

Technische Universität München
Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung

**Monitoring der Überdauerung und Verbreitung von
transgenem Raps (*Brassica napus* L.)**

Tristan Funk

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Agrarwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Huber
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. G. Wenzel
2. Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann

Die Dissertation wurde am 23.08.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 17.01.2006 angenommen.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlichst danken:

Herrn Professor Dr. G. Wenzel für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Univ. Prof. Dr. G. Forkmann für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Univ. Prof. Dr. W. Huber für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Dr. Gerhard Schwarz für die hervorragende Betreuung der Arbeit, seine stetige Diskussionsbereitschaft und seine wertvollen Anregungen.

Den Kollegen der AG Molekulare Marker, allen voran den ehemaligen Kollegen der 'AG Schwarz' Dr. Michael Dilger, Dr. Stefan Bäumler, Dr. Annette Block und Peter Westermeier (Euch beiden ein dickes Lob für die Geduld beim Korrekturlesen!), für die erfrischenden Diskussionen.

Der 'guten Seele' des Labors, Amalie Fiedler, für ihren leckeren Kaffee und ihre stets hilfreichen Tips nicht nur im Laboralltag.

Dr. Friedrich Felsenstein für die Möglichkeit, die hervorragenden Räumlichkeiten und Geräte der EpiLogic/EpiGene GmbH benutzen zu dürfen.

Dem Personal des Versuchsguts Roggenstein für die exzellente technische Betreuung des Feldversuchs, namentlich Dr. R. Müller, Johann Dennert, Jan-Dirk Otten und Dieter Hirschel.

Allen DiplomandInnen und studentischen Hilfskräften für ihre tatkräftige Mithilfe.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Assistentin Andrea Müller für ihre erstklassige Unterstützung im Labor, auf dem Feld und überhaupt.

Das größte Dankeschön geht an meine Frau Gladis sowie meine Kinder Avelina und Leo für ihre unendliche Geduld und ständige Bereitschaft, mir den Rücken freizuhalten.

Diese Arbeit wurde durch das Bayerische Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz finanziert.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Gentechnisch veränderte Pflanzen	2
1.1.1	Entwicklung der Anbauflächen transgener Kulturpflanzen	2
1.1.2	Die wichtigsten transgenen Eigenschaften	4
1.1.3	Wirtschaftliche Bedeutung	6
1.1.4	Politische und rechtliche Rahmenbedingungen	7
1.1.5	Monitoring	9
1.2	Ausbreitung transgener Pflanzen in der Umwelt	10
1.2.1	Raps	11
1.2.2	Mais	15
1.2.3	Zuckerrübe	16
1.2.4	Kartoffel	17
1.2.5	Vertikaler Gentransfer	17
1.2.6	Horizontaler Gentransfer	19
1.3	Persistenz in der Umwelt	21
1.3.1	Persistenz im Boden	21
1.3.2	Persistenz auf Ruderalstandorten	22
1.4	Molekularbiologische Methoden zum GVO-Nachweis	23
2	MATERIAL UND METHODEN	28
2.1	Material	28
2.1.1	Pflanzenmaterial	28
2.1.2	Verbrauchsmaterial und Chemikalien	29
2.1.3	Enzyme und Kits	29
2.1.4	Basislösungen	30
2.1.5	DNA-Molekulargewichtstandards	30
2.2	Methoden	31
2.2.1	Feldversuchsdesign	31
2.2.2	Ermittlung des Pollenflugs	32
2.2.3	Ermittlung der Auskreuzung in Raps und Rüben	33
2.2.4	Probenahme Ausfallraps in Folgekulturen und auf dem Brachstreifen	34
2.2.5	Ermittlung der Auskreuzung auf kreuzungskompatible Wildarten	34
2.2.6	Ermittlung des Sameneintrags bei der Ernte	35
2.2.7	Entnahme und Untersuchung von Bodenproben	35
2.2.8	Test auf Lebensfähigkeit der Samen	36

2.2.9	Bodenbearbeitung.....	36
2.2.10	Herbizideinsatz in den Fruchtfolgegliedern	36
2.2.11	Statistische Auswertungen.....	37
2.2.12	DNA-Isolierung.....	37
2.2.13	Agarosegelelektrophorese	39
2.2.14	DNA-Quantifizierung	39
2.2.15	Qualitative PCR.....	39
2.2.16	Oligonukleotide	40
2.2.17	Quantitative real-time PCR.....	41
3	ERGEBNISSE.....	43
3.1	Auskreuzung in nicht-transgenen Nachbarparzellen.....	43
3.2	Vergleich der Auskreuzungsraten mit Biotest und quantitativer PCR.....	49
3.3	Pollenverbreitung	50
3.3.1	Pollenverteilung in der Entfernung	51
3.3.2	Pollenverteilung in der Höhe	53
3.3.3	Einflußfaktoren auf die Pollenverbreitung	55
3.3.4	Auskreuzung auf verwandte Arten	56
3.4	Persistenz im Boden	58
3.4.1	Sameneintrag in den Boden.....	59
3.4.2	Auflaufrips nach Ernte.....	60
3.4.3	Veränderung der Samenbank	61
3.4.4	Durchwuchsrips in der Folgekultur.....	62
3.4.5	Ausfallrips auf dem Brachstreifen	64
3.5	Nachweis transgener Pollen.....	64
4	DISKUSSION.....	67
4.1	Auskreuzung von transgenem Raps	67
4.1.1	Auskreuzungspotential von Raps.....	67
4.1.2	Auskreuzung auf kreuzungskompatible Arten	69
4.1.3	Nachweisverfahren zur Ermittlung der Auskreuzung	73
4.2	Pollenverbreitung	75
4.2.1	Wind.....	75
4.2.2	Pollenverbreitung durch Insekten.....	77
4.2.3	Mathematische Prognosemodelle für Pollenflug und Auskreuzung	78
4.3	Persistenz von transgenem Raps in der Umwelt.....	81

4.3.1	Überdauerung im Boden durch Dormanz.....	81
4.3.2	Einfluß von Bodenbearbeitungsmaßnahmen	87
4.4	Monitoring	89
4.4.1	Koexistenz.....	91
5	ZUSAMMENFASSUNG	94
6	LITERATURVERZEICHNIS	96
7	ANHANG.....	117
7.1	Versuchsplan 2001/2002.....	117
7.2	Versuchsplan 2002/2003.....	118
7.3	Versuchsplan 2003/2004.....	119

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

bp	Basenpaare
C _T	Threshold cycle
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
dATP	2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	2'-deoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP	2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	2'-deoxyuridine 5'-triphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
<i>epsps</i>	5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase
EtBr	Ethidiumbromid
FAM	6-Carboxyfluorescein
GS	Glutamin-Synthetase
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
g	Gramm; Erdbeschleunigung
HR	herbizidresistent; Herbizidresistenz
Hz	Hertz
M	Mol; molar
mM	millimolar
<i>nptII</i>	neomycin-phosphotransferase II; Antibiotikaresistenz-Gen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
<i>pat</i>	Phosphinothricin-Acetyl-Transferase
PEG	Polyethylenglykol
PCR	polymerase chain reaction; Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure (Tris-Acetat-EDTA)
TAMRA	N,N,N',N'-Tetramethyl-6-carboxyrhodamin
Tris	2-Amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
VIC	fluorogener Farbstoff unbekannter Struktur
w/v	weight/volume; Masse/Volumen

1 EINLEITUNG

Trotz weltweit steigender Anbauflächen gentechnisch veränderter Organismen (GVO) wird die gezielte Übertragung einzelner Gene in Pflanzen mit Hilfe der Gentechnik sowie deren Anbau von Wissenschaftlern, Politikern und Verbrauchern nach wie vor kontrovers diskutiert. Den Argumenten der Befürworter der sogenannten 'grünen' Gentechnik, die einen innovativen Ansatz für mehr Nachhaltigkeit in der pflanzlichen Produktion sehen - z.B. durch eine Resistenz gegenüber Schadorganismen, sich daraus ergebende geringere Produktionskosten und bessere Umweltverträglichkeit durch eine Reduzierung der Aufwandmengen chemischer Pflanzenschutzmittel, eine Steigerung der landwirtschaftlichen Produktion oder die qualitative Verbesserung der Ernteprodukte – stehen Unsicherheiten und Ängste gegenüber möglichen unerwarteten Folgen der Freisetzungen gegenüber wie z.B. die Ausbildung von Antibiotikaresistenzen, die Auslösung von Allergien oder eine unkontrollierbare Ausbreitung in verwandte Pflanzenarten (vertikaler Gentransfer) oder in Bakterien (horizontaler Gentransfer).

Auf Grund der bisher weltweit gesammelten Erfahrungen beim Anbau transgener Kulturpflanzen und des sich als relativ gering eingeschätzten Risikos, das von ihnen ausgeht, haben sich die EU-Mitgliedstaaten mit Verabschiedung der Europäischen Freisetzung - Richtlinie 2001/18/EG darauf verständigt, den kommerziellen Anbau gentechnisch veränderter Pflanzen zuzulassen. Anbaubegleitend muß jedoch ein Umweltbeobachtungsprogramm zur Erfassung möglicher unerwarteter und unvorhersehbarer Langzeitfolgen durchgeführt werden. Relevante Parameter für dieses sogenannte Monitoring werden derzeit noch von verschiedenen Arbeitsgruppen erarbeitet.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Projekts 'Bestimmung der Halbwertszeit transgener Kulturpflanzen in der Umwelt' am Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung der TU München durchgeführt. Dieses ist ein Teil eines vom bayerischen Umweltministerium geförderten Monitoring-Verbundprojektes in Zusammenarbeit mit dem Landesamt für Umweltschutz (Augsburg), der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (Freising) und der Technischen Universität München.

Die Schwerpunkte der vorliegenden Dissertation waren die Ermittlung der Auskreuzungsraten von transgenem, herbizidresistentem Raps in unmittelbar benachbarte konventionelle Rapsbestände sowie die Untersuchung seines Persistenzverhaltens

unter landwirtschaftlichen Praxisbedingungen. Desweiteren wurden die für die Pollenverbreitung relevanten Parameter ermittelt. Die gewonnenen Daten sollen dabei als Grundlage für die Entscheidungsfindung wissenschaftlicher und politischer Gremien bei der Entwicklung eines praktikablen Monitoringkonzeptes dienen.

1.1 Gentechnisch veränderte Pflanzen

Unter gentechnisch veränderten Pflanzen bzw. Organismen (GVO) versteht man nach Artikel 2 der Europäischen Freisetzung - Richtlinie 2001/18/EG Pflanzen bzw. Organismen, deren genetisches Material auf eine Weise verändert wurde, wie es unter natürlichen Bedingungen durch Kreuzung oder natürliche Rekombination nicht vorkommt.

1.1.1 Entwicklung der Anbauflächen transgener Kulturpflanzen

1994 wurde in den USA mit der von der Firma Calgene entwickelten FlavrSavr™-Tomate die erste gentechnisch veränderte Pflanze zum kommerziellen Anbau und zur Vermarktung zugelassen. Seither stieg die Anbaufläche gentechnisch veränderter Pflanzen kontinuierlich mit jährlich zweistelligen Zuwachsraten auf weltweit 81 Mio. ha im Jahr 2004. Dies entspricht einer Steigerung von 20 % gegenüber dem Vorjahr (JAMES, 2004).

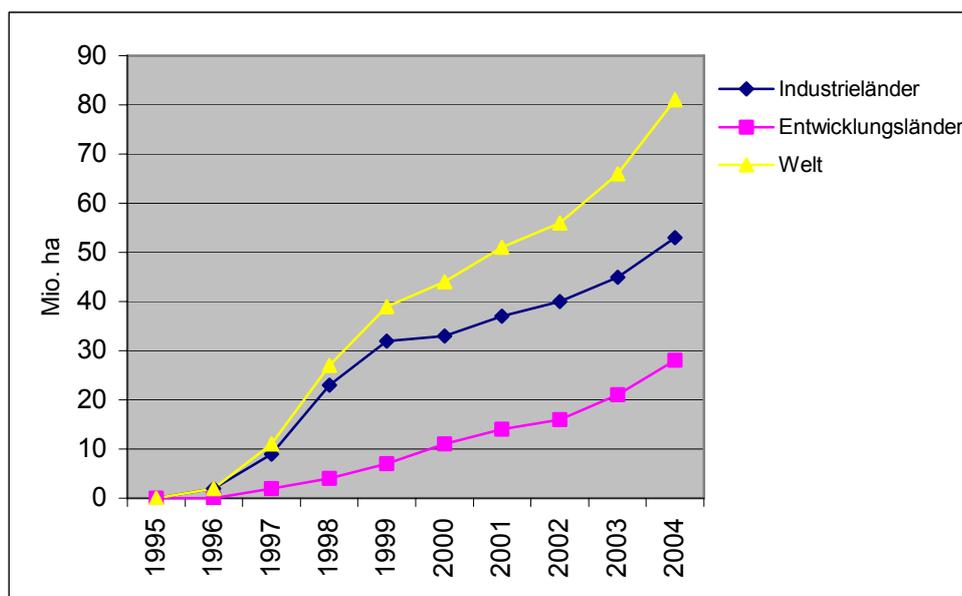


Abbildung 1: Entwicklung der globalen Anbaufläche gentechnisch veränderter Pflanzen
(Quelle: JAMES, 2004)

Im Jahr 2004 bauten schätzungsweise 8,25 Mio. Landwirte in siebzehn Ländern transgene Nutzpflanzen an (Tabelle 1). 99 % der globalen Anbaufläche von GVO entfallen dabei derzeit auf nur acht Länder: USA (59 %), Argentinien (20 %), Kanada (6 %), Brasilien (6 %), China (5 %), Paraguay (2 %), Indien (1 %) und Südafrika (1 %). Den größten prozentualen Zuwachs der jährlichen Anbaufläche verzeichnete dabei Indien (+ 400 %).

Tabelle 1: Verteilung der weltweiten GVO-Anbaufläche 2004

Land	Anbaufläche (Mio. ha)	Anteil an weltweiter GVO-Anbaufläche (%)
USA	47,6	59
Argentinien	16,2	20
Kanada	5,4	6
Brasilien	5,0	6
China	3,7	5
Paraguay	1,2	2
Indien	0,5	1
Südafrika	0,5	1
Uruguay	0,3	< 1
Australien	0,2	< 1
Rumänien	0,1	< 1
Mexico	< 0,1	< 1
Spanien	< 0,1	< 1
Phillipinen	< 0,1	< 1
Kolumbien	< 0,1	< 1
Honduras	< 0,1	< 1
Deutschland	< 0,1	< 1

Quelle: JAMES, 2004

Die weltweit wichtigsten Kulturarten, von denen derzeit gentechnisch veränderte Sorten angebaut werden, sind Soja, Mais, Baumwolle und Raps (Tabelle 2). Transgene Sorten machen bereits 29 % der weltweiten Anbaufläche dieser vier Kulturen aus. Der Anteil der Anbaufläche transgener Pflanzen an der weltweiten landwirtschaftlich genutzten Fläche im Jahr 2004 betrug 5 %.

Tabelle 2: Anbauflächen der wichtigsten transgenen Kulturpflanzen 2004

Kulturart	GVO-Anbaufläche weltweit (Mio. ha)	Veränderung ggü. Vorjahr (%)	GVO-Anteil an jeweiliger Gesamtanbaufläche (%)	Anteil an globaler GVO-Anbaufläche (%)
Soja	48,4	+ 17	56	60
Mais	19,3	+ 25	14	23
Baumwolle	9,0	+ 25	28	11
Raps	4,3	+ 20	19	6

Quelle: James, 2004

1.1.2 Die wichtigsten transgenen Eigenschaften

Herbizidresistenz

Seit Beginn der Kommerzialisierung transgener Pflanzen ist Herbizidresistenz die am weitesten verbreitete transgene Eigenschaft, da sie relativ leicht zu übertragen und wirtschaftlich am interessantesten ist (KERLAN et al., 1992; RAYBOULD & GRAY, 1993). Mit Breitbandherbiziden, gegen die entsprechende Kulturpflanzen resistent sind, kann die Begleitvegetation effektiv beseitigt werden, ohne die GVO selbst zu schädigen. Der Vorteil für den Landwirt liegt darin, daß die Applikation des Herbizids weniger häufig stattfinden muß und der Anwendungszeitpunkt flexibler zu gestalten ist als bei konventionellen Herbiziden, die nur bestimmte Arten der Begleitvegetation erfassen. Eine gentechnisch vermittelte Resistenz gibt es derzeit gegenüber Herbiziden mit den Wirkstoffen Glyphosat, Glufosinate-Ammonium, Bromoxynil und Sulfonylharnstoff (MARIANI et al., 1990; KERLAN et al., 1992; BROWN & BROWN, 1996). 2004 machten herbizidresistente Pflanzen 72 % der Anbaufläche von GVO aus (JAMES, 2004).

Insektenresistenz

Bacillus thuringiensis (*Bt*) ist ein insektenpathogenes Bakterium, dessen Endotoxine auf bestimmte Fraßinsekten wie Schmetterlinge, Käfer und Zweiflügler tödlich wirken. Da sich *Bt*-Toxine durch eine sehr selektive Wirkung gegenüber Insekten und eine geringe Persistenz im Ökosystem auszeichnen, gelten sie als nützlingsschonend und werden seit Jahrzehnten als fermentativ erzeugte *Bt*-Präparate, bestehend aus Bakteriensporen und Toxinen, sowohl in der konventionellen als auch in der ökologischen Landwirtschaft eingesetzt.

Durch die Übertragung eines bakteriellen *Bt*-Endotoxingens in das Genom einer Pflanze (z.B. die häufig verwendeten Gene für die Proteine Cry1Ab, Cry1Ac und Cry9c) wird diese dazu befähigt, das Toxin selbst zu produzieren. Je nach übertragenem *Bt*-Gen und verwendetem Promotor differieren die transgenen Pflanzen sowohl bei der Menge des *Bt*-Toxins als auch bei dessen Verteilung in der Pflanze, z.B. im Stengel oder im Pollen. Das *Bt*-Toxin wird von den Schädlingen durch Fraß an der Pflanze aufgenommen und entfaltet seine Wirkung im Verdauungstrakt, indem das Protein aktiviert und anschließend an spezifische Rezeptoren an der Darmwand gebunden wird. Durch die Bindung des *Bt*-Proteins an den Darm entstehen Perforationen in der Darmwand, wodurch die Darmfunktion erheblich gestört wird.

Dies führt zu einer Fresslähmung und dem Tod des Schädlings innerhalb von 72 Stunden (MONSANTO, 2001). Die erste *Bt*-Mais-Sorte wurde 1995 in den USA für den kommerziellen Anbau zugelassen (KAROZZI & KOZIEL, 1997). Neuere transgene Maissorten mit den Transformationsevents MON810 oder Bt11 (Handelsname YieldGard®) produzieren mit 90 ng Cry1Ab-Protein/g Trockenmasse Pollen deutlich geringere Mengen des *Bt*-Toxins als frühere Sorten (EPA, 2001).

Die einzelnen transgenen Kulturpflanzen produzieren *Bt*-Proteine, die jeweils nur für bestimmte, kulturartspezifische Insekten schädlich sind. Gentechnisch vermittelte Insektenresistenz wird hauptsächlich bei Mais und Baumwolle eingesetzt. *Bt*-Mais z.B. produziert ein *Bt*-Protein, das den Verdauungstrakt des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis* Hübner), des wichtigsten Schädlings im Maisanbau, zerstört. *Bt*-Baumwolle produziert ein Protein gegen den Baumwollkapselwurm (*Helicoverpa armigera* Hübner).

19 % der GVO-Anbaufläche entfallen auf Pflanzen mit Insektenresistenz, und zwar hauptsächlich auf *Bt*-Mais. Zunehmende Bedeutung gewinnen v.a. bei Mais und Baumwolle Sorten mit beiden transgenen Eigenschaften (sogenannte 'stacked genes'), die derzeit 9 % der GVO-Anbaufläche ausmachen (JAMES, 2004).

Virus- und Pilzresistenz

Ein weiterer wichtiger Bereich des Pflanzenschutzes durch Gentechnik ist Virusresistenz, da Virusinfektionen noch immer zu erheblichen Ernteverlusten führen und gegen Viruserkrankungen bei Pflanzen keine direkten chemischen Bekämpfungsmaßnahmen zur Verfügung stehen. Ansätze der Gentechnik sind u.a. eine Immunisierung der Wirtspflanze über die Produktion eines Hüllproteins durch die Pflanze oder die Unterbindung der viralen Hüllprotein-Produktion durch Antisense-Konstrukte (PRAVEE et al., 2005).

Im Bereich der Resistenzen gegen pilzliche Schaderreger wurden ebenfalls bereits erfolgversprechende Transformanten hergestellt, die allerdings noch keine Marktreife erlangt haben (BORNHOFF et al., 2004; www.transgen.de).

Veränderte Pflanzeninhaltsstoffe

In Zukunft werden GVO mit veränderter Zusammensetzung von Inhaltsstoffen von zunehmender Bedeutung sein, z.B. Raps mit modifiziertem Fettsäuremuster (KNUTZON et al., 1992; CHARLES & ULRICH, 1993; KINNEY, 1996; FACCIOTTI et al.,

1999) und Kartoffeln mit veränderter Stärkezusammensetzung (SCHWALL et al., 2000) oder erhöhten Mengen gesundheitsfördernder Substanzen wie Zeaxanthin (LÜBECK et al., 2002). Neben der Verwendung in der menschlichen und tierischen Ernährung spielt dies v.a. im Bereich der nachwachsenden Rohstoffe eine große Rolle.

Große Erwartungen setzt die Industrie auch in das sogenannte 'Gene oder Molecular Farming', bei dem Pflanzen medizinisch verwendbare Proteine, z.B. für Medikamente und Impfstoffe, produzieren (DALE et al., 1993; ARAKAWA et al., 1997; FISCHER & EMANS, 2000; STOGER et al., 2005). Besonders Tabak ist hierfür gut geeignet, da er leicht zu transformieren ist, große Mengen Blattmaterial produziert und nicht in die Nahrungskette gelangen kann.

Männliche Sterilität

Für die Herstellung von Hybridsaatgut ist bei vielen Kulturpflanzen wie zum Beispiel Raps und Mais zur Verhinderung einer Selbstbefruchtung die Kastration der Mutterlinien notwendig, um eine Selbstbefruchtung zu verhindern. Eine gentechnisch vermittelte männliche Sterilität wird bei Mais und Raps dadurch erreicht, daß das Enzym Barnase mit einem antherenspezifischen Promotor gekoppelt wird (BOTTERMANN, 1996). Barnase wird somit nur in den Tapetumzellen exprimiert, wo es die normale Zellaktivität hemmt und die Pollenbildung verhindert. Mit diesem System gekoppelt ist eine sogenannte 'fertility restoration' Komponente, die aus dem gleichen Promotor mit dem Enzym Barstar besteht und die Barnase hemmt. Bei der Kreuzung der männlich sterilen Mutterlinien mit Väterlinien, die die 'fertility-restoration' Komponente enthalten, entstehen fertile Samen. Das Barnase/Barstar-System ist zur Identifizierung der Transformanten mit Herbizidresistenz gekoppelt und wird für die Kulturen Raps und Mais unter dem Handelsnamen SeedLink[®] vertrieben (AVENTIS CROPS SCIENCE, 2000; FDA, 2000).

1.1.3 Wirtschaftliche Bedeutung

Durch die großen Anbauflächen haben transgene Pflanzen mittlerweile eine große wirtschaftliche Bedeutung erlangt. Der jährliche Umsatz mit GVO (Saatgut und entsprechende Pflanzenschutzmittel) betrug 2004 ca. 4,7 Mrd. US Dollar. Dies entspricht 15 % des weltweiten Umsatzes mit Pflanzenschutzmitteln und 16 % des Umsatzes an Saatgut (JAMES, 2004). In manchen Ländern dominieren transgene

Sorten mittlerweile in bestimmten Kulturarten (Tabelle 3). In den USA waren 2004 beispielsweise bereits 85 % der Sojaanbaufläche mit transgener Soja bestellt.

In der EU findet mit 58.000 Hektar *Bt*-Mais derzeit (2004) bislang lediglich in Spanien ein nennenswerter Anbau transgener Pflanzen statt. In Deutschland gab es einen Erprobungsanbau von *Bt*-Mais mit einem Umfang von rund 300 ha.

Trotz ihrer bislang ablehnenden Haltung ist die EU längst in großem Maßstab mit GVO in Berührung gekommen. Jährlich werden etwa 35 Mio. Tonnen Soja- Rohstoffe eingeführt, und zwar hauptsächlich aus den Ländern USA, Brasilien und Argentinien, auf die zusammen mit China rund 90 % der Soja-Welternte entfallen und die gleichzeitig die größten Anbauer transgener Soja sind (www.transgen.de).

Tabelle 3: GVO-Anteil einiger Kulturen in ausgewählten Ländern

Land	Kulturart	Anteil transgener Sorten (%)
Argentinien	Soja	> 95
Australien	Baumwolle	80
Canada	Raps	77
China	Baumwolle	66
Paraguay	Soja	60
Südafrika	Baumwolle	85
USA	Soja	85

Quelle: JAMES, 2004

1.1.4 Politische und rechtliche Rahmenbedingungen

Auf Grund der Blockadehaltung mehrerer EU-Staaten bestand von 1998 - 2004 ein 'de facto Moratorium' bezüglich der kommerziellen Zulassung transgener Pflanzen.

Im März 2001 haben die EU-Mitgliedsstaaten die EU-Freisetzungs-Richtlinie 2001/18/EG verabschiedet und damit die EU-weite Zulassung gentechnisch veränderter Pflanzen, Lebens- und Futtermittel beschlossen (EUROPEAN COUNCIL, 2001). Die Richtlinie setzt strenge Anforderungen an die Sicherheit der Produkte und soll für Transparenz und Wahlfreiheit der Verbraucher sorgen. Der Anbau transgener Pflanzen sowie die Einfuhr und Vermarktung GVO-haltiger Produkte kann die EU in Zukunft nur dann untersagen, wenn es begründete Zweifel an ihrer Sicherheit gibt (www.transgen.de).

Zuständig für die Antragstellung ist in Deutschland das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. Über die Zulassung entscheiden die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit, die zuständigen Behörden aller Mitgliedstaaten sowie die EU-Kommission. Alle Zulassungen sind zunächst auf zehn Jahre begrenzt.

Die EU-Freisetzung-Richtlinie 2001/18/EG ist seit 18.04.2004 in allen EU-Staaten rechtsverbindlich. Die Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 regelt dabei in der EU das Verfahren und die Voraussetzungen für die Zulassung von Lebens- und Futtermitteln, die aus gentechnisch veränderten Organismen bestehen, solche enthalten oder aus GVO hergestellt werden. Für GVO-Lebensmittel löst sie die im übrigen fortgeltende Novel Food-Verordnung ab. Die Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung von GVO auf allen Stufen des Inverkehrbringens einschließlich der Möglichkeit, Schwellenwerte festzulegen, wird durch die Verordnung (EG) Nr. 1830/2003 gewährleistet. Als Rückverfolgbarkeit wird hierbei die Möglichkeit bezeichnet, GVO und aus GVO hergestellte Produkte in jeder Phase des Inverkehrbringens über die gesamte Produktions- und Vertriebskette zurückzuverfolgen (AMTSBLATT DER EUROPÄISCHEN UNION, 2003). Den rechtlichen Rahmen für die Umsetzung in Deutschland bildet das neue Gentechnikgesetz (GenTG), das am 03.02.2005 verabschiedet wurde.

Lebensmittel und Zutaten sind kennzeichnungspflichtig, wenn das Produkt ein gentechnisch veränderter Organismus ist, gentechnisch veränderte Organismen enthält oder daraus besteht oder unmittelbar aus gentechnisch veränderten Organismen hergestellt ist - unabhängig davon, ob diese im Endprodukt nachweisbar sind. Die Kennzeichnungspflicht entfällt nur dann, wenn der GVO-Anteil aller bzw. jeder einzelnen Zutat unterhalb von 0,9 % liegt, vorausgesetzt, es handelt sich dabei um eine zufällige oder technisch unvermeidbare Verunreinigung (z.B. während Saatgutproduktion, Anbau, Ernte, Transport oder Verarbeitung) und der betreffende GVO ist in der EU zugelassen. Falls die Verunreinigung auf einen in der EU nicht zugelassenen, aber als unbedenklich eingestuft GVO zurückzuführen ist, gilt ein Schwellenwert von 0,5 %. Eine Befreiung von der Kennzeichnungspflicht besteht ebenfalls für tierische Produkte (z.B. Milch, Eier oder Fleisch), die von Tieren stammen, die mit GVO gefüttert wurden. Zusatzstoffe und Aromen sind kennzeichnungspflichtig, wenn sie direkt aus gentechnisch veränderten Pflanzen erzeugt werden. Enzyme gelten in der Mehrzahl als 'technische Hilfsstoffe' und sind daher nicht kennzeichnungspflichtig.

Der Schwellenwert für GVO-Anteile im Saatgut befindet sich noch in der Diskussion.

Ein zentraler Punkt der EU-Freisetzung-Richtlinie 2001/18/EG ist die Gewährleistung der Koexistenz verschiedener Formen der Landwirtschaft (ökologisch,

integriert, konventionell mit und ohne Gentechnik), für die die EU-Kommission Leitlinien erlassen hat. Die einzelnen EU-Mitgliedsstaaten müssen darauf aufbauend weiterführende praktikable nationale Regelungen erarbeiten, damit dieses Neben- und Miteinander möglich ist. Derzeit werden Richtlinien für die Entwicklung nationaler Strategien und eine 'gute landwirtschaftliche Praxis' entwickelt, um eine ungewollte Ausbreitung und Auskreuzung von GVO möglichst gering zu halten. Vorschläge der EU beinhalten u.a. Maßnahmen wie die Einhaltung von Mindestabständen, die Errichtung von Pufferzonen oder den Anbau von 'Fangpflanzen'.

1.1.5 Monitoring

Gentechnisch veränderte Kulturpflanzen unterliegen – bevor sie freigesetzt oder großflächig angebaut werden dürfen – umfangreichen Sicherheitsüberprüfungen (Abbildung 2). Nach positivem Abschließen der experimentellen Sicherheitsforschung in Labor und Gewächshaus wird die sogenannte Part B – Zulassung für Freisetzungsversuche erteilt. Die Genehmigung für den Vertrieb und den kommerziellen Anbau (Part C – Zulassung) wird dann erst erteilt, wenn schädliche Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt nicht zu erwarten sind.

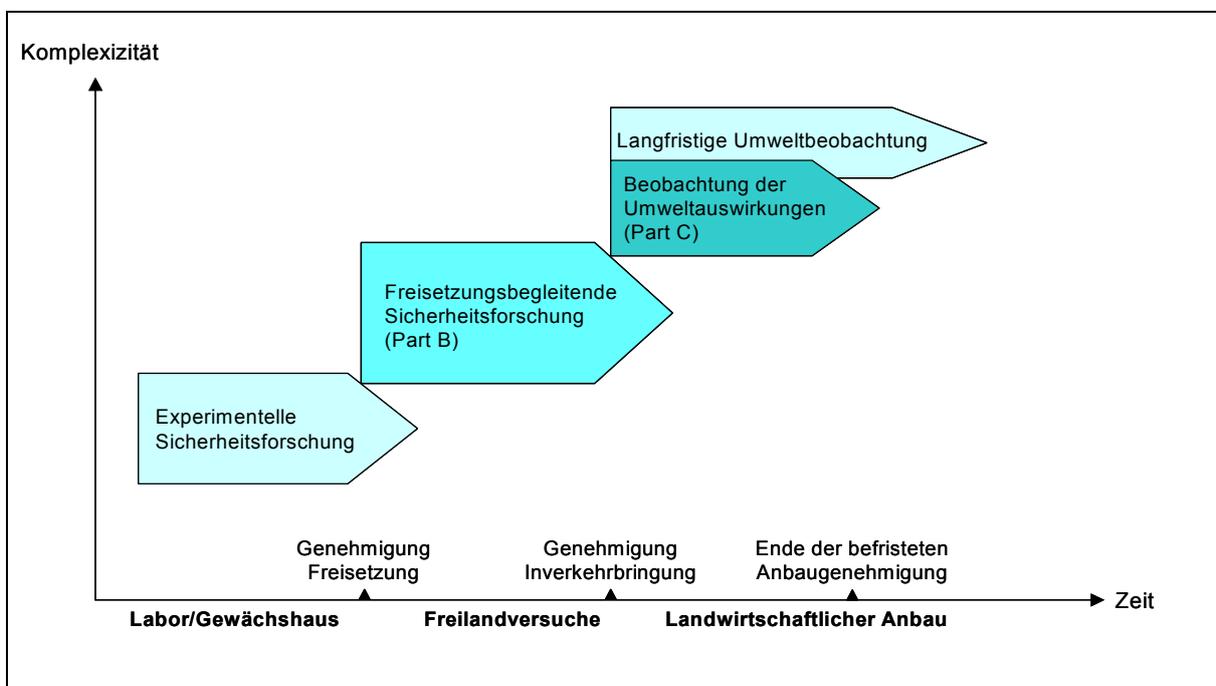


Abbildung 2: Von der freisetzungsbegleitenden Sicherheitsforschung zur langfristigen Umweltbeobachtung gentechnisch veränderter Pflanzen (nach www.biosicherheit.de)

Basierend auf den Regelungen der Freisetzung-Richtlinie 2001/18/EG werden in Zukunft Genehmigungen für gentechnisch veränderte Kulturpflanzen auf zehn Jahre befristet. Zusätzlich wird für jeden freigesetzten GVO ein Plan zur Umweltbeobachtung (= Monitoringkonzept) gefordert. Begleitend zum landwirtschaftlichen Anbau sollen dabei die Wechselwirkungen zwischen den transgenen Pflanzen und der Umwelt untersucht werden. Besonders die in der Umweltverträglichkeitsprüfung getroffenen Annahmen wie z.B. die Auswirkungen auf die Biodiversität von Flora und Fauna sollen unter landwirtschaftlichen Praxisbedingungen überprüft werden. Dadurch soll eine frühzeitige Erkennung unerwarteter oder unvorhersehbarer Effekte ermöglicht werden.

Ein Monitoringkonzept soll zwei Ansätze verfolgen: In der allgemeinen Umweltbeobachtung ('general surveillance') sollen unerwartete und langfristig auftretende Auswirkungen gentechnisch veränderter Pflanzen erfasst werden. Mit der fallspezifischen Umweltbeobachtung ('case specific monitoring') sollen diejenigen Auswirkungen bestimmter gentechnisch veränderte Kulturpflanzen untersucht werden, für die bei der Umweltverträglichkeitsprüfung bereits ein Risikopotential erkannt wurde, z.B. das Auftreten resistenter Maiszünsler im *Bt*-Mais (BDP, 2004).

Bislang wurden bereits mehrere Studien durchgeführt und Vorschläge erarbeitet, welche Gesichtspunkte in ein Monitoringprogramm aufgenommen werden sollen (WILHELM et al., 2003; ZÜGHART & BRECKLING, 2003). Da jedoch viele Fragestellungen sehr komplex sind (z.B. die Erfassung unbekannter Effekte oder die Abgrenzung von Effekten, die nicht auf natürlichen Veränderungen, sondern auf GVO zurückgehen), und die Erhebbarkeit, Handhabbarkeit und Auswertbarkeit der gewonnenen Daten ein wesentliches Kriterium darstellt, gibt es bislang noch keine rechtsverbindlichen Vorschriften. Vielmehr besteht noch weiterer Forschungsbedarf, wozu auch die vorliegende Arbeit beitragen soll.

1.2 Ausbreitung transgener Pflanzen in der Umwelt

Bei der Ausbreitung transgener Pflanzen wird nach LINDER & SCHMITT (1994) unterschieden zwischen der Ausbreitung im Raum (über Pollen oder Samen) und über die Zeit (Persistenz der Samen im Boden). Der wichtigste Aspekt bei der Ausbreitung von GVO in der Umwelt ist die Übertragung des Fremdgens durch sexuelle Prozesse, d.h. über Befruchtung durch Pollen. Die Weitergabe eines Fremdgens

durch Auskreuzung ist abhängig vom Befruchtungsmechanismus (Selbst-/ oder Fremdbefruchtung) der jeweiligen Pflanzenarten, Flugfähigkeit und Lebensdauer der Pollen sowie vom Verwandtschaftsgrad mit anderen Kultur- oder Wildpflanzen. In den kommenden Jahren wird in Deutschland vor allem bei den Kulturen Raps, Mais, Zuckerrübe und Kartoffel mit dem Anbau transgener Sorten zu rechnen sein (ZÜGHART & BRECKLING, 2003). Diese Kulturarten unterscheiden sich jedoch deutlich bezüglich ihres Ausbreitungs- und Persistenzverhaltens.

1.2.1 Raps

Raps (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) ist eine Ölpflanze mit weltweit wachsender Bedeutung. Die weltweite Anbaufläche betrug im Erntejahr 2004 ca. 26,4 Mio. ha (FAO, 2005), in Deutschland 1,28 Mio. ha (UFOP, 2005). Aufgrund der hohen Gehalte an Erucasäure und Glucosinulat wurde das aus den Samen gewonnene Öl lange Zeit nur als Lampenöl verwendet. Erst seit der züchterischen Entfernung der Erucasäure (sogenannte 'Nullsorten', ab 1974) aus dem Rapsöl und der Herstellung glucosinolatärmer Sorten (sogenannte 'Doppelnüllsorten', ab 1985) fand Raps Einzug in die menschliche Ernährung und Tierernährung, wofür er sich auf Grund seiner wertvollen ernährungsphysiologischen Eigenschaften hervorragend eignet. Des weiteren gewinnt Raps im Bereich der nachwachsenden Rohstoffe, v.a. als Biodiesel oder in der Kunststoffherzeugung, immer mehr an Bedeutung.

Transgene herbizidresistente (HR-) Rapspflanzen verfügen über eine Resistenz gegenüber Breitbandherbiziden mit Wirkstoffen wie z.B. Glyphosat (Handelsname Roundup®) oder Glufosinat (Handelsnamen z.B. BASTA® oder Liberty®). Somit schadet ihnen die Behandlung mit einem entsprechenden Herbizid nicht, während die konkurrierende Begleitvegetation beseitigt wird.

Glyphosat

Der Wirkstoff Glyphosat gelangt über die Blätter in die Pflanze und hemmt dort das Enzym EPSP-Synthase (Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase), das durch die Herstellung essentieller Aminosäuren eine lebenswichtige Rolle im Stoffwechsel der meisten Pflanzen spielt. Das Fehlen der Aminosäuren führt nach wenigen Tagen zum Absterben der Pflanzen. Zur Erzeugung Glyphosat-resistenter Pflanzen wurde ein *epsps*-Gen aus *Agrobacterium* sp. *CP4* übertragen, welches eine EPSP-

Synthese mit einer leicht abweichenden Struktur bildet, die nicht von Glyphosat gehemmt werden kann (SANDMANN & BÖGER, 1995).

Glufosinat

Glufosinat (= L-Phosphinotricin oder Glufosinate-Ammonium) befindet sich als Breitbandherbizid zur Unkrautkontrolle bereits seit 1984 auf dem Markt. Nach Aufnahme des Herbizids über grüne Pflanzenteile kommt es zur irreversiblen Hemmung des Enzyms Glutamin-Synthetase (GS), das durch die Umsetzung von Glutamat und Ammoniak zu der Aminosäure Glutamin der Ausgangspunkt der Ammoniumfixierung in Pflanzen ist. In der Folge kommt es in den Zellen zu einer Anreicherung des für die Pflanze toxischen Ammoniaks und schließlich zum Absterben der betroffenen Pflanzenteile (SANDMANN und BÖGER, 1995).

Durch die gentechnische Übertragung des *pat*-Gens (Phosphinothricin-Acetyl-Transferase) wurde Pflanzen eine Resistenz gegenüber diesem Herbizid verliehen. Die eingeführte Nucleotidsequenz wurde aus der Aminosäuresequenz des PAT-Enzyms abgeleitet, das vom Bodenbakterium *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 gebildet wird (WOHLLEBEN et al., 1988). Durch das *pat*-Gen wird die Bildung der Phosphinothricin-Acetyl-Transferase in den transgenen Pflanzen exprimiert, die die Aminogruppe des Wirkstoffs L-Phosphinothricin acetyliert (Abbildung 3) und dadurch inaktiviert, daß das neu entstandene N-acetyl-Phosphinothricin die GS nicht mehr inhibieren kann.

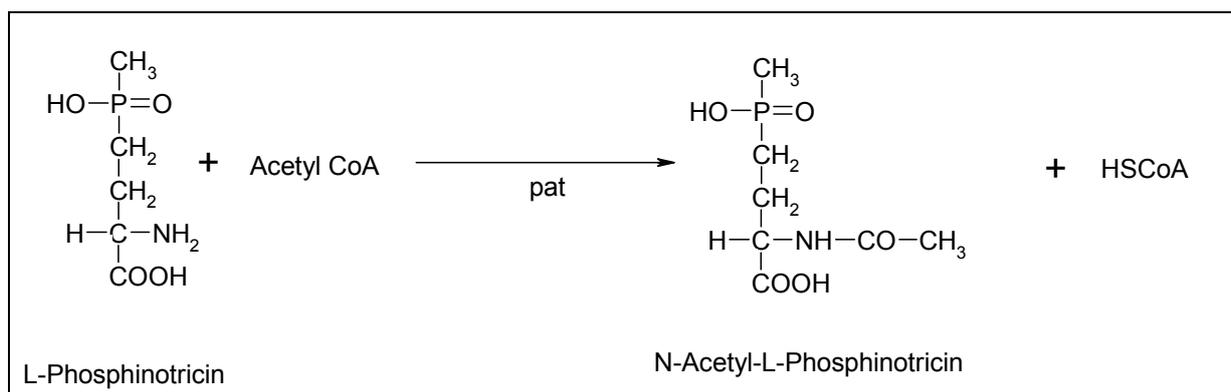


Abbildung 3: Wirkmechanismus der Phosphinothricin-Acetyl-Transferase (nach DRÖGE et al., 1992)

Transgene Pflanzen, denen das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* übertragen wurde, besitzen den gleichen Wirkmechanismus zur Entgiftung des Herbizids (THOMPSON et al., 1987). Glufosinat ist relativ schnell biologisch abbaubar. Seine

Halbwertszeit im Boden beträgt je nach klimatischen Bedingungen drei bis zwanzig Tage (SMITH, 1988).

Raps hat entomorphe Blüten, die sowohl zu Selbst- als auch zu Fremdbestäubung fähig sind. Der Fremdbefruchtungsanteil liegt bei 12 - 47 %. Die Höhe der Fremdbefruchtungsrate wird bestimmt durch anemophile Pollenverbreitung (Wind) und blütenbesuchende Insekten und kann je nach Sorte und Umweltbedingungen sehr starken Schwankungen unterliegen (BECKER et al., 1992; RIEGER et al., 2002). Daher stellt sich beim großflächigen Anbau von gentechnisch verändertem Raps die Frage der Auskreuzung von Transgenen in benachbarte Rapsfelder. Zudem ist beim Anbau von transgenem Raps auch eine Verwilderung und Ausbreitung der Pflanzen außerhalb von Ackerflächen sowie eine mögliche Auskreuzung in verwandte Wild- oder Unkrautarten zu berücksichtigen.

Mit Raps wurden bereits zahlreiche Studien zur Ausbreitung transgener Pollen über Wind- und Insektenbestäubung durchgeführt (Tabelle 4). TIMMONS et al. (1995) z.B. fanden in 2500 m Entfernung zur transgenen Parzelle Auskreuzungsraten von 0,08 % an Einzelpflanzen. Trotz der in den einzelnen Studien festgestellten Unterschiede bezüglich der Höhe der Auskreuzungsraten, die sich aus den unterschiedlichen Versuchsaufbauten und untersuchten Fragestellungen ergeben, zeigen alle Studien mit zunehmender Entfernung von der transgenen Pollenquelle einen starken Rückgang der Auskreuzungsereignisse.

Verschiedene Studien kamen zu dem Ergebnis, daß die Pollenverbreitung und Auskreuzung nicht allein windabhängig ist, da oft kein Zusammenhang zwischen der Windverteilung und der Verteilung der Auskreuzungsdaten feststellbar ist (SCHEFFLER et al., 1993; RIEGER et al., 2002). Vielmehr spielen auch blütenbesuchende Insekten wie v.a. Honigbienen (*Apis mellifera* L.) oder Hummeln (*Bombus terrestris* L.) eine große Rolle bei der Pollenverbreitung (SCHEFFLER et al., 1993; 1995; RAMSEY et al., 1999).

Tabelle 4: Übersicht über bisher festgestellte Auskreuzungsraten bei Raps

Entfernung [m]	Auskreuzungsraten [%]													
	männlich sterile Fangpflanzen			männlich fertile Fangpflanzen										
0						2,70					6,30			0,69
0,3						1,33								
0,6						1,03								
1				1,50			0,10							
2,5														0,29
3				0,38		0,63								
4												1,10		
4,6						0,60								
5											0,001			0,14
6				0,6		0,14						0,05		
6,5			28,50											0,75
7,5			3,75								0,50			0,05
8												0,14		
10												0,13		0,069
12						0,021								
14												0,05		
15														0,078
16	3-11							0,001						
20											0,76	0,11		0,066
24						0,002								
25														0,042
30												0,05		0,021
32								0,001		0,04				
34												0,09		
36						0,002								
42												0,33		
47						0,0002								
50											0,02	0,07		
54												0,11		
56												0,05		
100											0,25			
200		1,2-21	0,83						0,0156					0,00
150												0,17		
400									0,0038					
Referenz	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV

I - FISCHBECK et al. (1998); II - PFEILSTETTER et al. (1998); III - FELDMANN (2000); IV - FISCHBECK et al. (1998); V - SCHEFFLER et al. (1993); VI - MORRIS et al. (1994); VII - PAUK et al. (1995); VIII - SCHEFFLER et al. (1995); IX - WILKINSON et al. (1995); X - BROWN et al. (1996); XI - DOWNEY (1999); XII - SIMPSON et al. (1999); XIII - FELDMANN (2000); XIV - STANILAND et al. (2000)

1.2.2 Mais

Mais (*Zea mays* L.) ist eine der wichtigsten Kulturarten in Europa. Auf Grund des diklinen Blütenaufbaus und Protandrie ist Mais eine Pflanze mit überwiegender Fremdbefruchtung. Der Anteil der Selbstbefruchtung liegt je nach Sorte bei 1 - 15 % (HEPTING & OLTSMANN, 1985). Während der 2 - 14 Tage dauernden Maisblüte werden 14 - 50 Mio. Pollen pro Pflanze freigesetzt (MILLER, 1985). Theoretisch könnte es dadurch zwar zu Auskreuzungen auf verwandte Wildarten kommen, jedoch hat Mais in Europa keine kreuzungskompatiblen Verwandten (EASTHAM & SWEET, 2002). Zudem ist Mais nicht in der Lage, sich auf Ruderalstandorten zu etablieren und fortzupflanzen, was sich u.a. durch die hohen Ansprüche an die Keimtemperatur und die fehlende Frosthärte erklärt. Dadurch ist eine Samenverbreitung transgener Eigenschaften unter unseren klimatischen Bedingungen nahezu ausgeschlossen (WENZEL & FISCHBECK, 1998). In benachbarten Maisbeständen kommt es dagegen sehr leicht zu Auskreuzungen, auch wenn die Auskreuzungsraten auf Grund der schnell abnehmenden Pollenzahl in zunehmender Entfernung stark zurück gehen. Da Maispollen sehr groß sind (90 - 125 μm), können sie, verglichen mit vielen anderen windbestäubenden Pflanzen, nur relativ geringe Distanzen überwinden (CHAMBERLAIN & CHADWICK, 1972), auch wenn in Einzelfällen Auskreuzungen in Entfernungen von 600 - 800 m nachgewiesen werden konnten (SALAMOV, 1940; NARAYANASWAMY, 1997). Ein an diesem Lehrstuhl 1994 - 1997 durchgeführter Freisetzungsversuch mit transgenem Raps und Mais kam ebenfalls zu dem Ergebnis, daß die Konzentration von Maispollen in der Luft mit zunehmender Entfernung deutlich unter der von Rapspollen liegt (FISCHBECK, 1997). Durch die Einhaltung von Isolationsabständen von 200 m, wie es die deutsche Saatgutverordnung für die Saatguterzeugung vorschreibt (BUNDESGESETZBLATT, 1986), können 99 % Reinheit erreicht werden (INGRAM, 2000).

Ein Randstreifen hat einen deutlichen Effekt auf die Reduzierung der Auskreuzung innerhalb eines Bestandes. In einer Studie der Biologischen Bundesanstalt lagen die Auskreuzungsraten bereits nach wenigen Pflanzenreihen unter 0,5 % (BBA, 2002). Zu dem gleichen Ergebnis kommt die Auswertung des Erprobungsanbaus mit *Bt*-Mais in Deutschland. Nur innerhalb des 10 m breiten Randstreifens lag die Auskreuzungsrate in Einzelfällen über 0,9 %. In Entfernungen von 20 - 30 m lagen die Werte durchgehend unter 0,5 %, in 50 - 60 m Entfernung unter 0,2 % (DEUTSCHES

MAISKOMITEE, 2005). Auch WENZEL und FISCHBECK (1998) kamen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, daß neben einer zeitlich versetzten Blüte v.a. die Dichte und Wüchsigkeit eines benachbarten Maisbestandes einen entscheidenden Einfluß auf eine Einkreuzung haben.

Eine von der Europäischen Kommission in Auftrag gegebene Studie des Joint Research Centre (Bock et al., 2002) kommt nach Auswertung von sechs EU-Studien zu dem Ergebnis, daß bei einem großflächigen Anbau transgener Maissorten (Flächenanteil: 50 %) unter Beibehaltung der momentanen landwirtschaftlichen Praxis Auskreuzungsraten von 0,8 - 2,2 % zu erwarten wären. Zur Einhaltung des Schwellenwertes von 0,9 % wären zusätzliche Maßnahmen wie Abstandsregelungen oder der Anbau von Pflanzen mit unterschiedlichen Blühzeitpunkten nötig.

1.2.3 Zuckerrübe

Die Zuckerrüben (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *altissima* Döll) gehört zur Familie der Chenopodiaceae. Da die Zuckerrübe ein obligater Fremdbefruchter mit gametophytisch gesteuerter Selbstinkompatibilität ist, ist für die Bestäubung neben Insekten hauptsächlich Wind verantwortlich (FREE et al., 1975; VIGOUROUX et al., 1999).

Die Rübenbildung ist unabhängig von der Bestäubung, da die Zuckerrübe eine zweijährige Kulturpflanze ist und erst nach Vernalisation zur Blüte kommt. Die Möglichkeit von Genfluss besteht daher nach BARTSCH et al. (1999) hauptsächlich in den Saatgutproduktionsgebieten. BOUDRY et al. (1993) konnten nachweisen, daß es in Saatgutproduktionsgebieten regelmäßig zu Genfluß mit Wildrüben kommt. Zwischen kultivierten und wilden Formen von *B. vulgaris* bestehen keine Kreuzungsbarrieren (BARTSCH & POHL-ORF, 1996). Die wild wachsenden Arten der Gattung *Beta* sind überwiegend in konkurrenzschwachen Habitaten wie Meeresküsten oder landwirtschaftlichen Flächen zu finden (FREDSHAVEN & POULSEN, 1996). Nach DESPLANQUE et al. (1999) können Zuckerrüben auch auf Ruderalstandorten oder als Unkrautrüben ('weed beet'), die sich v.a. durch die Blüte im ersten Jahr auszeichnen, vorkommen. Die Unkrautrüben unterscheiden sich nach BOUDRY et al. (1993) hauptsächlich durch das dominante 'B'-Allel für einjährige Generationsphasen (wilde Rüben liegen als 'BB' vor und kultivierte als 'bb'). Hybridisierung zwischen Zuckerrübe und der Wilden Rübe (*Beta vulgaris* ssp. *maritima* L.) können in Regionen, in denen die Vermehrung von Zuckerrübensaatgut stattfindet, häufig vorkommen (SANTONI & BERVILLE, 1992).

1.2.4 Kartoffel

In Versuchen mit transgenen, herbizidresistenten Kartoffeln konnten TYNAN et al. (1990) Auskreuzungen bis in einer Entfernung von 4,5 m zu den transgenen Pflanzen nachweisen. Die Auskreuzungsraten lagen dabei bei 0,05 %. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen MCPARTLAN & DALE (1994), die in einer maximalen Entfernung von 10 m Auskreuzungen in Höhe von 0,017 % ermittelten. Da Kartoffeln vegetativ vermehrt werden und Bestäubung mit fremden Pollen keinen Einfluß auf die Knollen hat, spielt Auskreuzung unter landwirtschaftlichen Bedingungen jedoch in der Regel keine Rolle. Vermischungen mit transgenem Material sind daher eher beim Transport und bei der Verarbeitung zu erwarten. Manche Sorten besitzen allerdings ein großes Potential zur Bildung von Samen (true potato seed, TPS), die in großen Mengen ausfallen und bis zu acht Jahre im Boden überdauern können, wodurch in manchen Ländern bereits eine gewisse Problematik mit Durchwuchspflanzen entstanden ist (LAWSON, 1983). Im Fall von transgenen Kartoffeln kann es auf diese Weise zu einer Verunreinigung von konventionellem Erntegut kommen. Unter europäischen Klimabedingungen werden die Knollen von *Solanum tuberosum* L. nach der Abreife sehr schnell von Pilz-, Bakterien- und Virenkrankheiten befallen und können daher kaum in kalten und nassen Böden überjährig überdauern. Darüber hinaus ist es unwahrscheinlich, daß Kartoffeln innerhalb anderer Kulturen oder außerhalb landwirtschaftlicher Flächen das Potential haben, sich als Unkrautpflanzen zu etablieren, da sie nur eine geringe Konkurrenzkraft gegenüber anderen Pflanzen haben (EVENHUIS & ZADOKS, 1991; ASKEW, 1993). In Europa existieren zwar einige Kartoffelverwandte aus der Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) wie z.B. Tomate, Tabak, Paprika oder Petunie, doch ist die Bildung von Hybriden mit diesen Pflanzen äußerst unwahrscheinlich (DALE et al., 1992; EIJLANDER & STIEKEMA, 1994).

1.2.5 Vertikaler Gentransfer

Die unkontrollierte Ausbreitung transgener Pflanzen durch Auskreuzung in nicht transgene und kreuzungskompatible Kultur- oder Wildpflanzenarten wird als vertikaler Gentransfer bezeichnet. Mögliche Kreuzungspartner sind bei einigen transgenen Kulturpflanzenarten neben nicht-transgenen Pflanzen der gleichen Art auch nah verwandte Kulturpflanzen oder wild wachsende Arten. Da Mais und

Kartoffeln in Mitteleuropa keine kreuzbaren Verwandten haben, gilt dies in erster Linie für Zuckerrübe und Raps.

Bei der Zuckerrübe konnte die Entstehung transgener Hybriden vielfach beobachtet werden. Da fast alle Vertreter der Gattung *Beta vulgaris* L. Windbestäuber sind, ist eine Auskreuzung mit kreuzungskompatiblen Kultur- und Wildformen nahezu unvermeidbar (BOUDRY et al., 1993; RAYBOULD & GRAY, 1993; BARTSCH & SCHMIDT, 1997). SCOTT (1970) konnte eine stündliche Pollenkonzentration von über 50.000 Pollen/m³ Luft feststellen. REHEUL (1987) konnte Pollen noch in einer Entfernung von 1000 m nachweisen. Zudem werden die Blüten von zahlreichen nektarsammelnden Insekten angefliegen (FREE et al., 1975).

Die Bildung transgener Hybriden konnte mit den Kulturpflanzen Blattmangold (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *Flavescens*), Schnittmangold (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *cicla* L.), Rote Bete (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *vulgaris*), Gelbe Bete (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *lutea*) und Futterrübe (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *crassa*) nachgewiesen werden (GERDEMANN-KNÖCK & TEGEDER, 1997; HOFFMANN & KÖHLER, 2000). Die Hybridisierung mit verwandten Wildarten wie z.B. der Wildrübe (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) ist ebenfalls möglich (PAULUS et al., 1997). Zuckerrüben haben zwar in ungestörten Habitaten eine schlechte Konkurrenzkraft (BARTSCH et al., 1996), besitzen aber dennoch ein Potential zur Verwilderung und können unter günstigen Bedingungen überwintern, z.B. wenn sie auf Transportwegen verschleppt werden (POHL-ORF et al., 1999).

Da Raps eine ganze Reihe von kreuzungskompatiblen Verwandten hat, treten unter Freilandbedingungen immer wieder interspezifische Hybriden auf (Tabelle 32). In verschiedenen Studien wurde deutlich, daß Genfluß und Introgression, d.h. der stabile Einbau von Genen eines Genpools in einen anderen (ANDERSON, 1949), auf Rapsverwandte unter landwirtschaftlichen Bedingungen unvermeidbar ist, wenn auch in einem sehr geringen Ausmaß (KERLAN et al., 1993; TIMMONS et al., 1995; 1996; MIKKELSEN et al., 1996a).

Die meisten der nah verwandten Arten haben ihren Verbreitungsschwerpunkt im Agrarraum. Primär betroffene Bereiche, in die GVO-Raps und seine Hybriden einwandern könnten, sind landwirtschaftlich genutzte Flächen (z.B. Feld- und

Wiesenraine, Feldränder, Windschutzstreifen) und Ruderalstandorte (z.B. Schutthalden, Straßenböschungen oder Bahngleise) (ECKELKAMP et al., 1997).

Transgene Hybriden können problematisch werden, wenn sie sich selbst wie Unkraut verhalten oder sich in natürlichen Ökosystemen ausbreiten und andere Arten verdrängen. Voraussetzung dafür ist allerdings, daß die transgene Eigenschaft selektive Vorteile mit sich bringt (TIEDJE et al., 1989; ELLSTRAND & HOFFMANN, 1990; DALE, 1992; RAYBOULD & GRAY, 1993; ROGERS & PARKES, 1995).

Im Gegensatz zu den züchterisch bearbeiteten Kulturpflanzen besitzen die Samen von Wildpflanzen meist eine weitaus größere Dormanzneigung sowie eine ungleichmäßige Keimbereitschaft. Da diese Eigenschaften auf Komplexen Zusammenhängen beruhen, kann das Persistenzverhalten der Hybriden nicht aus dem Verhalten der jeweiligen Eltern vorhergesagt werden (ADLER et al., 1993).

1.2.6 Horizontaler Gentransfer

Eines der grössten Sicherheitsbedenken bei der Freisetzung transgener Pflanzen besteht in der möglichen Ausbreitung einer transgenen Eigenschaft über Artgrenzen hinweg. Die Aufnahme oder Weitergabe von genetischem Material außerhalb der sexuellen Fortpflanzungswege und unabhängig von bestehenden Artgrenzen, z.B. von einer Pflanze auf ein Bodenbakterium, wird als horizontaler Gentransfer bezeichnet (BRANDT, 1995).

Voraussetzung für horizontalen Gentransfer bei Bakterien ist ihre Fähigkeit, freie DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen. Diese Fähigkeit wird als natürliche Kompetenz bezeichnet. Eine Vielzahl von taxonomisch verschiedensten Bakteriengruppen verfügt über natürliche Kompetenz mit nachgewiesenen Transformationshäufigkeiten von 10^{-2} bis 10^{-7} (LORENZ und WACKERNAGEL, 1994).

Unter Laborbedingungen konnten TEPFER et al. (2003) den Transfer des für die Selektion transgener Pflanzen häufig verwendeten Antibiotika-Resistenzgens *nptII* von Tabak und Raps auf das Bodenbakterium *Acinetobacter* nachweisen. Wie auch in den Untersuchungen von DE VRIES et al. (2001) wurde dabei deutlich, daß für die Nutzung der genetischen Information eine Homologie mit dem Wirtsgenom notwendig ist. NETHERWOOD et al. (2004) wiesen in einer klinischen Studie nach, daß das *epsps*-Gen aus transgener Soja nach Passage des menschlichen Verdauungstraktes vollkommen degradiert war. Dennoch konnten sie feststellen, daß ein geringer Anteil der Microflora im Darm das Gen aufgenommen hatte.

Bevor Pflanzen-DNA für Mikroorganismen zugänglich ist, muß sie aus den Zellen freigesetzt werden. Dies geschieht z.B. durch Mikroorganismen im Boden oder durch tierische Verdauungssekrete. Damit eine effektive Transformation stattfinden kann, darf die DNA bei der Aufnahme zudem nur möglichst wenig degradiert sein. Es konnte nachgewiesen werden, daß freie DNA durch die Anheftung an Bodenpartikel eine gewisse Stabilität erhält und eine erhöhte Resistenz gegenüber Nukleasen hat. Dabei spielen die Art der Mineralien, die Konzentration und Wertigkeit der Kationen und der pH-Wert eine entscheidende Rolle (LORENZ & WACKERNAGEL, 1987; ROMANOWSKI et al., 1991; KHANNA & STOTZKY, 1992; PAGET et al., 1992).

Nach Inokulation von natürlichem, nicht-sterilem Boden mit Plasmid-DNA konnten ROMANOWSKI et al. (1993) nach 60 Tagen noch 0,01 % der zugeführten Plasmid-DNA wiederfinden. Die aus dem Boden extrahierte DNA konnte sogar noch für eine künstliche Transformation kompetenter *E.coli* Zellen eingesetzt werden, auch wenn die Transformationsfrequenz der DNA nach 60 tägiger Bodeninkubation nur noch sehr gering war.

Trotz der nachgewiesenen Überdauerung von pflanzlicher DNA in lebenden oder toten Zellen oder als freie DNA im Boden wird die Transformation von Bakterien unter natürlichen Bedingungen immer ein äußerst seltenes Ereignis bleiben. Zudem ergibt sich aus der Aufnahme artfremder DNA nicht zwangsläufig eine Veränderung in den Bakterien. Zu dauerhaften Veränderungen in Bakterienkolonien kommt es erst nach stabilem Einbau der DNA ins Genom des Empfängerorganismus, der Expression des Gens und der Vermittlung eines Selektionsvorteils.

In Laborexperimenten konnte gezeigt werden, daß ein horizontaler Gentransfer selbst noch in prozessierten Lebensmitteln vorkommen kann (HELLER et al., 1995; HERTEL et al., 1995; BRÄUTIGAM et al., 1997).

Auch für verschiedene Pilze konnte unter optimalen Versuchsbedingungen horizontaler Gentransfer nachgewiesen werden (FINCHAM, 1989). Eine natürliche Kompetenz für die Aufnahme von DNA wurde bisher nur bei den Pilzen *Aspergillus niger* (HOFFMANN et al., 1994) und *Plasmodiophora brassicae* (BRYNGELSON et al., 1988) beobachtet; diese Arbeiten sind jedoch sehr umstritten.

1.3 Persistenz in der Umwelt

1.3.1 Persistenz im Boden

Eine weitere Möglichkeit der Ausbreitung transgener Kulturpflanzen in der Umwelt ist neben der Pollenverbreitung die Überdauerung der Samen im Boden. Bei Mais und Kartoffeln ist die Wahrscheinlichkeit einer Überwinterung oder Überdauerung der Samen im Boden ziemlich gering. Zuckerrüben bilden normalerweise erst im zweiten Jahr einen Samenansatz und können daher überwintern. Durch Kältereize kann es zudem während der gesamten Vegetationsperiode zu Schossern, d.h. Samen bildenden Rüben, kommen. Falls diese nicht bekämpft werden und zum Aussamen gelangen, kann es im Folgejahr ebenfalls zum Auflaufen von Rüben kommen (ZIEGLER, 1998). Allerdings können Zuckerrüben in der Fruchtfolge sehr leicht bekämpft werden. Raps dagegen besitzt ein großes Potential zur mehrjährigen Überdauerung in der Samenbank im Boden. Da Raps als noch relativ junge Kulturpflanze erst seit ca. 120 Jahren systematisch züchterisch bearbeitet wird (RÖBBELEN, 1985), besitzt er noch einige Eigenschaften von Wildpflanzen wie z.B. das leichte Aufplatzen der Samenhülsen und die Fähigkeit der Samenüberdauerung im Boden.

Durch vorzeitiges Aufplatzen der Schoten, z.T. auch bedingt durch Vögel und Unwetter, sowie durch Verluste bei der Ernte mit dem Mähdrescher kann es zum Eintrag von sehr große Mengen an Rapssamen in den Boden kommen. In den Folgejahren kann es dadurch zu Durchwuchsraps in den Folgekulturen im Feld oder zu Ausfallraps am Feldrand kommen. PESSEL et al. (2001) fanden beispielsweise noch acht Jahre nach der Umstellung von Erucasäure-haltigen auf Erucasäure-freie Rapsorten Samen von Erucasäure-haltigem Raps an Straßenrändern. Durchwuchsraps in Folgekulturen ist ein weit verbreitetes Problem in der Landwirtschaft und kann, v.a. in Blattfrüchten wie Kartoffeln oder Zuckerrüben, auf Grund seiner Konkurrenzkraft zu nicht unerheblichen Ertragseinbußen bzw. zu Qualitätseinbußen bei anderer Produktionsausrichtung führen (LUTMAN, 1993; KNOTT, 1995). Auf Grund des langen Zeitraums, während dessen er auflaufen kann, kann auch ein Herbizideinsatz problematisch oder unmöglich werden (LUTMAN et al., 1994). Zudem kann transgener Durchwuchsraps wieder eine Quelle für Kontaminationen mit transgenen Pollen darstellen. In Kanada wurde beispielsweise im Rapsdurchwuchs

bereits die Entstehung multipler Resistenzen gegen mehrere Herbizide (Glufosinat und Glyphosat) beobachtet, die höchstwahrscheinlich auf einem Pollentransfer zwischen benachbarten Feldern mit unterschiedlichen herbizidresistenten Kulturen beruht (DOWNEY, 1999; HALL et al., 2000)

Rapssamen können mehrere Jahre keimfähig im Boden überdauern (LUTMAN, 1993; LOPEZ-GRANADOS & LUTMAN, 1998; PEKRUN et al., 1999), unter bestimmten Umständen sogar bis zu zehn Jahre lang (VAUGHAN et al., 1976; SAUERMAN, 1993; SCHLINK, 1998). Voraussetzung für die Überdauerung ist die Ausbildung Dormanz, wobei zwischen primärer und sekundärer Dormanz unterschieden wird (KARSEN, 1981). Durch die primäre Dormanz wird eine Keimungshemmung der reifen Samen sowohl auf der Mutterpflanze als auch noch kurze Zeit nach der Ernte bzw. nach dem Platzen der Schoten verursacht, wodurch ein sofortiges Keimen verhindert wird. Die sekundäre Dormanz entwickelt sich an keimbereiten Samen unter ungünstigen Umweltbedingungen, die ein Weiterleben des jungen Keimlings unmöglich machen würden. Bei einer Änderung der Umweltbedingungen kann die Dormanz über bestimmte Reize, z.B. Licht oder Temperaturwechsel, gebrochen werden, so daß die Samen zu keimen beginnen. Unter normalen Bedingungen bilden Rapssamen keine oder nur sehr geringe primäre Dormanz aus und sind größtenteils sofort keimfähig (LUTMAN, 1993; SCHLINK, 1994). Durch ungünstige Temperatur- und Lichtverhältnisse sowie Wasserstreß nach der Ernte kann jedoch eine sekundäre Dormanz induziert werden (PEKRUN et al., 1998).

1.3.2 Persistenz auf Ruderalstandorten

Eine Befürchtung beim Anbau transgener Kultursorten ist ein aggressiveres Ausbreitungsverhalten der Pflanzen auf Ruderalstandorten und von dort ausgehend in Naturhabitaten (CRAWLEY et al., 1993; KAREIVA et al., 1996; BARTON et al., 1997; SNOW & PALMA, 1997). Nach LECKIE et al. (1993) ist es bei einem großflächigen Anbau transgener Pflanzen unvermeidbar, daß das Transgen in wilde Populationen einwandert und sich dort mindestens eine Generation lang hält.

Das Ausbreitungsverhalten einer Pflanzenart ist abhängig vom Grad der Domestikation und der Art der gentechnisch übertragenen Eigenschaft, d.h. inwieweit die neue Eigenschaft der betreffenden Pflanze einen selektiven Vorteil in Konkurrenzsituationen vermitteln kann. Ein Selektionsvorteil ist z.B. durch Resistenzen gegenüber Schaderregern und Pathogenen oder verbesserte Standortanpassungen wie

Trocken- oder Kältetoleranz gegeben. Bei transgenem, insektenresistentem Raps etwa konnte bei starkem Herbivorendruck eine erhöhte Fitness festgestellt werden (STEWART et al., 1997).

Kulturpflanzen, darunter auch Raps, gelten in der Regel als nicht dauerhaft etablierungsfähig in natürlichen oder naturnahen Habitaten außerhalb kultivierter Felder. Entgegen der weit verbreiteten Meinung, daß Ruderalraps aus Samen des aktuellen Jahres oder des Vorjahres stammt, konnten PESSSEL et al. (2001) zeigen, daß die Rapspflanzen auf einen mindestens acht Jahre zurückliegenden Anbau der entsprechenden Sorten zurückgehen kann. Transgenen Ruderalrapspopulationen kommt damit eine große Bedeutung für unkontrollierten Genfluß zu, da sie neue Nachkommen hervorbringen und eine Auskreuzung in benachbarte Rapsbestände verursachen können.

Besonders an Feldrändern, -wegen und Straßenrändern, auf denen Raps transportiert wird oder Erde aufgeschüttet wurde, kommt es zu häufigem Auftreten von Ruderalraps (CRAWLEY et al., 1993), obwohl Raps außerhalb kultivierter Felder nur eine sehr schlechte Konkurrenzskraft besitzt.

Das häufige Auftreten wilder Rapspopulationen unterstreicht die Fähigkeit von konventionellem Raps ohne zusätzliche Selektionsvorteile zur Persistenz. Falls bei transgenen Pflanzen mit entsprechenden Konstrukten (z.B. für Insektenresistenz) ein Selektionsvorteil gegeben wäre, wären die Chancen einer Persistenz vermutlich erhöht (STEWART et al., 1997).

1.4 Molekularbiologische Methoden zum GVO-Nachweis

Nach den EU-Verordnungen zur Kennzeichnung und Rückverfolgbarkeit von GVO (1829/2003 und 1830/2003) sind für den Nachweis der gentechnischen Veränderung Tests mittels DNA oder Proteinen zulässig. Die Nachweismöglichkeit von GVO bzw. von gentechnisch hergestellten Lebensmitteln hängt wesentlich vom Verarbeitungsgrad und der Art der Verarbeitung eines Produktes ab (HÖRTNER, 1997). Bei der Analyse auf DNA-Ebene können zusätzliche Probleme wie z.B. die Denaturierung der DNA oder die Verwendung gleicher Genkonstrukte in verschiedenen Pflanzen auftreten.

Durch die EU-Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG sind GVO-Antragsteller in Zukunft dazu verpflichtet, entsprechendes GVO-Standard- und Referenzmaterial, Sequenzinformationen sowie Nachweis- und Bestimmungsmethoden für die Analyse zur

Verfügung zu stellen. Zuständig für die Evaluierung der Nachweismethoden ist das CRL (COMMUNITY REFERENCE LABORATORY) in Rom.

ELISA-Test

Bei der GVO-Analytik wird zwischen quantitativen und qualitativen Methoden zum Nachweis von GVO unterschieden. Der qualitative Nachweis von GVO erfolgt hauptsächlich durch 2 Methoden. Mit ELISA-Tests ('enzyme-linked immunosorbent assay') ist es möglich, Proteine in transgenen Organismen nachzuweisen. Die Veränderungen in GVO führen in der Regel zur Expression zusätzlicher oder veränderter Proteine in der gesamten Pflanze bzw. bei Verwendung entsprechender Promotoren in bestimmten Geweben. Unbekannte Proben werden dabei mit GVO-spezifischen Antikörpern inkubiert. Bei einer Bindung der Antikörper an die entsprechenden Proteine kommt es zu einer Farbreaktion. Da ELISA-Tests mit entsprechenden Kits kostengünstig und schnell durchzuführen sind, sind sie in der Lebensmittelindustrie weit verbreitet. Mit einer Nachweisgrenze von ca. 1 % GVO-Anteil ist der ELISA-Test zudem eine relativ empfindliche Methode (STAVE, 1999). Nachteilig ist, daß Proteine durch den Verarbeitungsprozess von Lebensmitteln oft verändert oder denaturiert werden (HUPFER et al., 1998). Derzeit können nicht alle Transformationsereignisse detektiert werden. Es gibt auch kein Protein, das in allen zugelassenen GVO exprimiert wird und somit in einem einzigen Immunoassay zum Screening jeglicher Organismen dienen könnte. Der Nachweis von anti-sense Konstrukten ist ebenfalls nicht möglich, da keine neuen Proteine exprimiert werden (LÜTHY, 1999).

Polymerase-Kettenreaktion

Die zweite und wichtigste Methode für den qualitativen GVO-Nachweis ist die PCR. Die PCR (polymerase chain-reaction; MULLIS & FALOONA, 1987) erlaubt die spezifische Vervielfältigung und Identifizierung von Abschnitten genomischer DNA. Die PCR ist ein enzymatischer, zyklischer Prozess, bei dem bereits ca. zehn Ausgangskopien eines Genomabschnittes (= Template) in der DNA-Probe für ein Hochamplifizieren der entsprechenden Sequenz ausreichend sind (PIATAK et al., 1993). Da die genetische Information in allen Zellen vorhanden ist, ist die PCR im Gegensatz zum Proteinnachweis nicht auf das Gewebe beschränkt, in dem das transgene Protein exprimiert wird. Die Einfachheit der Anwendung und der außerordentlich

empfindliche Nachweis geringer Template-Mengen haben die PCR auch in der Lebensmittelanalytik zu einem anerkannten Werkzeug für qualitative Untersuchungen gemacht (PIETSCH et al., 1997; HÜBNER et al., 1999; MEYER, 1999; VOLLENHOFER et al., 1999). Der Vorteil der PCR liegt darin, daß sie sehr sensitiv und universell einsetzbar ist (verschiedene Gewebe, verarbeitete Produkte, Lebensmittel etc.), eine hohe Spezifität hat und Nachweissysteme relativ leicht zu entwickeln sind.

Der spezifische Nachweis eines GVO erfolgt in der Regel durch Analyse eines einzigartigen Sequenzübergangs zweier genetischer Elemente innerhalb der eingebrachten Veränderung (MEYER, 1995) oder überspannt die Grenze zwischen Wildtyp-DNA und insertierter DNA am Integrationsort (ZIMMERMANN et al., 2000). Für ein allgemeines Screening auf GVO werden in der Regel die gebräuchlichsten transgenen Sequenzen wie z.B. der 35S-Promoter (CaMV, Cauliflower Mosaic Virus), das Antibiotika-Markergen *nptII* (neomycin-phosphotransferase II) oder der *nos*-Terminator (von *Agrobacterium tumefaciens*) benutzt (VOLLENHOFER et al., 1999).

Durch eine Weiterentwicklung der PCR zur QC-PCR (quantitative competitive PCR, GILLILAND et al., 1990; PIATAK et al., 1993; ZACHAR et al., 1993) wurde es Anfang der 1990er Jahre möglich, den DNA-Gehalt unbekannter Proben zu quantifizieren. Bei der kompetitiven PCR wird eine unbekannte Menge der zu quantifizierenden DNA (sogenannte Ziel-DNA) mit einer als Vergleichsgröße fungierenden Standard-DNA bekannter Konzentration koamplifiziert. Aufgrund des Verhältnisses (Endmenge von Target-DNA + Endmenge von Standard-DNA = 100 %) und durch Kenntnis der eingesetzten Standard-DNA-Menge ist eine relative Bestimmung der Ausgangsmenge der Ziel-DNA möglich. Der Standard sollte idealerweise große Ähnlichkeit mit der Ziel-DNA sowie die gleiche Amplifikations-Effizienz aufweisen (z.B. gleiche DNA, in die aber zur Unterscheidung Insertionen eingefügt werden (HÜBNER, 1999)). Die Konstruktion der Standards kann z.B. nach CELI et al. (1993) oder FÖRSTER (1994) erfolgen.

Quantitative Echtzeit-PCR

Die genaueste Methode zur quantitativen Bestimmung von Transgenanteilen ist derzeit die real-time quantitative PCR (auch quantitative Echtzeit-PCR genannt). Dabei handelt es sich im Prinzip um eine herkömmliche Polymerase-Kettenreaktion, allerdings mit dem entscheidenden Unterschied, daß im Gegensatz zu Endpunkt-

analysen die Zunahme der PCR-Produkte während des gesamten PCR-Laufs kontinuierlich aufgezeichnet wird. Zur Detektion der Amplikonvermehrung wird neben den PCR-Primern eine sequenzspezifische fluorogene Sonde verwendet, die bei jedem Vermehrungszyklus mit den Primern an den Matrizenstrang hybridisiert (HOLLAND et al., 1991; LEE et al., 1993). TaqMan[®] - Sonden beispielsweise sind an ihrem 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert. Der Reporterfarbstoff emittiert nach Anregung mit einem Laser ein Fluoreszenzsignal, das auf Grund der räumlichen Nähe zum Quencherfarbstoff durch einen Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückt wird. In der Extensionsphase jedes PCR-Zyklus wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase in kleine Fragmente zerlegt und von der Matrize entfernt (HOLLAND et al., 1991), wodurch die räumliche Nähe der beiden Farbstoffe aufgehoben wird und die Fluoreszenz emittiert und detektiert werden kann. Da nur exakt bindende Sonden hydrolisiert werden, steigt das Fluoreszenzsignal proportional mit der Produktmenge an (WISEMAN, 2002). Real-time Detektionssysteme bestehen im Prinzip aus einem PCR-Cycler sowie einem optischen Detektionsmodul, über das die mit der Produktzunahme ansteigenden Fluoreszenzwerte online nach jedem Zyklus gemessen werden. Die Auswertung und Quantifizierung erfolgt mittels geeigneter Computersoftware. Die Fluorophore werden – je nach System – mit Halogen-, LED- oder Laserlicht angeregt.

Die Quantifizierung der unbekannt DNA-Menge basiert bei allen Systemen auf der Berechnung eines Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem sogenannten C_T -Wert (= Threshold Cycle). Der C_T -Wert ist derjenige PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt, d.h. wenn die Amplifikationskurve die sogenannte Baseline schneidet und in die exponentielle Phase übergeht. Während der ersten PCR-Zyklen wird nur die Hintergrundfluoreszenz gemessen, da die Reporterfluoreszenz unterhalb der Baseline aufgrund der noch geringen Konzentration der Zielsequenz im Reaktionsgefäß noch nicht detektierbar ist bzw. noch keinen mathematischen Zusammenhang zeigt.

Die Quantifizierung der DNA-Menge beruht nicht auf absoluten Mengen an PCR-Produkt, sondern auf der Kinetik der PCR-Reaktion. Als Richtlinie wird der C_T -Wert verwendet, da die Amplifikation zu diesem Zeitpunkt exponentiell ist und in dieser Phase der PCR-Reaktion noch keine limitierenden Faktoren wie z.B. Primer- oder Nucleotidmangel auftreten. Parallel dazu werden in jedem PCR-Lauf Standards mit

bekannter DNA-Menge amplifiziert. Aus der Intensität der gemessenen Fluoreszenzsignale lässt sich eine Regression ableiten und eine Standardkurve erstellen, anhand derer man aus einem bestimmten C_T -Wert auf eine Templatekonzentration schließen kann. Relativ zu dieser Standardkurve wird die Ausgangskonzentration der unbekannt DNA errechnet.

Ein zukünftiger Ansatz für einen GVO-Nachweis ist die Analyse mittels DNA-Microarrays (sogenannte 'DNA-Chips'), die bislang hauptsächlich zur Untersuchung von Genexpressionsanalysen verwendet werden (SCHENA et al., 1995). Für den Transgen-Nachweis kann DNA mit vielen verschiedenen Transformationsereignissen auf einem Trägermaterial fixiert und anschließend mit der zu untersuchenden unbekannt DNA hybridisiert werden. Dadurch können Proben in high-throughput Analysen gleichzeitig auf verschiedenste Transformationsereignisse getestet werden (BORDONI et al., 2004; RUDI et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Untersuchung der Auskreuzung von transgenem Raps mit Hilfe eines Biotests. Samenproben werden dabei ausgelegt und die Keimlinge mit dem Breitbandherbizid BASTA[®] besprüht. Da nur Träger des *pat*-Gens die Applikation schadlos überstehen, mussten die überlebenden Pflanzen transgen sein. Die Verifizierung der Transgenen erfolgte mittels qualitativer PCR. Der Vorteil des Biotests liegt darin, daß sehr große Mengen Samen getestet werden können. Zum Methodenvergleich wurden ausgewählte Parzellen auch mit quantitativer real-time PCR analysiert.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Bei den für den Feldversuch verwendeten Rapssorten handelt es sich um die Winterraps-Sorte 'Falcon' und die isogene Transformationslinie 'Falcon GS40/90'. Die Linie 'Falcon GS40/90' ist Träger des *pat*-Gens (Phosphinothricin-Acetyl-Transferase), das der Pflanze Resistenz gegenüber dem Totalherbizid Glufosinat-Ammonium (Handelsname BASTA[®] oder Liberty[®], Bayer CropScience) mit dem Wirkstoff L-Phosphinothricin verleiht (s. 1.2.1). Das *pat*-Gen ist mit jeweils einer Kopie an zwei unabhängigen Genorten integriert. Die eingeführte Nucleotidsequenz wurde aus der Aminosäuresequenz des PAT-Enzyms abgeleitet, das vom Bodenbakterium *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 gebildet wird (WOHLLEBEN et al., 1988). Zusätzlich zum *pat*-Gen enthalten die transgenen Pflanzen den 35S-Promotor und - Terminator des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV).

Das Saatgut wurde vom Saatzuchtunternehmen NPZ (Norddeutsche Pflanzenzucht, D-Holtsee) zur Verfügung gestellt.

Die Ansaat der Rübsenparzellen erfolgte mit der Sommerrübsen-Sorte 'Nokonova' sowie der Winterrübsen-Sorte 'Buko' (beide KWS Saat AG, D-Einbeck).

Auf den Getreideparzellen wurden die Winterweizen-Sorten Hybnos (Saaten-Union, D-Isernhagen) und Magnus (Saatzucht Engelen Büchling e.K., D-Büchling) sowie die Wintergersten-Sorten Franziska (Secobra Recherches S.A., D-Lemgo) und Tafeno (Lochow-Petkus GmbH, D-Bergen) gesät.

2.1.2 Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Die Hersteller und Spezifikationen aller benutzten Chemikalien und Agenzien sind in folgender Auflistung zusammengestellt:

Tabelle 5: Chemikalien und Agenzien

Chemikalie/Agens	Spezifikation	Hersteller
10x PCR Puffer		Applied Biosystems USA-Foster City
Agarose	NEO Ultra-Qualität	Roth, D-Karlsruhe
BASTA [®]	200g/l Glufosinate-Ammonium	Bayer CropScience, D-Langenfeld
Borsäure	p.a.	Merck, D-Darmstadt
Chloroform	p.a.	J.T. Baker, USA-Deventer
DNA-Beladungspuffer		Fermentas, D- St.Leon-Rot
dNTPs		Peqlab, D-Erlangen
EDTA	p.a.	Fluka, CH-Buchs
Eisessig, 100 %		J.T. Baker, USA-Deventer
EtBr-Lösung, 1 %ig	reinst	Roth, D-Karlsruhe
Ethanol absolut 100 %	p.a.	J.T. Baker, USA-Deventer
Gibberellinsäure		Merck, D-Darmstadt
HCl	p.a.	J.T. Baker, USA-Deventer
Isoamylalkohol	p.a.	J.T. Baker, USA-Deventer
Kaliumnitrat (KNO ₃)	p.a.	Merck, D-Darmstadt
NaAc-Trihydrat	p.a., kristallin	Roth, D-Karlsruhe
NaOH	p.a.	VWR-International, D-Darmstadt
Saccharose	p.a.	Roth, D-Karlsruhe
SDS	2x kristallin	Serva, D-Heidelberg
Tris	kristallin	Riedel-de Haën, D-Seelze
Wasser	reinst	Eppendorf, D-Hamburg

2.1.3 Enzyme und Kits

Tabelle 6: Enzyme

Enzym	Hersteller
Taq DNA-Polymerase	Qiagen, D-Hilden
AmpliTaq Gold	PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNAse A	Qiagen, Hilden

Tabelle 7: Kits

Kit	Hersteller
NucleoSpin 96 Plant [®]	Macherey-Nagel, D-Düren
2x TaqMan Mastermix [®]	PE Applied Biosystems, USA-Foster City
PicoGreen [®] dsDNA Quantitation Reagent	Molecular Probes, USA-Eugene

2.1.4 Basislösungen

Chloroform/Isoamylalkohol

Chloroform und Isoamylalkohol wurden im Verhältnis 24:1 gemischt.

3 M NaAc (pH 5,2)

Nach Lösen von NaAc in bidest. Wasser wurde mit Eisessig ein pH-Wert von 5,2 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

5 M NaCl

Die entsprechende Menge NaCl wurde in bidest. Wasser gelöst und autoklaviert.

10 N NaOH

Die entsprechende Menge NaOH wurde in bidest. Wasser unter Kühlung aufgelöst.

28% PEG 8000 (w/v)

Die entsprechende Menge PEG wurde unter Rühren in 5 M NaCl gelöst.

3,0 x SDS

Die Menge für 3 % (w/v) SDS wurde in 700 mM NaAc (pH 5,2) und 20 mM EDTA (pH 8,0) gelöst, mit konzentrierter NaOH auf pH 5,5 eingestellt und autoklaviert.

1 M Tris·Cl

Die entsprechende Menge Tris wurde in bidest. Wasser gelöst, mit konzentrierter HCl auf pH-Wert 8,0 eingestellt und autoklaviert.

2.1.5 DNA-Molekulargewichtstandards

Tabelle 8: DNA-Molekulargewichtstandards

Standard	Hersteller
100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, D-St.Leon-Rot
λ DNA / <i>Hind</i> III	MBI Fermentas, D-St.Leon-Rot
1kb DNA Ladder	MBI Fermentas, D-St.Leon-Rot

2.2 Methoden

2.2.1 Feldversuchsdesign

Die Anlage des Feldversuches auf der TUM-Versuchsstation Roggenstein im Landkreis Fürstfeldbruck (Tabelle 9) erfolgte im August 2001. Der Versuch wurde in drei Wiederholungen angelegt (Versuchsplan s. Anhang). Jede Wiederholung bestand aus 30 Rapsparzellen der Größe 6 x 6 m. Der Abstand der einzelnen Parzellen zueinander betrug 1,5 m. Jeweils vier Parzellen wurden mit der transgenen Linie 'Falcon GS40/90' bestellt, allerdings mit einem unterschiedlichen Anteil transgener Pflanzen (zwei Parzellen mit 100 % und jeweils eine Parzelle mit 1 % und 0,1 %). Mit den Verdünnungsstufen sollte die ungewollte Ausbringung von verunreinigtem Saatgut mit unterschiedlichen Transgenanteilen simuliert werden.

Jede der Transgenparzellen war von acht nicht-transgenen Rapsparzellen der Sorte 'Falcon' umgeben. In diesen Nachbarparzellen wurde das Ausmaß und die Verteilung der Auskreuzungsereignisse durch transgenen Pollen untersucht. Im zweiten und dritten Versuchsjahr wurde insgesamt jeweils nur noch eine 100 % transgene Parzelle angebaut.

Um den Einfluss der Faktoren Fruchtfolge und Stilllegung auf die Persistenz transgener Rapspflanzen unter landwirtschaftlichen Praxisbedingungen zu ermitteln, befanden sich in jeder Wiederholung zudem als jährlich rotierende Fruchtfolgeglieder Winterweizen, Wintergerste sowie eine ortsübliche Stilllegung mit einem Phacelia-Klee-Gemisch.

Zur Ermittlung der Auskreuzungsraten auf den Rapsverwandten Rübsen (*Brassica rapa* L.) wurden neben 100 % transgenen Parzellen in der Hauptwindrichtung zusätzliche Parzellen mit Sommerrübsen angelegt. Zur Erhöhung der Wahrscheinlichkeit einer zeitgleichen Blüte mit dem Raps wurde der Sommerrübsen bereits Anfang März gesät. Zusätzlich wurden im Gewächshaus Rübsen in Töpfen angezogen. Blühende Pflanzen wurden während der Rapsblüte unmittelbar neben den 100 % transgenen Rapsparzellen aufgestellt. Im zweiten und dritten Versuchsjahr wurde jeweils die Hälfte der Rübsenfläche mit Sommerrübsen und Winterrübsen bestellt.

Tabelle 9: Standortbeschreibung des Versuchsfeldes

Bodenart	sL4
Bodenpunkte	56
Ackerzahl	52
Koordinaten	48°11.00 N, 11°19.50 E
Höhe	516 m
Bodenprofil:	
0-25 cm	humoser-schwach humoser sandiger Lehm
25-35 cm	sehr schwach humoser feinsandiger Lehm
35-55 cm	schwach verdichteter feinsandiger Lehm
> 55 cm	sandiger Kies

2.2.2 Ermittlung des Pollenflugs

Zur Untersuchung der Pollenausbreitung wurden während der Rapsblüte in der Hauptwindrichtung vier stationäre Pollenfallen in den Abständen 0 m, 50 m, 100 m und 150 m vom Rand des Versuchsfeldes aufgestellt. Die Pollenfallen waren mit Vaseline-betricbenen Objektträgern bestückt, die zur Ermittlung der Höhenverteilung der Pollen jeweils in 1 m, 2 m, 3 m und 4 m Höhe angebracht waren. Die Objektträger wurden während der gesamten Blühphase täglich ausgewechselt. Die Zahl der Pollen/cm² wurde durch Auszählen einer Fläche von 1 cm² unter einem Lichtmikroskop ermittelt. Die Windrichtung und -stärke wurde durchgehend mit einem Windmesser (Modell 1482, Lambrecht GmbH, Göttingen) im Versuchsfeld aufgezeichnet. Temperatur und Niederschlag wurden von der Wetterstation der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) in Roggenstein erfasst.

Im zweiten und dritten Versuchsjahr wurde die Meßdistanz in der Hauptwindrichtung um zusätzliche

Pollenfallen in 200 m und 250 m Entfernung vom Versuchsfeld erweitert. In der entgegengesetzten Richtung wurden zusätzliche Fallen in 0 m und 50 m Entfernung vom Versuchsfeld aufgestellt. Weitere Entfernungen waren auf Grund der Geländebeschaffenheit nicht möglich.

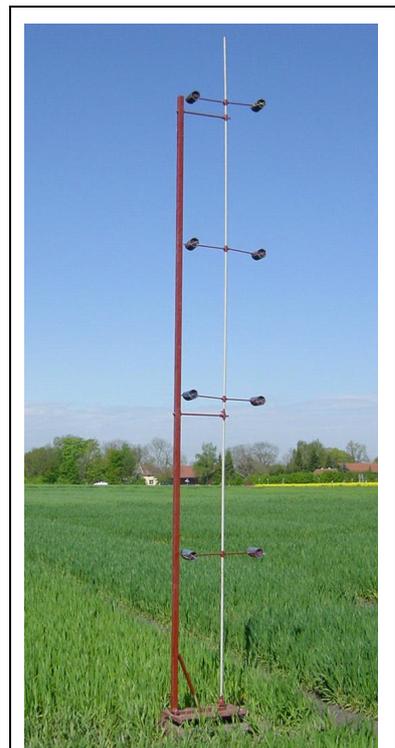


Abbildung 4:
Stationäre Pollenfalle

2.2.3 Ermittlung der Auskreuzung in Raps und Rüben

Biotest

Zur Ermittlung der Auskreuzungsraten in benachbarte nicht-transgene Rapsparzellen wurde in allen drei Versuchsjahren nach Abreife des Rapsbestandes ein Netz mit einem Raster von 25 Punkten, die jeweils einen Meter Abstand zueinander hatten, über alle die transgenen Parzellen umgebenden nicht-transgenen Parzellen gelegt. An jedem dieser Punkte wurden Stichproben mit einem Umfang von jeweils 20 Rapsschoten gezogen.

Der Transgenanteil der Samen wurde mit Hilfe eines Biotests ermittelt (CHEVRE, 2000; REBOUD, 2003). Nach Ermittlung der Keimfähigkeit wurden pro Stichprobe 315 Samen abgezählt (Contador E, Pfeuffer, D-Kitzingen) und in Keimschalen mit einem Substratgemisch aus Torf und Kompost im S1-Gewächshaus zur Keimung gebracht. Der Stichprobenumfang wurde so gewählt, daß pro Meßpunkt ein Transgenanteil von 0,33% bestimmbar war (= ein transgener Keimling von 300 aufgegangenen nicht-transgenen Keimlingen). Nach dem Ausbilden der ersten Laubblätter wurden die Keimlinge mit einer 1%-igen Lösung des Breitbandherbizids BASTA® besprüht. Zehn Tage nach der Behandlung war eine Selektion auf Herbizidresistenz möglich. Zur Überprüfung und Quantifizierung Falsch-positiver, d.h. überlebender Rapskeimlinge, die das *pat*-Gen nicht besaßen, wurden alle überlebenden Keimlinge mittels qualitativer PCR nachanalysiert.

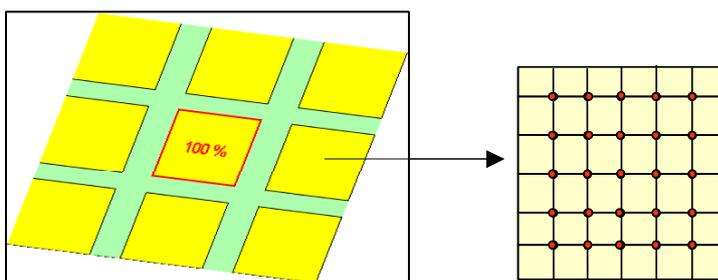


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Stichprobennahme in Rapsparzellen

Die Entnahme der Stichproben erfolgte an den roten Punkten des Rasters. Entfernung der Punkte zueinander: 1 m

Aus den Rübenparzellen des Versuchsfeldes wurden randomisiert per Hand Schoten entnommen. Die Samen wurden wie oben beschrieben mit dem Biotest auf Einkreuzung des Transgens untersucht. Mit den zusätzlich aufgestellten Rüben-Topfpflanzen wurde entsprechend verfahren.

Probenahme für die quantitative PCR

Die Transgenparzellen des dritten Versuchsjahres sowie die sie umgebenden Parzellen wurden zusätzlich zum Biotest zu Vergleichszwecken auch mittels quantitativer PCR auf die Auskreuzungsraten untersucht. Dazu erfolgte nach der Ernte der jeweils acht umgebenden Parzellen mit dem Parzellenmährescher eine randomisierte Stichprobennahme von verschiedenen Stellen im Erntegut. Die transgenen Parzellen wurden jeweils einzeln mit dem Mährescher geerntet und auf die gleiche Weise beprobt. Aus jeder Mischprobe wurden zweimal 10.000 Samen abgezählt und DNA isoliert.

2.2.4 Probenahme Ausfallraps in Folgekulturen und auf dem Brachstreifen

Zur Ermittlung der Persistenz von Rapsamen in Form von Ausfallraps wurde jährlich eine Bestandsaufnahme aller gefundenen Rapspflanzen durchgeführt.

Im Frühjahr wurden die Folgekulturen des Rapses (Winterweizen bzw. Wintergerste im dritten Versuchsjahr) auf Ausfallraps untersucht. Vorausgegangen war eine konventionelle Herbizidbehandlung der Getreideparzellen (Tabelle 10). Alle gefundenen Einzelpflanzen wurden mittels qualitativer PCR auf das *pat*-Gen untersucht.

Das Versuchsfeld war von einem 6 m breiten Brachstreifen umgeben, der bis auf ein einmaliges Mulchen vor der Rapsernte während der gesamten Vegetationszeit unbelassen blieb. Im Frühjahr wurde jeweils eine Bestandsaufnahme aller dort gefundenen Rapspflanzen durchgeführt. Von Blattproben jeder Einzelpflanze (ca. 0,5 cm²) wurde DNA isoliert und mittels qualitativer PCR auf das *pat*-Gen untersucht.

2.2.5 Ermittlung der Auskreuzung auf kreuzungskompatible Wildarten

Auf dem Brachstreifen wurden im Frühjahr randomisiert Blattproben (ca. 0,5 cm²) von Hirtentäschel (*Capsella bursa-pastoris* L. Medik.) entnommen. Weiterhin erfolgte die Untersuchung aller fünf gefundenen Hederich-Pflanzen (*Raphanus raphanistrum* L.). Zur Feststellung einer möglichen Auskreuzung wurde aus jeder Einzelpflanze DNA isoliert und mittels qualitativer PCR auf das *pat*-Gen untersucht.

2.2.6 Ermittlung des Sameneintrags bei der Ernte

Zur Ermittlung des Potentials des Sameneintrags während der Ernte wurden in den 1 % und 0,1 % transgenen Parzellen Auffangschalen der Größe 55,5 cm x 35,5 cm (0,197 m²) in die Fahrspur des Parzellenmähdreschers gestellt. Die Samen wurden anschließend abgezählt (Contador E, Pfeuffer) und zu jeweils 1.000 Samen in Keimschalen im Gewächshaus ausgesät. Für Aussagen über die Veränderung des Transgenanteils (Rückgang oder Zunahme) durch Auskreuzung innerhalb der Parzellen wurde mit den aufgefangenen Samen analog zur Überprüfung der Auskreuzung in den umliegenden Parzellen der Biotest durchgeführt (s. 2.2.3).

2.2.7 Entnahme und Untersuchung von Bodenproben

Zur Untersuchung des Bodens auf verbliebene und noch keimfähige Rapssamen (= Samenbank) wurden aus den transgenen Rapsparzellen Bodenproben entnommen. Die erste Beprobung wurde zur Ermittlung des Ist-Zustands im Boden im Jahr 2001 noch vor der ersten Rapssaat durchgeführt. Der Bohrstock hatte einen Innendurchmesser von 7,5 cm bzw. eine Fläche von 44,2 cm². Je Versuchsparzelle wurden fünf Bohrkern mit einer Beprobungstiefe von 30 cm entnommen. Die Bodenproben wurden anschließend mit einer Kombination aus Sieben der Maschenweiten 4 mm, 2 mm und 1 mm (Retsch, D-Haan) ausgewaschen, wobei die Rapssamen im kleinsten Sieb zurück blieben.

Zur Brechung der Keimruhe wurden die Samen zunächst für 6 Wochen bei 4 °C und Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden sie in Petrischalen auf doppel-

Lösung zur Keimstimulierung

KNO ₃	2000 ppm
Gibberellinsäure	2500 ppm
H ₂ O _{demin.}	

lagigem Filterpapier (Schleicher & Schuell, D-Daßel) mit einer keimstimulierenden Lösung (GEROWITT, 1998) ausgelegt und in einer Klimakammer bei 22 °C und Dauerbeleuchtung zum Keimen angeregt. Die Samen wurden nach PEKRUN et al. (1997b) als lebensfähig eingestuft, wenn ihre Wurzel eine Länge von mindestens 2 mm erreichte. Samen, die nach zwei Wochen noch nicht gekeimt waren, wurden als dormant eingestuft.

Alle Keimlinge wurden zusätzlich mittels qualitativer PCR auf das *pat*-Gen überprüft.

2.2.8 Test auf Lebensfähigkeit der Samen

Die Lebensfähigkeit der in den Bodenproben gefundenen Rapssamen, die trotz der Behandlung zur Brechung der Keimruhe nicht gekeimt waren, wurde mit Hilfe des Tetrazolium-Tests (= MTT-Test) ermittelt (WHARTON, 1955). Der Test dient dem Nachweis der Stoffwechselaktivität der Mitochondrien und damit der Lebensfähigkeit der Zelle. Beim MTT-Test dringt das gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in die Zelle ein, sein Tetrazoliumring wird durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien aufgespalten und es entsteht das dunkelblaue, alkohollösliche Formazan. Eine Lösung bestehend aus DMSO, Laurylsulfat (SDS) und Essigsäure lysiert anschließend die Zellen und setzt das Formazan frei. Die Intensität der alkoholischen Formazanlösung kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt werden (MOSMANN, 1989; LINDL & BAUER, 1994).

2.2.9 Bodenbearbeitung

Nach der Rapsernte wurde jeweils eine zweimalige nicht-wendende Bodenbearbeitung mit dem Grubber (Bearbeitungstiefe 12 cm) durchgeführt, um möglichst viele Samen zum Auflaufen zu bringen und das Potential der Samenbank möglichst gering zu halten.

2.2.10 Herbizideinsatz in den Fruchtfolgegliedern

In den Fruchtfolgegliedern Winterweizen und Wintergerste erfolgte die Bekämpfung der Begleitvegetation durch die Applikation konventioneller Herbizide mit ortsüblichen Aufwandmengen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Herbizidbehandlungen in den Winterweizen- und -Wintergerstenparzellen

Winterweizen				Wintergerste		
Jahr	Herbizid	Aufwand (l/kg/ha)	Zeitpunkt	Herbizid	Aufwand (l/kg/ha)	Zeitpunkt
2004	Bacara	0,80	Herbst	Bacara	0,80	Herbst
	Hoestar Super	0,12	Frühjahr	Hoestar Super	0,12	Frühjahr
	Wuchsstoff MCPA	1,50	Frühjahr			
2003	Bacara	0,80	Herbst	Stomp	3,0	Herbst
	Hoestar Super	0,12	Frühjahr	Cadou	0,40	Herbst
				Primus	0,10	Frühjahr
2002	Bacara	0,75	Herbst	Bacara	0,80	Herbst
	Primus	0,09	Frühjahr	Primus	0,10	Frühjahr
2001	Bacara	0,75	Herbst	Bacara	0,75	Herbst

2.2.11 Statistische Auswertungen

Alle statistischen Auswertungen wurden mit SPSS 12.0 für Windows durchgeführt. Unter der Annahme einer exponentiellen Abnahme der Auskreuzungen wurde eine Regressionskurve mit SigmaPlot 8.0 für Windows (SPSS, Chicago) berechnet.

Der χ^2 -Test wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(B_i - E_i)^2}{E_i}$$

B = Beobachtete Auskreuzungen in den acht umgebenden nicht-transgenen Parzellen

E = Erwartete Auskreuzungen auf Grund der Windverteilung während der Rapsblüte in den acht umgebenden nicht-transgenen Parzellen

K = Anzahl der Klassen (= Anzahl der umgebenden nicht-transgenen Parzellen)

2.2.12 DNA-Isolierung

DNA-Isolierung aus Blättern

Die DNA-Isolierung aus Blattmaterial von Raps, Rübsen und Hirtentäschel erfolgte mit einem NucleoSpin 96 Plant[®] Kit gemäß den Angaben des Herstellers. Zum Aufschluß der Zellen wurden jeweils ca. 25 mm² grünes Blattmaterial, welches direkt

nach der Probennahme bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurde, in ein 2 mm Reaktionsgefäß (Eppendorf, D-Hamburg) mit zwei Metallkugeln (Durchmesser 3 mm) sowie 400 μl des dem Kit beiliegenden Lysepuffers C1 überführt und 3 min bei 10.000 Hz mit einer Retsch Schwingmühle MM 301 zerkleinert.

DNA-Isolierung aus Rapssamen

Die DNA-Isolierung aus Rapssamen wurde mit einer modifizierten SDS-Methode nach MANIATIS et al. (1989) durchgeführt. Nach Zermahlung des Samenmaterials in einer Messermühle (Grindomix GM 200, Retsch, D-Haan) wurden 0,5 g in einem 50 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml 3,0x SDS und 50 μl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt. Nach 60 min Inkubation bei 60°C unter leichtem Schütteln wurden die Proben einer zweimaligen Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (24:1) mit jeweils 30 min in einem Überkopfschüttler unterzogen.

Die Phasentrennung erfolge durch Zentrifugation bei RT und 2100 g. Anschließend wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurde die wässrige Phase bei RT mit 1 Volumen Isopropanol versetzt, invertiert und

3x SDS-Puffer	
3,0% (w/v)	SDS
700 mM	NaAc (pH 5,2)
20 mM	EDTA (pH 8,0)
mit NaOH auf	pH 5,0

20 min bei 2100 g zentrifugiert. Nach Abziehen des Alkohols und Lufttrocknung des DNA-Präzipitats wurde die getrocknete DNA in 500 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ gelöst. Zum RNA-Verdau wurden 20 μl RNase A (10 mg/ml) zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine PEG-Fällung durch Zugabe von 1300 μl 28 %iger PEG-Lösung und Inkubation über Nacht. Nach abschließender Zentrifugation für 40 min bei 4°C und 2100 g wurde der Überstand abgezogen. Die DNA wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, nach zwei Waschschritten mit 1 ml Ethanol (75 %) und 10 min Zentrifugieren luftgetrocknet und bis zur gewünschten Konzentration in 10 mM Tris·Cl -Puffer rückgelöst.

DNA-Isolierung aus Pollen

Zur Analyse der Pollen, die mit den Objektträger-Fallen gesammelt wurden, wurden alle Pollen samt Vaselinebeschichtung abgekratzt und in den Puffer C1 des NucleoSpin 96 Plant[®] Kit überführt. Die Lagerung erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Der Aufschluß der Pollen erfolgte mit Ultraschall für 6 min und 35 % Amplitude (Sonifier W-250 D, Branson, Ultraschall- und Labortechnik, G. Heinemann, D-Schwäbisch Gmünd). Die

DNA-Isolierung wurde anschließend mit einzelnen 'mini spin columns' des NucleoSpin 96 Plant[®] Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Rücklösung der DNA erfolgte in 50 µl CE-Puffer des Kits.

2.2.13 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten zur Größenbestimmung und Qualitätsabschätzung erfolgte durch Agarosegelelektrophorese (AUSUBEL et al., 1999) in 1 x TAE-Puffer bei einer Spannung von 5 V pro cm Elektrodenabstand. Die DNA wurde in 1 x DNA-Beladungspuffer auf das Gel aufgetragen und mittels UV_{254 nm}-Licht induzierter Fluoreszenz von Ethidiumbromid (0,5 µg/ml EtBr in der Gellösung) sichtbar gemacht und mit einer Videodokumentationsanlage (Herolab E.A.S.Y RH, D-Wiesloch) erfasst.

1 x TAE-Puffer
40 mM Tris-Acetat
1 mM EDTA
pH 8,0

2.2.14 DNA-Quantifizierung

Die exakte Konzentrationsbestimmung der genomischen DNA für die quantitative PCR erfolgte mit dem PicoGreen[®] dsDNA Quantitation Kit nach Herstellerangaben. Die DNA wurde zunächst mit einem 0,8 % Agarosegel geschätzt und anschließend für die für die PicoGreen[®] Messung auf eine Konzentration von ca. 10 ng/µl verdünnt. Zur Ergebnisabsicherung wurden die DNA-Konzentrationen in zwei unabhängigen Doppelmessungen bestimmt. Als Kalibrationsstandard für die Quantifizierung diente eine Verdünnungsreihe ungeschnittener Lambda-DNA. Zur Messung und Auswertung der Fluoreszenzsignale wurde der Storm[™] FluorImager und die Software ImageQuant 5.0 (beides Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) benutzt.

2.2.15 Qualitative PCR

Alle DNA-Amplifikationen mittels Polymerase Chain Reaktion (PCR; MULLIS & FALOONA, 1987) wurden auf einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler (Applied Biosystems, (Applied Biosystems, USA-Foster City) sowie einem PTC-200 (MJ Research, Bio-Rad Laboratories, D-München) durchgeführt. Die Reaktionen fanden in 20 µl Reaktionsvolumen statt. Zur Kontrolle auf Kontaminationen wurde bei allen

PCR-Reaktionen eine Wasserprobe und beim GVO-Nachweis zusätzlich eine Positivkontrolle mit entsprechender genomischer DNA mitgeführt.

<u>Reaktionsansatz</u>	<u>PCR-Parameter</u>	
10 ng genomische DNA	95 °C 10 min 1 Zyklus	
0,5 U Taq DNA Polymerase	} 34 Zyklen	
0,2 µM Primer_for		95 °C 30 s
0,2 µM Primer_rev		60 °C 1 min
200 µM dNTPs		72 °C 2 min
1 x PCR Puffer		
ad 20 µl	72 °C 10 min 1 Zyklus	

2.2.16 Oligonukleotide

Die Auftragssynthese für die PCR Oligonukleotide (Primer) wurde von Applied Biosystems durchgeführt. Tabelle 11 zeigt die Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer, die Amplikonlänge, die Zielsequenz sowie deren Herkunft (EMBL).

Tabelle 11: Oligonukleotide

Qualitativer Transgennachweis		
Zielsequenz	Sequenz (5'-3')	Amplikon
S-glucosyl-transferase EMBL A62529	gluco-f CAAAGACGATAAAGGCTACGGC	614 bp
	gluco-r TAATGCTCCGATCAGAGCTTCC	
Phosphinothricin-acetyltransferase EMBL A99126	35S_pat-f CACAATCCCACTATCCTTCGC	127 bp
	35S_pat-r TGCTGTAGCTGGCCTAATCTCA	
Quantitativer Transgennachweis		
Zielsequenz	Sequenz (5'-3')	Amplikon
S-glucosyl-transferase EMBL A62529	s_gt-TM-f GTCCAGTTCGCTAAACGCCTAGT	71 bp
	s_gt-TM-r GAGGCGGTGTAGGTGGTGG	
	s_gt-TM-p CCAAAGGCGTCAAAGTCACAATCGC (Sonde)	
35S-Promotor/ Phosphinothricin-acetyltransferase EMBL A18053, A99126	pat-TM-f TAGCTGGCCTAATCTCAACTGGTC	87 bp
	pat-TM-r ATTTCAATTTGGAGAGGACAGGGTAC	
	pat-TM-p CCTCTCCGGAGACATGTCGACTCTAGAGGAT (Sonde)	

Die qualitativen PCR-Reaktionen wurden mit den Thermocyclern Perkin Elmer 9600 (Applied Biosystems) und PTC-200 (MJ Research) durchgeführt, für die quantitative

PCR kam der TaqMan® (ABI Prism® Sequence Detection System 7700, Applied Biosystems) zum Einsatz.

Für den quantitativen PCR-Assay wurden die Oligonukleotidsequenzen nach BLOCK (2004) verwendet. Die Oligonukleotide für den qualitativen PCR-Nachweis des transgenen Rapses wurden nach BLOCK (2004) unter Zuhilfenahme der Sequenzdatenbank EMBL ('European Molecular Biology Laboratory') abgeleitet (Tabelle 11). Die Zielsequenz für den Transgen-Nachweis war das synthetische Phosphinothricinacetyltransferase-Gen (EMBL A99126). Die Amplikonlänge beträgt 127 bp.

Als Referenzgen wurde die Sequenz des 'house-keeping' Gens S-Glucosyltransferase (EMBL A62529), das für die Synthese von Glucosinolat verantwortlich und spezifisch für Pflanzen der Gattung *Brassica* ist, verwendet. Die PCR-Fragmente haben eine Länge von 614 bp.

2.2.17 Quantitative real-time PCR

Die quantitativen PCR-Reaktionen wurden auf einem ABI Prism® 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Der PCR-Ansatz enthielt einen 1x TaqMan® Universal PCR Master Mix mit je 300 nmol Oligonukleotide, 200 nmol Sonde, jeweils 400 µM von dATP, dCTP, dGTP, 800 µM dUTP, 0,2 U UNG (AmpErase Uracil N-glycosylase) und 1 U AmpliTaq Gold DNA Polymerase in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Die Kalibrationsstandards und die DNA-Proben wurden im selben PCR-Lauf analysiert, wobei die '*gluco*'- und '*pat*'-Sequenzen in verschiedenen Reaktionsgefäßen amplifiziert wurden.

<u>Reaktionsansatz</u>	<u>Cycler-Parameter</u>	
75-225 ng genomische DNA	50 °C 2 min	} 1 Zyklus
0,3 µM Primer_for	95 °C 10 min	
0,3 µM Primer_rev	95 °C 15 s	} 45 Zyklen
0,2 µM Sonde	60 °C 1 min	
1 x TaqMan®PCR-Master Mix		
ad 25 µl		

Das 3'-Ende der TaqMan®-Sonden waren mit dem Quencherfarbstoff 6-tetramethylrhodamine (TAMRA) markiert. Die '*pat*'- und '*gluco*'-spezifischen Sonden waren an ihren 5'-Enden mit den fluoreszenten Reporterfarbstoffen FAM bzw. VIC markiert.

Herstellung der Kalibrierstandards

Zur Herstellung der Kalibrierstandards wurde genomische DNA der transgenen Linie 'Falcon GS40/90' über fünf Verdünnungsstufen kontinuierlich im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt. Die erste Stufe der Verdünnungsreihe wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Picogreen® auf 90 ng/µl eingestellt.

Quantifizierung der Transgenanteile

Die Bestimmung der Transgenanteile der unbekanntenen Samenmischproben wurde über eine exakte Quantifizierung berechnet. Im Gegensatz zur relativen Quantifizierung wird dabei die genaue Kopienzahl des *pat*-Gens berechnet.

Voraussetzung für eine absolute Quantifizierung sind DNA-Kalibrierstandards mit bekannter Genkopienzahl, die durch stufenweise DNA-Verdünnung den gesamten möglichen Arbeitsbereich abdecken. Zur Berechnung der Kopienzahlen wurden Regressionsgleichungen erstellt, indem die C_T -Werte der Standardreihen gegen den Logarithmus ihrer errechneten Kopienzahlen aufgetragen wurden. Die Berechnung der Kopienzahlen erfolgte über die Menge der eingesetzten genomischen Raps-DNA und der Masse von 1,225 pg pro haploidem Rapsgenomäquivalent (ARUMUGANATHAN und EARLE, 1999). Bei Berechnung der Kopienzahlen wurde berücksichtigt, daß bei der Rapsorte 'Falcon GS40/90' eine Doppelinsertion des Transgenkonstrukts pro haploidem Genom vorliegt.

Die Kopienzahl des endogenen Referenzgens '*gluco*' sowie des *pat*-Gens in den unbekanntenen Proben wurde durch Einsetzen ihrer C_T -Werte in die Gleichung der Kalibrationskurve der Standards ermittelt. Der Anteil der transgenen DNA an der Gesamt-DNA ergibt sich aus der Berechnung des Quotienten aus Transgen-Kopienzahl zu Referenzgen-Kopienzahl. Die Messung sowohl der Standardreihen als auch der DNA-Proben erfolgte jeweils in Dreifachwiederholungen.

Zur Überprüfung der resultierenden C_T -Werte wurde ein zweiseitiger Dixon Ausreißertest nach DIN 53804-1 (DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG, 2002) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,1$ durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Auskreuzung in nicht-transgenen Nachbarparzellen

Zur Ermittlung der Auskreuzung in benachbarte Parzellen wurden in jeder nicht-transgenen Rapsparzelle an 25 definierten Punkten Stichproben mit einem Umfang von je 20 Rapsschoten gezogen.

Im ersten Versuchsjahr enthielt jede Wiederholung neben einer Parzelle mit einem Transgenanteil von 0,1 % und 1 % insgesamt zwei 100 % transgene Parzellen. Aus der Anlage des Versuchs ergab sich, daß einige der nicht-transgenen Parzellen sowohl an Parzellen mit einem Transgenanteil von 100 % als auch mit 0,1 % und 1 % angrenzten. Der Einfluß der 100 % transgenen Parzellen war dabei so groß, daß es zu offensichtlichen Verfälschungen in den benachbarten Parzellen kam und die Ergebnisse daher nicht herangezogen werden konnten. Deshalb wurde in den darauf folgenden beiden Versuchsjahren jeweils nur in einer Wiederholung eine 100 % transgene Parzelle angebaut. Als Folge war im zweiten und dritten Versuchsjahr ein deutlicher Rückgang der Auskreuzungsraten aus den 0,1 % und 1 % transgenen Parzellen festzustellen.

Für jede transgene Parzelle wurde die durchschnittliche Auskreuzung in die acht umgebenden nicht-transgenen Parzellen berechnet, indem pro Meßpunkt 315 Samen ausgesät und im 2-Blatt-Stadium mit dem Totalherbizid BASTA besprüht wurden. Nach 10 Tagen war eine Selektion auf Herbizidresistenz möglich. Die Aussaatmenge wurde unter Berücksichtigung der Keimfähigkeit der Samen so gewählt, daß 300 Samen pro Meßpunkt aufgingen. Ein transgener Same pro Meßpunkt bedeutet somit eine Auskreuzungsrate von 0,33 %. Zur Quantifizierung überlebender Rapskeimlinge, die das *pat*-Gen nicht besaßen (Falsch-positive), wurden diese mittels qualitativer PCR nachanalysiert. Diese zusätzliche Überprüfung der phänotypischen Selektion ergab, daß im Durchschnitt 12,8 % aller überlebenden Pflanzen falsch-positiv waren, in Einzelfällen sogar bis zu 35 %.

Die durchschnittlichen Auskreuzungsraten aus den 100 % transgenen Rapsparzellen in die umliegenden nicht-transgenen Rapsparzellen des Feldversuchs waren relativ konstant und in allen drei Versuchsjahren gut reproduzierbar. Bei nur leichten Schwankungen bewegten sie sich in einem Bereich von 0,25 % bis 0,31 %. Der aktuelle Schwellenwert von 0,9 % wurde in keinem einzigen Fall überschritten. Die

Auskreuzungsraten aus den Parzellen mit einem Transgenanteil von 1 % und 0,1 % unterlagen stärkeren Schwankungen und waren deutlich niedriger (Tabelle 12).

Tabelle 12: Zusammenfassung der Auskreuzungsraten aus transgenen Rapsparzellen

Transgen-anteil	2001/2002		2002/2003		2003/2004	
	durchschnittl. Auskreuzung Einzelparzellen	durchschnittl. Auskreuzung	durchschnittl. Auskreuzung Einzelparzellen	durchschnittl. Auskreuzung	durchschnittl. Auskreuzung Einzelparzellen	durchschnittl. Auskreuzung
0,1 %	—	—	0,005 %	0,0065 %	0,0017%	0,00083%
	—		0,008 %		0,0000%	
1 %	—	—	0,002 %	0,01 %	—	—
	—		0,018 %		—	
100 %	0,29 %	0,29 %	0,25 %	0,25 %	0,31 %	0,31 %
	0,29 %		—		—	

Die Werte entsprechen jeweils dem Mittelwert der acht umgebenden nicht-transgenen Parzellen

In Tabelle 13 ist detailliert nach Jahren und Transgenanteil in den Auskreuzungsparzellen aufgeschlüsselt, wie häufig alle festgestellten Auskreuzungsraten an den einzelnen Meßpunkten in den umgebenden nicht-transgenen Parzellen vorkamen.

Tabelle 13: Detaillierte Auskreuzungsraten aus transgenen Rapsparzellen

Transgen-anteil und Erntejahr	Wiederholungen	durchschnittl. Auskreuzungsrate (%)	X _{min}	X _{max}	einzelne Auskreuzungsraten (%)	beobachtete Auskreuzungen	Anteil (%)
100 % (2001/2002)	2	0,29	0,0	5,0	> 5,0	1	0,30
					> 1,0	21	5,30
					> 0,7	20	5,00
					≥ 0,3	116	29,00
					< 0,3	242	60,50
100 % (2002/2003)	1	0,25	0,0	3,0	3,0	1	0,50
					> 1,0	8	4,00
					> 0,7	10	5,00
					≥ 0,3	54	27,00
					< 0,3	127	63,50
100 % (2003/2004)	1	0,31	0,0	4,0	4,0	2	1,00
					> 1,0	9	4,50
					> 0,7	9	4,50
					≥ 0,3	58	29,00
					< 0,3	121	60,50
1 % (2002/2003)	2	0,01	0,0	0,7	0,7	1	0,25
					≥ 0,3	10	2,50
					< 0,3	389	97,25
0,1 % (2002/2003)	2	0,0065	0,0	1,0	> 1,0	1	0,25
					> 0,7	1	0,25
					≥ 0,3	3	0,75
					< 0,3	395	98,75
0,1 % (2003/2004)	2	0,00083	0,0	0,3	> 0,3	0	0,00
					≥ 0,3	1	0,25
					< 0,3	399	99,75

< 0,3 % bedeutet kein einziges Ereignis, da ein Ereignis 0,33 % entspricht

Zur Verdeutlichung ist die Verteilung der einzelnen Befruchtungserfolge durch transgenen Pollen in den Nachbarparzellen in (Abbildung 6) dargestellt. Die graphische Darstellung der Auskreuzungsereignisse gibt Hinweise darauf, daß die Verteilung zufällig und ungerichtet war.

Bei Betrachtung der Verteilung der Auskreuzungsereignisse ist zunächst kein Auskreuzungsgradient bezüglich der Entfernung zu den transgenen Parzellen erkennbar. Wäre die Auskreuzung alleine vom Wind abhängig, müßte die Verteilung der Auskreuzungsereignisse der Windverteilung entsprechen. Während der gesamten Blühdauer des Rapses wurde die Windverteilung mit einem Windmesser aufgezeichnet. Auf der Grundlage der prozentualen Verteilung des Windes in den verschiedenen Himmelsrichtungen während der Rapsblüte wurde mit Hilfe des χ^2 -Tests überprüft, ob die beobachteten mit den durch die Windverteilung erwarteten Auskreuzungsraten in den Nachbarparzellen übereinstimmen. Aus dem Verhältnis der in jeder Windrichtung (d.h. in den acht umgebenden nicht-transgenen Parzellen) beobachteten und der auf Grund der Windverteilung zu erwartenden Verteilung der Auskreuzungsergebnisse wurde der χ^2 -Wert abgeleitet. Wenn der errechnete χ^2 -Wert den tabellierten Wert $\chi^2_{7;0,05} = 14,07$ überstieg, konnte auf dem 0,95 %-Niveau kein statistisch gesicherter Zusammenhang zwischen der erwarteten und der beobachteten Auskreuzungsrate festgestellt werden. In diesem Fall müssen andere Faktoren die Auskreuzung wesentlich beeinflußt haben. In allen drei Versuchsjahren und allen Wiederholungen ließ sich kein statistisch gesicherter Zusammenhang nachweisen (Tabelle 14 und Tabelle 15).

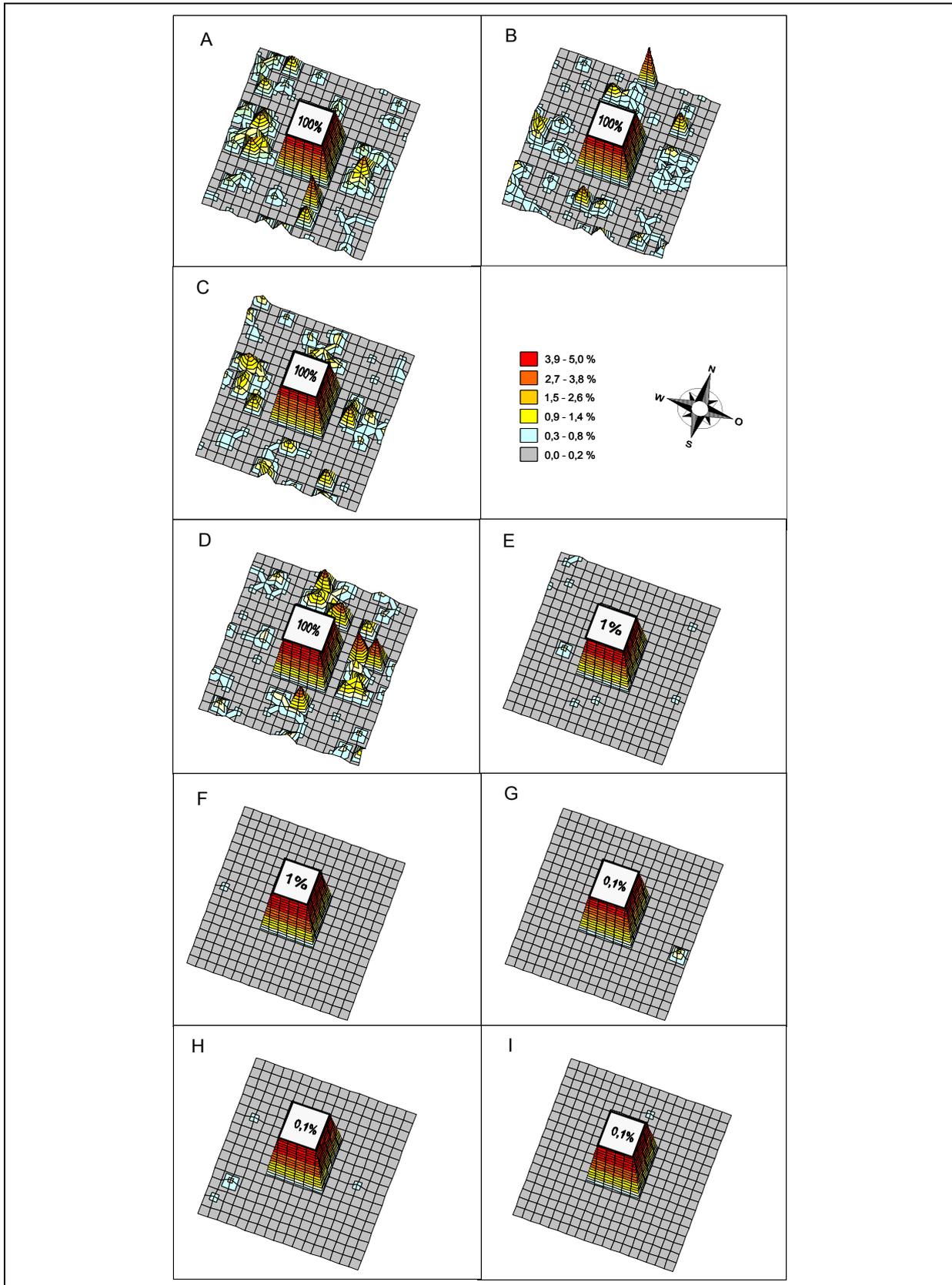


Abbildung 6: Verteilung der Auskreuzungsereignisse um die transgenen Parzellen

(A, B) Umgebung der 100 % transgenen Parzellen 2002; (C) Umgebung der 100 % transgenen Parzelle 2003; (D) Umgebung der 100 % transgenen Parzelle 2004; (E, F) Umgebung der 1 % transgenen Parzellen 2003; (G, H) Umgebung der 0,1 % transgenen Parzellen 2003; (I) Umgebung der 0,1 % transgenen Parzelle 2004

Tabelle 14: χ^2 -Test zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen Wind- und Auskreuzungsverteilung (2002)

		Auskreuzungsereignisse 2002					
		Transgenanteil 100 % (Wdh.1)			Transgenanteil 100 % (Wdh. 2)		
Wind- richtung	Windanteil (%)	n_b	n_e	χ^2	n_b	n_e	χ^2
NW	2,2	23	3,8		5	3,7	
N	2,3	7	4,1		34	4,0	
NO	7,9	7	14,0		13	13,6	
O	36,8	37	64,9		24	63,0	
SO	24,1	9	42,5	305,4	14	41,3	317,1
S	8,7	31	15,3		27	14,8	
SW	11,4	10	20,1		23	19,5	
W	6,5	52	11,4		31	11,1	
Summe	100	176	176		171	171	

n = Anzahl Auskreuzungsereignisse, b = beobachtet, e = erwartet, Wdh. = Wiederholung

Tabelle 15: χ^2 -Test zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen Wind- und Auskreuzungsverteilung (2003 und 2004)

		Auskreuzungsereignisse					
		Transgenanteil 100 % (2003)			Transgenanteil 100 % (2004)		
Wind- richtung	Windanteil (%)	n_b	n_e	χ^2	n_b	n_e	χ^2
NW	6,2	12	9,3		10	11,7	
N	5,6	19	8,4		51	4,3	
NO	26,4	6	39,4		11	24,9	
O	24,9	27	37,1		60	40,4	
SO	16,6	12	24,8	311,6	11	38,6	549,3
S	2,7	30	4,0		26	30,6	
SW	11,3	6	16,8		10	26,6	
W	6,2	37	9,3		10	11,9	
Summe	100	149	149		189	189	

n = Anzahl Auskreuzungsereignisse, b = beobachtet, e = erwartet

Der χ^2 -Test wurde nur mit den Auskreuzungsraten aus den 100 % transgenen Parzellen durchgeführt, da die Anzahl der Auskreuzungsereignisse aus den 1 % und 0,1 % transgenen Parzellen für einen χ^2 -Test nicht ausreichend waren.

Zum Vergleich wurde zusätzlich eine Korrelationsanalyse mit den Auskreuzungsraten aus den vier 100 % transgenen Parzellen und der Windverteilung durchgeführt (Tabelle 16). Auch hier konnte kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden.

Tabelle 16: Korrelation zwischen Auskreuzung und Windverteilung

Parzelle	Korrelationskoeffizient r	Signifikanz (2-seitig)
100% 2002 (Wdh. 1)	0,159	0,706
100% 2002 (Wdh. 2)	-0,029	0,945
100% 2003	-0,365	0,374
100% 2004	0,093	0,827

Der Gesamtdurchschnitt der Auskreuzungshäufigkeiten aller vier 100 % transgenen Parzellen wurde – unabhängig von der Himmelsrichtung - in Abhängigkeit von der Entfernung gebracht. Mit zunehmender Entfernung nahm die Auskreuzung schnell ab, wobei die höchsten Standardabweichungen in einer Entfernung von 3 und 4 m festgestellt wurden. Unter der Annahme einer exponentiellen Abnahme der Auskreuzungen wurde eine Regressionskurve berechnet. Die Parameter der Gleichung sind in Abbildung 7 dargestellt.

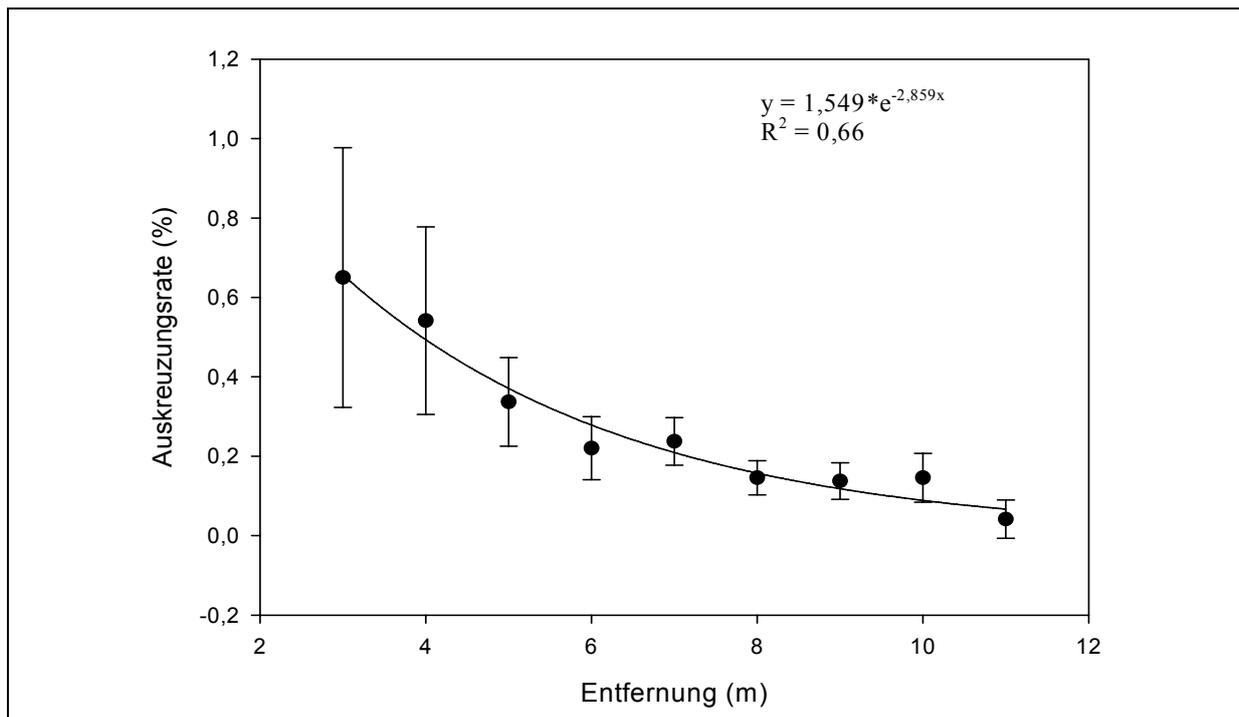


Abbildung 7: Durchschnittliche Auskreuzungsfrequenzen als Funktion der Distanz von den 100 % transgenen Parzellen

Die Regressionskurve beschreibt den Zusammenhang zwischen Auskreuzungsfrequenz und Entfernung, unabhängig von der Himmelsrichtung. Die Standardabweichung ist durch Balken dargestellt.

Varianzanalyse

Die einzelnen Auskreuzungswerte aller vier 100 % transgenen Rapsparzellen aus den drei Versuchsjahren wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse auf Unterschiede hinsichtlich der Gleichheit der Mittelwerte untersucht. Die einzelnen Parzellen unterscheiden sich demnach bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ nicht signifikant voneinander (Tabelle 17). Der Levene-Test bestätigte zusätzlich die Homogenität der Varianzen (Signifikanz 0,190).

Tabelle 17: Varianztabelle der Auskreuzungsraten aus den 100% transgenen Parzellen

	QS	df	MQ	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	6,184	3	2,061	,763	,515
Innerhalb der Gruppen	2149,905	796	2,701		
Gesamt	2156,089	799			

QS = Summe der Abweichungsquadrate; MQ = Mittlere Quadratsumme (= QS/df), df = Freiheitsgrade; F = F-Wert

3.2 Vergleich der Auskreuzungsraten mit Biotest und quantitativer PCR

Im dritten Versuchsjahr wurden die mit Hilfe des Biotests ermittelten Auskreuzungsraten mit den Ergebnissen einer quantitativen real-time PCR Analyse verglichen. Die Quantifizierung des Transgenanteils in den Stichproben aus dem Erntegut ausgewählter transgener Parzellen und benachbarter nicht-transgener Parzellen erfolgte mit Hilfe einer Regressionsgerade unter Einsatz von DNA-Standards mit bekannter DNA-Konzentration. Die Amplifikation der Standard-Verdünnungsreihe war über fünf Verdünnungsstufen linear und resultierte in einer hoch signifikanten Korrelation von $R^2 = 0,99$ % zwischen den C_T -Werten und der DNA-Konzentration.

Bezüglich der Höhe der festgestellten Auskreuzungsraten gab es Unterschiede zwischen den Ergebnissen des Biotests und der quantitativen PCR (Tabelle 18).

Für die 100 % transgene Parzelle lag die mit dem TaqMan[®] ermittelte Auskreuzungsrate in Höhe von 0,5655 % etwas über der des Biotests (0,3135 %). In den umgebenden Parzellen einer der beiden 0,1 % transgenen Parzellen wurde mit 0,0404 % ebenfalls ein höherer Wert ermittelt als mit dem Biotest (0,0017 %), wenngleich sich die Auskreuzungsraten in beiden Fällen auf einem sehr niedrigen Niveau befanden.

Das Ergebnis des Biotests bedeutet ein einzelnes festgestelltes Auskreuzungsereignis in den acht umgebenden Parzellen. Das Resultat der quantitativen PCR entspräche 24 Auskreuzungsereignissen beim Biotest.

Zusätzlich zu den benachbarten Parzellen wurde Erntegut, das direkt aus den beiden Parzellen mit 0,1 % Transgenanteil stammte, mittels quantitativer PCR untersucht. Dies ergab eine Zunahme des Transgenanteils auf 0,28 % und 0,32 %.

Tabelle 18: Vergleich der mit Biotest und quantitativer PCR ermittelten Auskreuzungsraten

Transgenanteil Parzelle (%)	Auskreuzung Biotest (%)	Auskreuzung TaqMan® (%)
100	0,3135	0,5655
0,1 (Wdh. 1)	0,0017	0,0404
0,1 (Wdh. 2)	0,0000	0,0001

Die mit dem TaqMan® ermittelten Auskreuzungsraten repräsentieren den Mittelwert von jeweils zwei Stichproben

3.3 Pollenverbreitung

Rapspollen besitzen ein großes Potential zur Wind- und Insektenverbreitung und können auch in größeren Distanzen noch zu einer Befruchtung führen. Die genauen Anteile von Wind und Insekten an der Bestäubung sind jedoch bisher noch ungenügend bestimmbar bzw. vorhersagbar. Weil eine ungewollte Ausbreitung transgener Pollen bezüglich der Einhaltung von Schwellenwerten problematisch sein kann, wird derzeit über die Einhaltung von Mindestabständen beim Anbau transgener Pflanzen diskutiert. Durch die Aufstellung von Pollenfallen sollte das Ausbreitungsverhalten von Pollen, d.h. die Veränderung der Pollenzahlen mit zunehmender Entfernung und unterschiedlicher Höhe, sowie der Einfluß von Windrichtung und -stärke, Temperatur und Niederschlägen untersucht werden. Durch einen Vergleich mit der tatsächlich stattfindenden Auskreuzung sollte versucht werden, abzuschätzen, welche biologischen und physikalischen Prozesse die entscheidenden Parameter für die Auskreuzung sind und durch welche Maßnahmen eine Auskreuzung transgener Eigenschaften möglichst gering gehalten werden kann.

3.3.1 Pollenverteilung in der Entfernung

Neben dem Versuchsfeld wurden in Abständen von jeweils 50 m in der Hauptwindrichtung (Osten) Pollenfallen bis in einer Entfernung von 250 m aufgestellt. In der zweithäufigsten Windrichtung (Westen) wurden Fallen in 0 m und 50 m aufgestellt. Weitere Entfernungen waren auf Grund der örtlichen Gegebenheiten nicht möglich. Die Objektträger der Pollenfallen wurden während der gesamten Blühzeit des Rapses täglich ausgewechselt. Die Ermittlung der Pollenzahlen an den einzelnen Tagen erfolgte durch Auszählen unter dem Mikroskop.

Die Untersuchung der Pollenverbreitung über die Distanz lieferte in allen drei Versuchsjahren vergleichbare Ergebnisse. Der Rückgang der Pollenzahlen mit zunehmender Distanz folgte immer dem gleichen Trend. Die höchsten Pollenzahlen (über 53-60 % aller gezählten Pollen) wiesen diejenigen Pollenfallen auf, die direkt am Feldrand aufgestellt waren (Abbildung 8). Der stärkste Rückgang der Pollenzahlen war innerhalb von 50 m Entfernung vom Feldrand zu verzeichnen. Innerhalb dieser Distanz befanden sich über 70 % aller gefangenen Pollen. Bis zu einer Entfernung von 150 m war ein weiterer Rückgang der Pollenmenge zu verzeichnen, im weiteren Verlauf bis 250 m blieb die Pollenmenge dann auf einem relativ konstanten Niveau in Höhe von rund 4% (Tabelle 19).

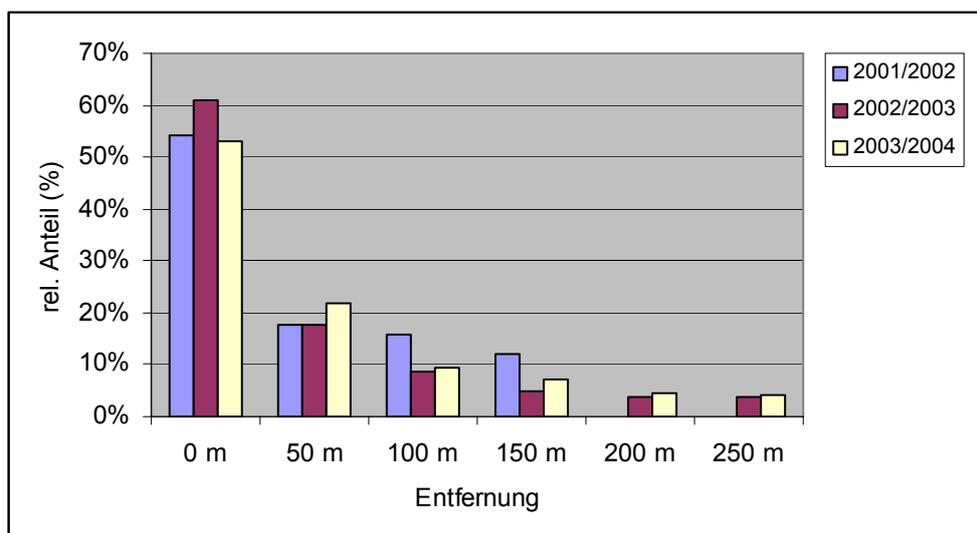


Abbildung 8: Pollenverteilung in unterschiedlichen Entfernungen

Die Pollenzahlen bzw. ihr relativer Anteil während der gesamten Blühdauer des Rapses wurden über alle drei Versuchsjahre in der Hauptwindrichtung mit zunehmender Entfernung zum Versuchsfeld aufsummiert.

2002 wurde die Pollenzahl in 200 m und 250 m nicht ermittelt.

Über die Pollenverbreitung in westlicher Richtung können auf Grund der sich aus der Geländebeschaffenheit ergebenden Beschränkungen in der Anzahl der aufgestellten Fallen und den untersuchten Distanzen nur begrenzte Aussagen getroffen werden. Dennoch zeichnet sich aus der Verteilung der gesammelten Pollen in 0 m und 50 m Entfernung zum Feld auch hier ab, daß der Großteil der Pollen (66 - 86%) direkt am Feldrand zu Boden sinkt (Tabelle 19). Der Rückgang der Pollenzahlen befindet sich demnach in der gleichen Größenordnung wie in östlicher Richtung.

Tabelle 19: Prozentuale Verteilung der Pollen in verschiedenen Entfernungen

		Pollenanteil (%)					
Richtung	Jahr	0 m	50 m	100 m	150 m	200 m	250 m
Osten	2001/2002	54,4	17,8	15,9	12,0	—	—
	2002/2003	61,0	17,7	8,8	5,0	3,9	3,6
	2003/2004	53,1	21,8	9,6	7,0	4,4	4,2
Westen	2001/2002	—	—	—	—	—	—
	2002/2003	66,0	34,0	—	—	—	—
	2003/2004	86,0	14,0	—	—	—	—

Die Pollenzahlen wurden über den gesamten Messzeitraum und alle Fallenhöhen aufsummiert. 2001/2002 wurde die Pollenverteilung nur in östlicher Richtung und in den Entfernungen 0 – 150 m ermittelt

Trotz der Jahrgangsunterschiede in der Blühdauer konnte intensiver Pollenflug jeweils nur an wenigen Tagen festgestellt werden, innerhalb derer über 86% der gesamten Pollen gezählt wurden (Tabelle 20). Intensiver Pollenflug wurde ab einer Pollenzahl von 1.000 gewertet.

Tabelle 20: Pollenfreisetzung während der Rapsblüte

Jahr	2002	2003	2004
Dauer der Blüte (Tage)	20	14	27
Intensiver Pollenflug (Tage)	6	4	5
Anteil am Pollenflug (%)	87	87	86

Die Anzahl der ermittelten Pollenzahlen (aufsummiert über alle Fallen in der Hauptwindrichtung in einer Distanz von 0 – 250 m) unterlagen an den einzelnen Tagen beträchtlichen Schwankungen in Höhe von 0 bis 3.049 (Tabelle 21).

Tabelle 21: Durchschnittliche Pollenzahl/cm² in den Pollenfallen

Jahr	Pollenzahl/cm ²				
	Summe	Durchschnitt	x _{min}	x _{max}	SD
2002	26.985	80,5	0	3.094	262,9
2003	16.956	71,6	0	1.538	184,3
2004	36.369	52,3	0	3.033	227,5

Die Anzahl Pollen/cm² in den Pollenfallen wurde an den einzelnen Meßtagen in der Hauptwindrichtung für die Distanzen 0 m bis 250 m aufsummiert
 x = Anzahl Pollen/m²; SD = Standardabweichung

Die Unterschiede in der Gesamtsumme der Pollen resultieren u.a. aus der unterschiedlichen Dauer der Rapsblüte in den einzelnen Jahren sowie den unterschiedlichen Wetterverhältnissen, die den Pollenflug begünstigen oder erschweren können.

3.3.2 Pollenverteilung in der Höhe

Zur Erfassung von Unterschieden in der Höhenverteilung der Pollen waren auf jeder Falle vier Objektträger in verschiedenen Höhen angebracht (1 m, 2 m, 3 m und 4 m). Die Anteile der Pollen in den Höhenstufen unterschieden sich in verschiedenen Entfernungen deutlich und waren unregelmäßig verteilt. Die Höhenverteilung in den einzelnen Entfernungen unterschied sich ebenfalls in allen drei Versuchsjahren (Abbildung 9 und Tabelle 22).

Tendenziell läßt sich ableiten, daß auf den Fallen in einer Entfernung bis 50 m die Pollen zunächst vor allem auf den unteren Objektträgern verteilt waren. Mit zunehmender Entfernung stieg der relative Anteil der Pollen in den höheren Objektträgern an. Die Ursache dafür ist vermutlich in Verwirbelungen und Thermik zu suchen.

Die unregelmäßige Pollenverteilung in der Höhe ist ein Hinweis darauf, daß, obwohl die meisten schnell zu Boden sinken, Pollen durch Luftverwirbelungen in höhere Luftschichten verfrachtet werden, wodurch die Überwindung größerer Entfernungen ermöglicht wird.

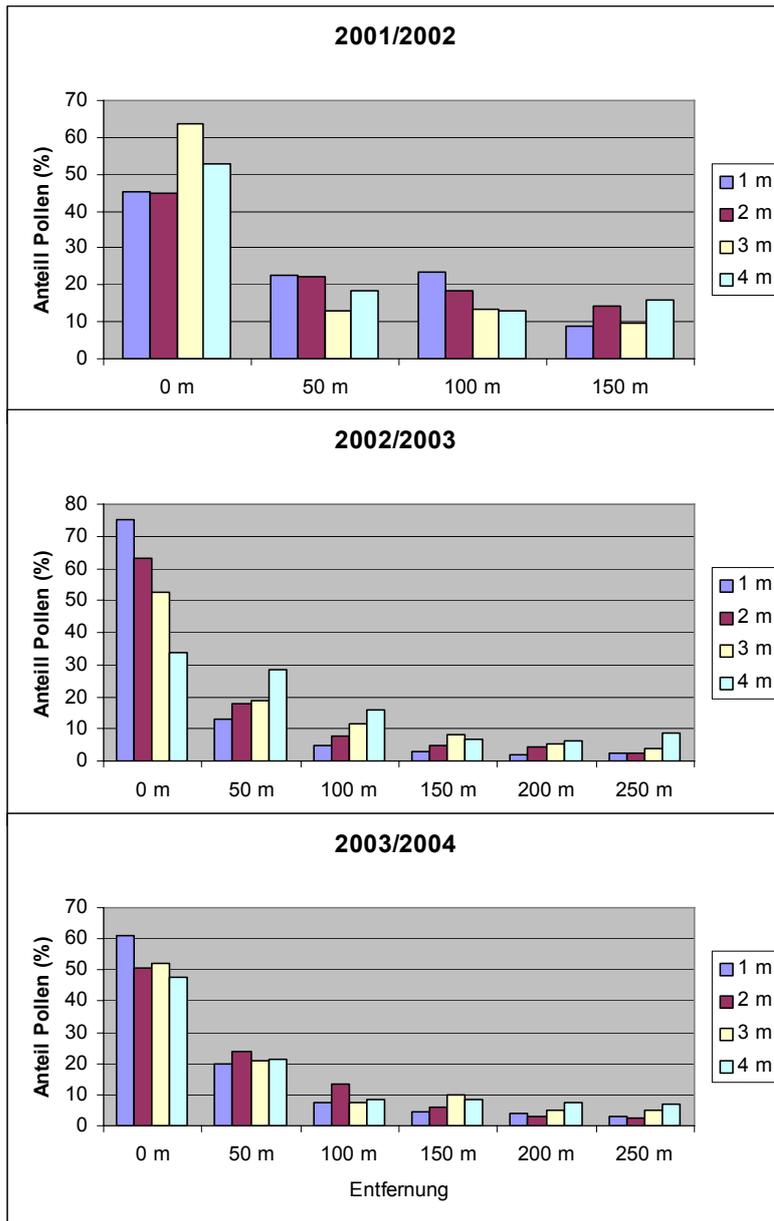


Abbildung 9: Pollenverteilung in der Höhe
 Die während der gesamten Blühdauer des Rapses in der Hauptwindrichtung in unterschiedlichen Höhen ermittelten Pollenzahlen wurden über alle Entfernungen aufsummiert.

Tabelle 22: Prozentuale Verteilung der Pollen in verschiedenen Fallenhöhen

Jahr	Pollenanteil (%)			
	1 m	2 m	3 m	4 m
2002	15,4	20,2	39,1	25,3
2003	38,9	24,8	20,0	16,3
2004	25,0	32,3	22,8	19,8

Die Pollenzahlen wurden über den gesamten Messzeitraum und alle Fallentfernungen in der Hauptwindrichtung aufsummiert. 2002 wurden die Pollenzahlen nur bis in einer Entfernung bis 150 m ermittelt

3.3.3 Einflußfaktoren auf die Pollenverbreitung

Zur Ermittlung der Faktoren, die einen Einfluß auf die Pollenverbreitung haben, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt.

Tabelle 23: Korrelationsanalyse aller untersuchten Einflußparameter auf den Pollenflug

		Pollen- zahl	Datum	Höhe	Distanz	Wind- richtung	Windge- schwindig- keit	Tempe- ratur	Nieder- schlag	Jahr	
Pollenzahl	r	1	-,048	-,013	-,216(**)	,111(**)	,267(**)	-,043	-,059(*)	-,048	
	α		,078	,640	,000	,000	,000	,114	,029	,078	
Datum	r		1	-,001	,229(**)	-,202(**)	,281(**)	-,292(**)	-,149(**)	1,000(**)	
	α			,978	,000	,000	,000	,000	,000	,000	
Höhe	r			1	,001	,001	,001	,002	-,001	-,001	
	α				,957	,958	,975	,953	,977	,978	
Entfernung	r				1	-,028	,078(**)	-,013	-,045	,230(**)	
	α					,295	,004	,635	,100	,000	
Windrich- tung	r					1	,390(**)	-,137(**)	,053(*)	-,194(**)	
	α						,000	,000	,049	,000	
Windge- schwindigk.	r						1	-,220(**)	-,113(**)	,289(**)	
	α							,000	,000	,000	
Temperatur	r							1	,032	-,292(**)	
	α								,244	,000	
Nieder- schlag	r								1	-,153(**)	
	α									,000	
Jahr	r									1	
	α										
N											1359

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant
 * Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant

Für die Berechnung wurden die Werte aller drei Versuchsjahre herangezogen.
 r = Korrelationskoeffizient; α = Irrtumswahrscheinlichkeit; N = Gesamtzahl

Über alle drei Versuchsjahre hinweg konnten bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,01$ signifikante Korrelationen zwischen der Pollenzahl und den Faktoren Fallendistanz, Windrichtung und -geschwindigkeit nachgewiesen werden; bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen Pollenzahl und Niederschlag (Tabelle 23). Für die Pollenzahl und die Faktoren Fallenhöhe und Temperatur konnte dagegen keine Korrelation festgestellt werden.

Die Anteile der Faktoren Fallendistanz und -höhe an der Gesamtvarianz (partielles ϵ^2) der Pollenzahl wurden unter Berücksichtigung der Kovariaten Temperatur, Windrichtung, -stärke und Niederschlag mit Hilfe einer mehrfaktoriellen Varianzanalyse geschätzt (Tabelle 24). Für die Fallendistanz wurde ein signifikanter Anteil von 8,1 % ermittelt, während für die Fallenhöhe kein Einfluß auf die Varianz der

Pollenzahl abzusichern war. Die Wechselwirkung Fallenhöhe und Fallendistanz war ebenfalls nicht signifikant.

Tabelle 24: Varianztabelle der Pollenzahlen und der untersuchten Parameter

Faktor	QS	df	MQ	F	Signifikanz	Partielles ϵ^2
Modell	14881029,185	28	531465,328	12,421	,000	,207
Niederschlag	87003,366	1	87003,366	2,033	,154	,002
Temperatur	19410,896	1	19410,896	,454	,501	,000
Windgeschwindigkeit	4207389,093	1	4207389,093	98,331	,000	,069
Windrichtung	2,791	1	2,791	,000	,994	,000
Fallendistanz	4995294,604	5	999058,921	23,349	,000	,081
Fallenhöhe	38613,701	3	12871,234	,301	,825	,001
Fallenhöhe * Fallendistanz	214739,143	15	14315,943	,335	,992	,004
Fehler	56950605,815	1331	42787,833			
Gesamt	71831635,000	1359				

QS = Summe der Abweichungsquadrate; MQ = Mittlere Quadratsumme (= QS/df), df = Freiheitsgrade; F = F-Wert

3.3.4 Auskreuzung auf verwandte Arten

Die Möglichkeit des Auskreuzens transgener Eigenschaften auf verwandte Wild- oder Kulturpflanzen ist ein wesentlicher Aspekt bei der Risikobewertung transgener Pflanzen. Eine wichtige Fragestellung dabei ist, ob die Übertragung des Transgens den transgenen Hybriden einen Selektionsvorteil verschafft, der sie durch unkontrollierte Ausbreitung in der Umwelt persistenter und schwerer zu bekämpfen macht und evtl. zur Verdrängung anderer Populationen führt. Diese Fragestellung ist gerade bei Raps interessant, da er mit einer Reihe von Kultur- und Wildpflanzen kreuzungskompatibel ist.

Auskreuzung in Rübsen

Zur Feststellung der Auskreuzung transgener Rapspflanzen auf kreuzungskompatible Kulturpflanzen wurden in der Hauptwindrichtung in jeder Wiederholung Rübsenparzellen angelegt (s. Versuchsplan).

Im Gegensatz zum ersten Versuchsjahr befanden sich die Rübsenparzellen im zweiten und dritten Versuchsjahr jedoch nicht mehr direkt neben 100 % transgenen Rapsparzellen, da diese wie bereits beschrieben entfernt worden waren. Jeweils eine Hälfte aller Rübsenparzellen wurde im zweiten und dritten Versuchsjahr zusätzlich im Oktober mit Winterrübsen (Sorte 'Buko') bestellt. Trotz der sehr frühen Ansaat der Rübsenparzellen bereits in der ersten Märzhälfte setzte beim Sommerrübsen die Blüte erst während der letzten Tage der Rapsblüte ein (Abbildung 10). Trotz der nur

geringen Überschneidung der beiden Blühfenster kam es zu einer Auskreuzung des transgenen Konstrukts in den Rübsenbestand. Die Blühzeitpunkte von Raps und Winterrübsen waren dagegen in beiden Versuchsjahren nahezu identisch.



Abbildung 10: Sommerrübsen bei Blühbeginn des Rapses

Zusätzlich wurden während der Rapsblüte neben den 100 % transgenen Rapsparzellen im Gewächshaus angezogene blühende Rübsen in Töpfen aufgestellt und nach Ende der Rapsblüte zur Abreife wieder ins Gewächshaus überführt. Die randomisiert beprobten Samen wurden im Gewächshaus angesät und via Biotest auf Einkreuzung des transgenen Konstrukts geprüft. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die potentiell transgenen Hybriden mittels qualitativer PCR getestet.

Tabelle 25: Auskreuzung in Sommer- und Winterrübsen

	getestete Samen			transgene Hybriden			Auskreuzung (%)		
	2002	2003	2004	2002	2003	2004	2002	2003	2004
Sommerrübsen	21.364	19.000	18.000	40	0	0	0,19	0,00	0,00
Winterrübsen	—	22.000	18.000	—	0	0	—	0,00	0,00
Topfpflanzen	32.000	4179	908	43	286	39	0,13	6,84	4,30

Nach der Reduzierung Transgenparzellen im zweiten und dritten Versuchsjahr befand sich keine transgene Parzelle mehr in unmittelbarer Nähe der Rübsenparzellen, in denen daraufhin keine Auskreuzung mehr festgestellt werden konnte.

Die transgenen Raps-Rübsen-Hybriden wurden im Gewächshaus großgezogen. Die einzelnen Pflanzen unterschieden sich sehr stark in ihrem Habitus. Zur Überprüfung ihrer Fertilität wurden die Hybriden eingetütet und geselbstet. Dabei zeigten sie im Vergleich zu den beiden Ausgangsspezies einen sehr uneinheitlichen und stark reduzierten bis fehlenden Schoten- und Kornansatz in Höhe von durchschnittlich 140-154 Samen/Pflanze, wohingegen Raps ca. 2.000 Samen/Pflanze produziert (AIGNER et al., 1998).

Tabelle 26: Samenansatz transgener Raps-Rübsen-Hybriden (2002)

Herkunft	Anzahl Pflanzen	Mittelwert Samen/Pflanze	x_{\min}	x_{\max}	SD
Parzellen	43	154	0	1606	372,1
Topfpflanzen	40	140	0	478	121,9

x_{\min} = kleinster Wert, x_{\max} = höchster Wert, SD = Standardabweichung

Auskreuzung auf kreuzungskompatible *Brassica*-Wildarten

Die Bestandsaufnahmen der mit Raps kreuzungskompatiblen *Brassica*-Arten in dem das Versuchsfeld umgebenden Brachstreifen ergaben neben einzelnen Pflanzen von Hederich (*Raphanus raphanistrum* L.) nur große Populationen von Hirtentäschel (*Capsella bursa pastoris* L.). Von allen 5 gefundenen Hederich-Pflanzen wurden Blattproben genommen und mittels PCR auf Einkreuzung des *pat*-Gens untersucht. Alle Pflanzen erwiesen sich dabei als nicht-transgen.

Die Analyse aller 125 randomisiert gezogenen und auf das *pat*-Gen untersuchten Hirtentäschel-Proben zeigte, daß es ebenfalls zu keiner Hybridisierung mit transgenem Raps gekommen war.

3.4 Persistenz im Boden

Im Anschluß an die Ernte erfolgte zur Reduzierung der Samenbank im Boden eine zweimalige Bodenbearbeitung mit dem Grubber, wodurch ein Großteil der sich im Boden befindlichen Samen zum Auflaufen gebracht wurde. Nach der anschließenden Saatbettvorbereitung und Aussaat der Folgekultur wurden pro vorausgegangener Transgenparzelle 5 Bodenproben gezogen. Die Beprobung wurde in allen Versuchsjahren zum gleichen Zeitpunkt wiederholt, um aus der Anzahl gefundener Samen im Boden im Vergleich zum Eintrag auf die Abnahme der Samenbank zu schließen. Die Beprobung der Versuchsfläche vor der erstmaligen Ansaat des Versuches hatte ergeben, daß sich im Boden keine Samen mehr aus früherem Rapsanbau befanden. Der letzte Rapsanbau auf der Versuchsfläche lag bei Versuchsbeginn mindestens 20 Jahre zurück.

3.4.1 Sameneintrag in den Boden

Vor dem Ziehen der Bodenproben wurde die Anzahl der Rapssamen ermittelt, die während des Dreschvorgangs auf den Boden fiel. Dies entspricht dem Eintrag in die Samenbank. Während der Ernte wurden in jeder transgenen Parzelle unter dem Mähdrescher Schalen aufgestellt, in denen die Samen aus aufplatzenden Schoten aufgefangen wurden. Die Eintragsmenge variierte sowohl innerhalb der einzelnen Versuchsjahre als auch zwischen den einzelnen Parzellen und reichte von 5.827 bis 21.949 Samen/m². Im ersten und dritten Versuchsjahr bewegte sich der Eintrag bei rund 10000 Samen/m², während der Mittelwert im zweiten Versuchsjahr mit 14.000 Samen/m² deutlich höher lag (Tabelle 27). Für die enorme Steigerung des Eintrags könnte die extreme Trockenheit 2003 während der gesamten Vegetationsperiode des Rapses verantwortlich sein. Die Samen, die bereits vor der Ernte, z.B. durch Aufplatzen der Schoten, auf den Boden gefallen waren, konnten nicht berücksichtigt werden.

Tabelle 27: Rapssameneintrag in den Boden während der Ernte

Transgenanteil Parzelle (%)	Eintrag in den Boden (Samen/m ²)		
	2001/2002	2002/2003	2003/2004
0,1	6.873	11.817	6.998
0,1	8.990	13.766	6.562
0,1	15.071	12.492	—
1,0	6.467	6.812	—
1,0	7.365	11.147	—
1,0	15.345	21.949	—
100	5.827	21.036	15.817
100	8.381	—	—
100	8.838	—	—
100	10.751	—	—
100	12.162	—	—
100	12.198	—	—
Durchschnitt	9.856	14.146	9.792

Nach der Ernte wurde zur Reduzierung der Samen im Boden eine zweimalige flache Bodenbearbeitung mit dem Grubber durchgeführt. Durch die anschließende Saattbettbereitung und Aussaat der Folgefrucht Winterweizen bzw. Wintergerste im dritten Jahr wurde ebenfalls noch ein Teil der Samen zum Auflaufen angeregt.

3.4.2 Auflaufrapr nach Ernte

Zur Ermittlung der Auflaufraten und der sich daraus ableitenden Entwicklung der Samenbank wurde nach der Ernte im dritten Versuchsjahr zunächst keine Bodenbearbeitung durchgeführt. Ca. drei Wochen nach der Ernte wurde die Anzahl der aufgelaufenen Keimlinge/m² durch Auszählen repräsentativer Stichproben mit einem Göttinger Schätzrahmen sowohl innerhalb von zwei Transgenparzellen (Transgenanteil 100 % und 0,1 %) als auch in jeweils vier umliegenden Parzellen in jeder Himmelsrichtungen ermittelt (Tabelle 28). Anschließend wurden die ausgezählten Flächen (0,1 m²) mit einer 1 %-igen BASTA[®]-Lösung besprüht. Nach einer Woche wurde der Transgenanteil in der behandelten Fläche durch Auszählen der überlebenden Pflanzen ermittelt.

Zwei Wochen nach Durchführung einer flachen Bodenbearbeitung mit dem Grubber wurde erneut die Anzahl der aufgelaufenen Rapsplänzchen auf den gleichen Parzellen ermittelt. Anschließend wurden die ausgezählten Flächen wieder mit BASTA[®] besprüht und die Anzahl der überlebenden Pflanzen ermittelt.

In der 100 % transgenen Parzelle waren durchschnittlich 5040 Pflanzen/m² aufgelaufen. Die BASTA[®]-Behandlung überlebten jedoch nur 290 Pflanzen/m² bzw. 5,8 %. In den vier umliegenden Parzellen betrug die durchschnittliche Auflaufrate 7970 Pflanzen/m². Nach der BASTA[®]-Behandlung konnte nur noch 1 Pflanze/m² gefunden werden. In der 0,1 % transgenen Parzelle betrug der Auflauf 8560 Pflanzen/m², die BASTA[®]-Behandlung überlebten durchschnittlich 16 Pflanzen/m². Dies entspricht einem Transgenanteil von 0,187 % und bedeutet, daß sich der Transgenanteil innerhalb der transgenen Parzelle leicht erhöht hat. In den umliegenden Parzellen gingen 7840 Pflanzen/m² auf, die BASTA[®]-Spritzung ergab einen nur marginalen Transgenanteil in Höhe von 0,006 %.

Nach der anschließenden Bodenbearbeitung mit dem Grubber liefen deutlich weniger Rapspflanzen auf als direkt nach der Ernte.

Tabelle 28: Auflaufrapr vor und nach der Bodenbearbeitung

Transgen-Parzelle	Pflanzen/m ²					
	vor Bodenbearbeitung			nach Bodenbearbeitung		
	Auflauf	nach BASTA [®]	Transgenanteil (%)	Auflauf	nach BASTA [®]	Transgenanteil (%)
100 %	5.040	290	5,8	132	106	80,3
Umgebung 100 %	7.970	1	0,0	189	6	2,9
0,1 %	8.560	16	0,2	340	0	0,0
Umgebung 0,1 %	7.840	0,5	0,0	402	0	0,0

3.4.3 Veränderung der Samenbank

Zur Ermittlung der Abnahme der im Boden verbliebenen Samen (Samenbank) wurden die Parzellen des Versuchsjahres 2001/2002 jeweils im Herbst in allen drei Versuchsjahren und die des Versuchsjahres 2002/2003 in zwei Versuchsjahren beprobt (Tabelle 29). Dazu wurden nach dem Auflaufen der Folgekultur Winterweizen (bzw. Wintergerste im dritten Versuchsjahr) Bodenproben gezogen. Der Bohrstock hatte einen Innendurchmesser von 7,5 cm bzw. eine Fläche von 44,2 cm². Je Versuchsparzelle wurden fünf Bohrkern mit einer Beprobungstiefe von 30 cm entnommen. Die gefundenen Samen wurden zur Brechung der Keimruhe stratifiziert und in der Klimakammer zum Keimen gebracht.

Tabelle 29: Ergebnisse der Bodenproben

Versuchs- jahr	Proben- nahme	Parzellen (Transgen- anteil) (%)	Eintrag bei Ernte (Samen/m ²)	gefunden in Bodenproben (Samen/m ²)	gefunden (%)	keimfähige Samen/m ² im Boden	keim- fähig (%)	Abnahme keimfähige Samen (%)
2001/2002	2002	100	9.693	83	0,9	0,0	0,0	100,0
		1	9.726	15	0,2	0,0	0,0	100,0
		0,1	1.0311	60	0,6	30,2	0,3	99,7
2001/2002	2003	100	9.693	23	0,2	22,6	0,2	99,8
		1	9.726	45	0,5	0,0	0,0	100,0
		0,1	10.311	60	0,6	30,2	0,3	99,7
2001/2002	2004	100	9.693	23	0,2	0,0	0,0	100,0
		1	9.726	0	0,0	0,0	0,0	100,0
		0,1	10.311	15	0,1	0,0	0,0	100,0
2002/2003	2003	100	31.064	45	0,1	0,0	0,0	100,0
		1	19.645	30	0,2	30,2	0,2	99,8
		0,1	19.193	15	0,1	15,1	0,1	99,9
2002/2003	2004	100	31.064	0	0,0	0,0	0,0	100,0
		1	19.645	75	0,4	0,0	0,0	100,0
		0,1	19.193	60	0,3	0,0	0,0	100,0

Gegenüberstellung von Sameneintrag bei der Ernte, Größe der im Boden verbliebenen Samenbank sowie des Anteils noch keimfähiger Samen am Gesamteintrag

Aus der Untersuchung der Bodenproben geht hervor, daß im Herbst des gleichen Jahres der Rapserte trotz wiederholter Bodenbearbeitung zur Reduzierung der Samenbank noch ein Potential von bis zu 30 keimfähigen Samen/m² im Boden vorhanden war. In den Rapsparzellen des ersten Versuchsjahres wurde im Folgejahr ebenfalls ein Potential an Samen gleicher Höhe gefunden, wobei es in den 100% transgenen Parzellen sogar zu einer leichten Zunahme im Vergleich zum Vorjahr kam. Daraus ergibt sich bereits im Herbst des gleichen Jahres sowie im ersten Jahr nach dem Rapsanbau eine Abnahme der keimfähigen Samen im Boden von 99,7-

100 % gegenüber dem Eintrag bei der Ernte. Im zweiten Jahr nach der Ernte wurden noch bis zu 23 Samen/m² gefunden, die jedoch alle nicht mehr keimfähig waren. Der Anteil der noch keimfähigen Samen an der Gesamtzahl der gefundenen Samen variierte sowohl innerhalb der Versuchsjahre als auch mit zunehmendem zeitlichen Abstand zum Eintrag. Der Anteil der Samen in der Samenbank im Vergleich zum Eintrag lag in allen untersuchten Parzellen zwischen 0,1 % und 0,9 %. Der Anteil der tatsächlich noch keimfähigen Samen lag mit 0,0 - 0,3 % deutlich darunter. Die Lebensfähigkeit der nicht gekeimten Samen wurde mit Hilfe des Tetrazolium-Tests überprüft. Der Test war in allen Fällen negativ.

3.4.4 Durchwuchsrap in der Folgekultur

Bei der Ernte und beim Transport von transgenem Raps kann es ebenfalls zu Samenverlusten kommen, wodurch im Folgejahr in Form von Ausfall- oder Durchwuchsrap eine Quelle für ungewollten Gentransfer entstehen kann.

Um eine mögliche Zu- oder Abnahme der Transgenanteile festzustellen, wurden die auf den Raps folgenden Kulturen Winterweizen und Wintergerste auf Durchwuchsrap und auf eine Veränderung des Transgenanteils im Vergleich zu den Ausgangsparzellen untersucht. Vorausgegangen waren im Frühjahr und Herbst standortübliche konventionelle Herbizidbehandlungen in den Beständen (s. Tabelle 10). Zwischen den 100 % transgenen Rapsparzellen und den Verdünnungsstufen ergaben sich dabei deutliche Unterschiede.

Tabelle 30: Durchwuchsrap in der Folgekultur Winterweizen in den früheren Transgenparzellen

Anbau-Jahr	Probe-Jahr	Transgenanteil Parzellen (%)	Anzahl Parzellen	Durchwuchsrapspflanzen	Mittelwert	Transgene Pflanzen	Mittelwert Transgene/Parzelle	Transgenanteil (%)
2001/ 2002	2003	100	6	11	1,8	3	0,5	27,3
		1	3	6	2	0	0	0
		0,1	3	7	2,3	0	0	0
2001/ 2002	2004	100	6	0	0	0	0	0
		1	3	0	0	0	0	0
		0,1	3	0	0	0	0	0
2002/ 2003	2004	100	1	0	0	0	0	0
		0,1	2	0	0	0	0	0

In allen drei Wiederholungen mit Winterweizen wurden 2003 insgesamt 125 Rapspflanzen gefunden, 24 davon in den Parzellen, auf denen im Vorjahr transgene Pflanzen gestanden waren. Insgesamt wurden vier transgene Pflanzen gefunden,

drei davon in vormaligen 100 % transgenen Parzellen und eine in einer direkt benachbarten Parzelle. Diese kann entweder von einer transgenen Hybride stammen oder der Samen wurde bei der Ernte bzw. nachfolgender Bodenbearbeitung verschleppt. Bezogen auf insgesamt 11 Rapspflanzen, die auf den sechs 100 % transgenen Parzellen gefunden wurden, entsprechen die drei transgenen einem Anteil von 27,3 %. In den vormals 1 % und 0,1 % transgenen Parzellen wurden keine transgenen Pflanzen gefunden. Auskreuzungen aus diesen Parzellen, die eine Saatgutkontamination mit gentechnisch veränderten Samen simulieren sollten, haben demnach nicht zu einem Aufschaukeln der Transgenanteile in den Folgejahren geführt. Die gesamte Rapsfläche hatte 2003 einen Transgenanteil von 7,4 %. Der Transgenanteil innerhalb des Durchwuchsrapses betrug dagegen nur 3,2 %. 2004 wurden in den Wintergerstenparzellen (d.h. den Rapsparzellen des zwei Jahre zurückliegenden ersten Versuchsjahres) insgesamt nur zwei Rapspflanzen gefunden, die beide nicht transgen waren. Dies stellt einen sehr starken Rückgang im Vergleich zum Vorjahr dar. Die Anzahl der Durchwuchspflanzen in den Winterweizenparzellen 2004 (die Rapsparzellen des zweiten Versuchsjahres) unterschied sich deutlich von der des ersten Versuchsjahres, da insgesamt nur zwei Rapspflanzen gefunden wurden, die nicht transgen waren und auch auf keiner vormals transgenen Parzelle standen (Tabelle 30). Da die gefundenen Rapspflanzen bis zur Ernte des Weizens nicht mehr zur Blüte kamen, hatten sie keinen weiteren Einfluß auf die Ausbreitung der transgenen Eigenschaft in den Folgekulturen. Im Versuchsjahr 2004 wurden in den Fruchtfolgegliedern Weizen und Gerste nach den Unkrautbekämpfungsmaßnahmen jeweils zwei nichttransgene Rapspflanzen gefunden. Auch diese konnten sich bis zur Ernte der Gerste nicht weiter vermehren. Das Auftreten von transgenen Rapspflanzen bei einem erneuten Anbau von nicht-transgenen Raps wurde somit allein durch das restliche Samenpotential im Boden bestimmt.

In der Folgefrucht Winterweizen wurden in den Parzellen, in denen im ersten Versuchsjahr transgener Raps stand, 24 Durchwuchsrapspflanzen gefunden. Dies entspricht einer Durchwuchspflanzendichte von 0,06 Pflanzen/m² und bestätigt die Ergebnisse der Untersuchung der Samenbank, wonach es im Untersuchungszeitraum zu einer nahezu vollständigen Reduzierung der Samenbank gekommen ist.

3.4.5 Ausfallraps auf dem Brachstreifen

Auf dem Brachstreifen wurde jährlich eine Bestandsaufnahme aller Rapspflanzen durchgeführt. Jede Einzelpflanze wurde mittels PCR auf das *pat*-Gen untersucht. Die im ersten Anbaujahr gefundenen Rapspflanzen mußten sich durch Samenverschleppung während oder nach der Saat (z.B. durch die Sämaschine oder Tiere) bzw. bei der Ernte ausgebreitet haben. Im zweiten und dritten Anbaujahr gefundene GVO-Rapspflanzen können dagegen auch auf Auskreuzung im Ausfallraps zurückgehen. Die Ausfallrapspopulation auf dem Brachstreifen nahm im Laufe der drei Versuchsjahre kontinuierlich zu und hat sich von 114 auf 255 Pflanzen mehr als verdoppelt (Tabelle 31). Der große Umfang dieser Ruderalrapspopulation ist ein Zeichen für die Konkurrenzkraft von Raps unter nahezu ungestörten Bedingungen, da auf dem Brachstreifen bis auf ein einmaliges Mulchen kurz vor der Rapsernte keinerlei Bewirtschaftungsmaßnahmen durchgeführt wurden.

Tabelle 31: Ausfallraps und Transgenanteil auf dem Brachstreifen

Jahr	Anzahl Pflanzen	Transgene	Transgenanteil (%)
2002	114	5	4,4
2003	158	1	0,6
2004	255	9	3,5

Anders verhielt es sich mit dem Anteil der transgenen Pflanzen auf dem Brachstreifen: Im zweiten Jahr ging der Anteil um 80% auf eine Pflanze zurück, stieg aber im dritten Jahr wieder stark an, wobei der relative Transgenanteil am Ende des Versuchs geringer war als am Anfang.

3.5 Nachweis transgener Pollen

Die EU-Freisetzung-Richtlinie 2001/18/EG legt besonderes Augenmerk auf die Ermöglichung einer Koexistenz von landwirtschaftlichen Anbausystemen mit und ohne Gentechnik. Da sich Pollen über größere Distanzen ausbreiten und nicht-transgene Nachbarbestände befruchten können, spielt der Pollenflug dabei eine zentrale Rolle. Für die Überwachung und Kontrolle derartiger Regelungen sind methodische Ansätze unverzichtbar, die frühzeitig mögliche transgene Auskreuzungen in einer Region schnell und kosteneffizient ermitteln können.

Im Rahmen dieses Projektes wurden Vorversuche zum Nachweis von Rapspollen-DNA durchgeführt. Die DNA-Extraktion aus Pollen ist aufgrund der sehr stabilen und chemisch inerten Pollenwände schwierig. Gängige Aufschlussmethoden und Lysepuffer sind deshalb für die DNA-Extraktion nur bedingt geeignet (WAIBLINGER et al., 1999). Ein vollständiger mechanischer Aufschluss, wie zum Beispiel durch die Verwendung von Glas-oder Metallkugeln, kann zu einer erheblichen Degradation genomischer DNA führen. Bei den hier durchgeführten Versuchen wurde festgestellt, daß die DNA-Extraktion durch eine rasche Degeneration der Pollen sowie Verschmutzungen beeinträchtigt wird. Mit herkömmlichen DNA-Isolationsmethoden wurden zudem nur geringe Extraktionseffizienzen erreicht. Gute Ergebnisse konnten durch den schonenden Aufschluss der Pollen mit Ultraschall erzielt werden. Nach Etablierung der Methode zum Pollenaufschluß gelang die eindeutige molekulargenetische Differenzierung von transgenen/nicht-transgenen Pollen mit ausgewählten Objektträgern der stationären Pollen-Fallen vom Freisetzungsversuch (Abbildung 11).

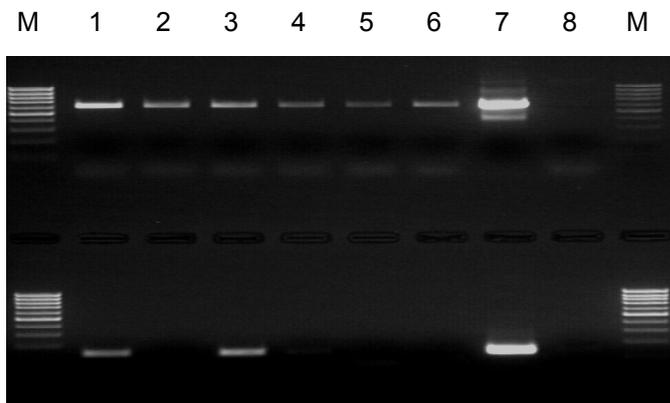


Abbildung 11: PCR-Nachweis von DNA aus Rapspollen

(M) 100 bp Leiter; (1-3) Objektträger-Pollenfalle; (4-6) mobile Pollenfalle; (7) 'Falcon GS40/90' (Positiv-Kontrolle); (8) H₂O
obere Reihe: *gluco*; untere Reihe: *pat*

Für eine großflächige Erfassung von Rapspollenflug wurden außerdem Testfahrten mit einer sogenannten 'mobilen' Sporendüsenfalle, die auf einem Fahrzeug montiert die Sammlung von in der Luft befindlichen Pollen ermöglicht, durchgeführt (Abbildung 12).

Eine ausführliche Beschreibung zum Aufbau und zur Funktionsweise der Düsen-sporenfalle für die Stichprobengewinnung vom fahrenden Fahrzeug aus findet sich

bei SCHWARZBACH (1979). Die einströmende Luft wird in der Falle beschleunigt und so umgeleitet, daß sich luftbürtige Teilchen bedingt durch die Schwerkraft am Fallenboden absetzen. Dieser ist abnehmbar und kann mit Agar-Pollenfangschalen belegt werden.



Abbildung 12: Mobile Düsensporenfalle

Bei Testfahrten in repräsentativen Rapsanbaugebieten im Raum Freising wurden Rapspollen mit der 'mobilen' Pollenfalle gesammelt. Nach Isolierung der Pollen-DNA konnte mittels qualitativer PCR das *Brassica*-spezifische Referenzgen 'gluco' nachgewiesen werden (Abbildung 11). Da derzeit in Deutschland kein transgener Raps angebaut wird, konnte mit der mobilen Pollenfalle kein transgener Rapspollen nachgewiesen werden.

4 DISKUSSION

Die einzelnen EU-Mitgliedstaaten sind durch die Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG dazu verpflichtet, nationale Regelungen und Richtlinien für eine 'gute landwirtschaftliche Praxis' beim Anbau gentechnisch veränderter Nutzpflanzen zu erlassen, die die Koexistenz von ökologischer, konventioneller und Gentechnik verwendender Landwirtschaft ermöglichen. Die Europäische Kommission hat diesbezüglich bereits Vorschläge, wie z.B. die Einhaltung von Mindestabständen zu nicht-transgenen Feldern, Pufferzonen oder zeitliche Anbauabstände, unterbreitet. Neben Mais kommt bei der Festlegung von Anbauregelungen besonders Raps eine wichtige Rolle zu, da er über ein hohes Auskreuzungspotential verfügt.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines bayerischen Monitoringprojektes durchgeführt mit dem Ziel, die möglichen Folgen eines Anbaus transgenen Rapses für die kleinstrukturierte Landwirtschaft, wie sie u.a. in Bayern vorliegt, abzuschätzen. Dazu wurde schwerpunktmäßig das Ausbreitungsverhalten von Rapspollen und die Ausbreitung von transgenem Raps durch Auskreuzung in direkt angrenzende Rapsbestände sowie verwandte Kultur- und Wildpflanzen untersucht. Weiterhin wurde das Überdauerungspotential transgener Rapsamen im Boden unter landwirtschaftlichen Praxisbedingungen ermittelt.

4.1 Auskreuzung von transgenem Raps

4.1.1 Auskreuzungspotential von Raps

Zahlreiche Studien haben sich bereits mit der Fragestellung beschäftigt, wie stark transgener Raps in benachbarte Rapsbestände auskreuzt. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über bisher festgestellte Auskreuzungsraten. Die meisten Studien zum Auskreuzungspotential von Raps unterscheiden sich z.T. deutlich in Bezug auf die untersuchten Parameter wie z.B. Größe der Felder, Entfernungen oder Anordnung der Pollenspender- und Empfängerpflanzen. Einige Studien verwendeten zudem männlich sterile Empfängerpflanzen. Da die Auskreuzungsraten bei männlich sterilen Pflanzen auf Grund der fehlenden Pollenkonkurrenz an den Empfängerpflanzen höher sind und nicht den tatsächlichen landwirtschaftlichen Anbaubedingungen entsprechen, können sie nur das Ausbreitungspotential transgener Pollen beschreiben. Daraus ergibt sich die Frage, in wieweit die Ergebnisse miteinander vergleichbar

bzw. relevant für einen Anbau unter landwirtschaftlichen Praxisbedingungen sind. Trotz der oft schlechten Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist allen Studien gemeinsam, daß mit zunehmender Entfernung von der transgenen Pollenquelle ein starker Rückgang der Auskreuzungsereignisse festgestellt und der momentan gültige Schwellenwert von 0,9 % für transgene Verunreinigungen problemlos eingehalten werden kann. An Einzelpflanzen oder in unmittelbarer Nähe zu transgenen Beständen kann es zwar immer wieder zu deutlich höheren Auskreuzungsraten kommen. Da jedoch bereits innerhalb der ersten Meter meist ein sehr starker Rückgang der Auskreuzungsraten erfolgt, kommt es durch die sehr geringen Transgenanteile in den weiter entfernten Bereichen eines Bestandes wieder zu einer starken 'Verdünnung' der Transgenanteile im Erntegut.

Die Einkreuzungsraten bei Raps unterscheiden sich zudem sowohl innerhalb verschiedener Rapsorten als auch zwischen verschiedenen Sortentypen (Linien- und Populationssorten, bei Hybriden restaurierte Hybriden und Verbundsorten) (SIMPSON et al., 1999). Beim Anbau von Hybridsorten ist eine vollständige Fremdbefruchtung erforderlich. Da die Selbstbefruchtung der weiblichen Komponente verhindert wird, ist eine unerwünschte Fremdbefruchtung bei diesem Sortentyp wesentlich wahrscheinlicher. In einer Studie der EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY (EASTHAM & SWEET, 2002) kam es bei einer Verbundsorte mit 80 % männlich sterilen Pflanzen zu 23 % bis 1,5 % Einkreuzungen (in 1,5 m und 91,5 m Entfernung von der Fremdpollenquelle). Im Vergleich dazu wurden für eine vollfertile Sorte nur 1 % und 0,1 % gemessen.

Im vorliegenden Feldversuch waren die Auskreuzungsraten in allen Versuchsjahren gut reproduzierbar und lagen in unmittelbarer Nähe der 100 % transgenen Parzellen zwischen 0,26 % und 0,31 %. Rund 90 % aller einzelnen Auskreuzungsereignisse lagen dabei bei maximal 0,3 % (Tabelle 13). Die Parzellen mit 1 % und 0,1 % transgenen Pflanzen, die transgen verunreinigtes Saatgut simulieren sollten, verursachten nur marginale Auskreuzungsraten in Höhe von durchschnittlich 0,01 % bzw. 0,00083-0,0065 % (Tabelle 12), so daß es nicht zu einer Zunahme, sondern zu einem starken Rückgang des Transgenanteils geführt hat. Somit lagen alle Auskreuzungsraten deutlich unter dem aktuellen Schwellenwert von 0,9 %.

Mit den Auskreuzungsdaten und der Windverteilung während der Rapsblüte wurde ein χ^2 -Test durchgeführt. Danach konnte kein Zusammenhang zwischen der

Verteilung der einzelnen Auskreuzungsereignisse und der Windverteilung festgestellt werden. Dieses Ergebnis wird von einer Studie von STANILAND et al. (2000) gestützt, die in ihrer Studie ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang nachweisen konnten. Die dort ermittelten durchschnittlichen Auskreuzungsraten von 0,7 % bei 0 m und 0,02 % bei 30 m Abstand wiesen jedoch einen exponentiellen Gradienten entlang der Entfernung zur Transgenparzelle auf. Weitere Studien kamen gleichfalls zu dem Ergebnis, daß die Pollenverbreitung und Auskreuzung nicht allein vom Wind abhängig sein kann, sondern auch von blütenbesuchenden Insekten wie v.a. Honigbienen oder Hummeln (SCHEFFLER et al., 1993; RAMSAY et al., 1999; RIEGER et al., 2002).

Im vorliegenden Feldversuch wurde zur Abschätzung und möglichen Voraussage der Pollenverbreitung unter landwirtschaftlichen Bedingungen mit den Auskreuzungsdaten aller vier 100 % transgenen Parzellen und unter Annahme einer exponentiellen Abnahme der Auskreuzungsraten in zunehmender Entfernung eine Regressionskurve erstellt. Die Kurve zeigt einen deutlichen Rückgang der Auskreuzungsraten von 0,65 % in 3 m Entfernung auf 0,04 % in der maximal gemessenen Entfernung von 12 m (Abbildung 7). Trotz dieses festgestellten Auskreuzungsgradienten sind die statistischen Auswertungen und die punktuelle Verteilung der Befruchtungseignisse deutliche Hinweise darauf, daß die Insektenbestäubung für die Auskreuzung in die unmittelbare Umgebung eine große Rolle spielen muß. Der Anteil der Windbestäubung an der Gesamtbestäubung wird zudem durch den Pollendruck innerhalb der Fangparzellen reduziert, der einer Befruchtung durch externen Pollen entgegenwirkt

4.1.2 Auskreuzung auf kreuzungskompatible Arten

Raps ($2n = 38$) ist ein amphidiploider Bastard mit dem Genom AACC und ursprünglich aus einer Kreuzung zwischen Rübsen (*B. rapa* L., Genom AA, $2n = 20$) und Kohl (*B. oleracea* L., Genom CC, $2n = 18$) entstanden (U, 1935). Auf Grund der engen verwandtschaftlichen Beziehung zu vielen *Brassica*-Vertretern (Abbildung 13) kann es sowohl mit Wildarten als auch landwirtschaftlich genutzten Vertretern dieser Pflanzenfamilie zu Hybridisierungen und damit, im Fall von transgenem Raps, zu einer ungewollten Weitergabe und Ausbreitung einer entsprechenden transgenen Eigen-

schaft kommen (FRELLO et al., 1995; BING et al., 1996; CHÈVRE et al., 1996; LEFOL et al., 1996; SAURE et al., 1999; MOYES et al., 2002; DARMENCY & FLEURY, 2000).

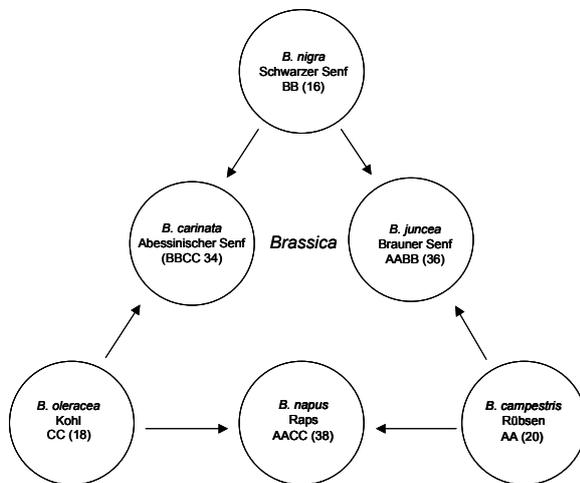


Abbildung 13: Verwandtschaftsverhältnis der Brassica-Arten nach U (1935)

Für einen erfolgreichen Genfluß zwischen verschiedenen Pflanzenarten unter landwirtschaftlichen Bedingungen ist die Überwindung mehrerer Hürden notwendig. Die Voraussetzungen für eine Befruchtung sind zunächst physische Nähe und Pollenbewegung, sich überschneidende Blühfenster, sexuelle Kompatibilität, ein enges Verwandtschaftsverhältnis und Durchsetzungsvermögen der Pollen. Nach der Befruchtung müssen zusätzliche natürliche Barrieren, z.B. die genetische Instabilität oder eine geringe Pollenfertilität bei den Nachkommen, überwunden werden, so daß die Lebensfähigkeit und Fruchtbarkeit der Hybriden und ihrer Nachkommen über mehrere Generationen einer Rückkreuzung gegeben ist. Wenn es schließlich zu einer erfolgreichen Introgression des Gens durch Rekombination zwischen den Genomen gekommen ist, muß sich das Gen innerhalb der natürlichen Populationen erhalten (SCHEFFLER & DALE, 1994; ROGERS & PARKES, 1995; CHÈVRE et al., 1998).

Ein erfolgreicher Gentransfer kann nur stattfinden, wenn jede dieser Voraussetzungen erfüllt wird. Die Etablierung des Transgens innerhalb wilder Populationen kann entweder durch Rekombination, Introgression oder durch die Stabilisierung einer Hybridart als neue Pflanzenart stattfinden (CHEVRE et al., 2000).

Eine weitere entscheidende Voraussetzung für die Etablierung transgener Eigenschaften im Genpool der Wildpflanzen ist, daß das jeweilige Gen in einem bestimmten Ökosystem einen Überlebensvorteil darstellt. Die Erfüllung all dieser

Voraussetzungen könnte zur Entstehung eines neuen, landwirtschaftlich problematischen Unkrauts oder einer neuen Spezies führen, die natürliche Ökosysteme stört und andere Pflanzen verdrängt (TIEDJE et al., 1989; CRAWLEY, 1990; KEELER & TURNER, 1990; WILLAMSON, 1992)

Tabelle 32 gibt eine Übersicht über die Fähigkeit der wichtigsten mit Raps kreuzungskompatiblen Pflanzen zur Bildung von F₂-Nachkommenschaften sowie ihre Rangfolge bei der Hybridisierung mit Raps.

Tabelle 32: Hybridisierung und Bildung von Nachkommen kreuzungskompatibler *Brassica*-Spezies

Species	F ₂ -Nachkommen	Rückkreuzung möglich	Rangfolge
<i>Brassica rapa</i>	ja	ja	1
<i>Brassica juncea</i>	ja	ja	2
<i>Brassica oleracea</i>	ja	ja	3
<i>Brassica nigra</i>	ja	ja	4
<i>Hirschfeldia incana</i>	nein	ja	5
<i>Raphanus raphanistrum</i>	nein	ja	5
<i>Diplotaxis eruciodes</i>	nein	ja	6
<i>Diplotaxis muralis</i>	nein	ja	6
<i>Sinapsis alba</i>	nein	nein	7
<i>Sinapsis arvensis</i>	nein	nein	7
<i>Diplotaxis tenuifolia</i>	nein	nein	8
<i>Rapistrum rugosum</i>	nein	nein	8
<i>Raphanus sativus</i>	nein	nein	8

Nach SCHEFFLER and DALE (1994)

Die Untersuchung der Auskreuzung transgener Rapspflanzen auf Rübsenparzellen führte im vorliegenden Feldversuch zu unterschiedlichen Ergebnissen. Trotz der deutlich früher als praxisüblich durchgeführten Ansaat der Sommerrübsenparzellen kam es erst während der letzten Tage der Rapsblüte zu einer geringen Überschneidung der beiden Blühfenster, die jedoch für eine Auskreuzungsrate des *pat*-Gens in Höhe von 0,19 % ausreichte. Nach der Reduzierung der Transgenparzellen im zweiten und dritten Versuchsjahr befanden sich die Rübsenparzellen im Gegensatz zum ersten Versuchsjahr nicht mehr direkt neben 100% transgenen Rapsparzellen. Dies dürfte der Grund dafür sein, daß in den beiden Folgejahren keinerlei Auskreuzungen mehr festgestellt werden konnten. Obwohl die Blühzeitpunkte von Raps und Winterrübsen in beiden Anbaujahren nahezu identisch waren, konnte keine Auskreuzung festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurden in den zusätzlich direkt neben den 100 % transgenen Parzellen aufgestellten Sommerrübsen-Topfpflanzen Auskreuzungsraten von bis zu 6,84 % (Tabelle 25)

festgestellt werden, wodurch das Hybridisierungspotential von Raps und Rübsen deutlich wird.

Von den mit Raps kreuzungskompatiblen Wildarten besteht für Rübsen (*B. rapa* L.) die größte Wahrscheinlichkeit einer Auskreuzung (BING, 1991; SCHEFFLER & DALE, 1994). Die Hybriden aus Raps und Rübsen besitzen in der Regel 29 Chromosomen und weisen äußerliche Merkmale beider Eltern auf (METZ et al., 1997). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, daß Raps und Rübsen unter Freilandbedingungen leicht miteinander hybridisieren (JØRGENSEN & ANDERSON, 1994; BING et al., 1996; METZ et al., 1997; RIEGER et al., 1999; HANSEN et al., 2001; HALFHILL et al., 2002, 2004; LU et al., 2002) und die interspezifischen Hybriden unter Feldbedingungen auch wieder mit Rübsen rückkreuzen können (JØRGENSEN et al., 1996). Die beobachteten Hybridisierungsraten schwankten je nach verwendeter Rapsorte und erreichten Werte von 0 - 16,9 %. Die Auskreuzung findet dabei meist mit Rübsen als weiblichem Elter statt.

Bei Hybriden zwischen Raps und kreuzungskompatiblen Brassica-Arten wurde unter Feldbedingungen nur im Falle von Rübsen bei den Nachkommen eine hohe Pollenfertilität beobachtet (JØRGENSEN & ANDERSEN, 1994; MIKKELSEN et al., 1996a, 1996b). Die weibliche Fertilität der Hybridpflanzen nimmt in den folgenden Generationen durch Rückkreuzung stetig zu (CHÈVRE et al., 1997). LANDBO & JØRGENSEN (1997) konnten zeigen, daß ein Großteil der Samen von Hybriden aus *B. rapa* und *B. napus* keine Dormanz zeigt, jedoch zu über 90 % keimfähig ist. Samen aus Rückkreuzungen der Hybriden mit *B. rapa* zeigten bereits wieder zu rund einem Drittel Dormanz.

Bezüglich der Weitergabe transgener Eigenschaften konnten METZ et al. (1997) in Kreuzungsexperimenten beobachten, das ebenfalls für Herbizidresistenz kodierende *bar*-Gen entsprechend den erwarteten Spaltungsregeln in die F₁ weitervererbt und von den Pflanzen exprimiert wurde. Der Einbau des Fremdgens ins Genom der Hybriden ist jedoch nicht sehr stabil, da der Anteil der transgenen Hybriden in den folgenden Rückkreuzungen BC1 und BC2 stärker als erwartet zurückging.

Zur Untersuchung der Verbreitung der transgenen Rapspflanzen des Freisetzungsversuchs über Auskreuzung in Populationen kreuzungskompatibler *Brassica*-Wildarten wurden Bestandsaufnahmen aller in Frage kommenden Hybridisierungspartner auf dem das Versuchsfeld umgebenden Brachstreifen durchgeführt. Die Bestandsauf-

nahmen ergaben neben einzelnen Pflanzen von Hederich (*Raphanus raphanistrum* L.) nur große Populationen von Hirtentäschel (*Capsella bursa pastoris* L.). Die Analyse aller 125 randomisiert gezogenen und auf das *pat*-Gen untersuchten Hirtentäschel-Proben war negativ. Unter Feldbedingungen konnte bislang in keiner Feldstudie eine Hybridisierung zwischen Raps und Hirtentäschel nachgewiesen werden.

Von allen 5 gefundenen Hederich-Pflanzen wurden Blattproben genommen und mittels PCR auf Einkreuzung des *pat*-Gens untersucht. Alle Pflanzen erwiesen sich dabei als nicht-transgen. Obwohl Hybridisierungen von Raps mit Hederich bisher nur sehr selten beobachtet wurden (EBER et al., 1994; BARANGER et al., 1995; CHEVRE et al., 1997, 1998, 2000; DARMENCY et al., 1998; WARWICK et al., 2003), ist unter natürlichen Bedingungen zumindest eine niedrige Hybridisierungsfrequenz und die Entstehung transgener Hybriden möglich. Die aus der Befruchtung mit Hederich hervorgegangenen Samen zeigen jedoch eine stark verminderte Keimfähigkeit und die F1-Pflanzen sind überwiegend pollensteril (RIEGER et al., 2001; WARWICK et al., 2003). In australischen Feldversuchen wurden Hybriden zwischen Imidazolin-resistentem Raps und Hederich gefunden, doch waren die Hybridisierungsraten mit 0,000004 % sehr gering (Rieger et al., 2001). Auskreuzungsversuche von CHÈVRE et al. (2000) mit männlich-sterilem HR-Raps als weiblichem Elter resultierten in Hybridisierungsraten von durchschnittlich 0,00009 %.

Zu Hybridisierungen scheint es in der Regel nur dann zu kommen, wenn Raps die Pollen-Empfängerpflanze war (SCHEFFLER & DALE, 1994; RIEGER et al., 2001; WARWICK et al., 2003). In Feldversuchen mit transgenem, männlich sterilem HR-Raps konnten Bastarde mit unterschiedlichen Ploidiestufen nachgewiesen werden. Herbizidresistenz wurde dabei in triploiden und amphidiploiden Hybriden exprimiert (BARANGER et al., 1995).

4.1.3 Nachweisverfahren zur Ermittlung der Auskreuzung

Die Ermittlung der Auskreuzungsraten mittels Biotest erwies sich auf Grund der sehr großen Mengen zu testender Rapssamen als hervorragende Methode. Die zusätzliche Überprüfung aller überlebenden Pflanzen des Biotests mittels qualitativer PCR ergab jedoch einen durchschnittlichen Anteil falsch-positiver Pflanzen, d.h. überlebener Pflanzen, die nicht Träger des *pat*-Gens waren, in Höhe von 12,8 %. Durch den hohen Durchsatz bei der Beprobung und die zahlreichen Einflußfaktoren

wie z.B. Temperatur, Pflanzendichte oder Überlappung von Blättern bei der Applikation des Breitbandherbizids sind gewisse Schwankungen bei der Wirksamkeit unvermeidbar. Die molekulare Überprüfung des Ergebnisses des Biotests mittels qualitativer PCR war daher zwingend erforderlich, da anderenfalls die Höhe und Verteilung der Auskreuzungen signifikant verfälscht worden wäre, d.h. die festgestellten Auskreuzungsraten höher gewesen wären. Der große Vorteil des Biotests kam durch das Entnahmemuster der Stichproben zum Tragen. Durch die Analyse der großen Anzahl von Stichproben waren sehr detaillierte Aussagen über die Verteilung der Auskreuzungsereignisse möglich.

Eine Untersuchung der Auskreuzungsraten ausschließlich mit Hilfe qualitativer PCR ist wegen der vielen PCR-Einzelreaktionen und der im Vorlauf notwendigen DNA-Isolierung sehr kosten- und zeitintensiv und daher bei einem großen Stichprobenumfang nicht praktikabel. Die quantitative PCR hat sich dagegen als eine höchst effiziente und sensible Methode zur Bestimmung der Transgenanteile im Erntegut bestätigt, da eine große Anzahl an Samen in Form von Mischproben gleichzeitig getestet und selbst kleinste Mengen transgener DNA nachgewiesen werden können. Durch die Analyse von Mischproben ist der Aufwand im Vergleich zu Einzelanalysen gering und das Ergebnis ist schnell verfügbar.

Im vorliegenden Feldversuch wurden mit der quantitativen PCR z.T. höhere Auskreuzungsraten als mit dem Biotest ermittelt. Eine Ursache dafür könnte in der oft sehr punktuellen Verteilung der einzelnen Auskreuzungsereignisse zu suchen sein, wodurch v.a. bei den 0,1 % transgenen Parzellen einige sehr seltene Auskreuzungsereignisse bei der Stichprobennahme möglicherweise nicht erfaßt werden konnten. Dafür spricht auch die Schwankung der mit dem Biotest bei den Parzellen mit 1 % und 0,1 % Transgenanteil festgestellten Auskreuzungen, wohingegen die Auskreuzungsraten bei allen 100 % transgenen Parzellen relativ konstant und über die drei Versuchsjahre sehr gut reproduzierbar waren (Tabelle 12). Deutliche Schwankungen bei der Ermittlung des Transgenanteils wurden auch von DIETZ-PFEILSTETTER et al. (2003) festgestellt, die die Auskreuzung in einer gemeinsamen Wertprüfung von transgenem und nicht-transgenem Raps mit einem Biotest untersuchten. Die ermittelten Werte schwankten dabei zwischen verschiedenen Stichproben eines Gesamternteguts von 0,0 – 1,16 %. Nach KRUSE (2002) können sich Unregelmäßigkeiten bei der Probenahme und –aufbereitung v.a. im Bereich sehr

geringer Kontaminationsraten entscheidend auf das Ergebnis auswirken. Dies wird auch in der vorliegenden Untersuchung deutlich. Die mit dem Biotest festgestellte Auskreuzung aus einer 0,1% transgenen Parzelle in Höhe von 0,0017 % entspricht einem transgenen Samen innerhalb des Gesamtstichprobenumfangs von 60.000 Samen aus acht Parzellen. Der mit der quantitativen PCR ermittelte Wert von 0,0404 % entspräche 24 transgenen Samen und damit auch nur drei Samen pro untersuchter Parzelle. Eine weitere Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse dürfte in der Art Probenahme zu suchen sein. Für den Biotest wurden in jeder der acht Parzellen per Hand an 25 Punkten Stichproben gezogen und einzeln getestet. Für die TaqMan-Analyse wurden die acht Parzellen mit dem Mährescher geerntet und Stichproben aus dem Erntegut entnommen, von denen jeweils 10.000 Samen pro Analyse vermahlen wurden. Durch den Mährescher kommt es zu einer anderen Durchmischung des Erntegutes als bei der manuellen Probenahme.

Da die Ergebnisse der beiden Methoden trotz Unterschieden in einem ähnlichen Bereich liegen, sind die Methoden durchaus miteinander vergleichbar. Der größere Aufwand des Biotests war in der vorliegenden Arbeit durch die hohe Auflösung der Auskreuzungsereignisse gerechtfertigt. Für eine großräumige Beprobung von Erntegut ist allerdings die real-time PCR auf Grund der genannten Vorteile die Methode der Wahl.

4.2 Pollenverbreitung

4.2.1 Wind

Klimatische Einflüsse (z.B. das Verkleben der Pollen bei Feuchtigkeit), die Anbau-dichte von Raps und die jeweilige Ausprägung der Landschaftsstrukturen haben einen großen Einfluß darauf, wie weit der Pollen vom Wind transportiert werden kann. Die Windgeschwindigkeit und Luftströmung hängt stark von der Topographie (z.B. Hügel, Hänge, Täler) und der Umgebungsvegetation ab (THOMPSON et al., 1999).

Unter kontrollierten Bedingungen sind Rapspollen 24 h bis eine Woche lebensfähig (MESQUIDA & RENARD, 1982), unter Feldbedingungen nimmt die Lebensfähigkeit innerhalb von 4-5 Tagen kontinuierlich ab (RANITO-LETHIMÄKI, 1995). Dadurch kann

es auch nach der Überwindung größerer Distanzen zu einer Befruchtung kommen. Einzelne Befruchtungseignisse durch transgenen Pollen wurden bis in einer Entfernung von 4 km beobachtet (THOMPSON et al., 1999). Während der gesamten Blühdauer des Rapses, die ca. 30-40 Tage dauert, produziert ein Bestand durchschnittlich 600-1000 Pollen/m³ Luft. Vereinzelt wurden auch Werte von bis zu 2800 Pollen/m³ Luft ermittelt (McCARTNEY & LACEY, 1991). Durch seine klebrige Oberfläche ist er auch für den Transport durch Insekten sehr gut geeignet (EISIKOWITCH, 1981).

Bei der Ausbreitung von Pollen muß jedoch unterschieden werden zwischen potentiell möglichem Pollenflug und tatsächlich stattfindendem Genfluß (RAYBOULD & CLARKE, 1999), da es trotz des Pollentransportes über weite Strecken durch Pollenkonkurrenz an den Empfängerpflanzen nur in sehr seltenen Fällen zu einem Befruchtungseignis kommt (SIMPSON et al., 1999). Die Konkurrenzfähigkeit fremder Pollen hängt davon ab, wie lange sie bestäubungsfähig bleiben und wieviele lebensfähige Pollen die Empfängerpflanze produziert.

Zahlreichen Studien haben sich mit der Pollenverbreitung beschäftigt. Durch unterschiedliche Versuchsdesigns, -größen und Witterungsverhältnisse wurden zwar in verschiedenen Entfernungen z.T. sehr unterschiedliche Pollenkonzentrationen gemessen, jedoch wurde in allen Studien festgestellt, daß die Pollenkonzentrationen in der Luft mit zunehmender Entfernung vom Feldrand stark rückläufig sind. TIMMONS et al. (1995) fanden in 360 m Entfernung noch 10 % der am Feldrand gemessenen Pollenkonzentration, während dieser Wert in einer Studie von McCARTNEY & LACAY (1991) bereits nach 10 m erreicht wurde. THOMPSON et al. (1999) ermittelten in einer Entfernung von 170 m einen Rückgang der Pollenkonzentration auf 25 % gegenüber dem Feldrand. LAVIGNE et al. (1998) ermittelten, daß ca. 50 % aller Pollen einer Pflanze nicht weiter als 3 m fliegen.

Bezogen auf diese Grundtendenz decken sich die im vorliegenden Feldversuch gewonnenen Erkenntnisse mit denen der oben genannten Studien. Die Verbreitung der Rapspollen wurde mit Hilfe von vaselinebestrichenen Objektträger-Pollenfallen ermittelt, die im Abstand von jeweils 50 m bis in einer Entfernung von 250 m aufgestellt waren. Obwohl die Gesamtzahl der während jeder Blühperiode freigesetzten Pollen über die drei Versuchsjahre starken Schwankungen unterworfen war, folgte die Verbreitung mit zunehmender Entfernung immer der gleichen

Tendenz: Nachdem über die Hälfte aller Pollen direkt am Feldrand gesammelt wurden, erreichten nur noch ca. ein Viertel der Pollen eine größere Entfernung als 50 m (Tabelle 19). Nach einem weiteren Rückgang erreichten die Pollenfallen in 200 und 250 m Entfernung ein gleichbleibendes Niveau von jeweils rund 4 %. Dies bestätigt, daß zumindest ein gewisser Teil der freigesetzten Pollen auch größere Entfernungen zurücklegen kann.

Die bei der Höhenverteilung der Pollen festgestellten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsjahren waren jedoch so groß, daß keine einheitliche Tendenz abgeleitet werden konnte. Die Unterschiede in der Fanghöhe (1 m, 2 m, 3 m und 4 m) deuten darauf hin, daß Aufwind und lokale Luftverwirbelungen einen bedeutenden Einfluß auf die Pollenverbreitung haben. Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten eines früheren Freisetzungsversuchs auf dem TUM Versuchsgut in Roggenstein, bei dem mit der gleichen Methode neben einem starken Rückgang der Pollenzahlen in zunehmender Distanz auch eine uneinheitliche Höhenverteilung festgestellt wurde (FISCHBECK et al., 1998). Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß intensiver Pollenflug nur an wenigen Tagen stattfand (Tabelle 20), kommt der Windrichtung und –stärke an den Tagen mit besonders starkem Pollenflug eine große Bedeutung zu, wodurch sich die Unterschiede in den einzelnen Studien zumindest zum Teil erklären lassen.

4.2.2 Pollenverbreitung durch Insekten

Bei der Pollenverbreitung durch Insekten spielen hauptsächlich Honigbienen (*Apis mellifera* L.) und Hummeln (*Bombus terrestris* L.) eine Rolle (OSBORNE et al., 1999; RAMSEY et al., 1999; PIERRE et al., 2003). Der Aktionsradius von Bienen liegt gewöhnlich in einem Umkreis von bis zu 2 km vom Bienenstock (dies entspricht einer Aktionsfläche von $12,5 \text{ km}^2$), auch wenn Sammelaktivitäten bis in fünf km festgelegt wurden (RAMSEY et al., 1999). Der Nektar von Rapsblüten ist sehr attraktiv für Honigbienen (FREE, 1993). Nektar sammelnde Insekten unterscheiden dabei nicht zwischen konventionellen und herbizidresistenten Rapspflanzen (PIERRE et al., 2003). Raps wird von einer Vielzahl von Insektenarten angefliegen. SAURE et al. (1999) ermittelten während der Rapsblüte 63 Bienen-, 32 Wespen- und 29 Schwebfliegenarten.

Hinweise auf die Rolle der Bienen bei der Befruchtung in größeren Distanzen ergeben sich aus der Tatsache, an weiter entfernten Pflanzen einzelne Auskreuzung-

sereignisse festgestellt wurden, während in der Umgebung nur äußerst geringe Auskreuzungsraten festzustellen waren; vereinzelte Auskreuzungsereignisse wurden auch an Einzelpflanzen in Entfernungen detektiert, in denen während der Blüte weniger als ein Pollen/m³ Luft gemessen wurde (THOMPSON et al., 1999). Auch SCHEFFLER et al. (1995) kommen in ihrer Studie zur Untersuchung der Auskreuzungsraten in größeren Entfernungen zu dem Schluß, daß Bienen der größte Einfluß bei der Pollenverbreitung über große Distanzen zukommt.

RAMSEY et al. (1999) konnten beobachten, daß an Bienen beim Verlassen des Bienenstockes oft noch größere Mengen lebensfähiger Rapspollen hafteten, da die Bienen auf Grund der Enge im Bienenstock über das Haarkleid passiv Pollen untereinander austauschen, zumal nicht immer alle Bienen eines Stockes an der gleichen Pflanzenart Nektar sammeln. Bienen gelten zwar als blütenstet/-treu, doch ist ein Wechseln der Blütenart während des Sammelns nicht ungewöhnlich (PROCTOR & LACK, 1996; RAMSEY et al., 1999).

Hummeln besuchen in Rapsfeldern durchschnittlich 500-700 Blüten pro Tag. Die dadurch verursachte Auskreuzungsrate ist dabei invers proportional zur Länge des Aufenthaltes im 'Empfängerfeld'. Eine längere Sammeltätigkeit der Hummeln im transgenen Feld führt jedoch nicht zu einer wesentlichen Erhöhung der Auskreuzungsrate, da nur vom Pollen der zuletzt besuchten Blüten eine nennenswerte Befruchtung ausgeht (CRESSWELL et al., 2002). Zudem legen Hummeln während des Sammelns meist nur geringe Distanzen zurück, so daß ein Großteil der Pollen in der unmittelbaren Umgebung der Pollenquelle verbreitet wird (SKOGSMYR, 1994)

Die unregelmäßige Verteilung der Auskreuzungsereignisse des vorliegenden Feldversuchs (Abbildung 6) sowie der fehlende Zusammenhang zwischen der Windverteilung während der Rapsblüte und der Verteilung der Auskreuzungsereignisse ist ebenfalls als ein starker Hinweis darauf zu werten, daß blütenbesuchenden Insekten eine entscheidende Bedeutung für die Auskreuzung zukommt. Gestützt wird diese These zudem durch den Umstand, daß im Umkreis von ca. 1 km vom Versuchsfeld mehrere Bienenvölker stationiert waren.

4.2.3 Mathematische Prognosemodelle für Pollenflug und Auskreuzung

Zur Untersuchung der Pollenverbreitung wurden nach AYLOR et al. (2003) in bisher durchgeführten Studien die folgenden Strategien benutzt: 1.) Ermittlung der Auskreu-

zungsraten in bestimmten Entfernungen, 2.) Ermittlung der Pollenkonzentration in der Luft in verschiedenen Entfernungen und 3.) Modellierung mit mathematischen Gleichungen. Die Pollenverbreitung folgt häufig einer leptokurtischen, negativ exponentiellen oder Weibull-Verteilung (BATEMAN 1947; 1950; LEVIN & KERSTER, 1974; TONSOR, 1985; MORRIS et al., 1994; GIDDINGS et al., 1997).

Zur Bestimmung des Verbreitungspotentials von Pollen werden volumetrische Pollenfallen (McCARTNEY & LACEY, 1991; TIMMONS et al., 1995) oder technische Pollensammler (KUHLMANN & BEISMANN, 2004) benutzt, die die Pollenzahl/m³ Luft in einem bestimmten Zeitraum und in unterschiedlichen Entfernungen ermitteln. Da jedoch nicht jeder Pollen zu erfolgreicher Befruchtung führt, können Aussagen über die Pollenverbreitung nur bedingt zur Vorhersage von Auskreuzungsraten herangezogen werden. In früheren Pollenverbreitungs-Experimenten wurde die Lebensfähigkeit der Pollen oder die tatsächlich stattfindende Befruchtung häufig außer Acht gelassen. Da zur Vorhersage und Beurteilung des Auskreuzungsrisikos einzelner Kulturen auf regionaler Ebene die Erkenntnisse aus der Untersuchung der Pollenverbreitung immer auch mit den tatsächlich festgestellten Auskreuzungsraten in Verbindung gebracht werden müssen (SQUIRE et al., 1999) und die Höhe der Auskreuzung zudem maßgeblich von der Lebensfähigkeit der Pollen, dem Ausmaß der Kreuzungskompatibilität und der Übereinstimmung der Blühzeitpunkte abhängt (GIDDINGS, 2000), wurden bestimmte Verfahren zur Pollenmarkierung entwickelt, um somit realistischere Aussagen über Pollenflug und möglichen Gentransfer treffen zu können, z.B. radioaktive Markierung (SCHLISING & TURPIN, 1971), Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen (WASER & PRICE, 1982; LINHART et al., 1987) oder Markergene (ELLSTRAND et al., 1989; GALEN, 1992).

Mathematische Modelle zur Vorhersage von Pollenflug lassen sich nach HELBIG et al. (2004) in zwei Gruppen einteilen: Modelle der ersten Gruppe beschreiben den zeitlichen Verlauf (Anfang, Dauer und Ende) des Pollenflugs. Grundlage für die Vorhersagen sind in der Regel Regressionsgleichungen zwischen meteorologischen Parametern und gemessenen Pollenkonzentrationen (MORENO-GRAU et al., 2000; LATALOWA et al., 2002) oder zwischen verschiedenen meteorologischen Parametern während eines bestimmten Zeitraums (EMBERLIN et al., 1999; LAIDI, 2001; GROOM-ADAMS et al., 2002). Mit Modellen der zweiten Gruppe wird versucht, Simulationen der zeitlichen und räumlichen Verbreitung der Pollen zu erstellen, indem gemessene Pollenkonzentrationen innerhalb und über Beständen mit meteorologischen Daten

verknüpft werden (MCCARTNEY & LACEY, 1991; CARRUTHERS et al., 1994; HUNT et al., 2001).

Nachdem die Pollenverbreitung und v.a. die daraus resultierenden Auskreuzungsraten einer Vielzahl von z.T. stark variierenden Einflußfaktoren wie z.B. Windrichtung, -stärke und -geschwindigkeit, Pollenproduktion und -lebensfähigkeit, Luftturbulenzen, Insektenaktivität, Temperatur, Niederschlag, Feldgröße und Überschneidung von Blühfenstern unterliegen (AYLOR et al., 2003; HELBIG et al., 2004), ist ihre Vorhersage sehr schwierig und oft mit großen Unsicherheiten behaftet. Zudem können kleinflächige Feldversuche den Pollenflug, der bei großflächigem Anbau zu erwarten ist, nur ungenügend vorhersagen (MORRIS et al., 1994; STONE, 1994). Da Simulationsmodelle in vielen Bereichen der Forschung ein nützliches Instrument darstellen, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen versucht, mit Hilfe von aus Feldversuchen gewonnenen Ergebnissen komplexe mathematische Prognosemodelle zu entwickeln, die eine möglichst genaue Vorhersage von Auskreuzungen durch transgenen Pollen in benachbarte und weiter entfernte Rapsbestände unter wechselnden Umweltbedingungen ermöglichen sollen (MCCARTNEY & LACEY, 1991; LAVIGNE et al., 1996; COLBACH et al., 1999; CRESSWELL et al., 2002; HIDALGO et al., 2002; BAKER & PRESTON, 2003; KLEIN et al., 2003; HELBIG et al., 2004; RICHTER et al., 2004; WALKLATE et al., 2004).

Zwar können viele der genannten Umweltparameter mittlerweile sehr gut von einigen Modellen berücksichtigt und variiert werden, auf Grund der Komplexität ihres Zusammenspiels kann ihr Einfluß auf die Auskreuzung jedoch stark variieren und v.a. im Bereich kürzerer Distanzen zu sehr unterschiedlichen Auskreuzungsraten führen. Dennoch sind die Modelle gut geeignet, um für bestimmte Geländebeschaffenheiten und Anbaustrukturen eine ungefähre Abschätzung des zu erwartenden Auskreuzungspotentials zu erreichen, auch wenn die Übertragbarkeit von Ergebnissen, die unter bestimmten Bedingungen erhalten wurden, auf generelle Aussagen nicht immer unproblematisch ist (HELBIG et al., 2004).

4.3 Persistenz von transgenem Raps in der Umwelt

4.3.1 Überdauerung im Boden durch Dormanz

Mit zunehmender Abreife eines Rapsbestandes kommt es häufig durch vorzeitige Reife einzelner Pflanzen, Vogelfraß oder Unwetter zum vorzeitigen Aufplatzen von Schoten und damit zum Eintrag von z.T. nicht unerheblichen Mengen an Samen in den Boden. Zusätzlich kann es je nach Erntebedingungen zu großen Dreschverlusten kommen. Der Sameneintrag in der landwirtschaftlichen Praxis beträgt in der Regel ca. 5.000-10.000 Samen/m² bzw. 2 - 5 % des Ertrages, kann aber unter extremen Witterungs- und Erntebedingungen auch 20 - 25 % erreichen (BOWERMAN et al., 1984; LUTMAN, 1993; BROWN et al., 1995; PRICE et al., 1996).

Die während der Ernte auf den Boden fallende Menge an Rapssamen wurde im vorliegenden Feldversuch mit Hilfe von Auffangschalen unter dem Mähdrescher erfaßt. Der durchschnittliche Eintrag variierte in den drei Versuchsjahren deutlich (9.856, 14.146 und 9.792 Samen/m²). Der höchste Eintrag wurde im Erntejahr 2003 ermittelt. Die extreme Trockenheit und hohen Temperaturen in diesem Jahr führten zur Ausbildung kleinerer Samen und brüchiger Schoten, wodurch in Einzelparzellen Werte von bis zu 21.949 Samen/m² ermittelt wurden.

In den Folgejahren kann es durch Überdauerung von Rapssamen im Boden zu Durchwuchsraps in den Folgekulturen im Feld oder zu Ausfallraps am Feldrand kommen. Transgener Durchwuchsraps kann somit wieder eine Quelle transgener Kontaminationen darstellen.

Voraussetzung für die Persistenz von Samen im Boden ist die Ausbildung von Keimruhe (Dormanz). Nach KARSEN (1981) wird dabei zwischen primärer und sekundärer Dormanz unterschieden. Durch die primäre Dormanz wird eine Keimungshemmung der reifen Samen sowohl auf der Mutterpflanze als auch noch kurze Zeit nach der Ernte bzw. nach dem Platzen der Schoten verursacht, wodurch ein sofortiges Keimen verhindert wird. Die sekundäre Dormanz entwickelt sich zum Schutz der keimbereiten Samen als Antwort auf suboptimale Keimbedingungen, die ein Weiterleben des jungen Keimlings unmöglich machen würden, und kann durch ungünstige Temperatur- und Lichtverhältnisse sowie Wasserstreß nach der Ernte induziert werden (PEKRUN, 1994; PEKRUN & LÓPEZ-Granados, 1995; PEKRUN et al., 1997a, b). Die Ausbildung einer sekundären Dormanz befähigt Rapssamen dazu, im

Boden mehrere Jahre lang lebensfähig zu bleiben (LUTMAN, 1993; HAILS et al., 1997; PEKRUN & LUTMAN, 1998; PEKRUN et al., 1998). Unter bestimmten Bedingungen konnten lebensfähige Samen noch nach zehn Jahren nachgewiesen werden (VAUGHAN et al., 1976; SAUERMAN, 1993; SCHLINK, 1998). Sekundäre Dormanz führt zur Ausbildung einer Lichtsensitivität, so daß Samen, die ursprünglich keinen Lichtreiz zur Keimung benötigen, nun auf diesen angewiesen sind. Dieser Lichtreiz wird mit Hilfe des Sensorpigments Phytochrom aufgenommen. Durch hellrotes Licht (Sonnenlicht) kommt es zu einer Konformationsänderung des bis dahin inaktiven 'Phytochrom red' (Pr) hin zum 'Phytochrom far red' (Pfr). Die lichtinduzierte Samenkeimung kann bereits einsetzen, wenn ein kleiner Anteil des Gesamtphytochroms auf diese Weise aktiviert ist (GERHARDS et al., 1998), was z.B. durch einen bei der Bodenbearbeitung einfallenden kurzen Lichtreiz geschehen kann. Bei einer Änderung der Umweltbedingungen kann die Dormanz über bestimmte Reize, z.B. Licht oder Temperaturwechsel, wieder gebrochen werden, so daß die Samen zu keimen beginnen.

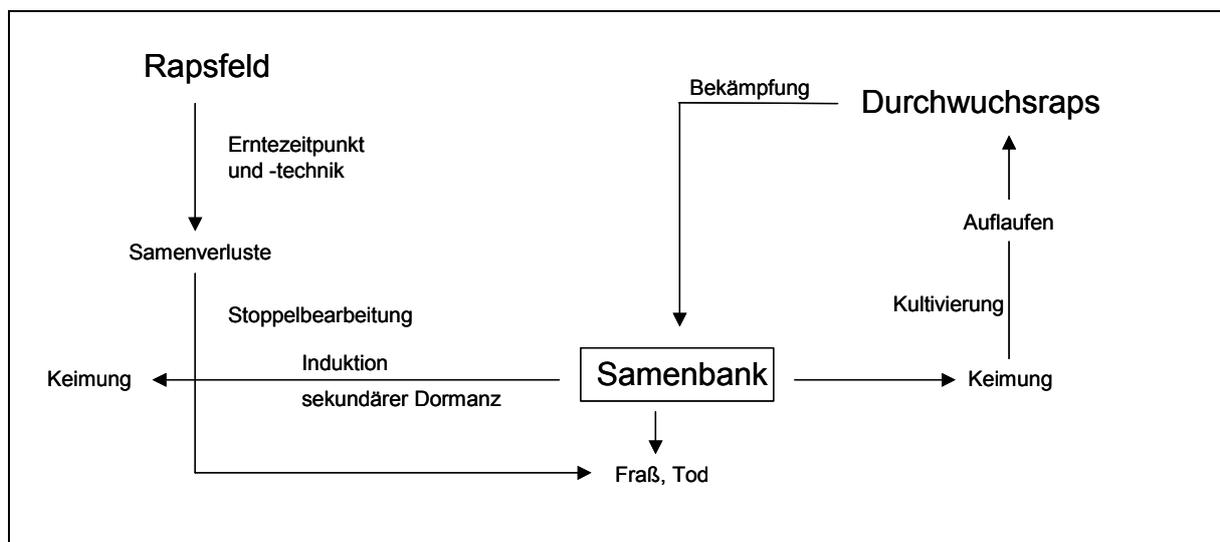


Abbildung 14: Lebenszyklus von Durchwuchsrapss
(nach PEKRUN et al., 1998)

Die meisten Kulturpflanzen besitzen eine relativ geringe Neigung zur Ausbildung einer Keimungsverzögerung oder Dormanz, da bei der Züchtung u.a. auf hohe, schnelle und einheitliche Auflaufzeiten selektiert wird (SNAYDON, 1980; LECK et al., 1989). Auch bei Raps ist die Überlebensfähigkeit der Samen in der Samenbank im Boden im Vergleich zu verwandten Wildarten relativ gering (HAILS et al., 1997; CHADOEUF et al., 1998). Unter normalen Bedingungen bilden Rapssamen keine oder

nur eine sehr geringe primäre Dormanz aus und keimen sofort oder nach flacher Bodenbearbeitung (LUTMAN, 1993; SCHLINK, 1994). Ein Teil wird jedoch durch Bodenbearbeitung, v.a. beim Einsatz des Pfluges, in tiefere Bodenschichten verlagert, wo die Überdauerung nach Induktion sekundärer Dormanz möglich ist.

Bei der Fähigkeit zur Ausbildung von Persistenz im Boden bestehen zudem große Sortenunterschiede (SCHLINK, 1994; PEKRUN et al., 1998; GRUBER et al., 2001; GULDEN et al., 2004). PEKRUN et al. (1997c) untersuchten 21 Sommer- und 25 Winterrapssorten in einem standardisierten Labortest auf ihr Dormanzverhalten. Der Anteil der Samen, die eine Dormanz ausbildeten, schwankte dabei von 0,58 % bis hin zu 76,1 %. Für die auch in der vorliegenden Arbeit verwendete Sorte 'Falcon' wurde dabei ein Mittelwert von 1,8 % bestimmt. Eine Untersuchung von 25 europäischen und chinesischen Sommer- und Winterrapssorten zeigte, daß Sommerformen von Raps ein höheres Potential zur Ausbildung sekundärer Dormanz besitzen als Winterformen (MOMOHO et al., 2002). Transgene Linien scheinen dabei gegenüber ihren nichttransgenen Ausgangssorten keinen Vorteil zu haben (GRUBER et al., 2001; BEISMANN et al., 2003), obwohl die Auswirkungen eines eingebrachten Transgenkonstrukts auf das Dormanzverhalten der Samen grundsätzlich nicht vorhersagbar sind (LINDER, 1998). Mehrere vergleichende Experimente ergaben keine Hinweise darauf, daß transgener Raps persistenter ist oder sich stärker ausbreitet als konventioneller Raps (CRAWLEY et al., 1993; BOOTH et al., 1996; SWEET et al., 1997). Vielmehr lassen die Ergebnisse anderer Studien den Schluß zu, daß transgene Sorten sogar eine eher geringere Fähigkeit zur Persistenz besitzen (CRAWLEY et al., 1993; HAILS et al., 1997; LINDER, 1998).

Neben Sortenunterschieden übt auch die Bodenart einen großen Einfluß auf die Persistenzfähigkeit der Samen im Boden aus, wobei die Wasserhaltefähigkeit der entscheidende Faktor für die Persistenz zu sein scheint (HAILS et al., 1997; PEKRUN et al., 1998; BENECH-ARNOLD et al., 2000). Sandige Böden mit wenig Wasserhaltekapazität sind demnach weniger dormanzfördernd. Auch NORRIS et al. (1999) fanden transgenen Durchwuchsraps drei Jahre nach dem Anbau des transgenen Rapses, wobei sich die einzelnen Standorte deutlich voneinander unterschieden. ROLLER et al. (2003) kamen bei ihren Untersuchungen der Einflüsse verschiedener Bodenbearbeitungsmaßnahmen auf die Reduzierung der Samenbank bezüglich des Einflusses der Bodenart auf die Ausbildung sekundärer Dormanz zu vergleichbaren Ergebnissen wie die vorliegende Arbeit. Die Versuche wurden neben unserem

Versuchsfeld bei gleicher Bodenart durchgeführt. Trotz der Verfrachtung der Samen durch Pflügen in tiefere Bodenschichten und geringer Auflaufraten im Vergleich zu flacher Bodenbearbeitung wurde nur bei einem sehr geringen Teil der Samen Dormanz induziert, so daß nach zwei Jahren kaum noch keimfähige Samen nachgewiesen werden konnten.

Obwohl Rapssamen jahrelang keimfähig im Boden überdauern können, geht auch nach CHADOEUF et al. (1998) der Anteil keimfähiger Rapssamen in der Samenbank bereits nach einem Jahr auf ca. 1 % zurück. Mit zunehmendem zeitlichem Abstand zum Eintrag wird der Anteil durch Einflußfaktoren wie Alterungsprozesse der Samen, Fraß durch Tiere, Abbau durch Bodenorganismen, Verpilzung und Keimung weiter reduziert, wobei Auflauf durch Keimung nur geringfügig zum Rückgang beiträgt. Anderen Studien zufolge betrug der Prozentsatz lebensfähiger Rapssamen nach einem Jahr im Boden 0 bis 27 %, und selbst innerhalb der einzelnen Studien wurden deutliche Unterschiede zwischen Einzelproben nachgewiesen (LUTMAN, 1993; LINDER & SCHMITT, 1995). Diese Variabilität kann auf unterschiedliche Böden sowie Licht- und Wasserverhältnisse während des Eintrags zurückgehen, da diese Faktoren einen starken Einfluß auf die Überdauerung durch sekundäre Dormanz ausüben.

Entsprechende Schwankungen können auch für Durchwuchsrap in Folgekulturen beobachtet werden, da sowohl Felder mit völliger Kontrolle des Durchwuchsrapes als auch solche mit größeren Durchwuchsrappopulationen noch nach drei Jahren auftreten können (NORRIS et al., 1999). Auch LUTMAN (1993) beschreibt nicht unübliche Auflaufraten nach drei Jahren unter Praxisbedingungen mit Fruchtfolge in Höhe von ca. 10 Pflanzen/m².

Die während der Ernte in den Boden eingetragene Menge an Rapssamen betrug im vorliegenden Feldversuch im ersten und dritten Versuchsjahr durchschnittlich rund 10.000 Samen/m² und lag damit im Bereich der in der Literatur angegebenen Größenordnung. Im zweiten Versuchsjahr, das durch ungewöhnlich hohe Temperaturen und große Trockenheit während der gesamten Vegetationsperiode gekennzeichnet war, lag der Mittelwert mit ca. 14.000 Samen/m² deutlich höher. In Einzelparzellen aufgetretene Höchstwerte von bis zu 21.949 Samen/m² verdeutlichen das Potential des Sameneintrags in den Boden. Nach der Ernte wurde eine

zweimalige flache Bodenbearbeitung mit dem Grubber durchgeführt. Dadurch sollten möglichst viele Samen zum Keimen angeregt und die in der Literatur beschriebenen hohen Einträge in die Samenbank minimiert werden. Durch die anschließende Saatbettbereitung und Aussaat der Folgefrucht Winterweizen bzw. Wintergerste im dritten Jahr wurde ebenfalls noch ein Teil der Samen zum Auflaufen angeregt.

Zur Ermittlung der Entwicklung der Samenbank wurden die Parzellen des Versuchsjahres 2001/2002 jeweils im Herbst in allen drei Versuchsjahren sowie die Parzellen des Versuchsjahres 2002/2003 in zwei Versuchsjahren durch die Entnahme von Bodenproben bis in einer Beprobungstiefe von 30 cm untersucht.

Wie bereits im Erntejahr wies die Samenbank im Folgejahr trotz wiederholter Auflaufstimulierender Maßnahmen (zweimalige flache Bodenbearbeitung mit dem Grubber und anschließende Saatbettvorbereitung und Aussaat der Folgefrucht) noch bis zu 30 keimfähige Samen/m² auf. In den 100% transgenen Parzellen konnte sogar eine leichte Zunahme im Vergleich zum Vorjahr festgestellt werden, was sich evtl. durch lokale Unterschiede in der Tiefenverlagerung der Samen durch die Bodenbearbeitung erklären läßt. Dies entspricht bereits im Herbst des gleichen Jahres einer Abnahme des Anteils keimfähiger Samen in der Samenbank von 99,7 - 100 % gegenüber dem Eintrag bei der Ernte. Im zweiten Jahr nach der Ernte konnten keine keimfähigen Samen mehr nachgewiesen werden. Die flache Bodenbearbeitung in Kombination mit Rapssorten, die eine geringe Persistenzneigung besitzen, ist demnach sehr gut geeignet, die Überdauerung der Samen im Boden zu minimieren.

Für die Ermittlung des Zustands der Samenbank und des darin enthaltenen Potentials transgener Rapssamen erwies sich die Probennahme mittels Bohrstock als hervorragende Methode. Die Charakterisierung der Samenbank mit Hilfe von Bodenproben wurde von LUTMAN et al. (2002) als sehr repräsentativ bewiesen, indem als Kontrolle zusätzlich zu den Samen kleine Plastikkügelchen in den Boden eingebracht wurden. Die Umrechnung der in den Bodenproben gefunden Kügelchen auf die gesamte Fläche entsprach dem ursprünglichen Eintrag dabei genauer als bei Versuchen, die die Samenbank mit Hilfe der Ermittlung von Keimlingen charakterisierten (BARBERI et al., 1998). Da es bereits vor der Ernte zu nicht unerheblichem Sameneintrag in den Boden kommen kann, dürfte der tatsächliche Eintrag in die Samenbank sogar noch deutlich über dem hier festgestellten liegen. Bezogen auf den höheren Eintrag fällt der Rückgang der Samenbank daher noch stärker aus.

In vorausgegangenen Studien wurde bereits festgestellt, daß die in der vorliegenden Arbeit verwendete transgene Rapsorte 'Falcon GS40/90' und ihre Ausgangssorte 'Falcon' nur eine relativ geringe Lebensfähigkeit im Boden haben (PEKRUN et al., 1998; GRUBER et al., 2001). Dies wurde auch durch neuere Untersuchungen von BEISMANN et al. (2003) bestätigt, die die Samenbanken von zehn Flächen ehemaliger Freisetzungsversuche von 'Falcon GS40/90' untersuchten und dabei nur auf den Flächen, bei denen der Rapsanbau maximal fünf Jahre zurücklag, lebensfähige Samen fanden.

Das Persistenzvermögen transgener Sommerrapssamen im Boden wurde von BLOCK et al. (2004) bestimmt. Von bayerischen Praxisflächen, die im Jahre 2000 mit Rapssaatgut der Sorte 'Hyola' bestellt worden waren und versehentlich 0,4 % bzw. 0,2 % *epsps*- und *pat*-Gen haltige Samen aufwiesen, wurden fünf repräsentative Flächen über drei Jahre auf ihren Transgenanteil in Saatgut, Erntegut sowie im Ausfallraps untersucht.

Mit Hilfe der quantitativen PCR wurden die Transgenanteile des *epsps*- und des *pat*-Gens im Durchwuchsraps exakt bestimmt. Trotz unterschiedlicher Bodenbearbeitungsmaßnahmen und Folgekulturen wurde auf allen untersuchten Flächen, die Transgenanteile im Saatgut gezeigt hatten und von denen Proben gesammelt werden konnten, auch zwei Jahre nach der Aussaat noch transgener Durchwuchsraps mit dem *pat*-Gen (0,02 % - 0,15 %) sowie dem *epsps*-Gen (0,05 % - 0,36 %) gefunden. Die Ergebnisse zeigten, daß die Transgenanteile für beide Gene im Erntegut und im Ausfallraps im Vergleich zum Saatgut durchschnittlich gleichen blieben. Es kam weder zu einer Aufschaukelung noch zu einer Reduzierung dieser Genfrequenzen. Anhand einzelner Ereignisse konnte jedoch eine Selektion herbizidtoleranter Pflanzen durch Anwendung des Komplementärherbizids vermutet werden.

Die Neigung zur Bildung von Dormanz wird bei Wildpflanzen häufig durch die Samenhülle beeinflusst, die aus maternalem Gewebe stammt (MAYER & POLJAKOFF-MAYBER, 1975). Für den Fall, daß maternale Effekte ausschlaggebend sind, kommt der Befruchtungsrichtung für die Persistenz der entstehenden Hybriden eine wichtige Rolle zu. Die Befruchtung einer Wildart mit transgenen Rapspollen würde dann zu Samen führen, die bessere Voraussetzungen bezüglich Persistenzbildung aufweisen als umgekehrt. Andererseits reagieren Wildpflanzen bei der Auslösung des

Keimungsreizes oft sehr unterschiedlich auf Umwelteinflüsse, so daß die Keimfähigkeit von Hybriden nicht zwingend vom Keimungsverhalten der Eltern abgeleitet werden kann. ADLER et al. (1993) konnten die Bedeutung der Befruchtungsrichtung für die Persistenz der entstehenden Hybriden am Beispiel von wildem und kultiviertem *B. rapa* belegen. Im Gegensatz dazu stellten allerdings LANDBO & JØRGENSEN (1997) unabhängig von der Befruchtungsrichtung eine nur geringe Dormanzneigung bei Raps-Rübsen-Hybriden fest, die der des Elternteils Raps entsprach. Rückkreuzungen, d.h. die Befruchtung von *B. napus* (♀) x *B. rapa* (♂) – Hybriden mit *B. rapa*, führten zu Samen, die ein unterschiedliches Keimungsverhalten und einen gewissen Anteil dormanter Samen aufwiesen. Auch LINDER (1998) konnte am Beispiel eines Genkonstrukts für veränderte Fettsäurezusammensetzung bei Raps zeigen, daß dieses je nach genetischem Hintergrund der Empfängerpflanze unterschiedliche Effekte auf die Dormanzbildung haben kann.

Fruchtfolgen mit einem hohem Rapsanteil können durch Akkumulierung von Samen im Boden die Problematik großer Samenbanken und des daraus resultierenden verstärkten Rapsdurchwuchses erhöhen. Eine zusätzliche Schwierigkeit ergibt sich bei der Bekämpfung von transgenem Durchwuchsraps in konventionellen Rapsbeständen. Da sich die verschiedenen Rapssorten z.T. deutlich in ihrer Neigung zur Ausbildung sekundärer Dormanz unterscheiden (SCHLINK, 1994; PEKRUN et al., 1997c), wäre ein Ansatzpunkt zur Verringerung dieser Problematik auch die Verwendung von Rapssorten mit geringer Dormanzneigung.

4.3.2 Einfluß von Bodenbearbeitungsmaßnahmen

Einen entscheidenden Einfluß auf die Persistenz der Samen in landwirtschaftlich genutzten Böden übt die Art der Bodenbearbeitung aus. Bereits durch eine einmalige Bodenbearbeitung mit dem Striegel kommt nach ROLLER et al. (2003) über die Hälfte der Rapssamen zur Keimung. Nach Einsatz des Grubbers keimten 30 % der Samen, während durch Pflügen nur 1 % der Samen zum Keimen gebracht werden konnten, da durch die Verlagerung der Samen in tiefere Bodenschichten kein Keimungsreiz ausgelöst wird. Eine Bodenbearbeitung mit dem Pflug führt zu einer wesentlich stärkeren Verlagerung der Samen in tiefere Bodenschichten als mit einem Grubber (COUSENS & MOSS, 1990; ROGER-ESTRADE et al., 2000).

Rapssamen können auf der Bodenoberfläche keine sekundäre Dormanz ausbilden. PEKRUN et al. (1998) schlagen daher als effektivstes Mittel zur Vermeidung von Durchwuchsraps vor, auf jegliche Bodenbearbeitung nach der Rapsernte zu verzichten. Da unter europäischen Bedingungen jedoch ein Verzicht auf Bodenbearbeitungsmaßnahmen in der Regel nicht durchführbar ist, sollte eine Stoppelbearbeitung erst im nächsten Frühjahr durchgeführt werden. Dies würde allerdings eine Umstellung von Winter- auf Sommerkulturen bedeuten und kommt daher für die meisten landwirtschaftlichen Betriebe nicht in Betracht. Zumindest aber sollte die Bodenbearbeitung erst vier Wochen nach der Ernte stattfinden und dann durch flache Bodenbearbeitung gute Auflaufbedingungen schaffen. Dies wäre in der landwirtschaftlichen Praxis kein Problem, da die Folgefrucht meist Winterweizen ist und erst im Herbst angesät wird. Eine pfluglose Bodenbearbeitung ist dabei in jedem Fall vorzuziehen, da durch die Verfrachtung der Samen in tiefere Bodenschichten gute Voraussetzungen für die Ausbildung sekundärer Dormanz geschaffen werden.

Der positive Effekt eines Verzichts auf Bodenbearbeitung in den ersten Wochen nach der Rapsernte auf die Reduzierung der Samenbank konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (s. 3.4.2). Ca. drei Wochen nach der Ernte und zunächst unter Verzicht auf jegliche Bodenbearbeitung wurde im letzten Versuchsjahr an ausgewählten Parzellen die Anzahl der aufgelaufenen Keimlinge ermittelt (Tabelle 28). Nach anschließender flacher Bodenbearbeitung mit dem Grubber erfolgte die erneute Ermittlung der Anzahl auflaufender Keimlinge. Die im Vergleich zum ursprünglichen Sameneintrag während der Ernte hohe Auflaufquote vor der Bodenbearbeitung (Tabelle 27) und die offensichtlich nur noch geringe Keimfähigkeit der verbliebenen Samen, die sich aus dem relativ geringen Auflauf nach der Bodenbearbeitung ergibt, sowie die Berücksichtigung der bereits ausgeführten Verhinderung der Ausbildung sekundärer Dormanz durch Verbleib der Samen an der Oberfläche und Tierfraß legen den Schluß nahe, daß dies, v.a. in Verbindung mit pflugloser Bodenbearbeitung, eine sehr effektive Methode ist, um den Umfang der Samenbank gering zu halten ist. Die Abnahme der Samenbank konnte durch die Untersuchung von Bodenproben bestätigt werden.

Ergänzende Maßnahmen zur Reduzierung der Samenbank und des Auflaufapses sind die Minimierung der Ernteverluste durch den richtigen Erntezeitpunkt, eine optimale Erntetechnik und ein gutes Unkrautmanagement in den Folgekulturen.

4.4 Monitoring

Da Raps in Europa eine Vielzahl von kreuzungskompatiblen Verwandten besitzt, hängen die Möglichkeiten und das Ausmaß ökologischer Folgen, die eine Hybridisierung und unkontrollierte Ausbreitung von transgenem Raps zur Folge haben könnten, vom regionalen Vorkommen potentieller Kreuzungspartner ab und müssen daher für jedes Land gesondert beurteilt werden (OECD, 1997).

Zuständig für die Erarbeitung von Vorschlägen, welche Kriterien in einem Monitoringkonzept berücksichtigt werden müssen, ist in Deutschland die 'Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik' unter der Leitung des Umweltbundesamtes sowie die Arbeitsgruppe 'Anbaubegleitendes Monitoring gentechnisch veränderter Pflanzen im Agrarökosystem' an der Biologischen Bundesanstalt in Braunschweig (WILHELM et al., 2003).

Die Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG (Art. 13, 19 und 20) sieht vor, daß der Anmelde- bzw. Vertreter von GVO bereits bei der Antragstellung auf Genehmigung einer Inverkehrbringung einen entsprechenden Monitoringplan vorlegen muß. Allgemeine Richtlinien eines Überwachungsplans sind im Annex VII der Freisetzungsrichtlinie aufgeführt (detaillierte Zusammenstellung der Richtlinien siehe WILHELM et al., (2003)). Die Freisetzungsrichtlinie macht allerdings keine konkreten Angaben darüber, welche Parameter verbindlich in einen Monitoringplan aufgenommen werden müssen. Grundsätzlich wird gefordert, einen Plan mit einer wissenschaftlich konzipierten Grundlage vorzulegen, daß die Größe des Beobachtungsraums in einem vernünftigen Verhältnis zu den jeweiligen Untersuchungszielen und -parametern stehen soll, den regionalen Besonderheiten Rechnung getragen wird und die Kosteneffizienz aller Maßnahmen gewährt ist. Soweit möglich, sollen Monitoringkonzepte zudem in bestehende Umweltbeobachtungsprogramme eingebunden werden (eine Übersicht solcher Programme findet sich z.B. bei ZÜGHART & BRECKLING (2003)). Die Ergebnisse des Monitorings sind der EU-Kommission und den zuständigen nationalen Behörden mitzuteilen.

Der Begriff Risikoforschung muß klar vom Begriff Monitoring abgegrenzt werden. Durch die Risikoforschung wird versucht, vor der Erteilung der Anbaugenehmigung durch zeitlich und räumlich begrenzte Labor- und Freisetzungsversuche, die nur mit der Auflage von Sicherheitsmassnahmen zur Minimierung der Ausbreitung und Persistenz der Pflanzen, der Gene und der Genprodukte durchgeführt werden dürfen, mögliche Gefahren von GVO für die Umwelt zu ermitteln und eine

Risikobewertung durchzuführen. Sobald transgene Pflanzen für den kommerziellen Anbau zugelassen sind, entfallen die räumlichen und - abgesehen von der zunächst auf 10 Jahre befristeten Anbaugenehmigung - zeitlichen Beschränkungen. Die Pflanzen werden Teil des Ökosystems und interagieren weiträumig und langfristig mit der Artengemeinschaft im Agrarraum. Aufgrund der komplexen Zusammenhänge ökologischer und evolutiver Prozesse im Agrarökosystem lassen sich langfristige Umweltwirkungen aus räumlich und zeitlich begrenzten Experimenten nur bedingt ableiten. Daher befasst sich das Monitoring anhand begründeter Hypothesen gezielt mit der Erfassung von Neben- und/oder Langzeitwirkungen auf Agrarökosysteme unter kommerziellen Anbaubedingungen von GVO und soll gleichzeitig als Frühwarnsystem für unerwünschte Wirkungen dienen. Begleituntersuchungen von Freisetzungen gentechnisch veränderter Pflanzen in Form eines Langzeitmonitorings sind die einzige praktikable Methode, um fundierte und umfassende Daten über das Umweltverhalten und mögliche Risiken transgener Pflanzen zu sammeln.

In verschiedenen Studien wurde versucht, praktikable und relevante Parameter für ein Monitoringkonzept zu identifizieren (z.B. TOLSTRUP et al., 2003; ZÜGHART & BRECKLING, 2003; SANVIDO et al., 2004). Wesentliche Kriterien bei der Auswahl konkreter Messgrößen sind dabei die Erhebbarkeit, Handhabbarkeit und Auswertbarkeit der gewonnenen Daten. Darüber hinaus ist die Verfügbarkeit von Referenzwerten (d.h. Ergebnissen von Feldversuchen) zur Bewertung der Ergebnisse von entscheidender Bedeutung (ZÜGHART & BRECKLING, 2003). Bei der Risikobeurteilung von GVO muß zudem der Erfassung regionaler Aspekte und Besonderheiten (z.B. Größe der Felder und Betriebe, Anbaustruktur, Wildpflanzenpopulationen, Ruderalstandorte, Biotope oder klimatische Gegebenheiten) eine vorrangige Rolle zukommen (SCP, 2001).

Bisher sind noch keine allgemeinen und technischen Richtlinien für ein Monitoring von transgenem Pollenflug ausgearbeitet. Diskutiert wird der Einsatz von stationären, passiven Massenpollenfiltern, die den Pollenflug während der gesamten Blüte erfassen (z.B. das vom Deutschen Wetterdienst standardmäßig verwendete Pollensammelgerät Sigma-2). Für eine hinreichende Raumrepräsentativität ist jedoch eine enorme Anzahl von Pollensammlern pro Fläche notwendig (KUHLMANN & BEISMANN, 2004). Im Gegensatz zu stationären Pollensammlern bietet ein mobiles Pollensammelsystem den Vorteil, daß sich mit geringem Aufwand selbst größere

Anbaugebiete gezielt beproben lassen und daß das Probenmaterial umgehend analysiert werden kann, so daß die Ergebnisse umgehend zur Verfügung stehen. Eine großräumige Aufstellung und wissenschaftliche Betreuung stationärer Fallen ist zudem sehr zeit- und kostenintensiv. Problematisch ist außerdem, daß es durch die lange Verweildauer der Pollen in den Sammelgeräten zu einer erheblichen Verschmutzung bzw. Degeneration der Pollenproben kommen kann, wodurch die nachfolgenden molekulargenetischen Analysen der Transgenanteile im Labor mit großen Fehlern behaftet sein können oder sogar unmöglich werden. Deshalb wäre der Einsatz eines mobilen Sammelsystems von Vorteil. Als Ergänzung zu einem Monitoringansatz wurde daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob eine mobile Pollenfalle zur schnellen Überprüfung großer Gebiete auf transgenen Rapspollen eingesetzt werden kann. Der eindeutige und gut reproduzierbare Nachweis PCR-Nachweis des *pat*-Gens aus Pollen der Objektträgerfallen sowie des *Brassica*-Referenzgens '*gluco*' nach Fangfahrten mit mobilen Pollenfalle haben gezeigt, daß der Einsatz einer mobilen Pollenfalle ein sehr nützliches Instrument zur Erfassung von transgenem Pollenflug darstellen könnte. Diese Methode wird bereits seit mehreren Jahren von der Firma EpiLogic GmbH erfolgreich genutzt, um pilzliche Sporen aus der Luft zu sammeln. Regelmäßig durchgeführte Fangfahrten in ganz Europa haben die Funktionalität sowie die Raumrepräsentativität der Sammeltechnik für Pilzsporen eindrucksvoll nachgewiesen.

4.4.1 Koexistenz

Koexistenz ist kein neues Phänomen in der Landwirtschaft. Die bisherige Erfahrung hat gezeigt, daß ein Neben- und Miteinander von ökologischer und konventioneller Landwirtschaft zwar gewisse Einschränkungen erfordert, aber ohne nennenswerte Schwierigkeiten zu erreichen ist. Die rechtlichen Voraussetzungen für den Anbau von GVO sind mit der Verabschiedung des Schwellenwerts für GVO-Beimischungen in Höhe von 0,9 % eindeutig. Welche Maßnahmen allerdings zur Einhaltung dieses Schwellenwertes ergriffen werden müssen, wird nach wie kontrovers diskutiert. Praxistaugliche Auflagen müssen dem spezifischen Auskreuzungsverhalten der jeweiligen Kulturart und den unterschiedlichen Agrarstrukturen in Deutschland Rechnung tragen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der bisher durchgeführten Studien zum Auskreuzungsverhalten von Raps (Tabelle 4) zeigen sehr deutlich, daß eine

Generalisierung der Auskreuzungsraten und Pollenflugdistanzen bei Raps nach derzeitigem Wissensstand nicht möglich ist. Für die Definition und Festlegung der erforderlichen Isolationsdistanzen unter Koexistenzbedingungen ergeben sich daraus große Unsicherheiten.

Eine Studie des SCIENTIFIC COMMITTEE ON PLANTS der EU (SCP, 2001) kommt zu dem Ergebnis, daß Auskreuzung über Pollen nur ein Faktor von vielen für die Ausbreitung von Transgenen ist (Tabelle 33). In der Tabelle sind dabei noch keine Verunreinigungen berücksichtigt, die während der Weiterverarbeitung auftreten können. Gefordert wird daher neben einem Monitoring der Umweltwirkungen auch, daß Empfehlungen zur 'guten fachlichen Praxis' erarbeitet und beim Anbau transgener Pflanzen beachtet werden.

Tabelle 33: Geschätzte Verunreinigung mit GVO während der verschiedenen Stadien der landwirtschaftlichen Produktion

	Raps (voll fertil)	Mais	Zuckerrübe
Saatgut	0,3 %	0,3 %	0,5 %
Saat	0 %	0 %	0 %
Auskreuzung	0,2 %	0,2 %	0,2 %
Durchwuchspflanzen	0,2 %	0 %	0,05 %
Ernte	0,01 %	0,01 %	0,01 %
Transport	0,05 %	0,01 %	0,01 %
Lagerung	0,05 %	0,05 %	0,1 %
Gesamt	0,81 %	0,57 %	0,67 %

Die Zahlen entsprechen Mittelwerten aus sechs verschiedenen Studien zur Koexistenz. Ihnen liegt die Annahme guter fachlicher Praxis zugrunde. Nach SCP, 2001

Beim GVO-Anbau stehen den Landwirten eine Reihe von anbautechnischen Maßnahmen zur Verfügung, mit denen eine ungewollte GVO-Verbreitung effektiv reduziert werden kann (Tabelle 34). Die Einhaltung von Isolationsabständen hat sich bereits bei der Produktion von konventionellem Saatgut als eine sehr wirksame Maßnahme zur Reinhaltung erwiesen. Bei einem großflächigem Anbau von GVO wird allerdings, v.a. bei kleinräumigen Strukturen, ein Mindestabstand nicht immer einzuhalten sein. Umso wichtiger ist in diesem Fall die umfassende Einhaltung aller zur Verfügung stehenden Mittel.

Tabelle 34: Maßnahmen zur Reduzierung von Pollen- und Samenverbreitung beim Anbau von GVO und ihre Effektivität

Maßnahme	Pollenverbreitung	Samenverbreitung
Saatgutuntersuchungen		XXX
Isolationsabstände	XXX	
Feldgröße	XXX	
Pufferzonen	XX	
Zeitl. Anbauabstand	X	XXX
Fruchtfolge	XX	XX
Durchwuchs-Kontrolle	XX	XXX
Reinigung d. Maschinen, Lager- räume etc.		XXX

XXX = sehr effektiv ; XX = effektiv ; X = wenig effektiv (nach TOLSTRUP et al., 2003)

Da Befruchtung durch fremde Pollen und Auskreuzung zum Fortpflanzungsmechanismus von Raps gehören, wird ein bestimmtes Maß an Auskreuzung bei großflächigem Anbau von transgenem Raps nie ganz zu vermeiden sein. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, da selbst von Parzellen mit einem geringen Transgenanteil in Höhe von 1 % und 0,1 % eine Auskreuzung in benachbarte Parzellen stattfand, wenn auch nur in einem sehr geringen Ausmaß.

Die 100 % transgenen Parzellen verursachten in unmittelbarer Nachbarschaft durchschnittliche Auskreuzungsraten von 0,29 %, die damit deutlich unterhalb des Schwellenwertes für eine Kennzeichnung lagen.

Neben dem Abstand zum Nachbarfeld ist dabei v.a. die Größe benachbarter Felder von großer Bedeutung. Nach Untersuchungen von REBOUD (2003) ist zur Reduzierung der Einsatz von Fangpflanzen, d.h. einem Randstreifen, der nach der Blüte entfernt werden kann, effektiver und ökonomisch sinnvoller als ein entsprechender Anbauabstand, für den dreimal so viel Fläche benötigt würde. Auch PFEILSTETTER et al. (1998) konnten durch die Verwendung eines Randstreifens die Auskreuzungsraten von transgenem Raps nach 8 m um 90 % reduzieren. In weiter entfernten Teilen eines Feldes kommt es durch die bestandeseigene Pollenproduktion zu Konkurrenzeffekten mit fremden Pollen und zu einem Verdünnungseffekt des Transgenanteils in der gesamten Erntepartie (FISCHBECK et al., 1998).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die EU-Mitgliedstaaten einigten sich mit Verabschiedung der Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG im Jahr 2001 darauf, gentechnisch veränderte Organismen (GVO) prinzipiell zuzulassen. Die Umsetzung der Richtlinie soll durch nationale Gesetzesvorlagen gewährleistet werden, die Monitoringkonzepte zur Erfassung möglicher Umweltwirkungen sowie Regelungen zur Sicherstellung der Koexistenz verschiedener Arten der Landwirtschaft beinhalten. Da die Risikobewertung transgener Pflanzen nach wie vor kontrovers diskutiert wird, untersuchte die vorliegende Arbeit mit einem Feldversuch unter landwirtschaftlichen Praxisbedingungen im Rahmen eines Bayerischen Monitoringprojektes das Potential von transgenem, herbizidresistentem Raps zur Persistenz und Ausbreitung.

Das Versuchsfeld enthielt neben den jährlich rotierenden Fruchtfolgegliedern Winterweizen und –gerste Parzellen mit Rübsen und Stilllegung. Zur Ermittlung der Auskreuzungsraten wurden Parzellen mit unterschiedlichen Anteilen der transgenen Sorte 'Falcon GS40/90' (100 %, 1,0 % und 0,1 %) sowie jeweils acht umgebende Parzellen mit der nicht-transgenen Ausgangssorte 'Falcon' angelegt. Mit Hilfe eines Biotests wurden insgesamt 630.000 Samen auf die Übertragung des *pat*-Gens untersucht. Die durchschnittlichen Auskreuzungsraten aus den 100 % transgenen Parzellen betrugen 0,29 %, während die 1,0 % und 0,1 % transgenen Parzellen, die eine Verunreinigung mit transgenem Saatgut simulierten, nur zu Auskreuzungen im Promillebereich führten. Eine vergleichende Analyse mit quantitativer real-time PCR lieferte teilweise höhere Auskreuzungsraten. Die Verteilung der Auskreuzungsereignisse war unabhängig von der Windrichtung und punktuell. Dies zeigt den bedeutenden Einfluß blütenbesuchender Insekten. Der Zusammenhang zwischen dem Rückgang der Auskreuzungsereignisse und der Distanz zur Pollenquelle wurde mit einer Regressionsgleichung ($R^2 = 0,66$) beschrieben.

Die Untersuchung des Hybridisierungspotentials mit kreuzungskompatiblen Kulturpflanzen ergab nur im ersten Versuchsjahr eine Auskreuzung des *pat*-Gens in Sommerrübsen in Höhe von 0,19 %. Mit Hilfe getopfter Rübsenpflanzen, die zur Rapsblüte neben den 100 % transgenen Parzellen aufgestellt wurden, konnte ein theoretisches Hybridisierungspotential in Höhe von 0,13 - 6,84 % gemessen werden. In Bezug auf Habitus und Kornansatz zeigten die Artbastarde deutliche morphologische Unterschiede gegenüber dem Elter Raps. Hybridisierung zwischen transgenem Raps und den Wildpflanzen Hirtentäschel und Hederich konnte nicht beobachtet werden.

Mit Hilfe stationärer Pollenfallen mit Vaseline-bestrichenen Objektträgern wurde die Pollenverbreitung bis in einer Entfernung von 250 m untersucht. Mit zunehmender Entfernung verringerte sich die Pollenzahl deutlich und erreichte zwischen 150 m und 250 m ein relativ konstantes Niveau von ca. 4 %. Die Pollenverteilung in unterschiedlichen Fanghöhen (1 - 4 m) war über die untersuchte Distanz sehr inhomogen. Dies deutet auf den Einfluss von Verwirbelungseffekten hin, die den Pollen in höhere Luftschichten verfrachten und größere Entfernungen überwinden lassen. Der Zeitraum der Blühperiode sowie die Anzahl freigesetzter Pollen wiesen erhebliche Jahrgangsunterschiede auf, wobei der Hauptpollenflug immer auf wenige Tage beschränkt war. Bei der Ernte kam es zum Eintrag von bis zu 14.146 Samen/m² in den Boden. Die Entnahme und Untersuchung von Bodenproben in den Transgen-Parzellen bis in einer Tiefe von 30 cm ergab, daß es durch die flache Bodenbearbeitung mit dem Grubber bereits im ersten Jahr nach der Ernte zu einer Reduktion der keimfähigen Samen in Höhe von 99,7 % - 100 % gekommen war. Während des gesamten Untersuchungszeitraums konnten bereits zwei Jahre nach der Ernte keine keimfähigen Samen mehr nachgewiesen werden. Auch in den Folgekulturen der Transgenparzellen wurde nach spätestens zwei Jahren kein Durchwuchsrap mehr in den Winterweizen und -gerstebeständen gefunden. Das Überdauerungspotential von Raps auf Ruderalstandorten wurde durch die Untersuchung des Brachstreifens um das Versuchsfeld ermittelt. Während die absolute Anzahl an Rapspflanzen dort zunahm, ging der relative Transgenanteil zurück. Die Einflüsse auf die Persistenz von Raps auf landwirtschaftlichen Kulturflächen werden diskutiert.

Als Instrument zur Überwachung des Pollenflugs transgener Pflanzen wurde der Einsatz einer mobilen Pollenfalle eingeführt. Entsprechende Optimierungen bei der DNA-Aufbereitung führten zu qualitativ hochwertiger Pollen-DNA für die PCR-Analyse. Die Eignung der Methode zum Monitoring großflächiger Anbaugelände konnte gezeigt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, daß eine gewisse Auskreuzung von transgenem Raps in benachbarte Rapsbestände zwar unvermeidbar ist, der gesetzliche Schwellenwert von 0,9 % jedoch selbst in unmittelbar benachbarten Feldern auch ohne umständliche und kostspielige Abstandsregelungen eingehalten werden kann. Da auch die Maßnahmen der üblichen 'guten landwirtschaftlichen Praxis' die Persistenz von transgenem Raps deutlich reduzieren können, ist die Koexistenz verschiedener Formen der Landwirtschaft mit und ohne Gentechnik möglich.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- ADLER LS, WIKLER K, WYNDHAM FS, LINDER CR, SCHMITT J (1993). Potential for persistence of genes escaped from canola: germination cues in crop, wild, and crop-wild hybrid *Brassica rapa*. *Funct Ecol* 7: 736-745
- AIGNER A, GEHRING K, ZELLNER M (1998). Ölfuchtbau: Winter- und Sommerraps. In: Die Landwirtschaft, Band 1, Pflanzliche Erzeugung. BLV Verlagsgesellschaft München: 432
- AMTSBLATT DER EUROPÄISCHEN UNION (2003)
http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2003/l_268/l_26820031018en00010023.pdf
- ANDERSON E (1949). Introgressive Hybridisation. John Wiley and Sons, New York
- ARAKAWA T, CHONG DKX, MERRITT JL, LANGRIDGE WHR (1997). Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Res* 6 (6): 403-413
- ARUMUGANATHAN K, EARLE ED (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* 9: 208-218
- ASKEW MF (1993). Volunteer potatoes from tubers and true potato seed. *Asp Appl Biol* 35: 9-15
- AUSUBEL FM, BRENT R, KINGSTON RE, MOORE DD, SEIDMAN JG, SMITH JA, STRUHL K (1999). *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th Edition, Wiley, New York
- AVENTIS CROPSCIENCE (2000). SeedLink: Kontrollierte Bestäubung
http://www.bayercropscience.de/imperia/md/content/gruene_gentechnik/info_shop/roschueren_pdf/4.pdf
- AYLOR DE, SCHULTES NP, SHIELDS EJ (2003). An aerobiological framework for assessing cross-pollination in maize. *Agric For Meteorol* 119: 111-119
- BAKER J, PRESTON C (2003). Predicting the spread of herbicide resistance in Australian canola fields. *Transgenic Res* 12: 731-737
- BARANGER A, CHÉVRE AM, EBER F, RENARD M (1995). Effect of oilseed rape genotype on the spontaneous hybridization rate with a weedy species: an assessment of transgene dispersal. *Theor Appl Genet* 91: 956-963
- BARBERI P, MACCHIA M, BONARI E (1998). Comparison between the seed extraction and seedling emergence methods of weed seedbank evaluation. *Weed Seedbanks: Determination, Dynamics and Manipulation. Asp Appl Biol* 51: 9-14
- BARTON J, CRANDON J, KENNEDY D & MILLER H (1997). A model protocol to assess the risks of agricultural introductions. *Nat Biotechnol* 15: 845-848

- BARTSCH D, POHL-ORF M (1996). Ecological aspects of transgenic sugarbeet: Transfer and expression of herbicide resistance in hybrids with wild beets. *Euphytica* 91: 55-58
- BARTSCH D, SCHMIDT M, POHL-ORF M, HAAG C, SCHUPHAN I (1996). Competitiveness of transgenic sugar beet resistant to beet necrotic yellow vein virus and potential impact on wild beet populations. *Mol Ecol* 5: 199-205
- BARTSCH D, SCHMIDT M (1997). Influence of sugar beet breeding on populations of *Beta vulgaris* ssp. *Maritima* in Italy. *J Veg Sci* 8: 81-84
- BARTSCH D, LEHNEN M, CLEGG J, POHL-ORF M, SCHUPHAN I, ELLSTRAND NC (1999). Impact of gene flow from cultivated beet on genetic diversity of wild sea beet populations. *Mol Ecol* 8: 1733-1741
- BATEMAN AJ (1947). Contamination of seed crops III. Relation with isolation distance. *Heredity* 1: 303-335
- BATEMAN AJ (1950). Is gene dispersal normal? *Heredity* 4: 353-363
- BBA (BIOLOGISCHE BUNDESANSTALT) (2002). Jahresbericht der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 2002: 99-108
- BDP (BUND DEUTSCHER PFLANZENZÜCHTER) (2004). Monitoring von GVP nach Inverkehrbringung. <http://www.bdp-online.de/monitoring.pdf>
- BECKER HC, DAMGAARD C, KARLSSON B (1992). Environmental variation for outcrossing rate in rapeseed (*Brassica napus*). *Theor Appl Genet* 84: 303-306
- BEISMANN H, ROLLER A, ZEITLER R (2003). Assessing the number of transgenic oilseed rape seeds in the soil seedbank of former release sites. *Asp Appl Biol* 69: 209-215
- BENECH-ARNOLD RL, SANCHEZ RA, FORCELLAB F, KRUKA BC, GHERSA CM (2000). Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *Field Crops Res* 67: 105-122
- BING, DJ (1991). Potential of gene transfer among oilseed *Brassica* and their weedy relatives. MSc Thesis. University of Saskatchewan
- BING DJ, DOWNEY RK, RAKOW GFW (1996). Hybridization among *Brassica napus*, *B. rapa* and *B. juncea* and their two weedy relatives *B. nigra* and *Sinapis arvensis* under open pollination conditions in the field. *Plant Breed* 115: 470-473
- BLOCK A (2004). Entwicklung und Validierung von qualitativen und quantitativen Nachweisverfahren für gentechnisch veränderten Raps. Diss. Rerum Naturum <http://tumb1.biblio.tu-muenchen.de/publ/diss/ww/2004/block.pdf>
- BLOCK A, WENZEL G, ZEITLER R, SCHWARZ G (2004) Persistence of accidentally released GM oilseed rape in agricultural environment. *Proceedings of the GfÖ* 34: 277 (http://www.uni-giessen.de/gfoe2004/programme_Dateien/pdf_files/SYMP15_271-286.pdf)

- BOCK AK, LHEUREUX K, LIBEAU-DULOS M, NILSAGÅRD H, RODRIGUEZ-CEREZO E (2002). Scenarios for co-existence of genetically modified, conventional and organic crops in European agriculture. Joint Research Centre, European Commission
http://www.jrc.cec.eu.int/download/GMCrops_coexistence.pdf
- BOOTH EJ, WALKER KC, WHYTOCK GP, SOVERO M (1996). Assessment of the ecological consequences of introducing transgenic rapeseed. 4th ESA Congress, Book of Abstracts (Persistence of oil-modified oilseed rape, *Sinapis arvensis* and *Brassica nigra*): 144-145
- BORDONI R, MEZZELANI A, CONSOLANDI C, FROSINI A, RIZZI E, CASTIGLIONI B, SALATI C, MARMIROLI N, MARCHELLI R, ROSSI BERNARDI L, BATTAGLIA C, DE BELLIS G (2004). Detection and quantitation of genetically modified maize (Bt-176 transgenic maize) by applying Ligation Detection Reaction and Universal Array Technology. J Agricult Food Chem 52: 1049-1054
- BORNHOFF BA, HARST M, TÖPFER R (2004). Untersuchungen zur Bestimmung des Pollenfluges bei Weinreben mittels transgener Pflanzen. In: Gesellschaft für Pflanzenzüchtung e.V. (ed.) Vorträge für Pflanzenzüchtung 64: 157-159
- BOTTERMAN J (1996). Pollination control in transgenic oilseed rape and maize. In: Transgenic plants - from the lab into the field, March 1-2 1996. Gesellschaft für Pflanzenzüchtung e.V (ed.) Köln-Vogelsang: 33
- BOUDRY P, MÖRCHEN M, SAUMITOU-LAPRADE P, VERNET P, VAN DIJK H (1993). The origin and evolution of weed beets: consequences for the breeding and release of herbicide-resistant transgenic sugar beets. Theor Appl Genet 87: 471-478
- BOWERMAN P (1984). Comparison of harvesting methods of oilseed rape. In: Agronomy, physiology, plant breeding and crop protection of oilseed rape. Asp Appl Biol 6: 157-165
- BRÄUTIGAM M, HERTEL C, HAMMES W (1997). Evidence for natural transformation of *Bacillus subtilis* in foodstuffs. FEMS Microbiol Lett 155: 93-98
- BRANDT P (1995). Transgene Pflanzen: Herstellung, Anwendung, Risiken und Richtlinien. Birkhäuser, Basel
- BROWN J, ERICKSON DA, DAVIS JB, BROWN AP (1995). Effects of swathing on yield and quality of spring canola (*Brassica napus* L.) in the pacific North West. In: Proceedings 9th International Rape Seed Congress, Cambridge 1: 339-341
- BROWN J, BROWN AP (1996). Gene transfer between canola (*Brassica napus* L.) and *B. campestris* L.) and related weed species. Ann Appl Bio 129: 513-522
- BROWN AP, BROWN J, THILL DC, BRAMMER TA (1996). Gene transfer between canola (*Brassica napus*) and related weed species. Cruciferae Newsletter 18: 36-37
- BRYNGELSSON T, GUSTAFSSON M, GRÉEN B, LIND C (1988). Uptake of host DNA by the parasitic fungus *Plasmodiophora brassicae*. Physiol Mol Plant Path 33: 163-171

- BUNDESGESETZBLATT (1986). Verordnung über den Verkehr mit Saatgut landwirtschaftlicher Arten und von Gemüsesorten. Bundesgesetzblatt Teil 1 vom 21.01.1986
- CARRUTHERS DJ, HOLROYD JCR, HUNT JCR, WENG WS, ROBINS AG, APSLEY DD, THOMSON DJ, SMITH FB (1994). UK-ADMS: A new approach to modelling dispersion in the earth's atmospheric boundary layer. *J Wind Engng* 52: 139-153
- CELI FS, ZENILMAN ME, SHULDINER AR (1993). A rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR. *Nucleic Acids Res* 21: 1047
- CHADOEUF R, DARMENCY H, MAILLET J, RENARD M (1998). Survival of buried seeds of interspecific hybrids between oilseed rape, hoary mustard and wild radish. *Field Crops Res* 58: 197-204
- CHAMBERLAIN AC, CHADWICK RC (1972). Deposition of spores and other particles on vegetation and soil. *Ann Appl Biol* 71: 141-158
- CHARLES CI, ULRICH T (1993). Biotechnology in the Food Industry. *Bio/Technology* 11: 895 - 902
- CHÈVRE AM, EBER F, BARANGER A, KERLAN MC, BARRET P, FESTOC G, VALLEE P, RENARD M (1996). Interspecific gene flow as a component of risk assessment for transgenic Brassicas. *Acta Hort* 407: 169 –179
- CHÈVRE AM, EBER F, BARANGER A, RENARD M (1997). Gene flow from transgenic crops. *Nature* 389: 924
- CHÈVRE AM, EBER F, BARANGER A, HUREAU G, BARRET P, PICAULT H, RENARD M (1998). Characterization of backcross generations obtained under field conditions from oilseed rape-wild radish F1 interspecific hybrids: an assessment of transgene dispersal. *Theor Appl Genet* 97: 90-98
- CHÈVRE AM, EBER F, DARMENCY H, FLEURY A, PICAULT H, LETANNEUR JC, RENARD M (2000). Assessment of interspecific hybridization between transgenic oilseed rape and wild radish under normal agronomic conditions. *Theor Appl Genet* 100: 1233-1239
- COLBACH N, MEYNARD JM, CLERMONT-DAUPHIN C (1999). GeneSys: A model of the effects of cropping system on gene flow from transgenic rapeseed. In: *Gene Flow and Agriculture: Relevance for Transgenic Crops*. PJW Lutman (ed.) BCPC Symposium Proceedings 72: 89-94
- COUSENS RD, MOSS SR (1990). A model of the effects of cultivation on the vertical distribution of weed seeds within the soil. *Weed Res* 30: 61-70
- CRAWLEY MJ (1990). The ecology of genetically engineered organisms: assessing the environmental risks. In: *Introduction of genetically modified organisms into the environment*. HA Mooney, G Bernardi (eds.) Wiley, Chichester, UK: 133-150
- CRAWLEY MJ, HAILS RS, REES M, KOHN D, BUXTON J (1993). Ecology of transgenic oilseed rape in natural habitats. *Nature* 363: 620-623

- CRESSWELL JE, OSBORNE JL, BELL SA (2002). A model of pollinator-mediated gene flow between plant populations with numerical solutions for bumblebees pollinating oilseed rape. *Oikos* 9: 375-384
- CRL (COMMUNITY REFERENCE LABORATORY). <http://gmo-crl.jrc.it/default.htm>
- DALE PJ (1992). Spread of engineered genes to wild relatives. *Plant Physiol* 100: 13-15
- DALE PJ, MCPARTLAN HC, PARKINSON R, MACKAY GR & SCHEFFLER JA (1992). Gene dispersal from transgenic crops by pollen. In: *The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. Proceedings of the 2nd International Symposium in Goslar*. R Casper, J Landsmann (eds.) Biologische Bundesanstalt, Braunschweig: 73-77
- DALE PJ, IRWIN JA, SCHEFFLER JA (1993). The experimental and commercial release of transgenic crop plants. *Plant Breed* 111: 1-22
- DARMENCY H, LEFOL E, FLEURY A (1998). Spontaneous hybridizations between oilseed rape and wild radish. *Mol Ecol* 7: 1467-1473
- DARMENCY H, FLEURY A (2000). Mating system in *Hirschfeldia incana* and hybridization to oilseed rape. *Weed Res* 40: 231-238
- DESPLANQUE B, BOUDRY P, BROOMBERG K, SAUMITOU-LAPRADE P, CUGUEN J, VAN DIJK H (1999). Genetic diversity and gene flow between wild and cultivated forms of *Beta vulgaris* L. (Chenopodiaceae), assessed by RFLP and microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 98: 1194-1201
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (2002). DIN 53804: Statistische Auswertungen. Teil 1: Kontinuierliche Merkmale. Beuth Verlag, Berlin
- DEUTSCHES MAISKOMITEE (2005). Koexistenz von GVO- und konventionellem Mais ist möglich. News 2/2005
http://maiskomitee.de/dmk_download/news_de/0205_Koexistenz_ist_moeglich.pdf
- DE VRIES J, MEIER P, WACKERNAGEL W (2001). The natural transformation of the soil bacteria *Pseudomonas stutzeri* and *Acinetobacter* sp. by transgenic plant DNA strictly depends on homologous sequences in the recipient cells. *FEMS Microbiol Lett* 195: 211-215
- DIETZ-PFEILSTETTER A, GLAND-ZWERGER A, GARBE V. (1999). Potential und Bewertung von Auskreuzungen aus gentechnisch verändertem Raps. *Nachrichtenbl Deut Pflanzenschutz* 51: 14-19
- DIETZ-PFEILSTETTER A, BÜBL W, STELLING D (2003). Occurrence of transgenic progenies in the harvest of winter oilseed rape variety trials. *Nachrichtenbl Deut Pflanzenschutz* 55 (6): 134-137
- DOWNEY RK (1999). Gene Flow and rape - the Canadian experience. In: *Gene Flow and Agriculture: Relevance for Transgenic Crops*. PJW Lutman (ed.) BCPC Symposium Proceedings No. 72: 109-116

- DRÖGE W, BROER I, PÜHLER A (1992). Transgenic plants containing the phosphinothicin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide L-phosphinothicin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta* 187: 142-151
- EASTHAM K, SWEET J (2002). Genetically modified organisms (GMOs): The significance of gene flow through pollen transfer. Environmental Issue Report No. 28. European Environment Agency (ed.) Kopenhagen
http://reports.eea.eu.int/environmental_issue_report_2002_28/en/tab_content_RLR
- EBER F, CHÉVRE AM, BARANGER A, VALLÉE P, TANGUY X, RENARD M (1994). Spontaneous hybridization between a male-sterile oilseed rape and two weeds. *Theor Appl Genet* 88: 362-368
- ECKELKAMP C, MAYER M, WEBER B (1997). BASTA-resistenter Raps. Vertikaler und horizontaler Gentransfer unter besonderer Berücksichtigung des Standortes Wölfersheim-Melbach. Werkstattreihe 100, Öko-Institut e.V., Freiburg
- EIJLANDER R, STIEKEMA WJ (1994). Biological containment of potato (*Solanum tuberosum*): Outcrossing to the related wild species black nightshade (*Solanum nigrum*) and bittersweet (*Solanum dulcamara*). *Sex Plant Reprod* 7: 29-40
- ELLSTRAND NC, DEVLIN B, MARSHALL DL (1989). Gene flow by pollen into small populations: data from experimental and natural stands of wild radish. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9044-9047
- ELLSTRAND NC, HOFFMANN CA (1990). Hybridization as an avenue of escape for engineered genes – strategies for risk reduction. *Bioscience* 40 (6): 438-442
- EMBERLIN J, MULLINS J, CORDEN J, JONES S, MILLINGTON W, BROOKE M, SAVANGE M (1999). Regional variations in grass pollen seasons in the UK, long-term trends and forecast models. *Clin Exp Allergy* 29: 347-356
- EMBL (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY) (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>)
- EPA (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY) (2001). Biopesticides Registration Action Document - *Bacillus thuringiensis* Plant-Incorporated Protectants. Product Characterization.
http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/pips/bt_brad2/2-id_health.pdf
- EUROPEAN COUNCIL (2001). 2001/18/EC European Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC - Commission Declaration. Official Journal of the European Community. L106: 0001-0039
http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2001/l_106/l_10620010417en00010038.pdf
- EVENHUIS A, ZADOKS JC (1991). Possible hazards to wild plants of growing transgenic plants. A contribution to risk analysis. *Euphytica* 55: 81-84
- FACCIOTTI MT, BERTAIN PB, YUAN L (1999). Improved stearate phenotype in transgenic canola expressing a modified acyl-acyl carrier protein thioesterase. *Nat Biotechnol* 17: 593-597

- FAO (2005). FAOSTAT data
<http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>
- FDA (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION) (2000): Biotechnology Consultation Note to the File BNF No. 000066
<http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/bnfm066.html>
- FELDMANN S (2000). Begleitforschung zur Freisetzung herbizidresistenter, transgener Rapspflanzen 1995-1999. Niedersächsisches Landesamt für Ökologie (ed.) Nachhaltiges Niedersachsen 13 - Dauerhaft umweltgerechte Entwicklung: 1-57
- FINCHAM JRS (1989). Transformation in fungi. *Microbiol Rev* 53: 148-170
- FISCHBECK G (1997). Zusammenfassende Bewertung des modellhaften Anbaus transgener Nutzpflanzen. In: FORBIOSICH – Ergebnisse Biologischer Sicherheitsforschung in Bayern 1993-1998
- FISCHBECK G, JAHOR A, WENZEL G (1998). Modellhafter Anbau transgener Nutzpflanzen zum Studium ihrer Wechselwirkungen mit der Umwelt. Teilprojekt A 1: Auswirkungen des Anbaus transgener Nutzpflanzen mit *pat*-Gen vermittelter Herbizidtoleranz auf die Umwelt. Abschlußbericht FORBIOSICH, Bayerische Forschungsförderung
- FISCHER R, EMANS N (2000). Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Res* 9: 279–299
- FÖRSTER E (1994). An improved general method to generate internal standards for competitive PCR. *BioTechniques* 16 (1): 18-20
- FREDSHAVEN JR, POULSEN GS (1996). Growth behaviour and competitive ability of transgenic crops. *Field Crops Res* 45: 11-18
- FREE JB, WILLIAMS H, LONGDEN PC, JONSSON MG (1975). Insect pollination of sugar beet (*Beta vulgaris*) seed crops. *Annals Appl Biol* 81: 127-134
- FREE JB (1993). Insect pollination of crops. Academic Press, London
- FRELLO S, HANSEN KR, JENSEN J, JORGENSEN RB (1995). Inheritance of rapeseed (*Brassica napus*)-specific RAPD markers and a transgene in the cross *B. juncea* x (*B. juncea* x *B. napus*). *Theor Appl Genet* 91: 236-241
- GALEN C (1992). Pollen dispersal dynamics in an alpine wildflower, *Polemonium viscosum*. *Evolution* 46: 1043-1051
- GERDEMANN-KNÖRCK M, TEGEDER M (1997). Kompendium der für Freisetzungen relevanten Pflanzen. *Brassicaceae, Beta vulgaris, Linum usitatissimum*. UBA Texte 38/97. Umweltbundesamt (ed.) Berlin
- GERHARDS R, JUROSZEK P, KLÜMPER H, KÜHBAUCH W (1998). Möglichkeiten zur photobiologischen Unkrautregulierung auf Ackerschlägen. *Pflanzenbauwissenschaften* 2 (2): 91-96, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

- GEROWITT B (1998). Untersuchungen zur Abnahme des Samenvorrates von *Galium aparine* L. im Boden unter dem Einfluß der Bodenbearbeitung. J Plant Dis Prot Special Issue XVI: 91-98
- GIDDINGS GD, SACKVILLE HNR, HAYWARD MD (1997). The release of genetically modified grasses. Part 1: pollen dispersal to traps in *Lolium perenne*. Theor Appl Genet 94: 1000-1006
- GIDDINGS G (2000). Modelling the spread of pollen from *Lolium perenne*. The implications for the release of wind-pollinated transgenics. Theor Appl Genet 100: 971-974
- GILLILAND G, PERRIN S, BLANCHARD K, BUNN F (1990). Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci 87: 2725-2729
- GROOM-ADAMS B, EMBERLIN J, CORDEN J, MILLINGTON W, MULLINS J (2002). Predicting the start of the birch pollen season at London, Derby and Cardiff, United Kingdom, using a multiple regression model, based on data from 1987 to 1997. Aerobiologia 18: 117-123
- GRUBER S, PEKRUN C, CLAUPEIN W (2001). Genotypische Variation der Entwicklung sekundärer Dormanz bei Raps. Tagungsband der 44. Jahrestagung der Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften. Mitt Ges Pflanzenbauwiss 13: 250-251
- GULDEN RH, THOMAS AG, SHIRTLIFFE SJ (2004). Relative contribution of genotype, seed size and environment to secondary seed dormancy potential in Canadian spring oilseed rape (*Brassica napus*). Weed Res 44 (2): 97-106
- HAILS RS, REES M, KOHN D, CRAWLEY MJ (1997). Burial and seed survival in *Brassica napus* subsp. *oleifera* and *Sinapis arvensis* including a comparison of transgenic and non-transgenic lines of the crop. Proc R Soc Lond B 264: 1-7
- HALFHILL MD, MILLWOOD RJ, RAYMER PL, STEWART CN JR. (2002). Bt-transgenic oilseed rape hybridization with its weedy relative, *Brassica rapa*. Environ Biosafety Res 1: 19-28
- HALFHILL MD, ZHU B, WARWICK SI, RAYMER PL, MILLWOOD RJ, WEISSINGER K, STEWART JR. CN (2004). Hybridization and backcrossing between transgenic oilseed rape and two related weed species under field conditions. Environ Biosafety Res 3: 73-81
- HALL L, TOPINKA K, HUFFMAN J, DAVIS L, GOOD A (2000). Pollen flow between herbicide-resistant *Brassica napus* is the cause of multiple-resistant *B. napus* volunteers. Weed Sci 48: 688-694
- HANSEN LB, SIEGISMUND HR, JØRGENSEN RB (2001). Introgression between oilseed rape (*Brassica napus* L.) and its weedy relative *B. rapa* L. in a natural population. Genetic Resources and Crop Evolution 48: 621-627
- HELBIG N, VOGEL B, VOGEL H, FIEDLER F (2004). Numerical modelling of pollen dispersion on the regional scale. Aerobiologia 20: 3-19

- HELLER, KJ, GEIS, A, NEVE, H (1995). Behaviour of genetically modified microorganisms in yoghurt. *Syst Appl Microbiol* 18: 504-509
- HEPTING L & OLTMANN W (1985). In: Lehrbuch der Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen – Band 2 spezieller Teil. W Hoffmann, A Mudra, W Plarre (eds.) Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg: 152-173
- HERTEL, C, PROBST, AJ, CAVADINI, C, MEDING, E, HAMMES, WP (1995). Safety assessment of genetically modified microorganisms applied in meat fermentation. *Syst Appl Microbiol* 18: 469-476
- HIDALGO PJ, MANGIN A, GALÁN C, HEMBISE O, VÁZQUEZ LM, SANCHEZ O (2002). An automated system for surveying and forecasting *Olea* pollen dispersion. *Aerobiologia* 18: 23-31
- HÖRTNER H (1997). Nachweismöglichkeiten gentechnisch hergestellter Lebensmittel. *Ernährung/Nutrition* 21: 443-446
- HOFFMANN T, GOLZ C, SCHIEDER O (1994). Foreign DNA sequences are received by a wild-type strain of *Aspergillus niger* after coculture with transgenic higher plants. *Curr Genet* 27: 70-76
- HOFFMANN M, KÖHLER W (2000). Modellierung von Genfluss und Verwilderung bei transgenen Zuckerrüben (*Beta vulgaris* convar. *Altissima* DÖLL). In: Biologische Sicherheitsforschung bei Freilandversuchen mit transgenen Organismen und anbaubegleitendes Monitoring. Proceedings zum BMBF-Statusseminar 23.-30. Juni 1999. J Schiemann (ed.) Braunschweig: 101-110
- HOLLAND P, ABRAMSON RD, WATSON R, GELFAND DH (1991). Detection of specific polymerase chain reaction products by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7276-7280
- HÜBNER, P, STUDER, E, LÜTHY, J (1999). Quantitation of genetically modified organisms in food. *Nat Biotechnol* 17: 1137-1138
- HUNT JRC, HIGSON HL, WALKLATE PJ, SWEET JB (2001). Modelling the dispersion and cross-fertilisation of pollen from GM crops. Final report to the Department for Environment, Food and Rural Affairs (formerly Ministry of Agriculture, Fisheries and Food). Cambridge Environmental Research Consultants Ltd., Cambridge
- HUPFER C, HOTZEL H, SACHSE K, ENGEL KH (1998). Detection of the genetic modification in heat treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Z Lebensm Unters Forsch* 206: 203-207
- INGRAM J (2000). Report on the separation distances required to ensure cross-pollination is below specified limits in non-seed crops of sugar beet, maize and oilseed rape. Ministry of Agriculture Fisheries and Food – UK (eds.) National Institute of Agricultural Botany, Cambridge, UK
- JAMES C (2004). Preview: Global status of commercialized Biotech/GM crops: ISAAA Briefs No. 32. ISAAA, Ithaca, NY

- JØRGENSEN RB, ANDERSON B (1994). Spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy *B. campestris* (*Brassicaceae*): A risk of growing genetically modified oilseed rape. *Am J Bot* 81: 1620–1626
- JØRGENSEN RB, ANDERSEN B, LANDBO L, MIKKELSEN TR (1996). Spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy relatives. *Acta Hort* 407: 193–200
- KAREIVA P, PARKER IM, PASCUAL M (1996). Can we use experiments and models in predicting the invasiveness of genetically engineered organisms? *Ecology* 77: 1670-1675
- KAROZZI NB, KOZIEL MG (1997). Transgenic maize expressing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein for control of the European corn borer. In: *Advances in insect control: the role of transgenic plants*. N Carozzi, M Koziel (eds) Taylor and Francis, Philadelphia, PA: 63-74
- KARSSEN CM (1981). Environmental conditions and endogenous mechanisms involved in secondary dormancy of seeds. *Isr J Bot* 29: 45-64
- KEELER KH, TURNER CE (1990). Management of transgenic plants in the environment. In: *Risk assessment in genetic engineering: environmental release of organisms*. Levin M, Strauss H (eds.) McGraw-Hill, New York: 189-218
- KERLAN MC, CHÈVRE AM, EBER F, BARANGER A, RENARD M (1992). Risk assessment of outcrossing of transgenic rapeseed to related species: I. Interspecific hybrid production under optimal conditions with emphasis on pollination and fertilization. *Euphytica* 62: 145-153
- KERLAN MC, CHÈVRE AM, EBER F (1993). Interspecific hybrids between a transgenic rapeseed (*Brassica napus*) and related species: Cytogenetical characterization and detection of the transgene. *Genome* 36: 1099-1106
- KHANNA M & STOTZKY G (1992). Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA. *Appl Environ Microbiol* 58: 1930-1939
- KINNEY AJ (1996). Designer oils for better nutrition. *Nat Biotechnol* 14: 946
- KLEIN EK, LAVIGNE C, FOUPELLASSAR X, GOUYON PH, LAREDO C (2003). Corn pollen dispersal: quasi-mechanistic model and field experiments. *Ecol Monogr* 73: 131-150
- KNOTT CM (1995). Control of volunteer oilseed rape in peas. *Proceedings Brighton Crop Protection Conference – Weeds* 3: 889-894
- KNUTZON DS, THOMPSON GA, RADKE SE, JOHNSON WB, KNAUF VC, KRIDL JC (1992). Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2624-2628

- KRUSE M (2002). Die Bedeutung der Saatgutprobenahme bei GVO-Schwellenwerten nahe 0 %. In: Schwellenwerte für Produkte aus gentechnisch veränderten Pflanzen. Deutsche Forschungsgemeinschaft (ed.) Wiley VCH, Weinheim, Mitteilung 7: 72-79
- KUHLMANN M, BEISMANN H (2004). Raumrepräsentativität technischer Pollensammler für ein Monitoring von transgenen Pollen auf regionaler Ebene. *Gentechnik* 64: 7-12
- LAAIDI M (2001). Regional variations in the pollen season of *Betula* in Burgundy: Two models for predicting the start of the pollination. *Aerobiologia* 17: 247–254
- LANDBO L, JØRGENSEN RB (1997). Seed germination in weedy *Brassica campestris* and its hybrids with *B. napus*: Implications for risk assessment of transgenic oilseed rape. *Euphytica* 97: 209-216
- LATALOWA M, MIETUS M, URUSKA A (2002). Seasonal variations in the atmosphere *Betula* pollen count in Gdansk (southern Baltic coast) in relation to meteorological parameters. *Aerobiologia* 18: 33–43
- LAVIGNE C, GODELLE B, REBOUD X, GOUYON PH (1996). A method to determine the mean pollen dispersal of individual plants growing within a large pollen source. *Theor Appl Genet* 93: 1319-1326
- LAVIGNE C, KLEIN EK, VALLÉE P, PIERRE J, GODELLE B, RENARD M (1998). A pollen-dispersal experiment with transgenic oilseed rape. Estimation of the average pollen dispersal of an individual plant within a field. *Theor Appl Genet* 96: 886-896
- LAWSON HM (1983). True potato seeds as arable weeds. *Potato Research* 26 (3): 237–246
- LECK MA, PARKER VT, SIMPSON RL (1989). *Ecology of soil seed banks*. Academic press, New York
- LECKIE D, SMITHSON A, CRUTE I (1993). Gene movement from oilseed rape to weedy populations - a component of risk assessment for transgenic cultivars. *Asp Appl Biol* 35: 61-66
- LEE LG, CONNELL CR, BLOCH W (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucl Acids Res* 21: 3761-3766
- LEFOL E, DANIELOU V, DARMENCY H (1996). Predicting hybridization between transgenic oilseed rape and wild mustard. *Field Crops Res* 45: 153 –161
- LEVIN DA, KERSTER HW (1974). Gene flow in seed plants. *J Evol Biol* 7: 139-220
- LINDER CR, SCHMITT J (1994). Assessing the risk of transgene escape through time and crop-wild hybrid persistence. *Mol Ecol* 3: 23-30
- LINDER CR, SCHMITT J (1995). Potential persistence of escaped transgenes: Performance of transgenic, oil-modified *Brassica* seeds and seedlings. *Ecol Appl* 5: 1056-1068

- LINDER CR (1998). Potential persistence of transgenes: Seed performance of transgenic canola and wild x canola hybrids. *Ecol Appl* 8: 1180-1195
- LINDL T, BAUER J (1994). Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. Gustav Fischer, Stuttgart, Jena, New York
- LINHART YB, BUSBY WH, BEACH JH, FEINSINGER P (1987). Forager behavior, pollen dispersal, and inbreeding in two species of hummingbird-pollinated plants. *Evolution* 41: 679-682
- LOPEZ-GRANADOS F, LUTMAN PJW (1998). Effect of environmental conditions on the dormancy and germination of volunteer oilseed rape seed (*Brassica napus*). *Weed Sci* 46, 419-423
- LORENZ MG & WACKERNAGEL W (1987). Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Appl Environ Microbiol* 53: 2948-2952
- LORENZ MG & WACKERNAGEL W (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* 58: 563-602
- Lu CM, Kato M, Kakihara F (2002). Destiny of a transgene escape from *Brassica napus* into *Brassica rapa*. *Theor Appl Genet* 105: 78-84
- Lübeck J, Römer S, Adomat C, Sandmann G (2002). Genetic engineering of potato tuber carotenoid composition. In: Potatoes Today and Tomorrow. Wenzel G, Wulfert I (eds.) Bonn, Saatgut Treuhand, EAPR Hamburg 14-19 July 2002, Vorträge Pflanzenzüchtung, Suppl I: 91
- LÜTHY J (1999). Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. *Food Control* 10: 359-361
- LUTMAN PJW (1993). The occurrence and persistence of volunteer oilseed rape (*Brassica napus*). *Volunteer Crops as Weeds. Asp Appl Biol* 35: 29-36
- LUTMAN PJW, LÓPEZ-GRANADOS F, PEKRUN C (1994). The biology and control of volunteer oilseed rape. In: Proceedings of HGCA-Oilseeds Conference, Kettering, UK: 11
- LUTMAN PJW, CUSSANS GW, WRIGHT KJ, WILSON BJ, MCN WRIGHT G, LAWSON HM (2002). The persistence of seeds of 16 weed species over six years in two arable fields. *Weed Res* 42: 231-241
- MANIATIS T, FRITSCH EF, SAMBROCK J (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- MARIANI C, DE BEUCKELEER M, TRUETTNER J, LEEMANS J, GOLDBERG RB (1990). Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347: 337-741
- MAYER AM, POLJAKOFF-MAYBER (1975). *The germination of seeds*. Oxford, UK

- MCCARTNEY HA, LACEY ME (1991). Wind dispersal of pollen from crops of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J Aerosol Sci* 22 (4): 467-477
- MCPARTLAN HC & DALE PJ (1994). An assessment of gene transfer by pollen from field grown transgenic potatoes to nontransgenic potatoes and related species. *Transgenic Res* 3: 216–225
- MESQUIDA J, RENARD DM (1982). Study of the pollen dispersal by wind and of the importance of wind pollination in rapeseed (*Brassica napus* var *oleifera* Metzger). *Apidology* 4: 353-366
- METZ PLJ, JACOBSEN E, NAP JP, PEREIRA A, STIEKEMA WJ (1997). The impact on biosafety of the phosphinothricin-tolerance transgene in inter-specific *B. rapa* x *B. napus* hybrids and their successive backcrosses. *Theor Appl Genet* 95: 442-450
- MEYER R (1995). Detection of genetically engineered plants by polymerase chain reaction (PCR) using the Flavr Savr™ tomato as an example. *Z Lebensm Unters Forsch* 201: 583-586
- MEYER R (1999). Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control* 10: 391-399
- MIKKELSEN TR, ANDERSEN B, JØRGENSEN RB (1996a). The risk of transgenic crop spread. *Nature* 330: 31
- MIKKELSEN TR, JENSEN J, JØRGENSEN RB (1996b). Inheritance of oilseed rape (*Brassica napus*) RAPD markers in a backcross progeny with *Brassica rapa*. *Theor Appl Genet* 92: 492-497
- MILLER PD (1985): Maize pollen: Collection and enzymology. In: Maize for biological research. WF Sheridan (ed) A special publication of the Plant Molecular Biology Association, USA: 279-282
- MOMOH EJJ, ZHOU WJ, KRISTIANSSON B (2002). Variation in the development of secondary dormancy in oilseed rape genotypes under conditions of stress. *Weed Res* 42: 446-455
- MONSANTO (2001). Kompendium YieldGard®.
<http://www.monsanto.de/Service/broschueren/YieldGard.pdf>
- MORENO-GRAU S, ANGOSTO JM, ELVIRA-RENDUELES B, BAYO J, MORENO J, MORENO-CLAVEL J (2000). Effects of meteorological parameters and plant distribution on *Chenopodiaceae-Amaranthaceae*, *Quercus* and *Olea* airborne pollen concentrations in the atmosphere of Cartagena (Spain). *Aerobiologia* 16: 17–20
- MORRIS WF, KAREIVA PM, RAYMER PL (1994). Do barren zones and pollen traps reduce gene escape from transgenic crops? *Ecol Appl* 4: 157-165
- MOSMANN T (1989). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63

- MOYES CL, LILLEY JM, CASAIS CA, COLE SG, HAEGER PD, DALE PJ (2002). Barriers to gene flow from oilseed rape (*Brassica napus*) into populations of *Sinapis arvensis*. *Mol Ecol* 11: 103–112
- MULLIS KB, FALOONA FA (1987). Specific synthesis of DNA invitro via a polymerase-catalyzed chain-reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350
- NARAYANASWAMY S (1997). Determination of isolation distance for hybrid seed production. *Curr Res (Univ. Bangalore)* 26: 193-195
- NETHERWOOD T, MARTÍN-QRÚE SM, O'DONNELL AG, GOCKLING S, GRAHAM J, MATHERS JC, GILBERT HJ (2004). Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nat Biotechnol* 22: 204-209
- NORRIS CE, SIMPSON EC, SWEET JB, THOMAS JE (1999). Monitoring weediness and persistence of genetically modified oilseed rape (*Brassica napus*) in the UK. In: *Gene Flow and Agriculture: Relevance for Transgenic Crops*. PJW Lutman (ed.) BCPC Symposium Proceedings No. 72: 255-260
- OECD (1997). Consensus Document on the Biology of *Brassica Napus* L. (Oilseed Rape). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.7 <http://www.oecd.org/home/>
- OSBORNE JL, CLARK SJ, MORRIS RJ, WILLIAMS IH, RILEY JR, SMITH AD, REYNOLDS DR, EDWARDS AS (1999). A landscape-scale study of bumble bee foraging range and constancy, using harmonic radar. *J Appl Ecol* 36: 519-533
- PAGET E, MONROZIER LJ, SIMONET P (1992). Adsorption of DNA on clay minerals: protection against DNase I and influence on gene transfer. *FEMS Microbiol Lett* 97: 31-40
- PAUK J, STEFANOV I, FEKETE S, BOGRE L, KARSAI I, FEHER A, DUTITS D (1995). A study of different (CAMV 35S and MAS) promotor activities and risk assessment of field use in transgenic rapeseed plants. *Euphytica* 85: 411-416
- PAULUS H, ALBERT R, PASCHER K, GOLLMANN G (1997). Ökologische Risikoabschätzung von Freisetzungen gentechnisch veränderter Organismen für die spezielle Situation in Österreich. *Forschungsberichte. Bundeskanzleramt – Sektion 4 (ed.)* Wien
- PEKRUN C (1994). Untersuchungen zur sekundären Dormanz bei Raps (*Brassica napus* L.). *Diss Universität Göttingen*
- PEKRUN C & LÓPEZ-GRANADOS F (1995). The effect of water stress and light conditions on the induction of secondary dormancy in seeds of *Brassica napus* L. In: *Proceedings of the 9th International Rapeseed Congress, Cambridge Vol. III*: 1052-1054
- PEKRUN C, LÓPEZ-GRANADOS F, LUTMAN PJW (1997a). Studies on the persistence of rape seeds (*Brassica napus* L.), emphasizing their response to light. In: *Basic and Applied Aspects in Seed Biology*. RH Ellis, M Black, AJ Murdoch, TD Hong (Eds) Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 339-347

- PEKRUN C, LUTMAN PJW & BAEUMER K. (1997b). Induction of secondary dormancy in rape seeds (*Brassica napus* L.) by prolonged imbibition under conditions of water stress or oxygen deficiency in darkness. *Eur J Agron* 6 : 245-255
- PEKRUN C, POTTER TC, LUTMAN PJW (1997c). Genotypic variations in the development of secondary dormancy in oilseed rape and its impact on the persistence of volunteer rape. *Proceedings Brighton Crop Protection Conference – Weeds* 1: 243-248
- PEKRUN C, HEWITT JDJ, LUTMAN PJW (1998). Cultural control of volunteer oilseed rape (*Brassica napus*). *J Agric Sci* 130 (2): 155-163
- Pekrun C, Lutman PJW (1998): The influence of post-harvest cultivation on the persistence of volunteer oilseed rape. *Asp Appl Biol* 51: 113-118
- PEKRUN C, LANE PW, LUTMAN PJW (1999). Modelling the potential for gene escape in oilseed rape via the soil seedbank: Its relevance for genetically modified cultivars. In: *Gene Flow and Agriculture: Relevance for Transgenic Crops*. PJW Lutman (ed.) BCPC Symposium Proceedings No. 72: 101-106
- PESEL FD, LECOMTE J, EMERIAU V, KROUTI M, MESSEAN A, GOUYON PH (2001). Persistence of oilseed rape (*Brassica napus* L.) outside of cultivated fields. *Theor Appl Genet* 102: 841-846
- PFEILSTETTER E, MATZK A, SCHIEMANN J, FELDMANN S (1998). Untersuchungen zum Auskreuzungsverhalten von Liberty-tolerantem Winterraps auf nicht-transgenen Raps. *BMBF-Workshop Biologische Sicherheit, Braunschweig*: 175-183
- PFEILSTETTER E, MATZK A, FELDMANN SD, SCHIEMANN J (2000). Rapid and efficient screening of phosphinothricin tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) with a novel germination test. *Euphytica* 113: 119-124
- PIATAK M, LUK KC, LIFSON JD (1993). Quantitative competitive polymerase chain-reaction for accurate quantification of HIV DNA and RNA species. *BioTechniques* 14 (1): 70-81
- PIERRE J, MARSAULT D, GENECQUE E, RENARD M, CHAMPOLIVER J, PHAM-DELEGUE MH (2003). Effects of herbicide-tolerant transgenic oilseed rape genotypes on honey bees and other pollinating insects under field conditions. *Entomol Exp Appl* 108: 159-168
- PIETSCH K, WAIBLINGER HU, BRODMANN P, WURTZ A (1997). Screeningverfahren zur Identifizierung 'gentechnisch veränderter' pflanzlicher Lebensmittel. *Deut Lebensm Rundsch* 93: 35-38
- POHL-ORF M, BRAND U, DRIESSEN S, HESSE P, LEHNEN M, MORAK C, MÜCHER T, SAEGLITZ C, VON SOOSTEN C, BARTSCH D (1999). Overwintering of genetically modified sugar-beet, *Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*, as a source for dispersal of transgenic pollen. *Euphytica* 108: 181-186

- PRAVEE S, MISHRA AK, DASGUPTA A (2005). Antisense suppression of replicase gene expression recovers tomato plants from leaf curl virus infection. *Plant Sci* 168: 1011-1014
- PRICE JS, HOBSON RN, NEALE MA, BRUCHE DM (1996). Seed Losses in Commercial Harvesting of Oilseed Rape. *J Agric Engng Res* 65: 183-191
- PROCTOR M & LACK A (1996). *The Natural History of Pollination*. HarperCollins, London
- RAMSAY G, THOMPSON CE, NEILSON S, MACKAY GR (1999). Honeybees as vectors of GM oilseed rape pollen. In: *Gene Flow and Agriculture: Relevance for Transgenic Crops*. PJW Lutman (ed.) BCPC Symposium Proceedings No. 72: 209-214
- RANITO-LEHTIMÄKI A (1995). Aerobiology of pollen and pollen antigens. In: *Bioaerosols Handbook*. C Cox, C Wathes (eds.) CRC Lewis
- RAYBOULD AF & GRAY AJ (1993). Genetically modified crops and hybridization with wild relatives: a UK perspective. *J Appl Ecol* 30: 199-219
- RAYBOULD AF, CLARKE RT (1999) Defining and measuring gene flow. In: *Gene Flow and Agriculture: Relevance for Transgenic Crops*. PJW Lutman (ed.) BCPC Symposium Proceedings No. 72: 41-48
- REBOUD X (2003). Effect of a gap on gene flow between otherwise adjacent transgenic *Brassica napus* crops. *Theor Appl Genet* 106: 1048-1058
- REHEUL D (1987). Ruimtelijke isolatie in de plantenveredeling. Ruimtelijke isolatie in de plantenveredeling. 1. Ruimtelijke isolatie bij windbestuivers. *Landbouwtijdschrift* 40: 5-14
- RICHTER O, FOIT K, SEPPELT R (2004). Mathematical models for gene flow from GM crops in the environment. In: *Complexity and Integrated Resources Management, Transactions of the 2nd Biennial Meeting of the International Environmental Modelling and Software Society, iEMSs*. C Pahl-Wostl, S Schmidt, AE Rizzoli, AJ Jakeman (eds.) Manno, Switzerland
- RIEGER MA, PRESTON C, POWLES SB (1999). Risks of gene flow from transgenic herbicide-resistant canola (*Brassica napus*) to weedy relatives in southern Australian cropping systems. *Aust J Agric Res* 50: 115-128
- RIEGER MA, POTTER TD, PRESTON C, POWLES SB (2001). Hybridisation between *Brassica napus* L. and *Raphanus raphanistrum* L. under agronomic field conditions. *Theor Appl Genet* 103: 555-560
- RIEGER MA, LAMOND M, PRESTON C, POWLES SB, ROUSH RT (2002). Pollen-mediated movement of herbicide resistance between commercial canola fields. *Science* 296: 2386-2388
- RÖBBELEN G, EMIROGLU SH, INCEKARA F, PLARRE W, SCHUSTER W (1985). Öl- und Faserpflanzen. In: *Lehrbuch der Züchtung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen-Band 2 Spezieller Teil*. W Hoffmann, A Mudra, W Plarre (eds) Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg: 289-349

- ROGERS HJ, PARKES HC (1995). Transgenic plants and the environment. *J Exp Bot* 46: 467-488
- ROGER-ESTRADE J, COLBACH N, CANEILL J (2000). Modelling vertical and lateral weed seeds movements during mould-bournd ploughing with skim-coulters. In: *Proceedings Xieme Colloque International sur la Biologie des Mauvaises Herbes*, Dijon, France: 399-406
- ROLLER A, BEISMANN H, ALBRECHT H (2003). The influence of soil cultivation on the seedbank of GM-herbicide tolerant and conventional oilseed rape. *Asp Appl Biol* 69: 131-136
- ROMANOWSKI G, LORENZ MG UND WACKERNAGEL W (1991). Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I. *Appl Environ Microbiol* 57: 1057-1061
- ROMANOWSKI G, LORENZ MG UND WACKERNAGEL W (1993). Use of Polymerase chain reaction and electroporation of *Escherichia coli* to monitor the persistence of extracellular plasmid DNA introduced into natural soils. *Appl Environ Microbiol* 59: 3438-3446
- RUDI K, RUD I, HOLCK A (2003). A novel multiplex quantitative DNA array based PCR (MQDA-PCR) for quantification of transgenic maize in food and feed. *Nucleic Acids Res* 31 (11): 62
- SALAMOV AB (1940). About isolation of corn. *Sel I Sem* 3: 25-27
- SANDMANN G, BÖGER P (1995) Herbizide. In: *Schadwirkungen auf Pflanzen*. B Hock, E Elstner (eds.) Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: 155-174
- SANTONI S, BERVILLE A (1992). Characterization of the nuclear ribosomal DNA units and phylogeny of *Beta* L. wild forms and cultivated beets. *Theor Appl Genet* 83: 533-542
- SANVIDO O, BIGLER F, WIDMER F, WINZELER M (2004). Monitoringkonzept für den Anbau von transgenen Pflanzen. *Agrarforschung* 11 (1): 10-15
- SAUERMANN W (1993). Einflüsse auf den Glucosinolatgehalt – Ergebnisse 2-jähriger Untersuchungen aus den Landessortenversuchen. *Raps* 11 (2): 82-86
- SAURE C, KÜHNE S, HOMMEL B (1999). Untersuchungen zum Pollentransfer von transgenem Raps auf verwandte Kreuzblütler durch Wind und Insekten. BMBF-Statusseminar, Braunschweig
- SCHEFFLER JA, PARKINSON R, DALE PJ (1993). Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). *Transgenic Res* 2: 356-364
- SCHEFFLER JA, DALE PJ (1994). Opportunities for gene transfer from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) to related species. *Transgenic Res* 3: 263-278

- SCHEFFLER JA, PARKINSON R, DALE PJ. (1995). Evaluating the effectiveness of isolation distances for field plots of oilseed rape (*Brassica napus*) using a herbicide-resistance transgene as a selectable marker. *Plant Breed* 114: 317-321
- SCHEMA M, SHALON D, DAVIS RW, BROWN PO (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470
- SCHLINK S (1994). Ökologie der Keimung und Dormanz von Körnerraps (*Brassica napus* L.) und ihre Bedeutung für eine Überdauerung der Samen im Boden. Diss Universität Göttingen
- SCHLINK S (1998). 10 years survival of rape seed (*Brassica napus* L.) in soil. *J Plant Dis Prot Special Issue XVI*: 169-172
- SCHLISING RA, TURPIN RA (1971). Hummingbird dispersal of *Delphinium cardinale* pollen treated with radioactive iodine. *Am J Bot* 58: 401-406
- SCHWALL GP, SAFFORD R, WESTCOTT RJ, JEFFCOAT R, TAYAL A, SHI YC, GIDLEY MJ, JOBLING SA (2000). Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B. *Nat Biotechnol* 18: 551 - 554
- SCHWARZBACH E (1979). A high throughput jet trap for collecting mildew spores on living leaves. *Phytopath Z* 94: 165-171
- SCOTT RK (1970). The effect of weather on the concentration of pollen within sugar beet crops. *Ann Appl Biol* 66: 119-127
- SCP (SCIENTIFIC COMMITTEE ON PLANTS) (2001). Opinion of the Scientific Committee on Plants concerning the adventitious presence of GM seeds in conventional seeds. SCP/GMO-SEED-CONT/002-FINAL
http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/index_en.html
- SIMPSON EC, NORRIS CE, LAW JR, THOMAS JE, SWEET JB (1999). Gene flow in genetically modified herbicide tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) in the UK. In: Gene Flow and Agriculture: Relevance for Transgenic Crops. PJW Lutman (ed.) BCPC Symposium Proceedings No. 72: 75-82
- SKOGSMYR, I (1994). Gene dispersal from transgenic potatoes to conspecifics: A field trial. *Theor Appl Genet* 88: 770–774
- SMITH AE (1988). Persistence and transformation of the herbicide glufosinate-ammonium in prairie soils under laboratory conditions. *J Agr Food Chem* 36: 393-397
- SNAYDON RW (1980). Plant demography in agricultural systems. *Bot Monogr* 15: 109-118
- SNOW AA, PALMA PM (1997). Commercialization of transgenic plants: Potential ecological risks. *BioScience* 47 (2): 86-96

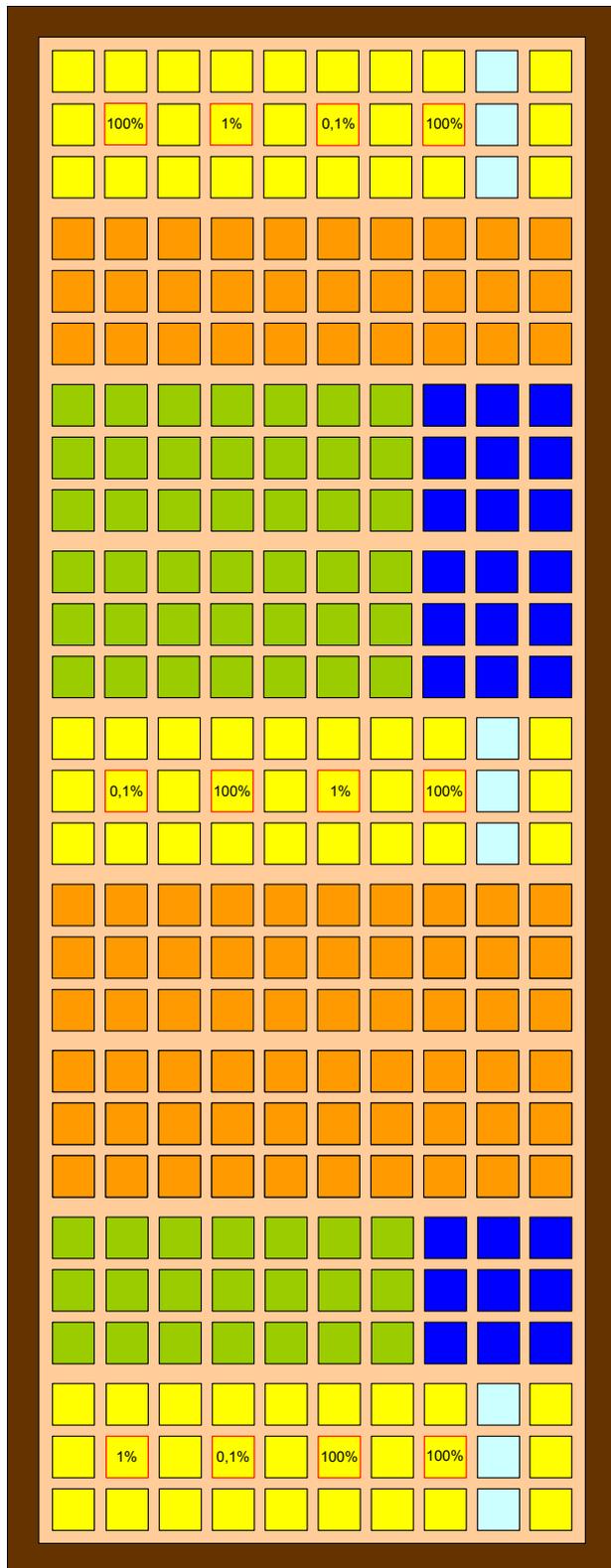
- SQUIRE GR, CRAWFORD JW, RAMSAY G, THOMPSON CE (1999). Gene flow at the landscape level. In: Gene Flow and Agriculture: Relevance for Transgenic Crops. PJW Lutman (ed.) BCPC Symposium Proceedings No. 72: 57-64
- STANILAND BK, McVETTY PBE, FRIESEN LF, YARROW S, FREYSSINET G, FREYSSINET M (2000). Effectiveness of border areas in confining the spread of transgenic *Brassica napus* pollen. Can J Plant Sci 80: 521-526
- STAVE JW (1999). Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO - future needs. Food Control 10: 367-374
- STEWART CN, ALL JR. JN, RAYMER PL, RAMACHANDRAN S (1997). Increased fitness of transgenic insecticidal rapeseed under insect selection pressure. Mol Ecol 6: 773-779
- STOGER E, MA JKC, FISCHER R, CHRISTOU P (2005). Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. Curr Opin Plant Biol 16: 167-173
- STONE R (1994). Large plots are next test for transgenic crop safety. Science 266: 1472-1473
- SWEET JB; SHEPPERSON R, THOMAS JE, SIMPSON E (1997). The impact of releases of genetically modified herbicide tolerant oilseed rape in the UK. Proceedings Brighton Crop Protection Conference - Weeds 4: 291-302
- TEPFER D, GARCIA-GONZALES R, MANSOURI H, SERUGA M, MESSAGE B, LEACH F, PERICA MC (2003). Homology-dependent DNA transfer from plants to a soil bacterium under laboratory conditions: implications in evolution and horizontal gene transfer. Transgenic Res 12: 425-437
- THOMPSON CJ, MOVVA NR, TIZARD R, CRAMERI R, DAVIES JE, LAUWEREYS M, BOTTERMAN J (1987). Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygrosopicus*. EMBO J 6 (9): 2519-2523
- THOMPSON CE, SQUIRE G, MACKAY GR, BRADSHAW JE, CRAWFORD JW, RAMSAY G, (1999). Regional patterns of gene flow and its consequence for GM oilseed rape. In: Gene Flow and Agriculture: Relevance for Transgenic Crops. PJW Lutman (ed.) BCPC Symposium Proceedings No. 72: 95-100
- TIEDJE JM, COLWELL RK, GROSSMAN YL, HODSON RE, LENSKI RE, MACK RN, REGAL PJ (1989). The planned introduction of genetically engineered organisms: Ecological considerations and recommendations. Ecology 70 (2): 298-315
- TIMMONS AM, O'BRIEN ET, CHARTERS YM, DUBBELS SJ, WILKINSON MJ (1995). Assessing the risks of wind pollination from fields of genetically modified *Brassica napus* ssp. *oleifera*. Euphytica 85: 417-423
- TIMMONS AM, CHARTERS YM, CRAWFORD JW, BURN D, SCOTT SE, DUBBELS SJ, WILSON NJ, ROBERTSON A, O'BRIEN ET, SQUIRE GR, WILKINSON MJ (1996). Risks from transgenic crops. Nature 380: 487

- TOLSTRUP K, ANDERSEN SB, BOELT B, BUUS M, GYLLING M, HOLM PB, KJELLSSON G, PEDERSEN S, ØSTERGÅRD H, MEKKELSEN SA (2003). Report from the Danish working group on the coexistence of genetically modified crops with conventional and organic crops. DIAS Report Plant Production No. 94, Danish Institute of Agricultural Sciences
http://www.agrsci.dk/gmcc-03/Co_exist_rapport.pdf
- TONSOR ST (1985). Leptokurtic pollen-flow, non leptokurtic gene-flow in a wind-pollinated herb, *Plantago loceolata* L. *Oecologia* 67: 442-446
- TYNAN JL, WILLIAMS MK & CONNER AJ (1990). Low frequency of pollen dispersal from a field trial of transgenic potatoes. *J Gen Breed* 44: 303-306
- UFOP (UNION ZUR FÖRDERUNG VON OEL- UND PROTEINPFLANZEN E. V.) (2005).
<http://www.ufop.de/>
- U N (1935). Genome Analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and the peculiar mode of fertilization. *Jpn J Bot* 7: 389-452
- VAUGHAN JG, PHELAN JR, DENFORD KE (1976). Seed studies in the *Cruciferae*. In: The biology and chemistry of the *Cruciferae*. JG Vaughan, AJ MacLeod, BMG Jones (eds.) Academic Press, New York: 119-144
- VIGOUROUX Y, DARMENCY H, DE GARAMBE GT & RICHARD-MOLARD M (1999). Gene flow between sugar beet and weed beet. In: Gene Flow and Agriculture: Relevance for Transgenic Crops. PJW Lutman (ed.) BCPC Symposium Proceedings No. 72: 83-88
- VOLLENHOFER S, BURG K, SCHMIDT J, KROATH H (1999). Genetically modified organisms in food-screening and specific detection by polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem* 47: 5038-5043
- WAIBLINGER HU, WURZ A, FREYER R, PIETSCH K (1999). Spezifischer Nachweis von gentechnisch verändertem Raps in Honig. *Deut Lebensm Rundsch* 5: 44-48
- WALKLATE PJ, HUNT JCR, HIGSON HL, SWEET JB (2004). A model of pollen-mediated gene flow for oilseed rape. *Proc Roy Soc Lond B* 271: 441-449
- WARWICK SI, SIMARD MJ, LÉGÈRE A, BECKIE HJ, BRAUN L, ZHU B, MASON P, SÉGUIN-SWARTZ G, STEWART JR CN (2003). Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives: *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Wild.) O.E. Schulz. *Theor Appl Genet* 107: 528-539
- WASER NM, PRICE MV (1982). A comparison of pollen and fluorescent dye carry-over by natural pollinators of *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae). *Ecology* 63: 1168-1172
- WENZEL G, FISCHBECK G (1998). Herbizidtolerante Sorten und mögliche Toleranzen bei Vertretern der Begleitflora. In: *Mitt Ges Pflanzenbauwiss* 11: 1-6
- WHARTON, MJ (1955). The use of the tetrazolium test for determining the viability of seeds of the genus *Brassica*. *Proc Int Seed Test Ass* 20: 81-88

- WILHELM R, BEIßNER L, SCHIEMANN J (2003). Konzept zur Umsetzung eines GVO-Monitoring in Deutschland. *Nachrichtenbl Deut Pflanzenschutz* 55 (11): 258-272
- WILKINSON MJ, TIMMONS AM, CHARTERS Y, DUBBELS S, ROBERTSON A, WILSON N, SCOTT S, O'BRIEN E, LAWSON HM (1995). Problems of risk assessment with genetically modified oilseed rape. *Brighton Crop Protection Conference – Weeds*: 1035-1044
- WILLAMSON M (1992). Environmental risks from the release of genetically modified organisms (GMOs)-the need for molecular ecology. *Mol Ecol* 1: 3-8
- WISEMAN G (2002). State of the art and limitations of quantitative polymerase chain reaction. *J AOAC Int* 85: 792-796
- WOHLLEBEN W, ARNOLD W, BROER I, HOILLEMANN D, STRAUCH E, PÜHLER A (1988). Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70: 25-37
- ZACHAR V, THOMAS RA, GOUSTIN AS (1993). Absolute quantification of target DNA: a simple competitive PCR for efficient analysis of multiple samples. *Nucleic Acids Res* 21: 2017-2018
- ZIEGLER K (1998). Beta-Rüben: Zucker- und Futterrüben. In: *Die Landwirtschaft, Band 1, Pflanzliche Erzeugung*. BLV Verlagsgesellschaft München: 388
- ZIMMERMANN A, LÜTHY J, PAULI U (2000). Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site. *Lebensm Wiss Technol* 33: 210-216
- ZÜGHART W, BRECKLING B (2003). Konzeptionelle Entwicklung eines Monitoring von Umweltwirkungen transgener Kulturpflanzen, F & E-Vorhaben im Auftrag des Umweltbundesamtes, FKZ 299 89 406
http://www.biosicherheit.de/pdf/dokumente/monitoring_konzept_uba-uni_bremen.pdf

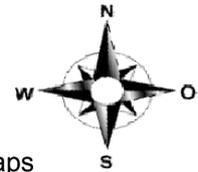
7 ANHANG

7.1 Versuchsplan 2001/2002



Legende:

-  Raps
-  Transgener Raps
-  Winterweizen
-  Wintergerste
-  Rübsen
-  Stilllegung
-  Brachstreifen



Parzellengröße: 6 x 6 m

Parzellenabstand: 1,5 m

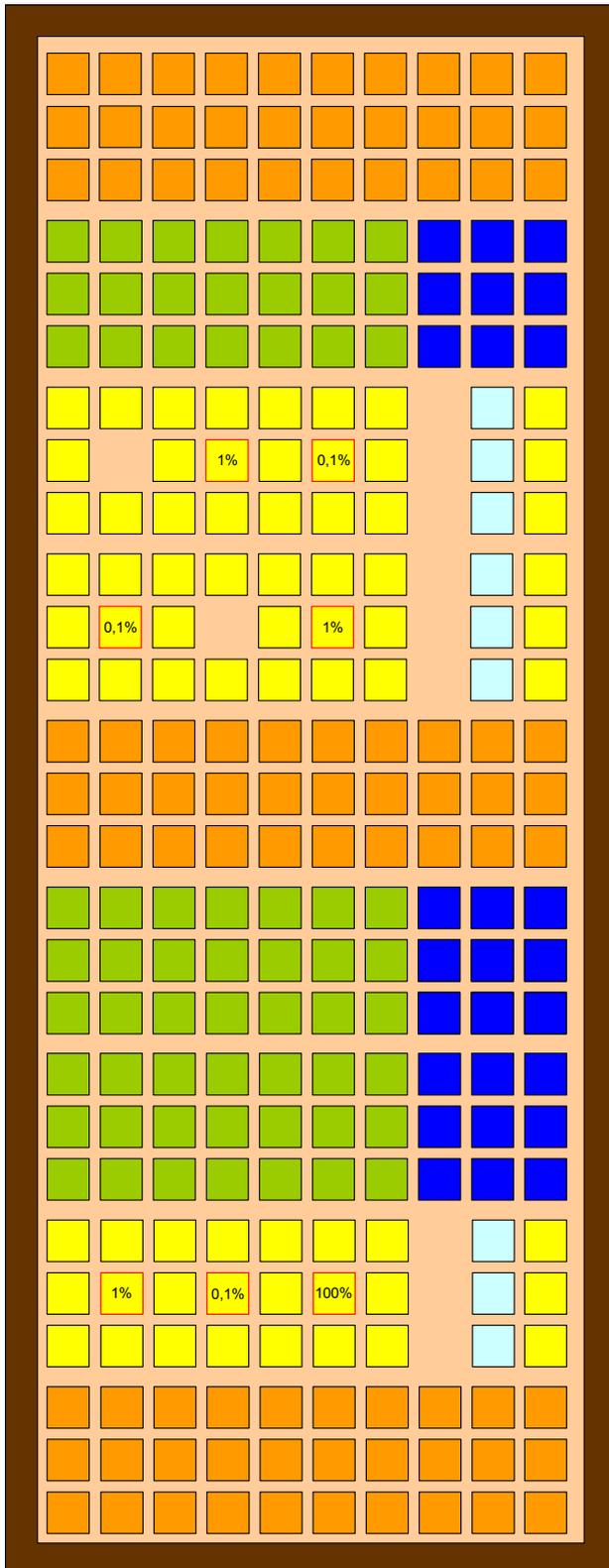
Brachstreifen: 9 m

Wege: 6 m

Feldgröße: 107 x 266 m

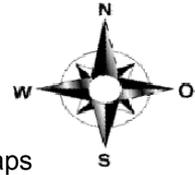
Gesamtfläche: 28462 m²

7.2 Versuchsplan 2002/2003



Legende:

-  Raps
-  Transgener Raps
-  Winterweizen
-  Wintergerste
-  Rübsen
-  Stilllegung
-  Brachstreifen



Parzellengröße: 6 x 6 m

Parzellenabstand: 1,5 m

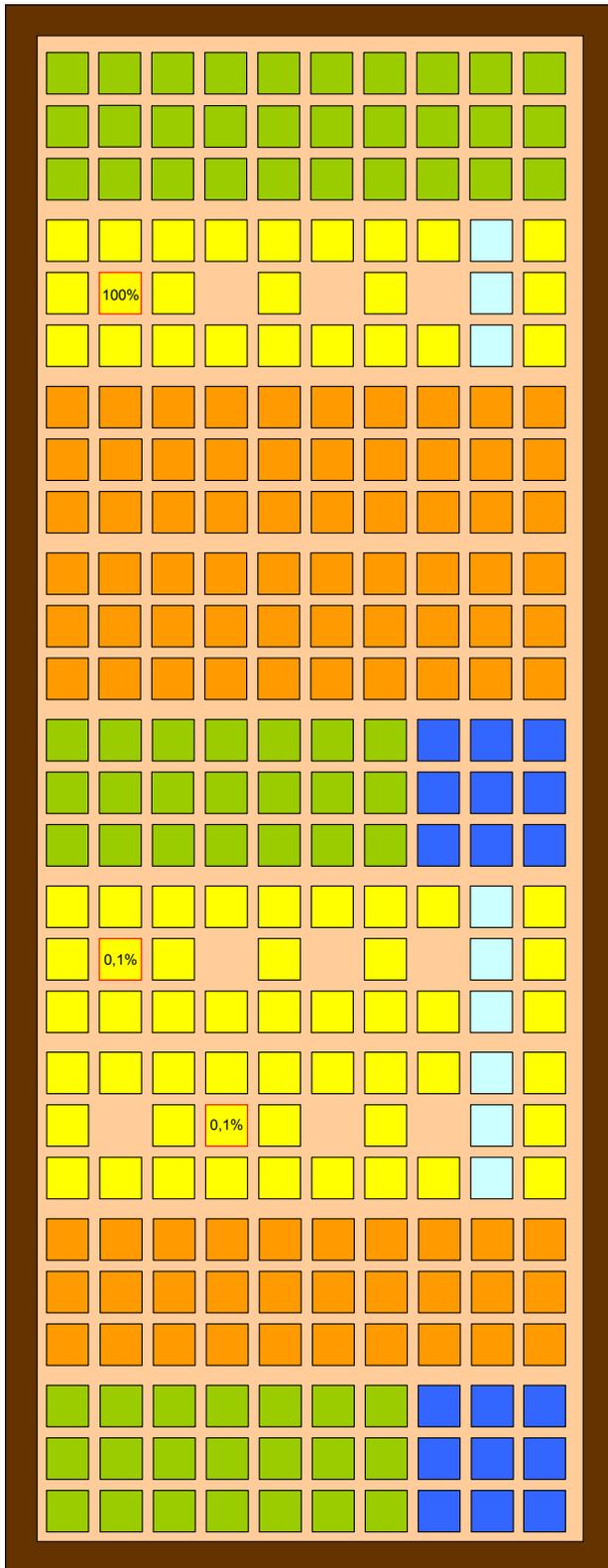
Brachstreifen: 9 m

Wege: 6 m

Feldgröße: 107 x 266 m

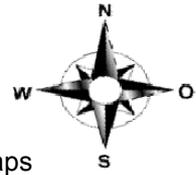
Gesamtfläche: 28462 m²

7.3 Versuchsplan 2003/2004



Legende:

- Raps
- Transgener Raps
- Winterweizen
- Wintergerste
- Rübren
- Stilllegung
- Brachstreifen



Parzellengröße: 6 x 6 m

Parzellenabstand: 1,5 m

Brachstreifen: 9 m

Wege: 6 m

Feldgröße: 107 x 266 m

Gesamtfläche: 28462 m²

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Tristan Funk
Geburtsdatum: 29.06.1970
Geburtsort: Friedberg/Bay.
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder

Schulische Ausbildung

1977-1981 Grundschule in Derching
1981-1990 Gymnasium bei St. Stephan, Augsburg

Zivildienst

9/1990 – 12/1991 Arbeiter-Samariter-Bund (ASB), Augsburg

Ausbildung

9/1992 – 12/1995 Ausbildung zum staatl. geprüften Übersetzer in Englisch und Spanisch am Fremdspracheninstitut der Landeshauptstadt München

Studium

10/1995 – 7/2001 Agrarwissenschaften an der TU München-Weihenstephan;
Studienrichtung Pflanzenbauwissenschaften
Abschluß als Diplom-Agraringenieur (Univ.)

Berufstätigkeit

8/2001-12/2004 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung der TU München-Weihenstephan