion (Fladung 1999). Drei unabhängige Linien, die bisher *rolC* stabil exprimieren, weisen einen einfach strukturierten Transgen-Integrationsort auf. Dabei wird entweder eine fast vollständige linke Border (zwei fehlende Basenpaare) und eine komplett fehlende rechte Border gefunden, oder die linke Border ist um neun Basenpaare verkürzt, während die rechte Border die typischen drei Nukleotide ‚TGA‘ zeigt. Dagegen offenbarte die transgene Linie, die Reversionen zum Wildtyp-Phänotyp zeigt, einen komplex strukturierten Transgen-Insertionsort (Fladung 1999).

Abb. 6: Phänotypische Reversion bei der Zitterpappel. A. Revertierter Sproß einer 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappelpflanze. B. Revertierte Blätter. C. Chimäres Blatt. Das hellgrüne Blattgewebe repräsentiert den *rolC*-exprimierenden Teil, das dunkelgrüne Gewebe den Teil des Blattes ohne *rolC*-Expression.



Weitere Untersuchungen werden zur Zeit intensiv betrieben, um die molekulare Struktur des Transgen-Insertionsorts von 35S-*rolC*-transgenen Zitterpappeln zu analysieren, die ebenfalls durch Reversionen gekennzeichnet sind (Fladung und Kumar, unveröff.). Darüber hinaus soll der Transgen-Integrationsort bei einer Vielzahl von bisher das *rolC*-Gen stabil exprimierenden Linien untersucht werden. Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, in Bäumen genomische Bereiche zu charakterisieren, die eine langfristige stabile Integration und Expression von fremden Genen erlauben.

Bisher konnten in zwei Linien der Zitterpappel Abweichungen vom erwarteten Phänotyp beobachtet werden, während in allen anderen Linien keine Veränderungen gefunden wurden. Weitere, umfangreiche molekulare Analysen sollen durchgeführt werden, um die Ursachen der beobachteten Reversionen in der Zitterpappel zu klären.

2. Transgene Zitterpappeln unter Freilandbedingungen

Beschreibung des Versuchs

Untersuchungen zur Stabilität fremder Gene in Bäumen sind bisher hauptsächlich von im Gewächshaus kultivierten Pflanzen durchgeführt worden. Für eine Abschätzung wichtiger Fragen zum Verhalten gentechnisch veränderter Bäume im Freiland ist es aber notwendig, transgene Bäume unter Freilandbedingungen anzubauen (Fladung *et al.* 1997c, 1998, Fladung 1998b, Fladung und Muhs 1999). Als langlebige Organismen sind Bäume im Freiland in der Regel wechselnden Witterungsbedingungen ausgesetzt und müssen mit dem einmal vorhandenen Genbestand über Jahrzehnte bestehen. Daher muß gewährleistet sein, daß wenn gentechnisch veränderte Bäume in die forstliche Praxis eingeführt werden sollen, also unter natürlichen Bedingungen im Freiland über einen langen Zeitraum kultiviert werden, die erwünschten neuen Merkmalen genetisch stabil und funktionsbereit bleiben (Ahuja und Fladung 1996, Fladung 1998b, Fladung und Muhs 1999).

Einem Antrag der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, vertreten durch das Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Großhansdorf, vom 24. November 1995 auf Genehmigung einer Freisetzung mit gentechnisch veränderten Zitterpappeln in den Jahren 1996 bis 2001 wurde mit Bescheid vom 28. Mai 1996 stattgegeben. Somit konnte auf der institutseigenen Versuchsfläche an der Sieker Landstr. 2, Gemarkung Schmalenbek, Schleswig-Holstein, Flur 8348A, Flurstück 2115, mit dem ersten Freisetzungsversuch von gentechnisch veränderten Bäumen in Deutschland begonnen werden.

Als Ausgangsmaterial wurden Klone der Zitterpappel ausgewählt, die auch schon im Gewächshaus untersucht wurden. Das Versuchsmaterial bestand aus sechs verschiedenen,

unabhängigen 35S-*rolC*- und zwei *rbcS-rolC*-transgenen Linien. Die Versuchsanlage umfaßt eine Fläche von ca. 1500 qm. Die Pflanzen sind in einer Blockanlage vollständig randomisiert mit vier Wiederholungen und jeweils acht Pflanzen ausgepflanzt. Nicht-transformierte Ausgangsklone sind mit gleicher Pflanzenzahl ($4 \times 8 = 32$) 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.

Mit den geplanten Arbeiten sollen experimentell Fragen hinsichtlich der Stabilität und Expressivität fremder Gene im Genom von Forstpflanzen am Beispiel der Zitterpappel unter Einfluß natürlicher Bedingungen im Freiland in einem Zeitraum von vier Jahren untersucht werden.

Abb. 7: Blick auf den Freisetzungversuch mit gentechnisch veränderten Bäumen. Zeitpunkt der Aufnahme: August 1998.



Mit molekularen Methoden können die transgenen Pflanzen jederzeit hinsichtlich der Anzahl der integrierten Kopien von *rolC* untersucht werden. Hierfür wird entweder im Southern-Experiment ein Digoxigenin-markierter Abschnitt des *rolC*-Gens als molekulare Sonde eingesetzt oder die Inverse-PCR-Technik mit geeigneten Primern verwendet.

3. Bewertung der Ergebnisse in Hinblick auf eine praktische Verwendung transgener Bäume

Wie für den landwirtschaftlichen Bereich eröffnen gentechnologische Verfahren als effiziente Züchtungsmethodik auch für die Forstwirtschaft neue Perspektiven (Fladung 1998a, Griffin 1996, Gupta *et al.* 1993, Jouanin *et al.* 1993). Wesentliche Unterschiede zu landwirtschaftlichen Nutzpflanzen stellen bei Bäumen die vergleichsweise langen Nutzungszeiträume und Reproduktionsintervalle dar. Weiterhin sind viele Forstpflanzen im Gegensatz zu landwirtschaftlichen Nutzpflanzen größtenteils Wildpopulationen und aus molekulargenetischer Sicht weitgehend noch unerforscht.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die Zitterpappel als ein Beispiel gewählt, die Integration und Expression von fremden Genen in Bäumen zu studieren. Zur Zeit gibt es nur wenige experimentelle Ansätze, die es erlauben, einen Nutzen und mögliche Risiken bei der Verwendung von gentechnisch veränderten Bäumen in der Forstwirtschaft oder als Ziergehölze abzuschätzen. Die Diskussion über Bedingungen für eine Zulassung gentechnisch veränderter Bäume und über mögliche, daraus resultierende Risiken für forstliche Ökosysteme ist z.Z. in vollem Gang (Muhs 1998).

Der Einsatz gentechnischer Methoden bei Bäumen ist seit Ende der achtziger Jahre möglich (Griffin 1996, Gupta *et al.* 1993, Jouanin *et al.* 1993). Eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Übertragung von Fremdgenen setzt für die betreffende Pflanzenart in der Regel ein *in vitro*-Regenerationssystem voraus (Fladung 1998b). Für Forstpflanzen sind nur einige Beispiele bekannt, für die effiziente Regenerationssysteme etabliert worden sind, so daß züchterisch bearbeitetes Material (Ausleseebäume) derzeit nur von Pappeln in nennenswertem Umfang einem Gentransfer zugänglich ist (Ahuja 1986).

Bisher werden gentechnische Arbeiten in und außerhalb von Europa vornehmlich zur Verbesserung der Resistenz und von Holzeigenschaften von Bäumen durchgeführt. Vor allem heute liegt das Interesse auf einer Reduzierung bzw. Modifizierung der Zusammensetzung des Lignins (Boudet 1998, Baucher *et al.* 1998). Viele andere Eigenschaften des Holzes aber sind bisher auf molekularer Ebene noch nicht verstanden. Dieses macht die Entwicklung und den Einsatz von molekularen Markern notwendig (Neale and Harry 1994, Neale *et al.* 1992, Fladung und Stephan 1997). Die genetische Kontrolle für einige Eigenschaften des Holzes ist durch umfangreiche Untersuchungen gezeigt worden (Zobel und Jett 1995).

Auch wenn zur Zeit kein gentechnisch verändertes Pflanzenmaterial von Forstbaumarten in Deutschland und der Europäischen Gemeinschaft vermarktet wird, so ist abzusehen, daß dieses in den nächsten Jahren der Fall sein kann (Fladung 1998b, Griffin 1996, Muhs 1998).

Für den Verbraucher, insbesondere für den Waldbesitzer, stellt sich die Frage nach der Relevanz veränderter Inhaltsstoffe im Holz oder anderen Organen (z.B. Blättern) von Bäumen hinsichtlich möglicher veränderter phytopathologischer Eigenschaften (Resistenzen). Abgewogen werden müßten wirtschaftliche Verwendungsmöglichkeiten mit möglichen ökologischen Risiken beim Anbau von gentechnisch veränderten Bäumen (Muhs 1998).

Ein Problem, das offenbar spezifisch für langlebige Pflanzen ist, stellt die Gewährleistung einer stabilen Expression der übertragenen Gene über viele Jahre dar. Wird beispielsweise eine Krankheitsresistenz gentechnisch auf einen Klon übertragen und der Klon mit einer Umtriebszeit von etwa 30 Jahren angebaut, kann sich die übertragene Resistenz als instabil erweisen. Die betroffenen Pflanzen werden dann durch die allgegenwärtige und alljährlich auftretende Krankheit mehr oder weniger geschädigt, so daß nach Beendigung der Umtriebszeit kaum noch gesunde Pflanzen im Bestand vorhanden sind.

Die vorgelegten und andere Untersuchungen zur Stabilität fremder Gene in Bäumen sind bisher vornehmlich im Gewächshaus durchgeführt worden. Für eine Abschätzung wichtiger Fragen zum Verhalten gentechnisch veränderter Bäume im Freiland wurde der erste Freisetzungsversuch mit gentechnisch veränderten Bäumen in Deutschland etabliert (Fladung *et al.* 1997c, 1998, Fladung 1998b, Fladung und Muhs, im Druck). Als langlebige Organismen sind Bäume im Freiland in der Regel wechselnden Witterungsbedingungen ausgesetzt und müssen mit dem einmal vorhandenen Genbestand über Jahrzehnte bestehen. Daher muß gewährleistet sein, daß unter natürlichen Bedingungen gentechnisch übertragene Merkmale über einen langen Zeitraum genetisch stabil und funktionsbereit bleiben (Ahuja und Fladung 1996, Fladung 1998b, Fladung und Muhs im Druck). Dieser Forderung muß, sofern in absehbarer Zeit gentechnisch veränderte Forstpflanzen auf dem Markt angeboten werden, Rechnung getragen werden.

Bei der Betrachtung möglicher Risiken bei der Verwendung gentechnisch veränderter Bäume muß auch die Fähigkeit von Bäumen berücksichtigt werden, mit sogenannten Mykorrhizen eine Lebensgemeinschaft zu bilden. Mykorrhizen sind Symbiosen zwischen Pilzen und Feinstwurzeln, die mit hoher Intensität bei über 90% aller Pflanzenarten und insbesondere bei allen Bäumen vorkommen. Es ergibt sich ein Forschungsbedarf, Untersuchungen an Mykorrhizen bei der Begleitforschung nach Freisetzung gentechnisch veränderter Pflanzen mit einzubeziehen. In einer Kooperation mit der Universität Jena wird daher im Rahmen einer freisetzungsbegleitenden Sicherheitsforschung an den bereits freigesetzten *35S-rolC*- und *rbcS-rolC*-transgenen Zitterpappeln der Status der Mykorrhiza festgestellt und mit dem von Kontrollpflanzen verglichen. Die Wurzeln von Zitterpappeln können mit Hilfe molekularer

Methoden identifiziert und von denen z.B. der Gräser unterschieden werden (Ziegenhagen und Fladung 1997). Anschließend ist zu prüfen, ob und unter welchen Bedingungen ein möglicher horizontaler Gentransfer zwischen Pflanzen und Pilzen innerhalb einer mykorrhizalen Assoziation stattfinden kann. Diese letztere Fragestellung ist zentraler Bestandteil einer weiteren Kooperation, in der mit der Universität Tübingen ein weiterer Freisetzungsversuch mit gentechnisch veränderten Bäumen vorbereitet wird.

In einem weiteren bereits genehmigten Projekt sollen Untersuchungen zur Besiedelung phytopathogener Pilze auf den Blättern der freigesetzten *35S-rolC*- und *rbcS-rolC*-transgenen Zitterpappeln durchgeführt werden. Eine gleichzeitige Bestimmung des Gehalts an niedermolekularen Zuckern soll einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Kohlenhydratstoffwechsel, und dem Verhalten der *35S-rolC*- und *rbcS-rolC*-transgenen Bäume gegenüber phytopathogenen Pilzen offenbaren.

Schließlich ist im Rahmen einer Risikobetrachtung auch der vertikale Gentransfer via Pollen oder Samen zu berücksichtigen. Klone oder Sorten von in der Regel fremdbefruchtenden Forstpflanzenarten sind nicht durch Kreuzungsbarrieren von anderen Individuen der gleichen, nicht domestizierten Wildart getrennt. Wenn also eine unkontrollierte Ausbreitung eines Genkonstrukts, das in eine Zuchtsorte oder einen Klon gentechnisch übertragen wurde, verhindert werden soll, müssen dessen direkten und indirekten Ausbreitungsmöglichkeiten bekannt sein (Muhs 1998).

Die wirksamste Ausbreitung besteht über Pollen oder Samen. Wenn sich gentechnisch veränderte Pflanzen wie Wildpflanzen verhalten, und etwa den gleichen Fitnesswert (Zahl der erfolgreich etablierten Nachkommen) besitzen, kann es zu einer allmählichen Ausbreitung des Konstrukts kommen (Muhs 1998). Ist der Fitnesswert der gentechnisch veränderten Linie aber geringer als der von Wildpflanzen, werden die Nachkommen der transgenen Pflanzen auf lange Sicht keine erfolgreiche Introgression des Genkonstrukts in der Wildpopulation bewirken können. Die Wildpopulation wird damit ihren natürlichen Genbestand beibehalten (Muhs 1998). So muß als Schlußfolgerung bei der Betrachtung der verschiedenen Risiken der Ausbreitung gefordert werden, daß ein gentechnisch veränderter Klon steril sein muß (Muhs 1998, Strauss *et al.* 1995).

Jedoch können die wichtigen Fragen zum vertikalen Gentransfer im Rahmen des Freisetzungsversuchs mit *35S-rolC*- und *rbcS-rolC*-transgenen Zitterpappeln nicht bearbeitet werden. Eine Auflage für die Genehmigung des Freisetzungsversuchs durch das Robert-Koch-Institut in Berlin war, daß die gentechnisch veränderten Bäume keine fertilen Blütenorgane bilden dürfen. Im Rahmen einer Deutsch-Chinesischen Zusammenarbeit wird

aber zur Zeit eine Kooperation mit Forschergruppen in China angestrebt, die bereits vor etwa zehn Jahren gentechnisch veränderte Bäume ins Freiland ausgepflanzt haben (Ewald 1997). Ein Teil dieser Bäume bildeten 1998 Blüten (Ewald, pers. Mitteilung), so daß mit diesem Material in Kooperation mit den chinesischen Kollegen eine Risikoforschung zum horizontalen Gentransfer initiiert werden kann.

Gentechnisch veränderte Bäume können aber auch dazu verwendet werden, Projekte zur Genisolierung aus Bäumen und zur molekularen Analyse von Entwicklungsprozessen in verholzenden Pflanzen zu bearbeiten. Solche Gene sind von besonderem Interesse, die an der Ausprägung von typischen Eigenschaften von Bäumen wie Langlebigkeit und intensiver Verholzung beteiligt sind. Hier kann der Ansatz helfen, der im Rahmen dieser Arbeit an gentechnisch veränderten Zitterpappeln etabliert wurde. Dabei wurde zum ersten Mal ein Springendes Gen (Transposon *Ac* aus Mais) in eine Baumart überführt. Es konnte gezeigt werden, daß dieses Transposon in der Zitterpappel tatsächlich in unbekannte Bereiche des Genoms springt. Zur Zeit werden Arbeiten durchgeführt, haploide Zitterpappeln zu erhalten, um mit Hilfe eines effizienten Transposon-Tagging-System relevante Gene mit dem Transposon *Ac* zu markieren. Die erhaltenen Sequenzen können mit bereits bekannten Genomen (*Arabidopsis*, Reis, u.a.) verglichen und mit Hilfe vergleichender Ansätze wie der Mikrosyntanie kartiert werden. Eine Validierung der möglichen Funktion der erhaltenen Gensequenzen kann nach Transformation von Bäumen erfolgen.

Die beschriebenen *35S-rolC*- und *rbcS-rolC*-transgenen Zitterpappeln stellen auch das Untersuchungsmaterial dar, das in Zusammenarbeit mit dem Institut für Holzbiologie der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft für die Beantwortung von Fragen zur Holzbildung bearbeitet wird. Dabei könnte der beobachtete verfrühte Austrieb der *35S-rolC*-transgenen Zitterpappeln in Verbindung mit der Initiierung der Kambiumaktivität von besonderem Interesse sein. Schließlich sind Arbeiten zur Untersuchung der molekularen Grundlagen des Austriebs aus Ruheknospen geplant. Dabei soll die Signalwirkungskette aufgeklärt werden, die sich in Knospen während der verschiedenen Phasen im Zuge der Induktion und der Brechung der Dormanz abspielen. In einem weiteren Forschungsprojekt in Kooperation mit der Universität Hohenheim und Universität Freiburg soll die Reaktion der *35S-rolC*-transgenen Zitterpappeln auf eine Infektion mit Misteln untersucht werden.

Abschließend wird festgestellt, daß die im Rahmen des genehmigten Habilitationsstipendium sowie im begleitenden Sachbeihilfeprojekt erhaltenen Ergebnisse sehr vielversprechend sind. Somit wurden die im Antrag aufgeführten Ziele erreicht und teilweise sogar übertroffen. Die

beschriebenen *iaaL*- und *rolC*-transgenen Zitterpappeln tragen damit zu einem Erkenntnisgewinn in der Botanik und der Forstgenetik bei.

Zitierte Literatur

- Ackermann, C. (1977) Pflanzen aus *Agrobacterium rhizogenes*- Tumoren an *Nicotiana tabacum*. Plant Sci. Lett. 8, 23-30.
- Ahuja, M.R. (1986) Aspen. In Evans, D.A., Sharp, W.R. and Ammirato, P.J. eds. *Handbook of Plant Cell Culture 4, Techniques and Applications*, New York: Macmillan Publishing Company, 626-651.
- Ahuja, M.R. (1988) Gene transfer in forest trees. In: Hanover, J.W. and Keathley, D.E. eds. *Genetic manipulation of woody plants*. New York: Plenum Press, 25-41.
- Ahuja, M.R., Boerjan, W., Neale, D.B. (1996) Somatic cell genetics and molecular genetics of trees. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Boston, London, 287 Seiten.
- Ahuja, M.R., Fladung, M. (1996) Stability and expression of chimeric genes in *Populus*. In: Ahuja, M.R., Boerjan, W., Neale, D.B. (eds), *Somatic Cell Genetics and Molecular Genetics of Trees*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 89-96.
- Aloni, R. (1991) Wood formation in deciduous trees. In: Raghavendra, A.S. (ed), *Physiology of trees*. John Wiley & Sons, Inc., 175-197.
- Baucher, M., Monties, B., Van Montagu, M., Boerjan, W. (1998) Biosynthesis and genetic engineering of lignin. *Critic. Rev. Plant Sci.* 17, 125-197.
- Bevan, M.W., Chilton, M.D. (1982) T-DNA of the *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids. *Ann. Rev. Genet.* 16, 357-384.
- Boudet, A.M. (1998) A new view of lignification. *Trends in Plant Sci.* 3, 67-71.
- Brandt, P. (1995) Transgene Pflanzen. Herstellung, Anwendung, Risiken. Birkhäuser Verlag Basel, Boston, Berlin, 306 Seiten.
- Brown, C.L., Sommer, H.E., Wetzstein, H. (1994) Morphological and histological differences in the development of dwarf mutants of sexual and somatic origin in diverse woody taxa. *Trees* 9, 61-66.
- Burström, H.G. (1969) Influence of the tonic effect of gravitation and auxin on cell elongation and polarity in roots. *Amer. J. Bot.* 56, 679-684.
- Chilton, M.D., Drummond, M.H., Merlo, D.J., Sciaky, D., Montoya, A.L., Gordon, M.P., Nester, E.W. (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11, 263-271.
- Chilton, M.D., Tepfer, D.A., Petit, A., Casse-Delbart, F., Tempe, J. (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of host plant root cells. *Nature* 295, 432-434.
- Costantino, P., Capone, I., Cardarelli, M., De Paolis, A., Mauro, M.L., Trovato, M. (1994) Bacterial plant oncogenes: the *rol* genes' saga. *Genetica* 94, 203-211.
- De Cleene, M., De Ley, J. (1976) The host range of crown gall. *Bot. Rev.* 42, 389-466.
- De Cleene, M., De Ley, J. (1981) The host range of infectious hairy roots. *Bot. Rev.* 47, 147-194.
- Deutsch, F. (1998) Ein Vergleich holzbiologischer Merkmale zwischen transgenen Aspen und ihren Kontrollen. Dipl.arb. Fachbereich Biologie, 59 Seiten.
- Estruch, J.J., Chriqui, D., Großmann, K., Schell, J., Spena, A. (1991) The plant oncogene *rolC* is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates. *EMBO J.* 10, 2889-2895.
- Ewald, D. (1997) Aspekte der Pappelzüchtung in China. *AFZ/Der Wald* 18, 970-973.
- Faiss, M., Strnad, M., Redig, P., Dolezal, K., Hanus, J., Van Onckelen, H., Schmülling, T. (1996) Chemically induced expression of the *rolC* encoded β -glucosidase in transgenic tobacco plants and analysis of cytokinin metabolism: *rolC* does not hydrolyze endogenous cytokinin glucosides *in planta*. *The Plant J.* 10, 33-46.
- Filippini, F., Rossi, V., Marin, O., Trovato, M., Costantino, P., Downey, P.M., Schiavo, F.L., Terzi, M. (1996) A plant oncogene as a phosphatase. *Nature* 379, 499-500.
- Fillatti, J.J., Sellmer, J., McCown, B., Haissig, B., Comai, L. (1987) *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Mol. Gen. Genet.* 206, 192-199.
- Fladung, M. (1990) Transformation of diploid and tetraploid potato clones with the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* and characterization of transgenic plants. *Plant Breeding* 104, 295-304.
- Fladung, M. (1993) Influence of the indoleacetic acid-lysine synthetase gene (*iaaL*) of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on yield attributes of potatoes. *Plant Breeding* 111, 242-245.
- Fladung, M. (1996) Transgenic potato plants can be used to evaluate the stability of foreign genes: reversions and chimeras in multiple copies of *rolC* harboring clones. *Agronomie* 16, 113-121.
- Fladung, M. (1997) Orientierung Gentechnik - Informationen über ein Politikum. CED Elektronische Datenbanken, CD-ROM Verlag GmbH, ISBN 3-932045-22-X.

- Fladung, M. (1998a) Die Bedeutung bio- und gentechnologischer Verfahren für die Forstpflanzenzüchtung. Vortr. Pflanzenzüchtg. 43, 124-133.
- Fladung, M. (1998b) Transgene Bäume in der biologischen Forschung - Perspektiven und Grenzen. Biologie in unserer Zeit 28, 201-213.
- Fladung, M. (1999) Gene stability in transgenic aspen-*Populus*. I. Flanking DNA sequences and T-DNA structure. Mol. Gen. Genet. 260, 574-581.
- Fladung, M. (im Druck) Prospects for the isolation of genes controlling tree-specific traits by using a transposon tagging approach. IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Jerusalem, Israel, 14.-19.6.1998.
- Fladung, M., Ballvora, A. (1992) Further characterization of *rolC* transgenic tetraploid potato clones, and influence of daylength and level of *rolC* expression on yield parameters. Plant Breeding 109, 18-27.
- Fladung, M., Gieffers, W. (1993) Resistance reactions of leaves and tubers of *rolC* transgenic tetraploid potato to bacterial and fungal pathogens. Correlation with sugar, starch and chlorophyll content. Physiological and Molecular Plant Pathology 42, 123-132.
- Fladung, M., Ahuja, M.R. (1995) 'Sandwich' method for non-radioactive hybridizations. Biotechniques 18, 3-5.
- Fladung, M., Ahuja, M.R. (1996a) Gene transfer in aspen. In: Schmidt, E.R., Hankeln, T. (eds.), Transgenic Organisms and Biosafety, Horizontal Gene Transfer, Stability of DNA and Expression of Transgenes. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 275-281.
- Fladung, M., Ahuja, M.R. (1996b) Stabile Expression von *rolC* in einem Baum? Vortr. Für Pflanzenzüchtung 32, 199-201.
- Fladung, M., Ahuja, M.R. (1997) Excision of the maize transposable element *Ac* in periclinal leaves of 35S-*Ac-rolC* transgenic aspen-*Populus*. Plant Mol. Biol. 33, 1097-1103.
- Fladung, M., Stephan, B.R. (1997) Molecular markers in tree species. In: Tree Breeding for Improved Wood and Fibre Quality using Advanced Biotechnologies. Hrsg. C. M. Cahalan. Second Report, EU FAIR Contract PL95-253. Bangor: University of Wales, 1997, 13-27.
- Fladung, M., Ziegenhagen, B. (1998) M13 DNA fingerprinting can be used in studies on phenotypical revisions of forest tree mutants. Trees 12, 310-314.
- Fladung, M., Ahuja, M.R. (1998) Genetic engineering of aspen using several gene constructs. In: El Bassam, N., Behl, R.K., Prochnow, B. (eds.), Sustainable Agriculture for Food, Energy and Industry. James & James (Science Publishers) Ltd, 118-122.
- Fladung, M., Muhs, H.-J. (1998) Untersuchungen zur Stabilität und Expressivität fremder Gene in Aspenklonen (*Populus tremula* und *P. tremula x P. tremuloides*) unter Freilandbedingungen. BMBF-Statusseminar: freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen, Braunschweig, 25.-25.05.1998.
- Fladung, M., Ballvora, A., Schmülling, T. (1993) Constitutive or light regulated expression of the *rolC* gene in transgenic potato plants has different effects on yield attributes and tuber carbohydrate composition. Plant Mol. Biol. 23, 749-57.
- Fladung, M., Muhs, H.J., Ahuja, M.R. (1996) Morphological changes observed in transgenic *Populus* carrying the *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes*. Silvae Genetica 45, 349-354.
- Fladung, M., Kumar, S., Ahuja, M.R. (1997a) Genetic transformation of *Populus* genotypes with different chimeric gene constructs: Transformation efficiency and molecular analysis. Trans. Res. 6, 111-121.
- Fladung, M., Großmann, K., Ahuja, M.R. (1997b) Alterations in hormonal and developmental characteristics in transgenic *Populus* conditioned by the *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes*. J. Plant Physiol. 150, 420-427.
- Fladung, M., Ahuja, M.R., Muhs, H.-J. (1997c) Wie stabil sind fremde Gene in Forstbäumen? ForschungsReport, Zeitschrift des Senats der Bundesforschungsanstalten, Bonn 1/1997, S. 9-12.
- Fladung, M., Ahuja, M.R., Muhs, H.-J. (1998) Wie stabil sind fremde Gene in Forstbäumen? Deutsche Baumschule 50, 8-10.
- Fladung, M., Kumar, S., Ahuja, M.R. (1999) Transposition of the maize transposable element *Ac* in transgenic aspen and its usability as a gene tagging system. In: Jamieson, A. (Ed.), Proc. of the Second International Wood Biotechnology Symposium, Canberra, Australien, März 1997, North Forest Products Limited Publisher, 125-135.
- Frugis, G., Caretto, S., Santini, L., Mariotti, D. (1995) *Agrobacterium rhizogenes rol* genes induce productivity-related phenotypical modifications in „creeping-rooted“ alfalfa types. Plant Cell Rep. 14, 488-492.
- Gierl, A., Saedler, H. (1992) Plant transposable elements and gene tagging. Plant. Mol. Biol. 19, 39-49.
- Glass, N.L., Kosuge, T. (1986) Cloning of the gene for indoleacetic acid-lysine synthetase from *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. J. Bacteriol. 166, 598-603
- Gorea, T. (1970) Fertilität und Kreuzbarkeit der Dihaplloiden von *Solanum tuberosum* L. und deren F1-Bastarden. Z. Pflanzenzüchtg 64, 201-220.
- Griffin, A.R. (1996) Genetically modified trees – the plantations of the future or an expensive distraction? Commonwealth For. Rev. 75, 169-175.

Grünwald *et al.* eingereicht

- Gupta, P.K., Pullman, G., Timmis, R., Kreitinger, M., Carlson, W., Grob, J., Welty, E. (1993) Forestry in the 21st century. *Bio/Technol.* 11, 454-459.
- Hachtel, W. (1998) Zuckersensoren bei Tier und Pflanze. *Spektr. der Wiss.*, Aug. 1988, 23-25.
- Hawkes, J.G. (1978) History of the potato. In: Harris, P.M. (ed), *The potato crop*. Chapman and Hall, London, 1-14.
- Hawkes, J.G. (1990) *The potato. Evolution, biodiversity and genetic resources*. Belhaven Press, London.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-31.
- Jones, J.D.G., Bishop, G., Carroll, B., Dickinson, M., English, J., Harrison, K., Jones, D., Scofield, S., Thomas, C.M. (1992) Prospects for establishing a tomato gene tagging system using the maize transposon *Activator (Ac)*. *Proc. Royal Soc. Edinburgh* 99B, 107-119.
- Jouanin, L., Brasileiro, A.C.M., Leple, J.C., Pilate, G., Cornu, D. (1993) Genetic transformation: a short review of methods and their applications, results and perspectives for forest trees. *Ann. Sci. For.* 50, 325-336.
- Kaendler, C., Fladung, M., Uhrig, H. (1996). Production and identification of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. papita* by using the *rolC* gene as morphological marker. *Theor. Appl. Genet.* 92: 455-462.
- Klee, H., Horsch, R., Rogers, S.G. (1987) *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38, 197-214.
- Knapp, S., Coupland, G., Uhrig, H., Starlinger, P., Salamini, F. (1988) Transposition of the maize transposable element *Ac* in *Solanum tuberosum*. *Mol. Gen. Genet.* 213, 285-90.
- Koncz, C., Schell, J., Redei, G.P. (1992) T-DNA transformation and insertion mutagenesis. In: Koncz, C., Chua, N.H., Schell, J. (eds), *Methods in Arabidopsis Research*, World Scientific Publishing, Singapore, 224-273.
- Koncz C., Schell J. (1986) The promoter of the TL- DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* vector. *Mol. Gen. Genet.* 204, 383-96.
- Kosuge, T., Comai, L., Glass, N.L. (1983) Virulence determinants in plant-pathogen interactions. In: Goldberg, B. (ed), *Plant Molecular Biology*, Alan R. Liss Inc., New York, 167-177.
- Kurioka, Y., Susuki, Y., Kamada, H., Harada, H. (1992) Promotion of flowering and morphological alterations in *Atropa belladonna* transformed with a CaMV 35S-*rolC* chimeric gene of the Ri plasmid. *Plant Cell Rep.* 12, 1-6.
- Langner, W. (1954) Rückmutation bei Zwergfichte. *Z. Forstgenetik Forstpflanzenzüchtung* 3, 138-139.
- Maurel, C., Brevet, J., Barbier-Brygoo, H., Guern, J., Tempe, J. (1990) Auxin regulates the promoter of the root-inducing *rolB* gene of *Agrobacterium rhizogenes* in transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* 223, 58-64.
- Meyer, P. (1995) *Gene silencing in higher plants and related phenomena in other eukaryotes*. Berlin: Springer Verlag.
- Muhs, H.-J. (1998) Gentechnisch veränderte Forstpflanzen – Bedingungen für ihre Zulassung, Risiken aus forstlicher Sicht. In: F.D.P. Fraktion im Schleswig-Holsteinischen Landtag (ed), *Gentechnik in der Landwirtschaft*, Druckerei Mordhorst, Kiel, 56-62.
- Neale, D.B., Devey, M.E., Jermstad, K.D., Ahuja, M.R., Alosi, M.C., Marshall, K.A. (1992) Use of DNA markers in forest tree improvement research. *New Forests* 6, 391-407.
- Neale, D.B., Harry, D.E. (1994) Genetic mapping in forest trees: RFLPs, RAPDs and beyond. *AgBiotech News and Information*, 6 (5), 107N-114N.
- Nilsson, O., Moritz, T., Imbault, N., Sandberg, G., Olsson, O. (1993a) Hormonal characterization of transgenic tobacco plants expressing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* T_L-DNA. *Plant Physiol.* 102, 363-71.
- Nilsson, O., Crozier, A., Schmülling, T., Sandberg, G., Olsson, O. (1993b) Indole-3-acetic acid homeostasis in transgenic tobacco plants expressing the *Agrobacterium rhizogenes rolB* gene. *The Plant J.* 3, 681-689.
- Nilsson, O., Little, C.H.A., Sandberg, G., and Olsson, O. (1996a). Expression of two heterologous promoters, *Agrobacterium rhizogenes rolC* and cauliflower mosaic virus 35S, in the stem of transgenic hybrid aspen plants during the annual cycle of growth and dormancy. *Plant Mol. Biol.* 31, 887-895.
- Nilsson, O., Moritz, T., Sundberg, B., Sandberg, G., Olsson, O. (1996b). Expression of the *Agrobacterium rolC* gene in a deciduous forest tree alters growth and development and leads to stem fasciation. *Plant Physiol.* 112, 493-502.
- Nilsson, O., Tuominen, H., Sundberg, B., Olsson, O. (1997) The *Agrobacterium rolB* and *rolC* promoters are expressed in pericycle cells competent to serve as root initials in transgenic hybrid aspen. *Physiol. Plant.* 100, 456-462.
- Nilsson, O., Olsson, O. (1997) Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of hairy roots. *Physiol. Plant.* 100, 463-473.
- Paszkowski, J. (1994) *Homologous recombination and gene silencing in plants*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Pomeroy, C.S. (1921) Bud variation in *Eleagnus*. *J. Heridity* 12, 227-230.

- Porter, J.R. (1991) Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. CRC Crit. Rev. Plant Sci. 10, 387-421.
- Ream, W. (1989) *Agrobacterium tumefaciens* and interkingdom genetic exchange. Ann. Rev. Phytopathol. 27, 583-618.
- Riker, A.J., Banfield, W.M., Wright, W.H., Keitt, W.H., Sagen, H.E. (1930) Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. J. Agr. Sci. 41, 507-540.
- Roberto F.F., Klee H., White F., Nordeen R., Kosuge, T. (1990) Expression and fine structure of the gene encoding indole-3-acetyl-L-lysine synthetase from *Pseudomonas syringae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5797-5801.
- Schmülling, T., Fladung, M., Grossmann, K., Schell, J. (1993) Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single *rol* genes. The Plant J. 3, 587-598.
- Schmülling, T., Röhrig, H., Pilz, S., Walden, R., Schell, J. (1993) Restoration of fertility by antisense RNA in genetically engineered male sterile tobacco plants. Mol. Gen. Genet. 237, 385-394.
- Schmülling, T., Schell, J. (1993) Transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks can be periclinal chimeras. Plant Mol. Biol. 21, 705-708.
- Schmülling, T., Schell, J., Spena, A. (1988) Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. EMBO J. 9, 2621-2639.
- Schwanitz, F. (1952/53) Über somatische Rückmutationen bei einer schmalblättrigen Pflanze von *Ilex aquifolium* L. Z. Forstgenetik Forstpflanzenzüchtung 2, 117-118.
- Scorza, R., Zimmermann, T.W., Cordts, J.M., Footen, K.J., Ravelonandro, M. (1994) Horticultural characteristics of transgenic characteristics expressing the *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 119, 1091-1098.
- Sitbon, F., Little, C.H.A., Olssen, O., Sandberg, G. (1992) Correlation between the expression of T-DNA IAA biosynthetic genes from developmentally regulated promoters and the distribution of IAA in different organs of transgenic tobacco. Physiol. Plant. 85, 679-688.
- Sitbon, F., Sundberg, B., Olssen, O., Sandberg, G. (1991) Free and conjugated indoleacetic acid (IAA) contents in transgenic tobacco plants expressing the *iaaM* and *iaaH* IAA biosynthesis genes from *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol. 95, 480-485.
- Slighton, J.L., Durand-Tardif, M., Jouanin, L., Tepfer, D. (1986) Nucleotide sequence analysis of the TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. J. Biol. Chem. 261, 108-121.
- Smith, E.F., Townsend, C.O. (1907) A plant tumour of bacterial origin. Science 25, 671-673.
- Sonnenwald, U., Brauer, M., von Schaeven, A., Stitt, M., Willmitzer, L. (1991) Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast: a powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. The Plant J. 1, 95-106.
- Spano, L., Pomponi, M., Costantino, P., Van Slogteren, G.M.S., Temp, J. (1982) Identification of T-DNA in the root-inducing plasmid of the agropine type *Agrobacterium rhizogenes* 1855. Plant Mol. Biol. 1, 291-300.
- Spena, A., Aalen, R.B., Schulze, S.C. (1989) Cell-autonomous behavior of the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* during leaf development: a visual assay for transposon excision in transgenic plants. Plant Cell 1, 1157-1164.
- Spena, A., Prinsen, E., Fladung, M., Schulze, S.C., van Onckelen, H. (1991) The indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas syringae* subsp. savastanoi induces developmental alterations in transgenic tobacco and potato plants. Mol. Gen. Genet. 227, 205-212.
- Spena, A., Schmülling, T., Koncz, C., Schell, J. (1987) Independent and synergistic activity of *rol A*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants. EMBO J. 6, 3891-3899.
- Stam, M., Mol, J.N.M., Kooter, J.M. (1997) The silence of genes in transgenic plants. Ann. Bot. 79, 3-12.
- Stitt, M., von Schaeven, A., Willmitzer, L. (1990) 'Sink' regulation of photosynthetic metabolism in transgenic tobacco plants expressing yeast invertase in their cell wall involves a decrease of Calvin-cycle enzymes and an increase of glycolytic enzymes. Planta 183, 40-50.
- Strauss, S.H., Rottmann, W.H., Brunner, A.M., Sheppard, L.A. (1995) Genetic engineering of reproductive sterility in forest trees. Mol. Breed. 1, 5-26.
- Tepfer, D. (1984) Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. Cell 37, 958-967.
- Tuominen, H., Sitbon, F., Jacobsson, C., Sandberg, G., Olsson, O., Sundberg, B. (1995) Altered growth and wood characteristics in transgenic hybrid aspen expressing *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA indoleacetic acid-biosynthetic genes. Plant Physiol. 109, 1179-1189.
- Van Altvorst, A.C., Bino, R.J., van Dijk, A.J., Lamers, A.M.J., Lindhout, W.H., van der Mark, F., Dons, J.J.M. (1992) Effects of the introduction of *Agrobacterium rhizogenes rol* genes on tomato plant and flower development. Plant Science 83, 77-85.
- Van der Salm, T.P.M., van der Toorn, C.J.G., Bouwer, R., Hänisch ten Cate, C.H., Dons, H.J.M. (1997) Production of *rol* gene transformed plants of *Rosa hybrida* L. and characterisation of their rooting ability. Mol. Breed. 3, 39-47.

- Walbot V. (1992) Strategies for mutagenesis and gene cloning using transposon tagging and T-DNA insertional mutagenesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 43, 49-82.
- Walden, R., Czaja, I., Schmülling, T., Schell, J. (1993) *Rol* genes alter hormonal requirements for protoplast growth and modify the expression of an auxin responsive promoter. *Plant Cell Rep.* 12, 551-554.
- White; P.R., Braun, A.C. (1941) Crown gall production by bacteria-free tumor tissues. *Science* 94, 239-241.
- White, F.F., Ghidossi, G., Gordon, M.P., Nester, E.W. (1982) Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3193-3197.
- Willmitzer, L. Sanches-Serano, J., Buschfeld, E., Schell, J. (1982) DNA from *Agrobacterium rhizogenes* is transferred to and expressed in axenic hairy root plant tissues. *Mol. Gen. Genet.* 186, 16-22.
- Wolter, F.P., Fritz, C.C., Willmitzer, L., Schell, J., Schreier, P. (1988) *RbcS* genes in *Solanum tuberosum*: Conservation of transit peptide and exon shuffling during evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 846-850.
- Wühlisch, G. von, Krusche, D., Muhs, H.-J. (1995). Variation in temperature sum requirement for flushing of beech provenances. *Silvae Genetica* 44, 343-346.
- Yokoyama, R., Hirose, T., Fujii, N., Aspúria, E.T., Kato, A., Uchiyama, H. (1994) The *rolC* promoter of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid is activated by sucrose in transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* 244, 15-22.
- Zambryski, P., Tempe, J., Schell, J., (1989) Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell* 56, 193-201.
- Zobel, B.J., Jett, J.B. (1995) Genetics of wood production. Springer Series in Wood Science. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 337.
- Ziegenhagen, B., Fladung, M. (1997) Variation in the *psbC* gene region of gymnosperms and angiosperms as detected by a single restriction site polymorphism. *Theor. Appl. Genet.* 94, 1065-1071.

Dissemination

Die Ergebnisse, die in diesem Abschlußbericht beschrieben sind, wurden teilweise in Journals oder Büchern veröffentlicht (siehe Anlage) sowie in einer kumulativen Habilitationsschrift zusammengefaßt, die Ende 1998 an der Universität Hamburg eingereicht wurde.

Veröffentlichungen:

- Fladung, M., Muhs, H.J., Ahuja, M.R. (1996) Morphological changes observed in transgenic *Populus* carrying the *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes*. *Silvae Genetica* 45, 349-354.
- Fladung, M., Ahuja, M.R. (1997) Excision of the maize transposable element *Ac* in periclinal leaves of *35S-Ac-rolC* transgenic aspen-*Populus*. *Plant Mol. Biol.* 33, 1097-1103.
- Ziegenhagen, B., Fladung, M. (1997) Variation in the *psbC* gene region of gymnosperms and angiosperms as detected by a single restriction site polymorphism. *Theor. Appl. Genet.* 94, 1065-1071.
- Fladung, M., Kumar, S., Ahuja, M.R. (1997a) Genetic transformation of *Populus* genotypes with different chimeric gene constructs: Transformation efficiency and molecular analysis. *Transgenic Research* 6, 111-121.
- Fladung, M., Großmann, K., Ahuja, M.R. (1997b) Alterations in hormonal and developmental characteristics in transgenic *Populus* conditioned by the *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Plant Physiol.* 150, 420-427.
- Fladung, M. (1998a) Die Bedeutung bio- und gentechnologischer Verfahren für die Forstpflanzenzüchtung. *Vortr. für Pflanzenzüchtung.* 43, 124-133.
- Fladung, M. (1998b) Transgene Bäume - Perspektiven und Grenzen. *Biologie in unserer Zeit* 28, 201-213.

- Fladung, M. Ahuja, M.R. (1998) Genetic engineering of aspen using several gene constructs. In: El Bassam, N., Behl, R.K., Prochnow, B. (eds.), Sustainable Agriculture for Food, Energy and Industry. James & James (Science Publishers) Ltd, 118-122.
- Fladung, M., Ziegenhagen, B. (1998) M13 DNA fingerprinting can be used in studies on phenotypical revisions of forest tree mutants. *Trees - Structure and Function* 12, 310-314.
- Fladung, M., Ahuja, M.R., Muhs, H.-J. (1998) Wie stabil sind fremde Gene in Forstbäumen? *Deutsche Baumschule* 50, 8-10.

Vorträge und Vortragsabstracts (01.05.1996 bis 31.12.1998)

- Fladung, M. Untersuchungen zur Genstabilität in transgenen Aspen. Vortragsveranstaltung der Gesellschaft für Pflanzenzüchtung 'Züchtung und Genetik von Obst-, Zier- und Forstgehölzen', Großhansdorf, 21.-23.5.1996.
- Fladung, M. Stable expression of *ro/C* in a transgenic tree species? In: EU Biotechnology Proposal Meeting 'Control of Gene Expression and Silencing in Transgenic Plants', Norwich, UK, 10.-12.7.1996
- Fladung, M. Transformation von Aspen mit verschiedenen Genkonstrukten. Abstract International Association Plant Tissue Culture, 5. Tagung der Deutschen Sektion, Stuttgart 10.-12.10.1996.
- Fladung, M., Stephan, B.R. Strategies for identifying molecular markers for wood properties - what can be done within the EU? EU-Meeting 'Tree Breeding for Improved Wood and Fibre Quality using Advanced Biotechnologies', Großhansdorf, 23.-24.11.1996.
- Fladung, M. Die Verwendung transgener Bäume für die Grundlagen- und die angewandte Forschung, Kolloquium Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz der Martin-Luther-Universität Halle, 11.12.1996.
- Fladung, M. Transgene Bäume. Biologisches Kolloquium der Technischen Universität Braunschweig, 12.12.1996.
- Fladung, M. Transformation of aspen using several gene constructs: basic aspects on gene stability and plant development. CRC for Hardwood Fibre and Paper Science, University of Melbourne, School of Forestry, Creswick, Australien, 7.3.1997.
- Fladung, M.; Ahuja, M.R. Transposition of the maize transposable element *Ac* in transgenic aspen and its usability as a gene tagging system. Second International Wood Biotechnology Symposium, Canberra, Australien, 11.3.1997.
- Fladung M. Transgene Bäume in der biologischen Forschung: Perspektiven und Grenzen. Arbeitskreis 'Gentechnik und Ökologie', Göttingen, 20.3.1997.
- Fladung, M. Transgene Gehölze in der biologischen Forschung - Perspektiven und Grenzen. Wissenschaftliches Kolloquium des Instituts für Botanik, Bereich Pflanzenbiochemie, der Friedrich-Schiller-Universität Jena, in Erfurt-Kühnhausen, 23.04.1997.
- Ahuja, M.R., Fladung, M. Expression and stability of transgenes in aspen-*Populus*. In: Abstracts of the 24th Biennial Southern Forest Tree Improvement Conference, Orlando, Florida, USA, 09.-12.06.1997, S. 32.
- Fladung, M. Stabile Expression fremder Gene in Pflanzen? Arbeitsbesprechung des Instituts für Forstgenetik, Großhansdorf, 17.06.1997.
- Fladung, M. Genetic engineering of aspen using several gene constructs. In: Abstracts zur Internationalen Konferenz "Sustainable Agriculture for Food, Energy and Industry" in Braunschweig, June 1997, FAO, Rome, 1997, S.111.
- Fladung, M. Transposition of the maize transposable element *Ac* in transgenic aspen-*Populus*. In: Abstracts of the Annual Meeting of the Genetics Society 1997 in Gießen, Hrsg. R. Renkawitz. *Genes, Chromosomes, Genomes*, Heidelberg 5 (1997), S. 28.
- Ahuja, M.R., Fladung, M. Regulation of transgene expression in *Populus*. Abstr. IUFRO Joint Meeting 'Somatic Cell Genetics of Trees' and 'Molecular Genetics of Trees', Quebec City/Canada, August 1997.
- Fladung, M., Ahuja, M.R. *Ac* transposition in trees: what can we do with it? Abstr. IUFRO Joint Meeting 'Somatic Cell Genetics of Trees' and 'Molecular Genetics of Trees', Quebec City/Canada, August 1997.
- Ahuja, M.R.; Fladung, M. Expression and stability of foreign genes in Aspen-*Populus*. In: Proc. XI World Forestry Congress, Vol. 2. Forests, Biological Diversity and the Maintenance of the Natural Heritage, Antalya, Turkey, 1997, S. 209.

- Fladung, M.; Ahuja, M. R.; Muhs, H.-J. Der Freisetzungsversuch mit gentechnisch veränderten Aspen in Großhansdorf. Institut für Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere, Universität Rostock, Dummerdorf am 19.11.1997.
- Fladung, M. Nutzen und Risiken bei der Verwendung transgener Bäume. In: Erkenntnisse, Methoden und Lösungsansätze für eine dauerhafte Naturentwicklung in Mitteleuropa. Hrsg.: Werner, A., Seyfarth, W., 27. Jahrestagung der GfÖ in Müncheberg vom 1.-6.9.1997 = ZALF-Bericht Nr. 32, S. 106.
- Fladung, M. Die Bedeutung bio- und gentechnologischer Verfahren für die Forstpflanzenzüchtung. 4. Tagung der Gesellschaft für Pflanzenzüchtung, Gießen, 3.-5.3.1998.
- Fladung, M. Bio- und gentechnologische Methoden für die Züchtung von Gehölzen - Chancen und Risiken. Gemeinsames Treffen der AG Zierpflanzen und AG Gehölze der Gesellschaft für Pflanzenzüchtung, Ahrensburg, 18.-19.5.1998.
- Fladung, M., Muhs, H.-J. Untersuchungen zur Stabilität und Expressivität fremder Gene in Aspenklonen unter Freilandbedingungen. BMBF-Workshop 'Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen', Braunschweig 25.-26.5.1998.
- Fladung, M. Prospects for the isolation of genes controlling tree-specific traits by using a transposon tagging approach. IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Jerusalem, Israel, 14.-19.6.1998.
- Fladung, M. Was ist ein Klon? Kolloquium des Instituts für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Großhansdorf, 25.6.1998.
- Fladung, M. Bio- und Gentechnik für die Züchtung von Gehölzen. Institut für Botanik, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 23.11.1998.
- Fladung, M. Wie stabil sind fremde Gene in Waldbäumen. Pflanzengenetisches Kolloquium im Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung der Universität Göttingen, 24.11.1998.

Posterpräsentationen (01.05.1996 bis 31.12.1998)

- Fladung, M., Ahuja, M.R. Untersuchungen zur Genstabilität in transgenen Aspen. 9. Hamburger Forst- und Holztagung, Eberswalde, 6.-9.5.1996.
- Fladung, M., Ahuja, M.R. Studies on genetic stability of transgenic aspen. In.: BFH, Poster Summaries for 4. Internationale Konferenz über Pflanzengenetische Ressourcen, Leibzig, 16.-22.6.1996.
- Ziegenhagen, B., Fladung, M. Ein Chloroplasten-DNA-Merkmal als evolutionärer Marker in Gymnospermen und Angiospermen? Vortragsveranstaltung der Gesellschaft für Pflanzenzüchtung 'Züchtung und Genetik von Obst-, Zier- und Forstgehölzen', Großhansdorf, 21.-23.5.1996.
- Ahuja, M.R., Fladung, M. Molecular genetics of transgenic *Populus*. SRIEG-Workshop 'Novel Application of Molecular Marker in Forest Trees', Houston, Texas, USA, 23.-26.6.1996.
- Fladung, M., Ahuja, M.R. (1996) Untersuchungen zur Genstabilität in transgenen Aspen. In: Tagungsprogramm und Abstracts, Botaniker-Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Düsseldorf, 25.-31.8.1996.
- Ziegenhagen, B., Fladung, M. A single restriction site polymorphism in *psbC* gene region as studied in a broad taxonomic range of gymnosperm and angiosperm tree species. In: Abstracts of the Annual Meeting of the Genetics Society 1996 in Jena, Hrsg. A. Burmester; J. Wöstemeyer. Genes, Chromosomes, Genomes, Heidelberg 4 (1996), S.
- Fladung, M., Ahuja, M.R. Stability of foreign genes in transgenic trees? In: Abstracts of the Annual Meeting of the Genetics Society 1996 in Jena, Hrsg. A. Burmester; J. Wöstemeyer. Genes, Chromosomes, Genomes, Heidelberg 4 (1996), S. 38
- Fladung, M., Ahuja, M.R. Stable expression of foreign genes in transgenic aspen? The possible role of methylation and co-suppression. Second International Wood Biotechnology Symposium, Canberra, Australien, 10.3.1997.
- Ziegenhagen, B., Fladung, M. Molekulare Methoden zur Erfassung von Biodiversität bei Waldbäumen. In: Abstracts zum Symposium Biologische Vielfalt in Ökosystemen - Konflikt zwischen Nutzung und Erhaltung. Zusammengefasst von I. Fiedler. Braunschweig, 22.-24.4.1997, S. 69.
- Fladung, M.; Ahuja, M.R., Muhs, H.-J. Alterations of hormonal levels in transgenic hybrid aspen revealed variations in bud dormancy and induces precocious flushing in the next spring. Abstr. IUFRO Joint Meeting 'Somatic Cell Genetics of Trees' and 'Molecular Genetics of Trees', Quebec City/Canada, August 1997.
- Almeida, H.; Cahalan, C.; Chantre, G.; Dirol, D.; Fladung, M.; Pereira, H.; Plomion, C.; Rozenberg, P.; Stephan, R.; Wilhelmsson, L.; Wimmer, R. Genetic improvement of wood properties: increasing selection efficiency for different end uses. Description of a European Union research project. Abstr. CTIA/IUFRO International Wood Quality Workshop, August 18 - 22, 1997, Quebec City, Canada.

- Fladung, M. Untersuchungen zur Stabilität fremder Gene und zur Transposition von *Ac* in Aspen-*Populus*. 11. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen, Dabringhausen, 4. - 7.3.1998.
- Fladung, M. Das *Ac*-Transposon aus Mais springt auch in Bäumen. In: Tagungsprogramm und Abstracts, Botaniker-Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Bremen, 30.8.-6.9.1998.
- Fladung, M. Molekulare Analyse des Integrationsortes von fremden Genen in Bäumen bei stabil und instabil exprimierenden Transformanten. In: Tagungsprogramm und Abstracts, Botaniker-Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Bremen, 30.8.-6.9.1998.