



Eingegangen

18. Juni 2012

RA Tronje Bohmer

☒ IPAZ • Heinrich-Buff-Ring 26-32 • D-35392 Gießen

An das

Saarländische Oberlandesgericht

66104 Saarbrücken

JUSTIZBEHÖRDEN
in Saarbrücken

Eing. 12. JUNI 2012

..... Bd. Akt An.
..... € Scheck/GS/Kostenm.**Research Centre for BioSystems,
Land Use and Nutrition (IFZ Gießen)**Institut für Phytopathologie und
Angewandte Zoologie (IPAZ)

Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel

IFZ für Umweltsicherung

Heinrich-Buff-Ring 26-32

D-35392 Gießen

Tel.: +49 - (0)641 / 99 - 3 74 90

Fax.: +49 - (0)641 / 99 - 3 74 99

Email: Karl-Heinz.Kogel@agrar.uni-giessen.de<http://www.uni-giessen.de/ipaz/>

Unser Zeichen: Ko / KHK

2012-06-06

Rechtsstreit Bergstedt**Ihr Schreiben vom 30. Mai 2012 / erhalten 5. Juni 2012**

Sehr geehrter Herr Präsident,

auf die mir von Ihnen übermittelten Fragen in der obigen Angelegenheit nehme ich wie folgt Stellung und überreiche ihnen zusätzlich Dokumente, die den in Frage stehenden Sachverhalt zweifelsfrei klarstellen:

Frage 1: Genehmigungsantrag der Justus-Liebig-Universität Gießen (JLU): der Antrag auf Durchführung von Versuchen im AgroBioTechnikum wurde nach Gentechnikgesetz bei den entsprechenden Behörden gestellt (Bescheid BVL 04.05.2009 (Az. 6786-01-0200). Genehmigungsgebühren waren weder bei Versuchen der JLU auf Versuchsfeldern in Gießen noch im AgroBioTechnikum aufzubringen.

Die Versuche im AgroBioTechnikum wurden auf Basis des Antrags der JLU an das BMBF und entsprechende Genehmigungsbehörden nach Gentechnikgesetz gestellt und bewilligt/genehmigt (vollständige Dokumentation: siehe z.B. Dokumente „Abschlussbericht“ Anlage 1 und Amtsblatt der EU, Anlage II). Die Versuche wurden von der JLU, bzw. mir als Projektleiter, Dr. Gregor Langen (JLU) als Beauftragtem für Biol. Sicherheit und Dr. Jafar Imani (JLU) als stellvertretendem Projektleiter, geplant, beantragt, durchgeführt und wissenschaftlich ausgewertet. Eine Verlegung der Versuche war damals notwendig, weil die Gefahr der Feldzerstörung durch Gießener Aktivisten bestand. Mitarbeiter der JLU waren zur Anlage, Durchführung und Auswertung der Versuche am AgroBioTechnikum vor Ort präsent. Falls erwünscht, kann eine lückenlose Dienstreisedokumentation von Mitarbeitern der JLU vorgelegt werden.

Kosten: Feldzerstörung und Androhung von Zerstörungen haben im Zusammenhang mit den Biosicherheitsversuchen der JLU zu erheblichen finanziellen Mehrbelastungen und außerordentlichen Kosten geführt. Auch die Verlagerung der Versuche von Gießen ins AgroBioTechnikum war mit erheblichen Mehrkosten verbunden, die den Etat für die Durchführung der wissenschaftlichen Arbeiten belastet hat. So mussten z.B. in erheblichen Umfang Kosten für Sicherung der Versuche am AgroBioTechnikum übernommen werden.

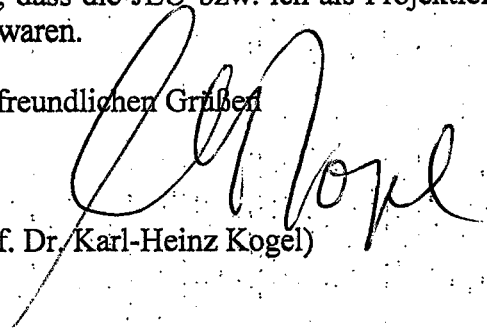
Die Darstellung, dass die Kläger und Frau Prof. I. Broer die Geldempfänger der Förderanträge gewesen wären, ist unrichtig und entbehrt jeder vernünftigen Grundlage (siehe vollständige Doku-

mentation der Versuchsplanung, Durchführung und Kostenaufwendung im Dokument „Abschlussbericht der JLU an BMBF, Anlage I).

Frage 2: Versuchsziele: Die Versuchsziele des von der JLU durchgeführten Projektes am AgroBioTechnikum sind detailliert u.a. im Dokument „Abschlussbericht“ (Anlage I) beschrieben. Die wissenschaftliche Fragestellung ging weit über die Frage nach den Auswirkungen der GMO auf Mykorrhiza hinaus. Ertragshebungen und Versuche zur Epidemiologie von Pflanzenkrankheiten, die eigentlich auch vorgesehen waren, konnten jedoch auf Grund der Zerstörungsversuche nicht unter den Bedingungen der Guten-Wissenschaftlichen-Praxis durchgeführt werden (Dokument Abschlussbericht, Anlage I und Anlage II). Publikationen der Versuchsergebnisse der Biosicherheitsversuche der JLU wurden in hochrangigen wissenschaftlichen Zeitschriften der Öffentlichkeit zugänglich gemacht (siehe z.B. Proc. Nat. Acad. Sci USA 107, 6198-6203, 2010). Die in der Frage 2 implizierte Verwendung von öffentlichen Fördermitteln für „andere Sachen“ ist deshalb nicht nachvollziehbar und aufgrund der wissenschaftlichen Veröffentlichungen klar widerlegbar.

Frage 3: Dies entspricht im Wesentlichen der Behauptung zu 1. Deshalb hier nochmals die Feststellung, dass die JLU bzw. ich als Projektleiter für die Versuche im AgroBioTechnikum verantwortlich waren.

Mit freundlichen Grüßen



(Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel)

Anlage I

386
- 508

Schlussbericht

BMBF- Verbundprojekt Förderkennzeichen: 0313282A

Thema:

Zur biologischen Sicherheit von gentechnisch verändertem Getreide

Teilprojekt:

Auswirkungen der transgenen Pflanzen auf nützliche pilzliche Mikroorganismen

Ausführende Stelle:

Justus-Liebig-Universität Gießen

Fachbereich:

Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement

Institut:

Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen

Projektleiter:

Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz Kogel

Laufzeit:

01.04.2005 bis 31.03.2010

Inhaltsverzeichnis

I. Kurze Darstellung des Projektes

- I.1. Aufgabenstellung
- I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde
- I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens
- I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand
- I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

II. Darstellung der erzielten Ergebnisse

- II.1. Verwendung der Zuwendung / Gegenüberstellung vorgegebene Ziele
- II.2. wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises
- II.3. Notwendigkeit, Angemessenheit der geleisteten Arbeit
- II.4. voraussichtlicher Nutzen
- II.5. bekanntgewordene Fortschritte
- II.6. Veröffentlichungen

III. Kurz gefasster Erfolgskontrollbericht des Projektes

- III.1. Beitrag zu förderpolitischen Zielen
- III.2. wissen.-tech. Ergebnisse, Erfahrungen
- III.3. Fortschreibung des Verwertungsplans
- III.4. Arbeiten die zu keiner Lösung geführt haben
- III.5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer
- III.6. Einhaltung von Ausgaben- und Zeitplan.

IV. Kurzfassung des Projektes (Berichtsblatt)

I. Kurze Darstellung des Projektes

Thema: „Zur biologischen Sicherheit von gentechnisch veränderter Gerste. Teilprojekt: Auswirkung von Pilzresistenzgenen auf Inhaltstoffe und deren Wechselwirkung mit assoziierten Pilzen“.

Antragsteller: Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement, Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie, Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel; Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen

Tel.: 0641-9937490

Fax: 0641-9937499

Email: Karl-Heinz.Kogel@agr.uni-giessen.de

I.1. Aufgabenstellung

Das Ziel des Verbundprojekts der beiden Partner, Justus-Liebig-Universität Gießen (JLU) und Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU; beteiligt im Zeitraum 2005-2008), war die Analyse von transgenen Gerstenlinien mit erhöhter Pilzresistenz und verbesserter Futtereigenschaft bezüglich bio-sicherheitsrelevanter Eigenschaften. Für die Versuche standen zur Verfügung: (a) Moderne Hochleistungssorten, in die ein thermostabiles (1,3-1,4)- β -Glucanase Gen (aus *Bacillus amyloliquefaciens*) aus transgenen Gerstenlinien eingekreuzt wurde. Die Linien wurden seit 1996 unter Feldbedingungen an der Washington State University, Pullman, USA, evaluiert. (b) Transgene Gerstenpflanzen, die das *Trichoderma harzianum* *ThEn42* Gen für Endochitinase exprimieren und Resistenz gegenüber einem Wurzelkrankheitskomplex verursacht durch *Rhizoctonia solani* und *Rhizoctonia oryzae* zeigen. Der künftige Markt für diese und weitere erst zu erstellende angepasste Pflanzen mit der transgenen Eigenschaft „Pilzresistenz“ ist deshalb aus ökologischer, aber auch ökonomischer Sicht interessant, weil die Kontrolle von Wurzel-, aber auch Ährenpathogenen, unter heutigen Produktionsbedingungen aufgrund fehlender oder unzureichender Wirksamkeit chemischer Wirkstoffe und fehlendem resistentem „germplasm“ immer schwieriger wird. Dies gilt für den konventionellen Anbau, aber in besonderem Maße für den organischen Landbau, wo Wurzel- und Ährenerkrankungen zu erheblichen auch gesundheitlich relevanten Intoxikationen beitragen. Gerade Wurzel- und Ährenerkrankungen werden in epidemiologisch relevantem Ausmaß durch "low input" Kulturmaßnahmen (Direktsaat, reduzierte Bodenbearbeitung) gefördert. Damit könnte ein Einsatz der hier lediglich unter Sicherheitsaspekten bearbeiteten „traits“ zu einer substanziellen Lösung von schwerwiegenden, weltweit auftretenden Problemen der Pflanzenproduktion beitragen.

In dem Projekt sollten transgene Pflanzen im Gewächshaus und im Freiland mit den folgenden Zielen bearbeitet werden: (a) Eine Evaluierung der direkten Interaktion von (transgener) Pflanze mit pilzlichen Mikroorganismen, inklusive einer Studie zur Epidemiologie der Pilzentwicklung auf transgener Gerste im direkten Vergleich zu den nicht transgenen Elternlinien. (b) Eine Evaluation der Effekte der Transgene auf die substanzielle Äquivalenz, wie auf Inhaltsstoffe und Kornqualität unter den Bedingungen des Feld- und Gewächshausanbaus (inklusive des Einflusses von Pathogendruck und Mykorrhizierung).

Die Feldstudien sollten unter den Produktionsbedingungen des „low inputs“ (reduzierte Bodenbearbeitung, reduzierte Pflanzenschutzmaßnahmen, reduzierte Saatlängen, reduzierte

Düngung) angelegt werden. Den Kern des Projekts bildete die Frage nach den Effekten von Transgenen auf die Besiedlung der Gersten durch Pathogene und Mutualisten. Die Sicherheitsrelevanz und ökologische Bedeutung der Fragestellung wird insbesondere durch die Tatsache deutlich, dass etwa 80% aller Landpflanzenfamilien in nützlicher Symbiose mit arbuskulären Mykorrhizapilzen leben, die ihrerseits erhebliche ökologische und phytomedizinische Potenziale besitzen: So sind mykorrhizierte Pflanzen widerstandsfähiger gegenüber mikrobiellen Pathogenen und toleranter gegenüber abiotischen Faktoren, wie Salzstress oder Wassermangel. Auch Getreide ist in einem hohen Ausmaß mykorrhizierbar, so dass es geboten erscheint, im Zusammenhang mit der Eigenschaft „Pilzresistenz“ Effekte von Transgenen gegenüber den ubiquitär verbreiteten, auch in Agrarökosystemen funktionellen Mikroorganismen zu prüfen.

Im Verbundprojekt sollten sich die wissenschaftlichen Kompetenzen der beteiligten Partner ergänzen: Die Arbeitsgruppe der JLU hat Erfahrung in epidemiologischen Methoden für Feldstudien, „low input“ Strategien und phytomedizinischen Methoden, die Arbeitsgruppe der FAU besitzt Erfahrung in molekularbiologischen und biochemischen Methoden. Synergien konnten auch deshalb genutzt werden, da die Gießener und Erlangerer Arbeitsgruppen z.B. in GABI-Agrotec oder GABI-forte, aber auch in der DFG Forschergruppe 666 kooperieren und Ressourcen erstellt haben (wie eigene Gersten *microarray* chips), die in dem hier durchgeführten Projekt genutzt wurden. Die Arbeiten wurden zudem in enger Kooperation mit der Washington State University (Partner 3) durchgeführt. Alle transgenen Gersten wurden von diesem Partner, der große praktische Erfahrung und ein einzigartiges technisches *know how* bezüglich der transgenen Gersten im Feldanbau besitzt, zur Verfügung gestellt.

Gemäß dem Bescheid des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittel-Sicherheit (BVL, Berlin) vom 03. April 2006 (Az. 6786-01-0168) erfolgte am 25.04.2006 die Durchführung der Freisetzung der gentechnisch veränderten Gerste auf dem Versuchsgelände des Instituts für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der JLU am Alten Steinbacher Weg 44, 35394 Gießen, Flur/Flurstück 15/75/2. Dieser Freilandversuch wurde am 28.03.2007 unter den agronomisch gleichen Bedingungen wiederholt. Darüber hinaus wurde ein weitgehend identischer Versuch im Jahr 2009 auf dem Versuchsstandort der Gemeinde 18184 Thulendorf in Mecklenburg-Vorpommern, Gemarkung Klein Lüsewitz (Flur: 2, Flurstück: 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54; Flur 1, Flurstück: 18, 19, 54) durchgeführt (Bescheid des BVL vom 04.05.2009 (Az. 6786-01-0200).

I.2. Voraussetzungen zur Durchführung des Vorhabens

Voraussetzung für die Durchführung des Verbundprojektes waren zum einen die Verfügbarkeit einer ausreichenden Menge an transgenem Saatgut sowie die Genehmigung der Freisetzung der gentechnisch veränderten Gerstenpflanzen. Zudem wird hier auf die oben skizzierten und in einschlägigen Publikationen nachgewiesenen wissenschaftlichen Kompetenzen der durchführenden Gruppen hingewiesen. Ohne die einschlägigen Kompetenzen der Projektleiter in den komplementären Bereichen Molekularbiologie, Biotechnologie und Feldanbau wäre das Projekt nicht durchführbar gewesen. Zudem war Voraussetzung für die Durchführung, dass die technische Versuchsanlage am Alten Steinbacher Weg samt dem kompetenten Personalbesatz zur Verfügung stand. Schließlich war die Kooperation mit der WSU eine wesentliche Voraussetzung für das Projekt, da das ursprüngliche Pflanzenmaterial von dorthier stammte und bereits mehrjährig im Feldanbau war.

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Neben den wissenschaftlich-technischen Vorbereitungen erfolgte eine sehr intensive Kommunikation mit der Öffentlichkeit mit zahlreichen Informationsveranstaltungen in Gießen, zahlreichen Beiträgen in der regionalen, übernationalen und internationalen Presse sowie Funk und Fernsehen (siehe www.uni-giessen.de/ipaz (Verbraucherschutz/Biosicherheit). Die mit erheblichem Zeitaufwand verbundene Kommunikation stieß zum weitaus größten Teil auf hohes Interesse, sodass sich sehr vernünftige Diskussionen ergaben. Der Besuch von Schulen ist insbesondere sehr positiv zu bewerten. Zahlreiche Schulklassen besuchten die Versuchsanlage. Dabei zeigten sich die Schüler hoch interessiert und zukunfts offen.

Lediglich eine kleine Gruppe von Versuchsgegnern (Aktionsgruppe Saasen) war einer rationalen Diskussion – die von mir mit hohem zeitlichem Aufwand auch in Bezug auf diese Splittergruppe geführt wurde, nicht zugänglich. Bereits Anfang 2006 mussten wir zur Kenntnis nehmen, dass diese Gruppe die wissenschaftlichen Versuche der Universität mit allen Mitteln verhindern wollten. Erklärtes Ziel der Gruppe war es, eine substanzielle Information der Öffentlichkeit mit belastbaren wissenschaftlichen Daten zu verhindern.

Die wissenschaftlichen Arbeiten wurden in 9 Arbeitspakete unterteilt:

- 1) Untersuchungen zur Interaktion der transgenen Gerstenpflanzen mit den endophytischen Pilzen *Glomus mosseae* und *Piriformospora indica* unter Gewächshausbedingungen im Vergleich zu den nichttransgenen Elternpflanzen.
- 2) Beantragung und Anlage von Feldversuchen mit gentechnisch veränderten Gerstenpflanzen für die Standorte Gießen und Thulendorf.
- 3) Evaluierung der Interaktion transgener Gerstenpflanzen mit dem Pilz *Glomus mosseae* und unterschiedlichen Schadpilzen unter Feldbedingungen.
- 4) Untersuchungen zur Epidemiologie pilzlicher Schaderreger.
- 5) Bestimmung agronomischer Parameter unter besonderer Berücksichtigung von Kornertrag und -qualität.
- 6) Etablierung der Metabolomanalyse für Gerste.
- 7) Vergleichende Analyse der Genexpression von transgenen Gerstenpflanzen und nicht transformierten Kontrollpflanzen unter Feldbedingungen (Standort Gießen).
- 8) Vergleichende Analyse metabolischer Unterschiede zwischen transgenen Gerstenpflanzen und nicht transformierten Kontrollpflanzen unter Feldbedingungen (Standort Gießen).
- 9) Strukturanalyse unbekannter Metabolite.

In Gießen sollten die Arbeitspakete 1-5 und in Erlangen die Arbeitspakete 6-9 der Versuchsplanung entsprechend durchgeführt werden. Ein Abschlussbericht von Partner 2 liegt bereits vor. Es wurden zwei Freisetzungsanträge an BVL gestellt. Der erste Antrag betraf die Freisetzung am Standort Gießen im Zeitraum 2005-2008. Der zweite Antrag betraf den Standort Thulendorf für den Zeitraum 2008-2010. Darüber hinaus wurden gemäß BVL-Auflagen Zwischenberichte der Freisetzungen angefertigt.

I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Im Rahmen des Verbundprojektes wurden die ersten Feldversuche mit transgener Gerste in Deutschland durchgeführt. Der wissenschaftliche und technische Stand als **Voraussetzung für die Durchführung der beantragten Versuche** wurde für den damaligen Projektantrag zusammengestellt und ist im Folgenden dem Antrag in englischer Sprache entnommen.

I.4.1. Agronomic relevance of endophytes (Ausgangsliteratur)

Plant compatibility with mycorrhizal fungi is a generalized and ancient phenomenon. In terrestrial ecosystems, species in more than 80% of extant plant families are capable of establishing arbuscular mycorrhiza (AM), and fossil evidence suggests that symbiosis of this kind existed more than 400 million years ago in the tissues of the first land plants (Remy et al., 1994). As such the ability of plants to form AM must be under control of mechanisms that have been conserved in new plant taxa as they appeared during evolution. This compatibility also implies that selective recognition processes in plants discriminate between beneficial and harmful microorganisms and that the essential genetic determinants for AM establishment are common to an extensive part of the plant kingdom.

Interactions between an AM fungus and a plant start when a hypha from a germinating soilborne spore comes into contact with a host root. This step is followed by induction of an appressorium, from which an infection hyphae penetrates deep into parenchyma cortex, where inter- and intracellular proliferation of mycelium is intense. Fungal development culminates in the differentiation of intracellular haustoria-like structures, known as arbuscles. This fungal structure, that establishes a large surface of contact with the plant protoplast, is attributed a key role in reciprocal nutrient exchange between the plant cell and the AM fungus. AM development continues within a root system as the fungus spreads to newly emerging roots. In this way, fungal colonization occurs concomitantly in different roots in an unsynchronized manner.

Through their function in the efficient exploitation of soil mineral resources and their bio-protective role against a number of common soilborne pathogens (Barea et al. 2002; Sanders 2003), AM fungi are instrumental in the survival and fitness of many plant taxa in diverse ecosystems, including many crop species (Allen 1991; Bethlenfalvai and Lindermann 1992). Thus, AM clearly affects prime agronomical parameters like quantity and quality of yield.

Earlier investigations demonstrated already that AM is present and plays a crucial role in agroecosystems (Winter 1951, Kruckelmann 1975, Land 1990, Baltruschat und Dehne 1988 and 1989, Baltruschat 1990). In these systems, the AM is able to strengthen the plant against adverse environmental conditions rather than it is a factor for improved plant nutrition (Peuss 1957). Mycorrhizal fungal species adapted to diverse agro-ecosystems seems to enhance resistance to biotic and tolerance to abiotic stress factors even under optimized nutritional conditions (Dehne, 1987; Baltruschat, 1993).

Owing to their key position at the plant-soil interface, AM is important to consider in the study of ecosystem impacts due to anthropological action. Human-induced changes in the earth's environment are clearly multi-factorial, and may have positive or negative impacts on mycorrhizal associations. One factor, that might directly affect mycosymbionts, is a change in the plant genotypes associated with fungal disease resistance. Both, a systematic epidemiological analysis as well as a direct interaction study are crucial for a mechanistic understanding of the impact of

specific as well as broad fungal resistance traits on changes in mycosymbionts. It can be expected that relevant effects rarely occur in isolation or under semi-artificial conditions but only under natural i.e. field situations. The complexity of regional combinations further highlights the need for mechanistic studies, since direct experimental exploration of a large number of scenarios would be virtually impossible. Processes and patterns at larger temporal and spatial scales have to be considered in an assessment of the impact on AM by transgenes conferring fungal resistance. Most laboratory experiments only allow access to short-term responses, while longer-term responses are really relevant. Large scale processes such as shifts in the regional distribution of transgenic plant certainly could affect AM, e.g. alter the current distribution of AM types. With potential impacts on host biodiversity, mycosymbiont species diversity may also be impacted at global scales.

I.4.2. Agronomic relevance for root and ear diseases

The *spike* is one target for *Fusarium* species. Infections not only result in a significant yield reduction, but also contaminate grains with mycotoxins produced by the pathogens. Thus, spike infections are highly critical for food safety (Jansen et al. 2005).

The *root* is the target for pathogens bearing – in present crop production systems - a highly devastating potential. Among the genus *Fusarium*, *F. culmorum* is predominantly present at the root. Furthermore, *Gaeumannomyces graminis* and *Rhizoctonia* species are serious fungal pathogens with worldwide distribution. The lack of significant genetic (monogenic) sources for disease resistance as well as the unsatisfactory efficacy of specific chemical fungicides for controlling root pathogens creates the urgent need for genomic strategies. In this context it must be emphasized that, because of economical pressure, farmers are continuously forced to reduce crop rotations which will significantly elevate the threat to plant production by these pathogens.

I.4.3. Requirement for root disease resistance cultivars for direct seed (no till) cropping systems

Compared to traditional cropping systems that use tillage, direct-seed cropping systems place seed and fertilizer directly into undisturbed soil with all residues of the previous crops left on the soil surface. These systems are being increasingly adopted by farmers worldwide because of their potential to reduce input costs, increase yields where water is limiting, reduce soil erosion, and conserve energy (Cook and Veseth, 1991; Cook, 1992; Cook et al., 1995; Cook, 2000). One of the main limiting factors to the adoption of direct-seeding for wheat and barley are root rot epidemics caused by *Rhizoctonia solani* anastomosis group 8 (AG8) and *R. oryzae* (Weller et al., 1986; Pumphrey et al., 1987; Ogoshi et al., 1990; Mazzola et al., 1996, Bockus and Shroyer, 1998; Cook, 2000). Both have a very wide host range, causing root rot on other cereal as well as on many broadleaf crops, including peas, canola, safflower, lentils, chickpeas, and potatoes (Cook et al. 2000a), which encompasses all crops available for rotation with cereals. This broad host range makes *Rhizoctonia* root rot of barley and wheat virtually impossible to control by crop rotation. Of the many practices tested to limit the severity of *Rhizoctonia* root rot, only two worked consistently. These are *i.* timely elimination of volunteer-cereal and grass-weed hosts of the pathogens (Smiley, et al., 1991, 1992), which minimizes the sources of inoculum; and *ii.* placement of fertilizer directly beneath each seed row (Cook, 2000b), which makes nutrients more accessible to diseased roots. However these two practices combined only can elevate grain yields to 80-85% of potential yield without root disease (Cook et al., 2002).

No useful resistance has been identified in germplasm comprised of 114 accessions of hexaploid and tetraploid wheat, triticale, wild *Triticum* species and barley (Smith *et al.*, 2003 a,b). Only germplasm of *D. villosum* exhibited some level of seedling resistance. However, *D. villosum* chromosomes do not pair well with wheat (*Triticum*) chromosomes (Maan, 1987; Smith *et al.*, 2003) and thus make it difficult to transfer the resistance to wheat via traditional chromosome manipulation. Root rot caused by *R. solani* AG8 and *R. oryzae* can therefore be considered a logical candidate for control by transgenic resistance.

Two observations led to an investigation of the hypothesis that expression in barley of the 42-kDa endochitinase-encoding gene *ThEn42* of *Trichoderma harzianum* can confer resistance to one or both pathogens responsible for *Rhizoctonia* root rot. (1) Zeilinger *et al.* (1999) monitored expression of this endochitinase during mycoparasitism with a fusion of the green fluorescent protein (GFP) to the 5' regulatory sequence of the chitinase as a reporter in *T. harzianum* P1 during confrontation assays with *R. solani*. In contrast to other enzymes, this endochitinase was induced before *T. harzianum* is in physical contact with its host and was able as such to inhibit the growth of *R. solani* strain 1450. (2) In 1998, Lorito *et al.* (1998) successfully transferred the 42-kDa chitinase gene *ThEn42* (*chit42*) into tobacco and potato and obtained high expression of this chitinase in different plant tissues. Selected transgenic lines were coordinately tolerant or highly resistant to *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Botrytis cinerea*, and *R. solani*. Their research provides the first demonstration that plants transformed for expression of a fungal chitinase gene show high resistance to several fungal pathogens. Resistance to apple scab was conferred with the endochitinase in transgenic apples (Bolar *et al.*, 2000) and to *Alternaria brassicicola* in transgenic broccoli (Mora and Earle, 2001a,b).

I.4.4. Literatur

1. Baltruschat, H. and H.-W. Dehne, 1989: The occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhiza in agroecosystems. II. Influence of nitrogen fertilization and green manure in continuous monoculture and in crop rotation on the inoculum potential in winter barley. *Plant and Soil* 113, 251-256.
2. Baltruschat, H., 1990: Der Einfluß mineralischer Düngung auf die VA Mykorrhiza. *Kali-Briefe* (Büntehof) 20, 77-91.
3. Barea *et al.* 2002. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 343-351.
4. Bockus, W.W. and Shroyer, J.P. 1998. The impact of reduced tillage on soilborne plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 36:485-500.
5. Bolar, J.P., Norelli, J.L., Wong, K.W., Hayes, C.K., Harman, G.E. and Aldwinckle, H.B. 2000. Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. *Phytopathology* 90(1):72-77.
6. Bousset L, Pons-Kühnemann J. 2003. Effects of Acibenzolar-S-Methyl and Ethirimol on the composition of a laboratory population of barley powdery mildew. *Phytopathology* 93:305-315.
7. Cook, R. J. 2001. Management of wheat and barley root diseases in modern farming systems. *Australasian Plant Pathology* 30:119-126.
8. Cook, R. J. 2003. Take-all of wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62:87-98.
9. Cook, R. J., D. M. Weller, A. Y. El-Banna, D. Vakoch, and H. Zhang. 2002. Yield responses of direct-seeded wheat to fungicide and rhizobacteria seed-treatments. *Plant Disease* 86:780-784.
10. Cook, R. J., W. F. Schillinger, and N.W. Christensen. 2002. *Rhizoctonia* root rot and wheat take-all in diverse no-till cropping systems. *Can. J. Pl. Pathology* 24:349-358.
11. Cook, R.J. 1992. Wheat root health management and environmental concern. *Can. J. Plant Pathol.* 14: 76-85.

12. Cook, R.J. 2000a. Advances in plant health management in the twentieth century. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38: 95-116.
13. Cook, R.J. 2000b. Influence of paired-row spacing and fertilizer placement on yield and root diseases of direct-seeded wheat. *Crop science* 40(4): 1079-1087.
14. Cook, R.J. and Veseth, R.J. 1991. *Wheat health management*. St. Paul, MN: APS Press.
15. Cook, R.J., Adams, E., Guy, S., Huggins, D., Kennedy, A., Ruark, D., Smiley, R., Thill, D., Veseth, R., Wilkins, D., Wysocki, D., Zakarison, E. and Zenner, R. 2003 *Retooling Agriculture*.
16. A Report on Direct-Seed Cropping Systems Research in the Pacific Northwest. A Pacific Northwest Extension Publication. Washington State University. Oregon State University. University of Idaho. In cooperation with USDA ARS and the Pacific Northwest Direct Seed Association pp.1-42
17. Cook, R.J., Gabriel, C.J., Kelman, A., Tolin, S. And Vidaver, A.R. 1995. Research on plant disease and pest management is essential to sustainable agriculture. *BioScience* 45:354-357.
18. Dehne, H.-W., 1997: Arbuskuläre Mykorrhizapilze als Faktoren im Integrierten Pflanzenbau. In: Anwendung arbuskulärer Mykorrhizapilze im Pflanzenbau. *Mitteilungen aus der Biol. Bundesanstalt für land- und Forstwirtschaft*, Heft 332, 8-15
19. Hau B, Pons J (1996) Selection of populations of barley powdery mildew influenced by fungicide strategies. In: Lyr H, Russell PE, Sisler HD (eds.) *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*. Intercept, Andover, 357-364.
20. Jansen C, von Wettstein D, Schäfer W, Kogel KH, Felk F, Maier FJ (2005) Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 102, 16892-16897.
21. Land, S., 1990: Auftreten und Charakterisierung der vesikulär-arbuskulären (VA) Mykorrhiza in intensiv genutzten Ackerböden. *Diss. Universität Hannover*
22. Lorito, M., Woo, S.L., Fernandez, I.G., Colucci, G., Harman, G.E., Pintor-Toro, J.A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C.B., Zoina, A., Tuzun, S. and Scala, F. 1998. Gene from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:7860-7865.
23. Maan, S.S. 1987. Interspecific and intergeneric hybridization in wheat. P.453-461. In E.G. Heyne (ed.) *Wheat and wheat improvement*. 2nd ed. Agron. Monogr. 13. ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI.
24. Mazzola, M., Wong, O.T. and Cook, R.J. 1996 Virulence of *Rhizoctonia oryzae* and *R. solani* AG-8 on wheat and detection of *R. oryzae* in plant tissue by PCR. *Phytopathology* 86: 354-360.
25. Mora, A. and Earle, E.D., 2001. Combination of *Trichoderma harzianum* endochitinase and a membrane-affecting fungicide on control of *Alternaria* leaf spot in transgenic broccoli plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 306-310.
26. Mora, A.A. and Earle, E.D. 2001. Resistance to *Alternaria brassicicola* in transgenic broccoli expressing a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene. *Molecular breeding* 8(1): 1-9.
27. Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25: 125-143.
28. Østergård H, Pons J (1996) Epidemic development of a barley powdery mildew population. In: *Cereal Rusts and Powdery Mildews Bulletin*, Vol.24, Supplement, 279-283.
29. Peuss, H., 1957: Untersuchungen zur Ökologie und Bedeutung der Tabakmykorrhiza. *Arch. f. Mikrobiol.* 29, 112-142
30. Pons J, Balzter H, Langsdorf A, Köhler W (1998) Population Genetics: Genetic Analysis and Modelling of Natural Populations. *Progress in Botany* 59:194-226.
31. Pons J, Hau B (1992) Variation in Fungicide Sensitivity in Populations of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 24:332-334.
32. Pons J, Hau B (1996) Modelling the dynamics of fungicide sensitivity within populations of powdery mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). In: EUR 16884 - COST 817 - Population studies of airborne pathogens on cereals as a means of improving strategies for disease control. *Integrated*

- control of cereal mildews and rusts: Towards coordination of research across Europe. (Limpert E, Finckh MR, Wolfe MS, eds.) 269-270.
33. Pons J, Hau B, Köhler W (1996) Dynamics of fungicide resistance and virulence of powdery mildew populations. In: Cereal Rusts and Powdery Mildews Bulletin, Vol.24, Supplement, 275-278.
 34. Pons J, Löwer C, Braun P, Köhler W (2000): Coevolution in Host-Pathogen Systems. Progress in Botany. Progress in Botany, 61:148 - 166.
 35. Pons-Kühnemann J (1994) Struktur und Dynamik der Fungizidresistenz in Populationen von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* bei verschiedenen Applikationsstrategien mit Triadimenol und Ethirimol. Aachen, Shaker.
 36. Remy Taylor Hass Kerp 1994. Four hundred-million-years-old vesicular arbuscular mycorrhizae. PNAS 91, 11841-11843.
 37. Sanders, I. R. 2003. Preference, specificity and cheating in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Trends in Plant Science 8, 143-145.
 38. Simón Pérez Martínez, Rod Snowdon, Jörn Pons-Kühnemann (2004). Variability of Cuban and international Populations of *Alternaria solani* from Different Hosts and Localities: AFLP Genetic Analysis. European Journal of Plant Pathology (accepted).
 39. Smiley, R.W., Ogg, A.G.Jr. and Cook, R.J. 1991. Influence of glyphosate on *Rhizoctonia* root rot, growth, and yield of barley. Plant disease 76(9):937-942.
 40. Smiley, R.W., Ogg, A.G.Jr. and Cook, R. J. 1992. Impact of sulfonylurea herbicides on *Rhizoctonia* root rot, growth, and yield of winter wheat. Plant disease 76(4): 399-404.
 41. Smith, J.D., Kidwell, K.D., Evans, M.A., Cook, R.J. and Smiley, R.W. 2003a. Assessment of spring wheat genotypes for disease reaction to *Rhizoctonia solani* AG-8 in controlled environment and direct-seeded field evaluations. Crop Sci. 43:694-700.
 42. Smith, J.D., Kidwell, K.D., Evans, M.A., Cook, R.J. and Smiley, R.W. 2003b. Evaluation of spring cereal grains and wild *Triticum* germplasm for resistance to *Rhizoctonia solani* AG-8. Crop Sci. 43:701-709.
 43. Varma A, Verma S, Sudha, Sahay N, Bütehorn B, Franken P (1999) *Piriformospora indica*, a cultivable plant growth-promoting root endophyte. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2741-2744.
 44. Verma S, Varma A, Rexer K-H, Hassel A, Kost G, Sarbhoy A, Bisen P, Bütehorn B, Franken P (1998) *Piriformospora indica*, gen. nov. sp. nov., a new root-colonizing fungus. Mycologia 90: 898-905
 45. Weller, D.M., Cook, R.J., MacNish, G., Bassett, E.N., Powelson, R.L. and Petersen, R.R. 1986. *Rhizoctonia* root rot of small cereals favored by reduced tillage in the Pacific Northwest. Plant Dis. 70: 70-73.
 46. Wettstein D. von, G. Mikhaylenko, J.A. Froseth & C.G. Kannangara (2000) Improved barley broiler feed with transgenic malt containing heat-stable (1,3-1,4)- β -glucanase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13512-13517.
 47. Wettstein, D.von, J. Warner & C.G. Kannangara (2003) Supplements of transgenic malt or grain containing (1,3-1,4)- β -glucanase to barley based broiler diets lift their nutritive value to that of corn. Brit. J. Poultry Sci. 44:438-449.
 48. Winter, A.G., 1951: Untersuchungen über die Verbreitung und Bedeutung der Mykorrhiza bei kultivierten Gramineen und einigen anderen landwirtschaftlichen Nutzpflanzen. Phytopath. Z. 17:421-432.
 49. Wu Yongchun 2003. Transformation of barley for resistance to *Rhizoctonia* root rot. Ph.D. thesis. Washington State University, Department of Plant Pathology. P.1-97.
 50. Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer K., Woo, S.L., Mach R.L., Fekete, C., Lorito, M. and Kubicek, P. 1999. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. Fung. Genet. 26:131-140.

I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Verbundprojekt wurde in enger Abstimmung mit Prof. Dr. Uwe Sonnewald, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, durchgeführt. Darüber hinaus gab es eine Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Diter von Wettstein, Washington State University (WSU), Pullman, WA USA), der das für die Experimente verwendete Pflanzenmaterial zur Verfügung stellte. Für die Feldversuche am Standort Thulendorf erfolgte eine Zusammenarbeit mit Kerstin Schmidt, InnoPlanta.

II. Darstellung der erzielten Ergebnisse

II.1. Verwendung der Zuwendung / Gegenüberstellung vorgegebene Ziele

II.1.1. Gegenüberstellung der Ziele / Ergebnisse

Im Weiteren stellen wird hier zunächst die im ursprünglichen Antrag genannten Ziele (Arbeitsplan), bzw. den daraus im Zuwendungsbescheid (2005) genehmigten Teil, den erreichten Ergebnissen gegenüber:

2004- 2005

Der ursprüngliche Antrag der Universitäten Gießen, Erlangen/Nürnberg und des Kooperationspartners WSU enthielt milestones für die Jahre 2004 und 2005. Der Projektbeginn des hier zu berichtenden Projektes war April 2005, ab diesem Zeitpunkt erfolgte auch eine Zuwendung von Mitteln. Die Arbeiten in 2004 sind nicht Gegenstand dieses Berichts. Im Jahr 2005 haben abweichend vom ursprünglichen Antrag Vermehrungsversuche von transgenem Material, molekulare Analysen des Materials (qRT-PCR; mikroskopische Analysen)), und erste Testungen im Gewächshaus stattgefunden. Zudem wurde, nachdem der Zuwendungsbescheid vorlag, in 2005 eine Genehmigung für die Freisetzung beim BvL gestellt.

2006

Beantragtes Teilziel:

The field nurseries at Gießen (and WSU): Planting by a dedicated Wintersteiger Precision Space Planter which permits total cleaning from grains between seeding of individual plots or drills/rows, thus avoiding admixtures of grains. Plantings with direct seed (no till) compared to conventional strategy.

Erzielte Ergebnisse:

Der Feldversuch wurde durchgeführt. Es erfolgte eine Teilverwüstung (siehe Ergebnisteil).

Kosten:

Durch Teilzerstörung waren die Kosten erheblich *höher* als beantragt. Zusätzliche Personalressourcen mussten für Aufräumarbeiten eingesetzt werden. Diese Kosten und insbesondere Bewachungskosten wurden von der JLU zusätzlich getragen.

Beantragtes Teilziel:

Epidemiological studies of pathogens and of mycorrhiza fungus *Glomus mosseae* and *Piriformospora indica* in the root/soil system of transgenic plants: incl. artificial soil inoculation (IPAZ)

Erzielte Ergebnisse:

Aufgrund der Teilerstörung wurden keine epidemiologischen Studien und keine Ertragshebungen durchgeführt.

Kosten:

Die für diese Arbeiten vorgesehenen Ressourcen (Personal) wurden zur Rettung von Freilandpflanzen und zu deren Inspektion für Versuchszecke verwendet. Außerdem wurden Gewächshausversuche mit transgenen Pflanzen zusätzlich durchgeführt.

Beantragtes Teilziel:

Laboratory studies (confocal laser microscopy) on the interaction of transgenes with mycorrhiza fungus *Glomus mosseae* and *Piriformospora indica* (all transgenes) (IPAZ)

Erzielte Ergebnisse:

Versuch wurde an den zur Verfügung stehenden Pflanzen durchgeführt.

Kosten:

wie beantragt.

Beantragtes Teilziel:

Ingredients and quality analysis: Rpg1 (IPK)

Erzielte Ergebnisse:

Die Versuche wurden nur in USA durchgeführt; eine Genehmigung für Freilandversuche in Gatersleben wurde nicht beantragt.

Kosten:

Die Versuche in USA wurden wie im Antrag dargelegt von amerikanischer Seite übernommen.

2007

Beantragtes Teilziel:

Field trials as in Year 2005-2006

Erzielte Ergebnisse:

Der Feldversuch wurde durchgeführt. Es erfolgte eine Teilverwüstung (siehe Ergebnisteil).

Kosten:

Durch Teilzerstörung waren die Kosten erheblich *höher* als beantragt. Zusätzliche Personalressourcen mussten für Aufräumarbeiten eingesetzt werden. Diese Kosten und insbesondere Bewachungskosten wurden von der JLU zusätzlich getragen.

Beantragtes Teilziel:

Epidemiological studies

Erzielte Ergebnisse:

Aufgrund der Teilzerstörung wurden keine epidemiologischen Studien und keine Ertragshebungen durchgeführt.

Kosten:

Die für diese Arbeiten vorgesehenen Ressourcen (Personal) wurden zur Rettung von Freilandpflanzen und zu deren Inspektion für Versuchszecke verwendet. Außerdem wurden Gewächshausversuche mit transgenen Pflanzen zusätzlich durchgeführt.

Beantragtes Teilziel:

Laboratory studies (confocal laser microscopy) on the interaction of transgenes with mycorrhiza fungus *Glomus mosseae* and *Piriformospora indica* (all transgenes) (IPAZ)

Erzielte Ergebnisse:

Versuch wurde an den zur Verfügung stehenden Pflanzen wie beantragt durchgeführt.

Kosten: wie beantragt.

Beantragtes Teilziel:

Ingredients and quality analysis: Transgen Chitinase (IPK)

Erzielte Ergebnisse:

Die Ergebnisse sind im Abschlussbericht der Universität Erlangen-Nürnberg aufgeführt und in Kogel et al. 2010 (PNAS siehe Anhang) veröffentlicht worden.

Kosten:

Wie beantragt.

2008

Beantragtes Teilziel:

Field trials as in Year (2005-2006 and 2006-2007)

Erzielte Ergebnisse:

Der Feldversuch wurde nicht durchgeführt. Es erfolgte eine Besetzung und Verwüstung der Freilandflächen; eine chemische Kontamination der Flächen konnte nicht ausgeschlossen werden.

Kosten:

Durch Verwüstung der Freisetzungsf lächen und Überwachung des verwüsteten Bereichs entstanden Mehrkosten in erheblichem Umfang, die die JLU zusätzlich tragen musste. Zusätzliche Personalressourcen mussten für Aufräumarbeiten eingesetzt werden. Diese Kosten und insbesondere Bewachungskosten wurden von der JLU zusätzlich getragen. Kosten für die im Antrag vorgesehenen Feldversuche wurde nach Beantragung beim Projektträger auf Gewächshausversuche umgewidmet.

Beantragtes Teilziel:

Epidemiological studies.

Erzielte Ergebnisse:

Konnte nicht erfolgen.

Kosten:

Kosten wurde nach Beantragung beim Projektträger auf Gewächshausversuche umgewidmet.

Beantragtes Teilziel:

Laboratory studies (confocal laser microscopy) on the interaction of transgenes with mycorrhiza fungus *Glomus mosseae* and *Piriformospora indica* (new genotypes with single (*ThEn42(GC)* gene insertion and root expression) (IPAZ)

Erzielte Ergebnisse:

Die Daten wurden an Gewächshauspflanzen erhoben.

Kosten:

wie beantragt.

Beantragtes Teilziel:

Ingredients and quality analysis: Transgen *Rpg1* (IPK)

Die Ergebnisse sind im Abschlussbericht der Universität Erlangen-Nürnberg aufgeführt und in Kogel et al. 2010 (PNAS siehe Anhang) veröffentlicht worden.

Kosten: wie beantragt.

2009

Beantragtes Teilziel:

The field nurseries at Gießen: Planting by a dedicated Wintersteiger Precision Space Planter which permits total cleaning from grains between seeding of individual plots or drills/ rows, thus avoiding admixtures of grains.

Erzielte Ergebnisse:

Die Versuche wurden wie beantragt durchgeführt (Ergebnisteil 2009), jedoch vom Standort Gießen zum Standort Thulendorf verlegt.

Kosten:

Aufgrund des Standortwechsels *höher* als beantragt. Die Mehrkosten (insbesondere Personalkosten) hat die JLU Gießen (IPAZ) übernommen.

Beantragtes Teilziel:

Field evaluations of fungal pathogens and of artificially inoculated beneficial fungus *Glomus mosseae* in the root/soil system of transgenic plants.

Erzielte Ergebnisse:

Der Versuchsteil wurde nach Zerstörung des Versuchsfeldes nach Wiederanlage wie beantragt durchgeführt (siehe Ergebnisteil 2009).

Kosten:

Aufgrund der Verwüstung nach *Erstanlage* des Versuchs sehr viel *höher* als beantragt: Die Mehrkosten (insbesondere Personalkosten) hat die JLU Gießen (IPAZ) übernommen. Wegen der Wiederanlage des Versuchs nach erster Zerstörung mussten Sachkosten teilweise im Vorgriff auf das Jahr 2010 verwendet werden (siehe Kostenplan), um eine qualitative hochwertige Versuchsauswertung zu gewährleisten.

Beantragtes Teilziel:

Greenhouse studies with the same transgenic barley genotypes.

Erzielte Ergebnisse:

Der Versuch konnte wie beantragt durchgeführt werden, da er vor dem Zugriff von Randalierern geschützt werden konnte (siehe Ergebnisteil 2009).

Kosten:

wie beantragt.

Beantragtes Teilziel:

Laboratory analysis with field and greenhouse samples for AM fungus quantification. (Histochemistry and QPCR).

Erzieltes Ergebnis:

Der Versuch konnte wie beantragt durchgeführt werden, da er vor dem Zugriff von Randalierern geschützt werden konnte (siehe Ergebnisteil 2009).

Kosten:

wie beantragt.

Beantragtes Teilziel:
Writing an (invited) review on global biosafety programs.

Erzieltes Ergebnis:
Die Versuchsdaten fanden Eingang in die Publikation Kogel et al. 2010 (PNAS, siehe Anhang)

Kosten:
Wie beantragt.

Januar-März 2010

Beantragtes Teilziel:
Greenhouse studies as in Year 2009.

Erzieltes Ergebnis:
Der Versuch konnte wie beantragt durchgeführt werden, da er vor dem Zugriff von Randalierern geschützt werden konnte (siehe Ergebnisteil 2010).

Kosten:
wie beantragt.

Beantragtes Teilziel:
Laboratory analysis with field and greenhouse samples for AM fungus quantification. (Histochemistry and QPCR).

Erzieltes Ergebnis:
Der Versuch konnte wie beantragt durchgeführt werden, da er vor dem Zugriff von Randalierern geschützt werden konnte (siehe Ergebnisteil 2010).

Kosten:
wie beantragt.

Beantragtes Teilziel:
Publication of the data.

Erzieltes Ergebnis:
Kogel et al. 2010 (PNAS, siehe Anhang)

Kosten:
Wie beantragt.

II.1.2. Beantragte und durchgeführte Veränderung zum ursprünglichen Antrag

Ausfall der epidemiologischen Studien der Jahre 2006, 2007 und 2008

Im ursprünglichen Projektantrag waren für die Freilandversuche der Jahre 2006 bis 2007 auch epidemiologische Studien an beiden transgenen Linien vorgesehen, um einen Einfluss der antifungal wirkenden Transgene auf pilzliche Blatt- und Ährenerkrankungen zu überprüfen. Dabei sollte die Hypothese überprüft werden, dass Gerste, welche das Endochitinase-Gen exprimiert, in den oberirdischen Pflanzenorganen resistenter gegenüber Pathogenen aus dem Reich der Echten Pilze (Fungi), welche Chitin in ihren Hyphen besitzen, ist. In Hinblick auf die transgene Gerste mit dem Glukanase-Gen hingegen war die Nullhypothese, dass aufgrund der hochspezifischen Expression des Transgens im Gersten-Endosperm kein positiver Effekt auf Blattpathogene zu erwarten ist. Diese für eine Gesamtbewertung der Pflanzen grundlegenden Untersuchungen konnten nicht durchgeführt werden: Aufgrund wiederholter mutwilliger Beschädigungen universitärer Einrichtungen im und um den Freisetzungsbereichs in den Jahren 2006 und 2007 (eine ausführliche Dokumentation der Schäden liegt Ihnen vor) standen nicht genügend unbeschädigte Freilandpflanzen zur Verfügung, um eine statistisch verwertbare Analyse von pilzlichen Infektionen durchzuführen. Deshalb wurden weder epidemiologische Analysen noch Ertragshebungen vorgenommen, da diese zu keinen wissenschaftlich belastbaren Aussagen geführt hätten.

Im März 2008 wurde das Versuchsfeld bereits vor der Aussaat besetzt. Da von den Besetzern eine Kontaminierung des Bodens angekündigt wurde und es zu erheblichen Zerstörungen im und um das Feld kam – u. a. wurden Bienenstöcke eines am Feld ansässigen Imkers zerstört – war aus unserer Einschätzung eine Versuchsdurchführung nach guter wissenschaftlicher Praxis am vorgesehenen Standort „Alter Steinbacher Weg“ nicht mehr möglich; von Feldversuchen in 2008 wurde deshalb abgesehen – sodass dementsprechend keine epidemiologischen Studien sowie keine Ertragsstudien für das Jahr 2008 vorgelegt werden können.

Die im ursprünglichen Antrag vorgesehenen Ressourcen zur Durchführung von epidemiologischen Studien und Ertragsstudien wurden nach Absprache mit dem Projektträger für Gewächshausversuche verwendet, in denen die transgenen Pflanzen mit Bodenpilzen inokuliert wurden, um zusätzliche Daten über die Beeinflussung von Bodenpilzen durch beide Transgene zu erhalten. Die Ergebnisse zu diesen Versuchen sind in diesem Bericht unter den entsprechenden Jahreskapiteln dargelegt. Zudem wurden Ergebnisse dieser zusätzlichen Versuche teilweise in der Publikation Kogel et al. 2010 (PNAS, siehe Anhang) veröffentlicht und stehen damit der Öffentlichkeit zur Verfügung.

Bei den umgewidmeten Mittel handelt es sich insbesondere um Personalmittel, die durch Ausfall der Bonitierungsversuche und Ertragsstudien nicht zu diesen Zwecken eingesetzt werden konnten. Sattdessen wurde das Personal im Gewächshaus eingesetzt. Im Gewächshaus selbst erfolgten keine Studien zur Epidemiologie und zur Ertragsbildung, da dies aus agronomischer Sicht nicht der guten wissenschaftlichen Praxis entsprochen hätte (artifizielle Versuchsbedingungen).

II.1.3. Ergebnisse der Freisetzungsversuche im Einzelnen

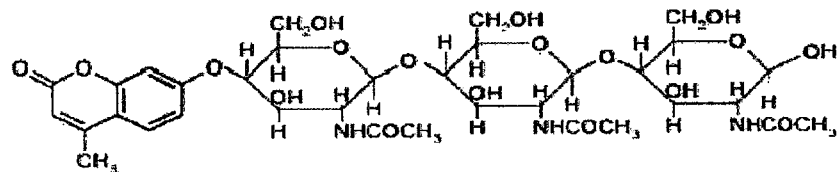
2005

Gemäß dem im Antrag ausgeführten Zeitplan und vorbereitend für die geplanten Freisetzen wurden unter definierten Umweltbedingungen im Gewächshaus Untersuchungen mit den oben genannten transgenen Gerstenlinien durchgeführt. Als Stellvertreter für die Gruppe der mutualistischen Endophyten wurde *Piriformospora indica* in die Untersuchungen einbezogen. Zur Bewertung der Interaktion wurden die Pflanzenhöhe, die Anzahl der Bestockungstriebe und die Anzahl ährentragender Halme bestimmt. Die Untersuchungen umfassten vier transgene Gerstenlinien. Drei Linien entstammen unabhängigen Transformationsereignissen mit dem Transgen *ThEn42* und unterscheiden sich in ihren Gehalten an rekombinantem Protein (16, 107 bzw. 200 µg ThEn42 g⁻¹ FW). Die vierte Linie exprimiert eine 1,3-1,4-β-Glucanase.

Anhand des Versuchsaufbaus sollte erfasst werden, ob (i) ein Zusammenhang zwischen der Synthese der rekombinanten Proteine und der Entwicklung von Krankheitssymptomen bzw. der biologischen Aktivität von *P. indica* besteht. Die Verwendung der drei ThEn42 exprimierenden Linien sollte (ii) zusätzlich klären, inwieweit graduelle Unterschiede in der Synthese von ThEn42 die Pflanze-Pilz Interaktionen beeinflussen. Diese Untersuchungen ergänzend, wurde das Pflanzenmaterial des Gewächshausversuchs für die Metabolitenanalyse durch Partner 2 genutzt.

Nachweis von Endochitinase im Samen transgener Linien

Zur Bestimmung der Enzymaktivität der *Trichoderma* Endochitinase in einzelnen Samen wurde ein qualitativer Test entwickelt. Dabei wurden einzelne Samen geschnitten und in 200 µl Natriumacetat Puffer (pH 5,5) mit 2 µg Methylumbelliferyl- Beta-D-N,N,N-Triacetylchitotrioside 10 min lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die im Korn vorhandene Endochitinase spaltet die Chitotrioside vom Fluoreszenzfarbstoff Methylumbelliferyl ab. Die intensive Fluoreszenz des Methylumbelliferon ist danach unter UV-Licht sichtbar (Abbildung 1).



4-Methylumbelliferyl Beta-D-N,N,N'-Triacetylchitotrioside

Abbildung 1: Nachweis von Endochitinase im Korn transgener Linien. Die unter UV-Licht leuchtende Lösung in den Reaktionsgefäßen zeigt die Aktivität der Endochitinase im Korn einer transgener Linie (links). Die Samen der nicht-transgenen Kontrolle zeigen keine Endochitinase Aktivität (rechts).

Quantitative Bestimmung der Aktivität von Endochitinase in pflanzlichen Geweben transgener Linien

Das Pflanzenmaterial wurde in Flüssigstickstoff gemörsert und 400 µl Extraktionspuffer (50 mM Na-Acetat mit 100 µg / ml Rinderserumalbumin (BSA, pH 5,5) zugegeben, gevortext und 10 min bei 13.000 U / min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Röhrchen überführt und bei 4°C gelagert. Für die quantitative Bestimmung der Chitinase wurden 5 µl-Protein-Lösung mit 45 µl Na-Acetat Puffer gemischt und mit 0,5 µg Methylumbelliferyl-chitotrioside (Sigma) gemischt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur 10 min lang unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde dann bei Zugabe von 50 µl 0,3 M Glycin / NaOH-Puffer (pH 10,6) gestoppt. Die Fluoreszenz wurde mit einem Spektrophotometer (Anregung/Emission 360 nm / 455 nm) gemessen. Die Menge des Enzyms wurde mit einer Standardkurve unter Verwendung von Endochitinase aus *Pichia pastoris* ermittelt (Abbildung 2).

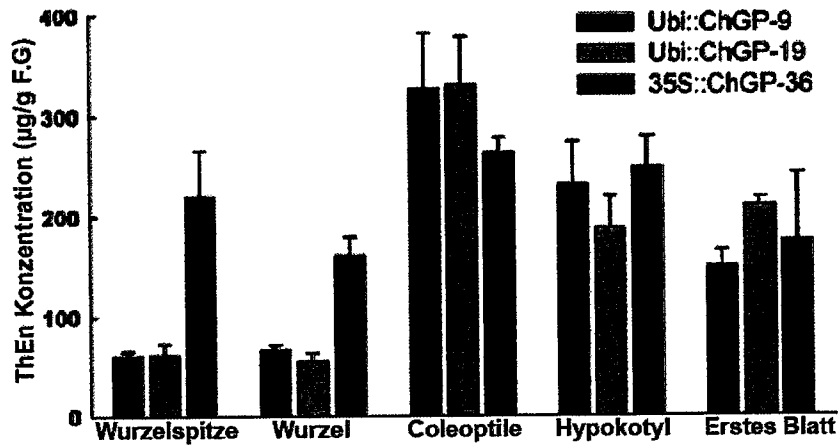


Abbildung 2: Gewebe-spezifische Anreicherung von Endochitinase (ThEn42) in transgenen Sämlingen. Die Abbildung zeigt die unterschiedlichen Mengen an Endochitinase in Wurzelspitzen, oberen Teilen der Wurzeln, Koleoptilen, Hypokotylen und ersten Blättern.

Southern Blot Analyse des nptIII-Gens

Eine Auflage für die Freisetzungsgenehmigung war ein Nachweis, dass keine unerwünschten bakteriellen DNA Sequenzen außerhalb der T-DNA übertragen wurden. Dazu wurde ein Southern blot durchgeführt (Abbildung 3) um die Abwesenheit des nptIII Antibiotika-Resistenzgens zu bestätigen. Die genomische DNA von vier Pflanzen der Linie pYW210-9-(4001-4360) bzw. fünf Pflanzen der Linie pJH271-Beta-Glu-307 wurden auf eine Nylonmembran geblottet. Die für die Hybridisierung verwendete Sonde basiert auf einem PCR-Produkt, welches die kodierenden Bereiche des nptIII-Gens (Position 965-1315 + 2086-3078) und des inserierten „transposable element“ IS1 (Position 1316-2085) komplett umfasst. Auf Grund fehlender Hybridisierungssignale in den transgenen Linien wird eine Integration des nptIII-Gens in das Genom der Linien pYW210-9-(4001-4360) und pJH271-Beta-Glu-307 ausgeschlossen.

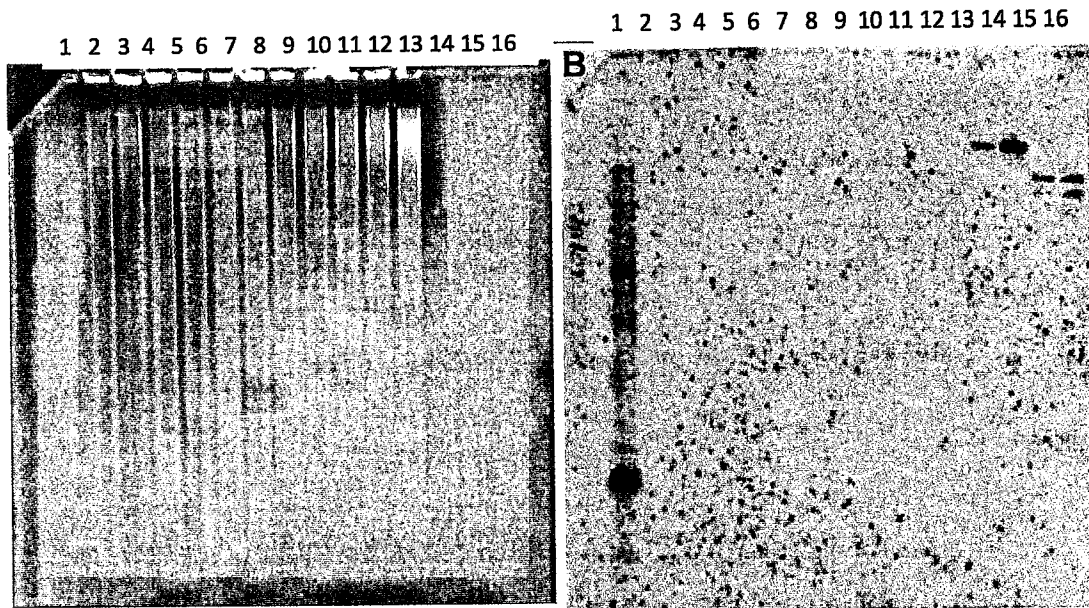


Abbildung 3: Die genomische DNA ausgewählter Pflanzen wurde mit *Hind*III (Proben 2, 4, 5, 6, 7) oder *Eco*RI (Proben 3, 8-12) verdaut und auf einem 0,8%igen TAE-Gel aufgetrennt. Die Plasmide wurden mit *Hind*III (pYW210; Proben 13, 14) oder *Not*I (pJH271; Proben 15, 16) linearisiert (A). Die verdaute DNA wurde auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer *npt*III-spezifischen Sonde hybridisiert (B). Zur Sondensynthese verwendete Primer (5'-GGCATTCTTGGCATAAGTGGT-3', 5'-ACTTGATGCGGAAGAAGTCG-3') liegen außerhalb der *npt*III-Sequenzen und amplifizierten die gesamte *npt*III-Region (inkl. des inkorporierten *transposable element* IS1-Elements). Als „Template“ diente das Plasmid pYW210, welches auf pBIN19 basiert. Die Sonde wurde nach radioaktiver Markierung des *npt*III-Amplikons mit dem Blot hybridisiert.

1-1kb Ladder; 2-Golden Promise (Wild type Kontrolle); 3-Baronesse (Wild type Kontrolle); 4-pYW210-9-(4001-4360); 5-pYW210-9-(4001-4360); 6-pYW210-9-(4001-4360); 7-pYW210-9-(4001-4360); 8-pJH271-Beta-Glu-307; 9-pJH271-Beta-Glu-307

Zusammenfassung der Ergebnisse (2005)

T₂ Einzelpflanzen als direkte Nachkommen der T₀ Pflanze pYW210-9 wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des Transgens *cThEn42(GC)* überprüft. Homozygote Pflanzen wurden schließlich mittels eines Enzymaktivitätstests unter Verwendung von 20 Körnern der positiv getesteten T₂ Pflanzen selektiert. Die rekombinanten Endochitinase (*cThEn42(GC)*) besitzt eine deutlich höhere Aktivität pro Gewichtseinheit Pflanzenmaterial als die pflanzlichen Chitinasen. Folglich wird das Substrat 4-Methylumbelliferyl-β-D-N,N',N''-triacetylchitotrioside (MUTC) schneller von *cThEn42(GC)* hydrolysiert. Das Substrat beginnt nach der Hydrolyse zu fluoreszieren, was bei

einer Wellenlänge von 360nm/ 455nm (Anregung/Emission) spektrophotometrisch gemessen werden kann. Die Quantifizierung der Messdaten erfolgte über eine Standardkurve, deren Einzelwerte die Hydrolyse des Substrats durch definierte Mengen der rekombinanten Endochitinase *cTheN42(GC)* repräsentieren. Die Analysebedingungen wurden so abgestimmt, dass eine Hydrolyse des Substrats MUTC durch pflanzliche Chitinasen unter dem Detektionsminimum lag. Die Elternpflanze Golden Promise diente bei den Messungen als Kontrolle. Die Linie pYW210-9-(4001-4360) basiert letztendlich auf einer T₂ Pflanze (direkter Nachkomme der T₀ Pflanze pYW210-9). In allen 20 getesteten, aus dieser Pflanze hervorgegangen, (T₃) Samen konnte mittels der Enzymaktivitätsmessung die rekombinante Endochitinase nachgewiesen werden und folglich wurde diese Pflanze als homozygot bewertet. Diese wurden dann für die Gewächshaus- sowie Freilandversuche vermehrt.

Gemäß Arbeitsplan wurden Gewächshausversuche durchgeführt, und die Methoden zur Bestimmung von Metaboliten in Gerstenblättern etabliert. Da der Grad der Wurzelbesiedlung durch *P. indica* nicht eindeutig mit den durch *P. indica* vermittelten biologischen Effekten (Wachstumsförderung, systemisch induzierte Resistenz) korreliert, wurden basierend auf früheren Studien mit *P. indica* Ertragsparameter (ährentragende Halme, Anzahl der Bestockungstriebe) und die Pflanzenhöhe zur Evaluation der Interaktionen herangezogen. Die Infektion des Wurzelgewebes durch die pilzlichen Schaderreger spiegelt sich hingegen in einem geringeren Sprosswachstum, Chlorosen und einer reduzierten Bestockungsrate wider. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Ergebnisübersicht zu den im Gewächshaus durchgeführten Versuchen. Die Daten basieren auf der Auswertung von 12 Einzelpflanzen zum Zeitpunkt „Ende des Ährenschiebens“ bestimmt.

Linie	Behandlung	Pflanzenhöhe Ø	Bestockungstriebe Ø	Ährentragende Halme Ø
Chitinase 16 µg	+ <i>P. indica</i>	51,4	14,8	4,5
	+ <i>Rhizoctonia</i>	55,0	15,5	4,7
	+ <i>Fusarium</i>	54,2	15,3	4,6
	Kontrolle (<i>Piri</i>)	48,8	13,5	4,0
	Kontrolle (<i>Rhizoctonia</i>)	56,9	16,1	4,9
Chitinase 107 µg	+ <i>P. indica</i>	51,3	14,5	4,4
	+ <i>Rhizoctonia</i>	59,8	19,9	6,6
	+ <i>Fusarium</i>	56,2	15,7	4,7
	Kontrolle (<i>Piri</i>)	56,3	15,8	4,8
	Kontrolle (<i>Rhizoctonia</i>)	55,0	18,3	6,1
Chitinase 200 µg	+ <i>P. indica</i>	49,8	8,3	1,4
	+ <i>Rhizoctonia</i>	52,1	13,5	3,8
	+ <i>Fusarium</i>	47,6	7,9	1,3
	Kontrolle (<i>Piri</i>)	49,4	8,2	1,4
	Kontrolle (<i>Rhizoctonia</i>)	46,8	15,6	5,2
Golden Promise	+ <i>P. indica</i>	53,3	14,0	3,9
	+ <i>Rhizoctonia</i>	54,5	18,2	6,1
	+ <i>Fusarium</i>	50,0	14,3	4,4
	Kontrolle (<i>P. indica</i>)	51,8	15,2	4,7
	Kontrolle (<i>Rhizoctonia</i>)	57,8	16,4	5,0
Beta-Glucanase	+ <i>P. indica</i>	48,6	12,2	3,3
	+ <i>Rhizoctonia</i>	53,9	15,0	4,5
	+ <i>Fusarium</i>	55,8	15,3	4,6
	Kontrolle (<i>P. indica</i>)	53,0	14,7	4,4
	Kontrolle (<i>Rhizoctonia</i>)	47,3	15,8	5,3
Baronesse	+ <i>P. indica</i>	53,3	15,1	4,6
	+ <i>Rhizoctonia</i>	57,7	19,2	6,4
	+ <i>Fusarium</i>	57,2	16,1	4,9
	Kontrolle (<i>P. indica</i>)	55,8	11,6	3,5
	Kontrolle (<i>Rhizoctonia</i>)	56,5	15,9	4,8
	Kontrolle (<i>Fusarium</i>)	60,9	17,2	5,2

Da unreife und reife Ähren für die Metabolitanalyse zu ernten waren, wurde die Menge an pilzlichem Inokulum so bemessen, dass lediglich moderate Symptome zu erwarten waren. Auf Grund dieser Maßnahme konnten keine Symptome an den Pflanzen während des Vegetationsverlaufs beobachtet werden. Ebenso konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Pflanzen bezüglich der untersuchten Parameter gezeigt werden. Stichprobenartige Untersuchungen an Wurzelmaterial zeigte eine partielle Besiedlung der transgenen Gerstenlinien durch die pathogenen Pilze. Das Ausbleiben der Entwicklung von Krankheitssymptomen an oberirdischen Pflanzenteilen kann durch eine kompensatorische Wirkung des pilzfreien Wurzelanteils erklärt werden.

Ein Freisetzungsantrag für die transgene Gerste wurde erfolgreich gestellt, so dass die Voraussetzung für die geplanten Analysen der Gerstenpflanzen unter Feldbedingungen erfüllt war.

In den Jahren 2006-2009 standen die Durchführung der Freisetzungsversuche mit transgenen Gerstenpflanzen und begleitende molekulare/biochemische und epidemiologische Untersuchungen im Vordergrund. Bei den transgenen Pflanzen handelte es sich um Endochitinase (ThEn42) bzw. Glucanase (1,3-1,4- β -Glucanase) exprimierende Gerstenlinien der Sorten Baronesse und Golden Promise. Der Freilandversuch wurde an zwei Standorten, Gießen und Thulendorf, durchgeführt. Die Anbauschemata der Jahre 2006, 2007 und 2009 sind den Abbildungen 8, 9 und 22 zu entnehmen.

2006

Mikroskopische Versuche

Zur Bewertung des Befalls wurde ein Versuch unter Gewächshausbedingungen mit den pYW210-9-(4001-4360) Endochitinase-Gerstenlinien durchgeführt (Versuchsplan s. unten). Dabei sollte die Besiedlung der Wurzel mit arbuskulären AM Pilzen ermittelt werden. Zur Visualisierung des Pilzes wurde die Farbstoffe WGA-Alexa Fluor 488 bzw. Trypan Blau verwendet.

Versuchsplan:

PG	Endophyt	Linie, Sorte	Entnahme (WAT)
1	<i>Glomus etunicatum (INOQ)</i>	pYW210-9-(4001-4360)	1,2,3,4
2	<i>Glomus intraradices (Mycosym)</i>	pYW210-9-(4001-4360)	1,2,3,4
3	<i>Gigaspora rosea</i>	pYW210-9-(4001-4360)	1,2,3,4
4	<i>Acaulospora longula</i>	pYW210-9-(4001-4360)	1,2,3,4
5	<i>Glomus etunicatum (INOQ)</i>	Golden Promise	1,2,3,4
6	<i>Glomus intraradices (Mycosym)</i>	Golden Promise	1,2,3,4
7	<i>Gigaspora rosea</i>	Golden Promise	1,2,3,4
8	<i>Acaulospora longula</i>	Golden Promise	1,2,3,4

Inokulation: Zumischen von ca. 20% arbuskuläre Mykorrhiza zum Substrat.

Substrat: Oil dri / Seramis (1:1), autoklaviert

Anlage: Vorkeimen Gerste auf Filterpapier und Überführung in Substrat:

Entnahme-Termine: 1-4 WAT (weeks after treatment)

Wiederholung: 4 x (je 2 Pflanzen/Topf)

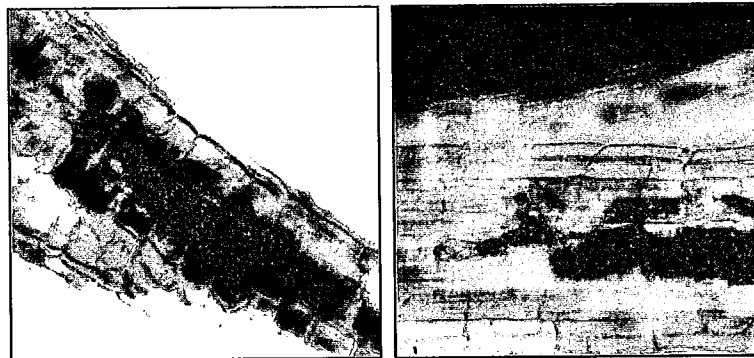
Bonitierung:

1. Gesamtverpilzung (Besiedlungsgrad %, Intensität der Mykorrhizierung %)
2. Arbuskeln
3. intraradikale Hyphen
4. Vesikel
5. Genomische DNA der AM (Entnahme 3 und 4 WAT)
6. RNA-Phosphattransporter (Entnahme 3 und 4 WAT)

Wurzelbonitur wahlweise Gridline-Methode oder Wurzelsegmente.

Ergebnisse:

Es wurden 100 Wurzelsegmente pro Wiederholung untersucht. Dabei wurde die Gesamtverpilzung (Häufigkeit, Intensität) ermittelt, aber auch der Anteil spezifischer Pilzstrukturen (intraradikale Hyphen, Arbuskel, Vesikel) bonitiert (Abbildungen 4, 5, 6 und 7).



Golden Promise (Kontrolle)

Transgen (pYW210-9)

Abbildung 4: Mykorrhizierung von Chitinase-überexprimierender Gerstenlinien. Die Bildung von Arbuskeln erfolgte in beiden Linien.

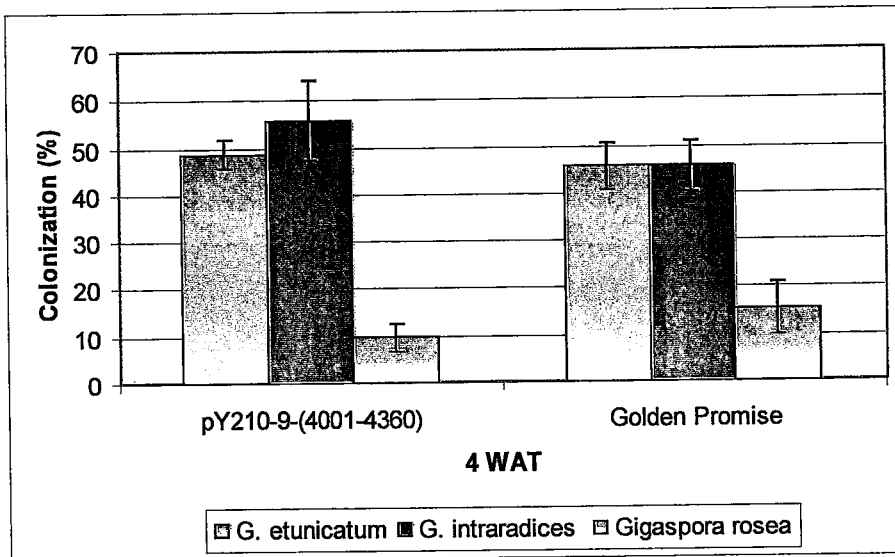


Abbildung 5: Besiedlung der Wurzeln durch verschiedene Mykorrhiza-Gattungen. Alle drei AM Gattungen konnten sowohl transgenen wie nicht-transgenen Linien besiedeln.

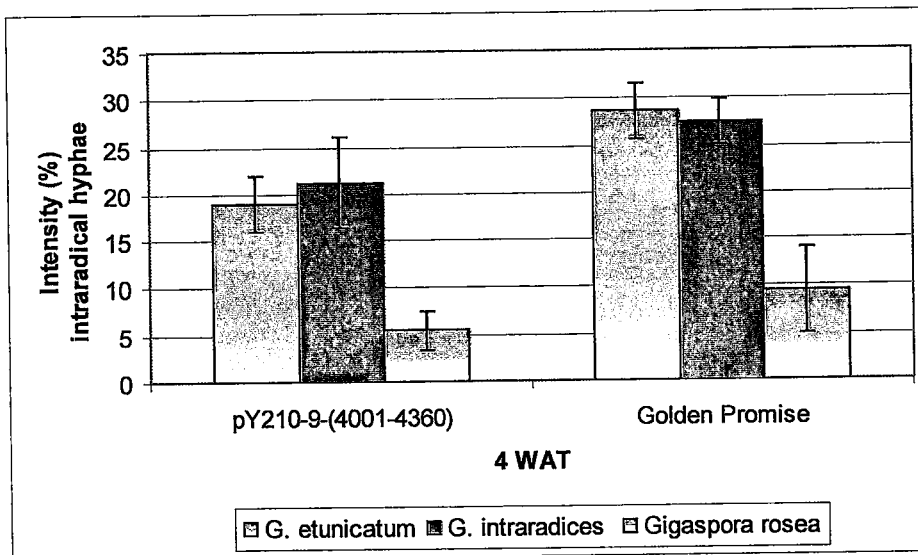


Abbildung 6: Besiedlungsintensität der Wurzeln durch verschiedene Mykorrhiza-Gattungen. Die Abbildung zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Bildung von intraradikalen Hyphen in den Gersten-Linien.

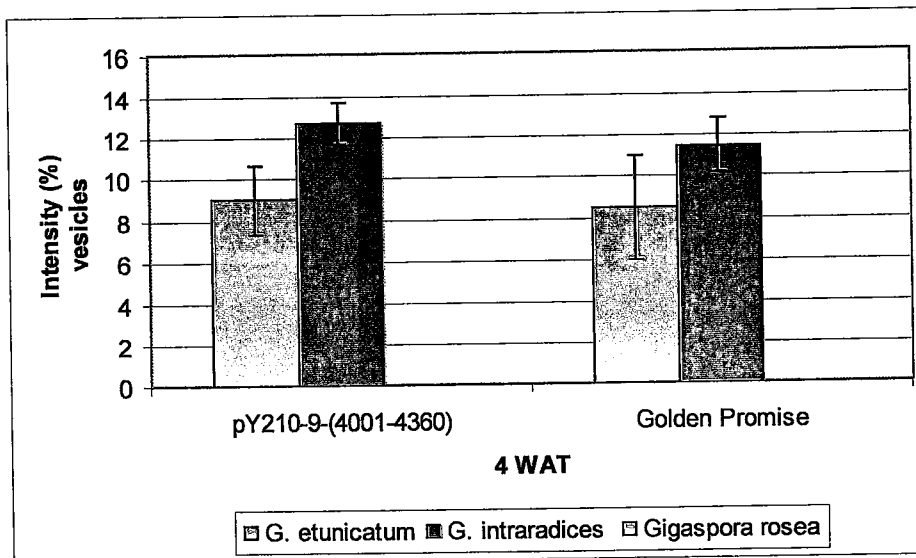
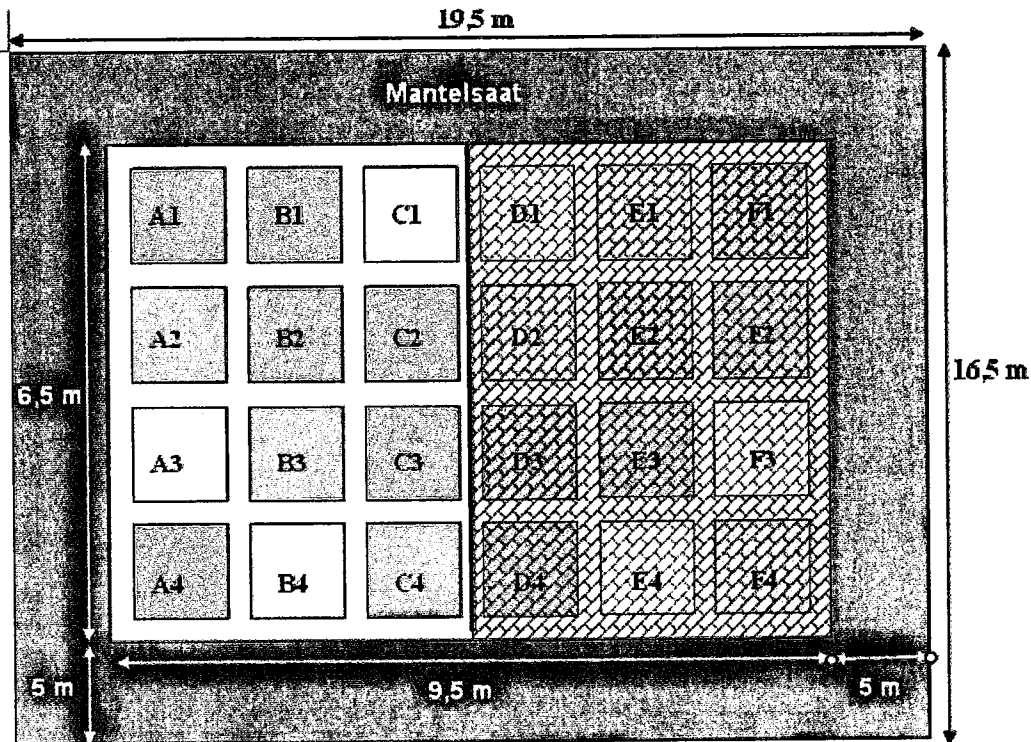


Abbildung 7: Vesikelbildung in den Wurzeln durch verschiedene Mykorrhiza- Gattungen. Die Vesikelbildung von beiden AM-Pilzen erfolgte in allen Gerstenlinien. Die Gattung *Gigaspora* bildet grundsätzlich keine Vesikel.

Freisetzungsversuch am Standort Gießen

Gemäß dem Bescheid des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittel-Sicherheit (BVL, Berlin) vom 03. April 2006; Az. 6786-01-0168, erfolgte am 25.04.2006 und 28.03.2007 die Durchführung der Freisetzung der gentechnisch veränderten Gerste auf dem Versuchsgelände des Instituts für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der Universität Gießen im Alter Steinbacher Weg 44, 35394 Gießen, Flur/Flurstück 15/75/2 (s. den Versuchsplan Abb. 3 und 4). Dabei sollte die Wechselwirkung transgener Pflanzen mit pilzlichen Mikroorganismen (pathogene und mutualistische) untersucht werden. Parallel erfolgte die Durchführung eines Versuches unter definierten Kulturbedingungen des Gewächshauses. Die Untersuchungen basieren auf molekularen und mikroskopischen Methoden.

Randomisierte Spaltanlage



A1, B2, C3 = Endochitinase
 B1, C2, A4 = Beta-Glucanase
 A2, B3, C4 = Golden Promise
 A3, B4, C1 = Baroness

Behandlung mit Mykorrhiza-
 Präparat
 (Amykor® Wurzel-Vital)

F1, E2, D3 = Endochitinase
 E1, D2, F4 = Beta-Glucanase
 F2, E3, D4 = Golden Promise
 F3, E4, D1 = Baroness

Keine Mykorrhiza (nur Blähton)

Abbildung 8: Konzeption des Freisetzungsversuchs 2006. Einen Tag vor der Aussaat wurde auf einer Hälfte des Versuchsfeldes das Mykorrhiza-Präparat Amykor Wurzel-Vital (Fa. Amykor, Wolfen) von Hand flach in den Boden eingearbeitet. In gleicher Weise wurde auf der zweiten Hälfte Blähton (Trägermaterial des Mykorrhiza-Präparats) als Kontrollbehandlung ausgebracht. Am nachfolgenden Tag wurde das Saatgut mit einer Parzellen-Sämaschine gedrillt. Die Sämaschine war so eingestellt, dass jede Einzelparzelle eine Grundfläche von 0,8 m² (0,8 m x 1 m) hat und der Abstand zwischen den Parzellen 25 cm beträgt. Die Aussaat erfolgt zunächst auf der Kontrollfläche, bevor die Parzellen der mit AM behandelten Fläche erfolgte. Anschließend wurde die Mantelsaat mit konventioneller Gerste mit einer Sämaschine gedrillt. Die Breite der Mantelsaat betrug 5 m und es wurden 400 Körner/m² ausgesät.

Versuchsplan 2007 (Split-Plot)

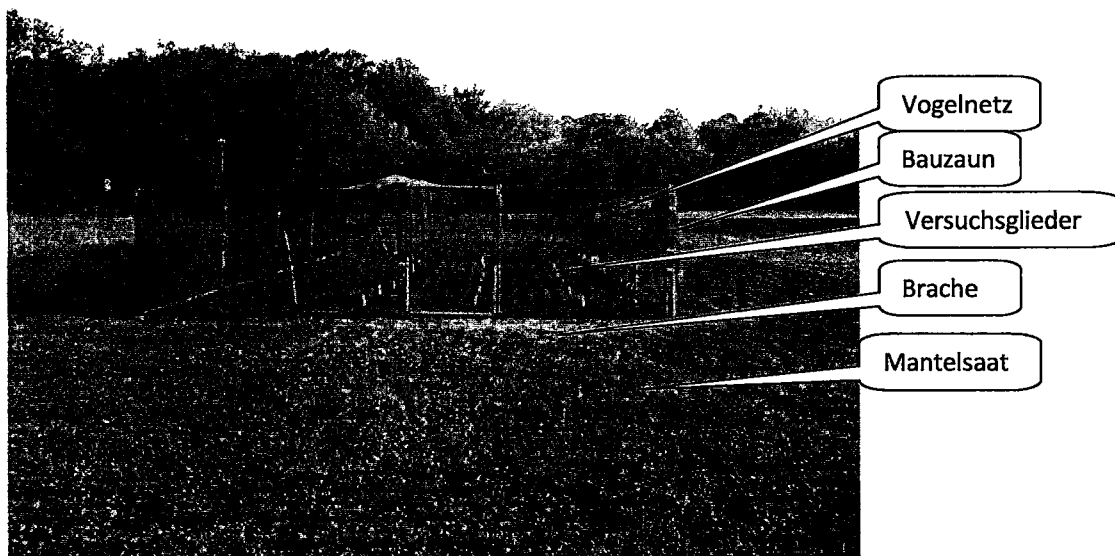
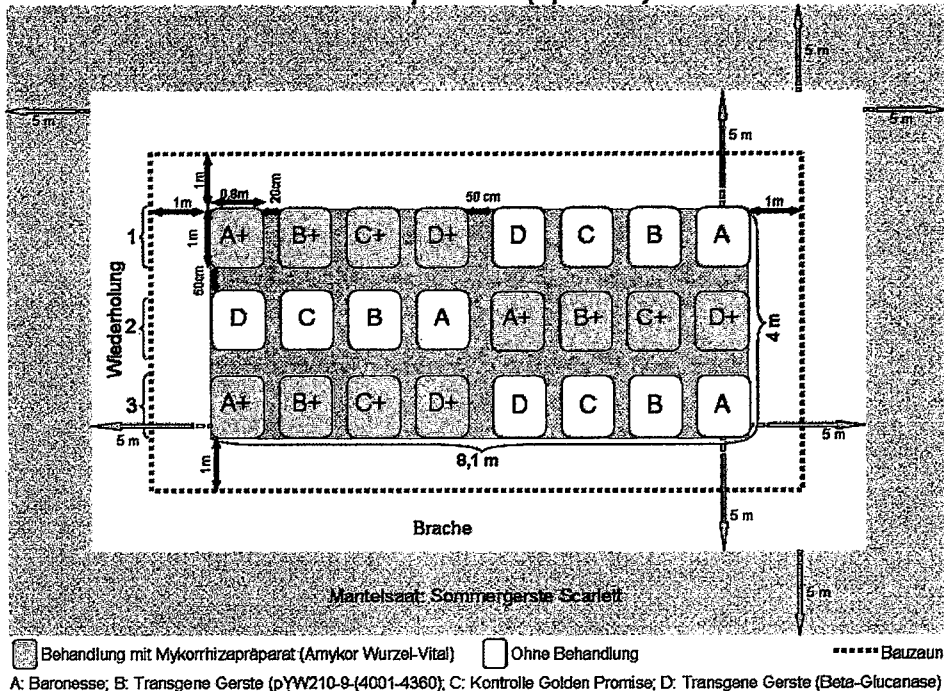


Abbildung 9: Konzeption des Freisetzungversuchs 2007. Die Mykorrhizierung erfolgte einen Tag vor der Aussaat. Dabei wird das Mykorrhiza-Präparat Amykor Wurzel-Vital (Fa. Amykor, Wolfen) von Hand flach in den Boden eingearbeitet. In gleicher Weise wird Blähton (Trägermaterial des Mykorrhiza-Präparats) als Kontrollbehandlung ausgebracht. Am nachfolgenden Tag wurde das Saatgut mit einer Parzellen-Sämaschine gedriilt. Die Sämaschine

wird mit Einzelmagazinen auf dem Feld bestückt, welche jeweils das Saatgut einer Parzelle Enthalten (Einzelparzelle- Grundfläche 0,8 m² (1m x 0,8 m). Der Abstand zwischen den Parzellen beträgt 20 cm. Das Experiment basiert auf drei biologischen Wiederholungen (drei Blöcke). Hier wurde zwischen den Blöcken ein 50 cm breiter Gehweg vorgesehen. Alle Parzellen wurden mit Plastikschildern gekennzeichnet, um deren Zuordnung über den gesamten Versuchszeitraum zu garantieren. Anschließend wurde die Mantelsaat mit konventioneller Gerste (Sorte: Scarlett) mit einer Sämaschine im Abstand vom 5 m vom Versuchsfeld gedreht. Die Breite der Mantelsaat beträgt 5 m und es werden 400 Körner / m² ausgesät. An diese Mantelsaat schließt sich eine 25 m breite Schwarzbrache an.

Molekulare Untersuchungen:

Probenahme von Wurzeln

Bei der Ernte wurden die transgenen Pflanzen sowie die nicht-transgenen Elternpflanzen mit Hilfe eines Spatens aus dem Boden gehoben und anschließend mit Wasser sorgfältig und vorsichtig von anhaftender Erde noch auf dem Versuchsfeld befreit. Junges Wurzelmaterial wurde schließlich in verschließbare Reaktionsgefäße überführt. Pro Parzelle wurden sechs Pflanzenwurzeln geerntet. Eine Hälfte des Probenmaterials wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann für die molekularen Analysen verwendet. Die andere Hälfte wurde am Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie mit einer Fixierlösung versetzt. Dieses Material wurde für die zytologischen Untersuchungen verwendet.

DNA-Extrakte aus Wurzel

Aus dem Wurzelmaterial von drei Pflanzen (pro Parzelle) wurde separat die DNA extrahiert. Dafür wurden jeweils 300 mg gemörsertes Wurzelmaterial laut Protokoll des DNAeasy Plant Mini Kits (Firma Qiagen) extrahiert und bis zur weiteren Untersuchungen mittels Polymerasekettenreaktion bei -20°C aufbewahrt.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde sowohl mit den universellen Primern NS5 (5'- AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3') und der rDNA internal Transcribed Spacers (ITS4: 5'- CTC CGC TTA TTG ATA TGC T-3') als auch mit Gerste ubiquitin- primer (Hv-Ubi60deg-rev 5'-CAG TAG TGG CGG TCG AAG TG-3'; Hv-Ubi60deg-fwd 5'-ACC CTC GCC GAC TAC AAC AT-3) als Kontrolle durchgeführt (Abbildung 10).

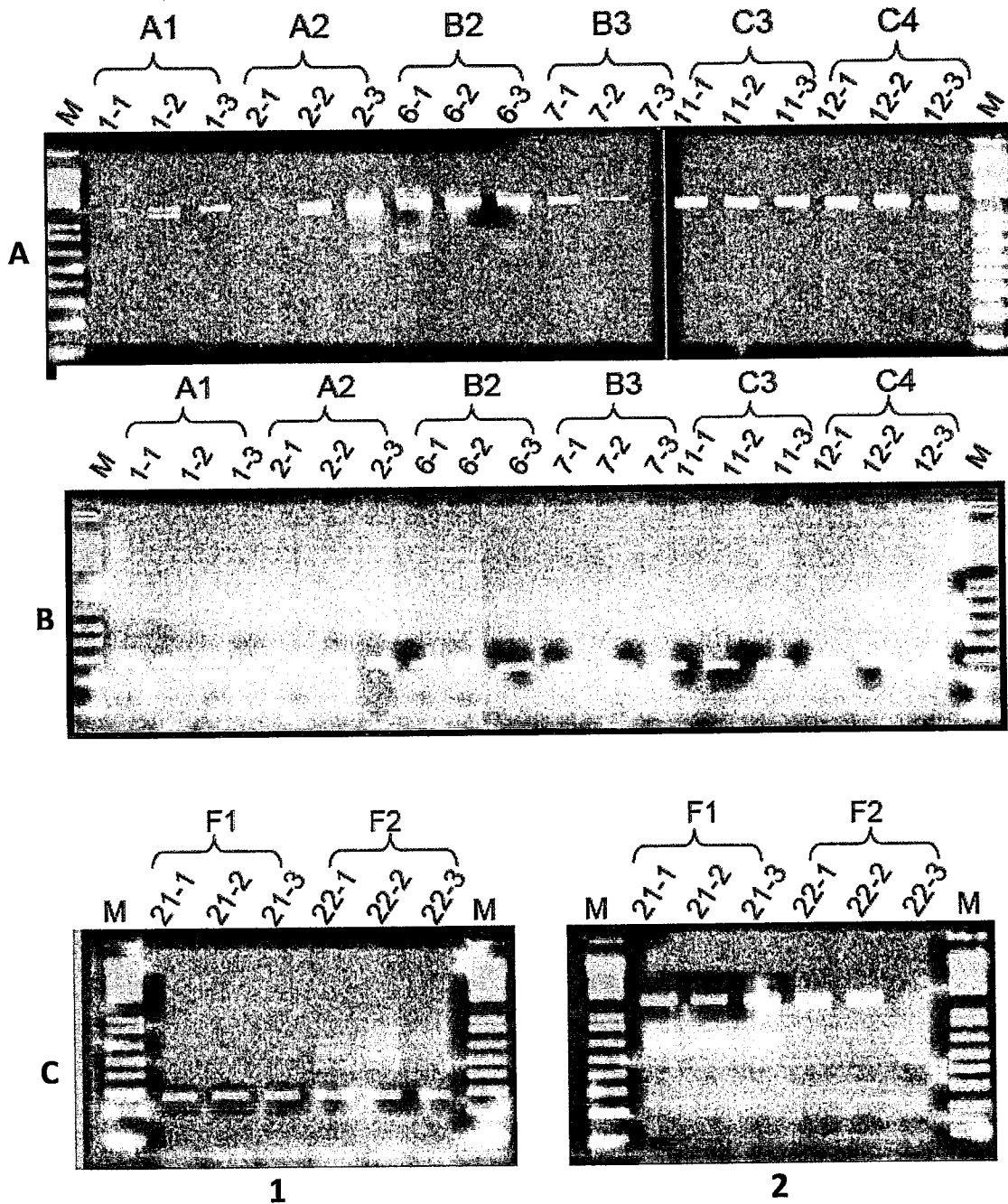


Abbildung 10: PCR-Analyse mittels pilzspezifischer Primer. Alle untersuchten Linien zeigen eine erfolgreiche Mykorrhizierung. Nur bei einer Wiederholung vom Versuchsglied 2-1 (A) und 22-3 (C2) waren keine Amplikons detektierbar. Das beruhte auf einem experimentellen Fehler, da sich bei der späteren Wiederholung der genannten Versuchsglieder PCR-Signale ergaben (Bild nicht gezeigt). A und C2: NS5 und ITS4 Primer; B und C1: Ubiquitin Primers.

- A1; B2; C2) pYW210 transgen + Amykor
- A2; B3; C4) Gp Kontrolle + Amykor
- F1) pYW210 transgen ohne Amykor
- F2) Gp ohne Amykor Kontrolle

2007

Gemäß dem Bescheid des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittel-Sicherheit (BVL, Berlin) vom 03. April 2006; Az. 6786-01-0168, wurde am 28.03.2007 der Freisetzungsversuch mit transgener Gerste am Standort Gießen unter der gleichen Bedingung wiederholt. Parallel wurde auch eine Wiederholung des Versuches unter definierten Kulturbedingungen des Gewächshauses durchgeführt.

Versuchsplan unter Gewächshausbedingungen

Hier wurde zu einer 1:1 Mischung vom autoklaviertem Oil dri/ Seramis 30% v/v Arbuskuläre Mykorrhiza zugemischt und in den Töpfe eingefüllt. Pro Topf wurden 2 vorgekeimte Gerstenpflanzen eingepflanzt. Pro Versuchsglied wurde 4 Wiederholungen durchgeführt. WAT: weeks after treatment.

PG	Endophyt	Linie, Sorte	Entnahme (WAT)
1	Kontrolle	pYW210-9-(4001-4360)	2,3,4
2	<i>Glomus intraradices</i> «AMYCOR»	pYW210-9-(4001-4360)	2,3,4
3	<i>Glomus mosseae</i>	pYW210-9-(4001-4360)	2,3,4
4	Kontrolle	Golden Promise	2,3,4
5	<i>Glomus intraradices</i> «AMYCOR»	Golden Promise	2,3,4
6	<i>Glomus mosseae</i>	Golden Promise	2,3,4

Molekulare Untersuchungen:

Probenahme von Wurzeln

Gewächshaus:

Die Probenahme erfolgte 2, 3 und 4 Wochen nach der Aussaat. Dabei wurden die Pflanzen aus dem Topf gehoben und anschließend mit Wasser sorgfältig und vorsichtig von anhaftendem Substrat befreit. Das Wurzelmaterial wurde schließlich in verschließbare Reaktionsgefäße überführt. Eine Hälfte des Probenmaterials wurde sofort in flüssigem Stickstoff zur molekularen Analysen schock gefroren. Die andere Hälfte wurde für die zytologischen Untersuchungen in einer Fixierlösung aufbewahrt.

Freiland:

Die Aussaat erfolgte am 28.03.2007. Der Freisetzungsversuch wurde durch die Beerntung von Wurzelmaterial am 05.07.2006 (Mantelsaat am 01.08.2007) beendet. Die Probennahme erfolgte wie für das Jahr 2006 beschrieben.

DNA-Extrakte aus Wurzel
s. 2006

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde sowohl mit den universellen Primern NS5 (5'- AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3') und der rDNA internal Transcribed Spacers (ITS4: 5'- CTC CGC TTA TTG ATA TGC T-3') als auch mit Gerste ubiquitin- primer (Hv-Ubi60deg-rev 5'-CAG TAG TGG CGG TCG AAG TG-3'; Hv-Ubi60deg-fwd 5'-ACC CTC GCC GAC TAC AAC AT-3) als Kontrolle durchgeführt (Abbildung 15). Dieses Amplikon dient als Matrix zur Bestimmung der Untergruppen unter Verwendung AM spezifischer Primern (NS31 fwd 5'-TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC und AM1rev 5'-GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA-3') (Abbildung 16).

Mikroskopische Untersuchungen:

Zur Bewertung des Befalls wurden Versuche unter Gewächshaus- und Feldbedingungen mit den transgenen Gerstenlinien durchgeführt. Dabei sollte die Besiedlung der Wurzel mit AM Pilzen ermittelt werden. Zur Visualisierung des Pilzes wurde der Farbstoff WGA-Alexa Fluor 488 bzw. Trypan Blau verwendet. Bonitierung erfolgte nach den folgenden Kriterien (Abbildung 11):

1. Gesamtverpilzung (Besiedlungsgrad %, Intensität der Mykorrhizierung %)
2. intraradikale Hyphen (s. Abbildung 10A)
3. Arbuskeln (s. Abbildung 10C)
4. Vesikel (s. Abbildung 10B)
5. Genomische DNA der AM (Entnahme 3 und 4 WAT)

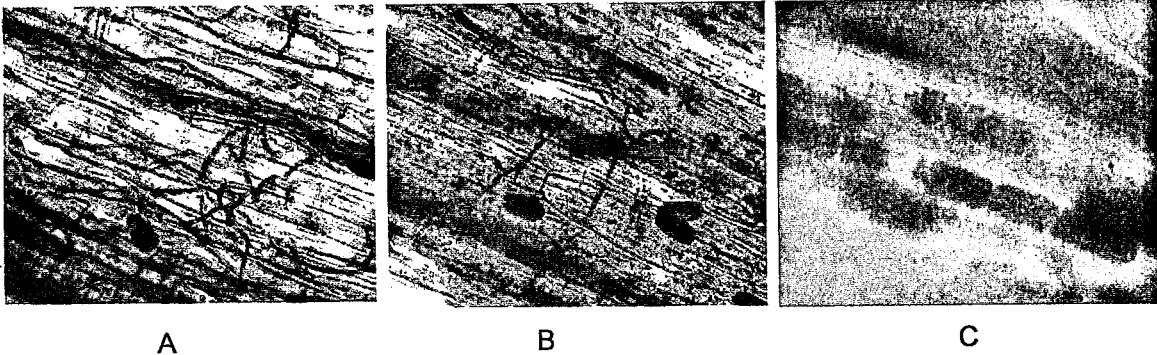


Abbildung 11: Mykorrhizierung von Chitinase-überexprimierender Gerstenlinien. A: Interradikale Hyphen; B: Entwicklung von Vesikel in den Wurzelzellen; C: Arbuskelbildung innerhalb der Zellen.

Ergebnisse:

Freilandversuch

Es wurden 100 Wurzelsegmente pro Wiederholung untersucht. Dabei wurde die Gesamtverpilzungsrate (Häufigkeit, Intensität) ermittelt, aber auch der Anteil spezifischer Pilzstrukturen (interradikale Hyphen, Arbuskeln, Vesikel) bonitiert. Die folgenden Abbildungen 12,13 und für den Gewächshausversuch 14) zeigen eine erfolgreiche Mykorrhizierung einzelner Versuchsglieder.

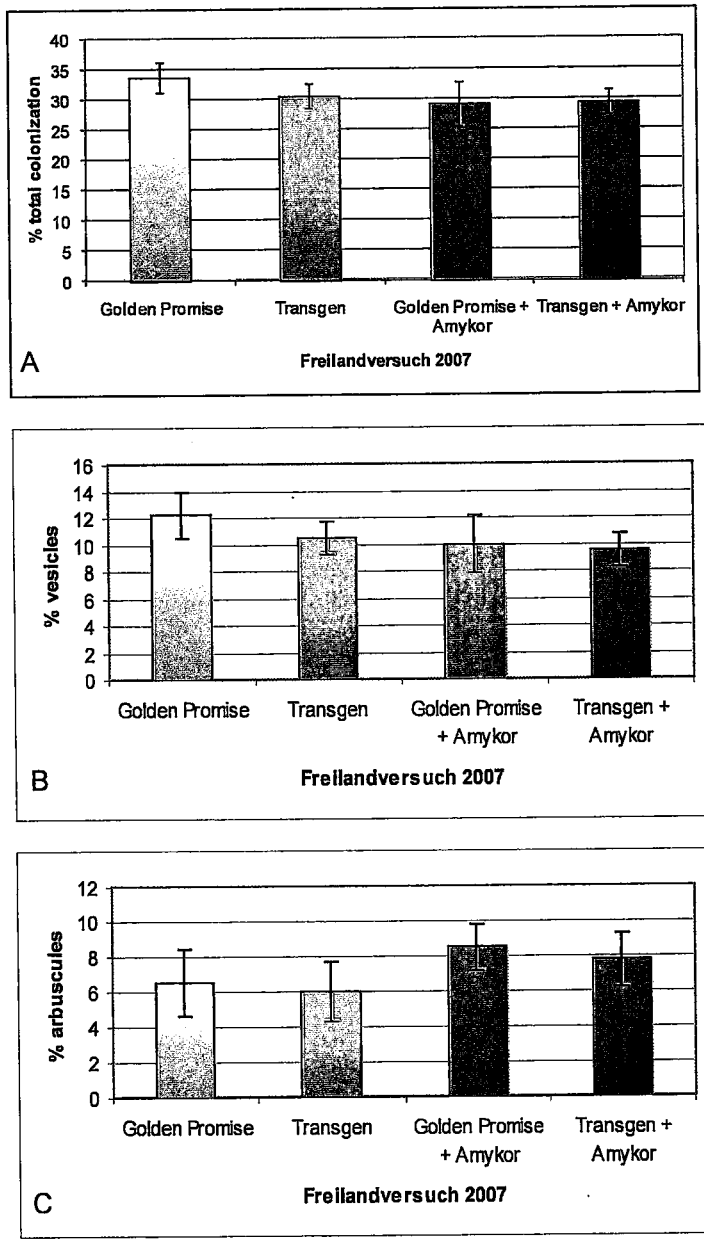


Abbildung 12: Erfolgreiche Mykorrhizierung von Chitinase-überexprimierenden Gerstenlinien im Freilandversuch: Es wurde kein signifikanten Unterschied in der Bildung von interradikalen Hyphen (A), Arbuskeln (B) und Vesikeln (C) in den Gerstenlinien gefunden.

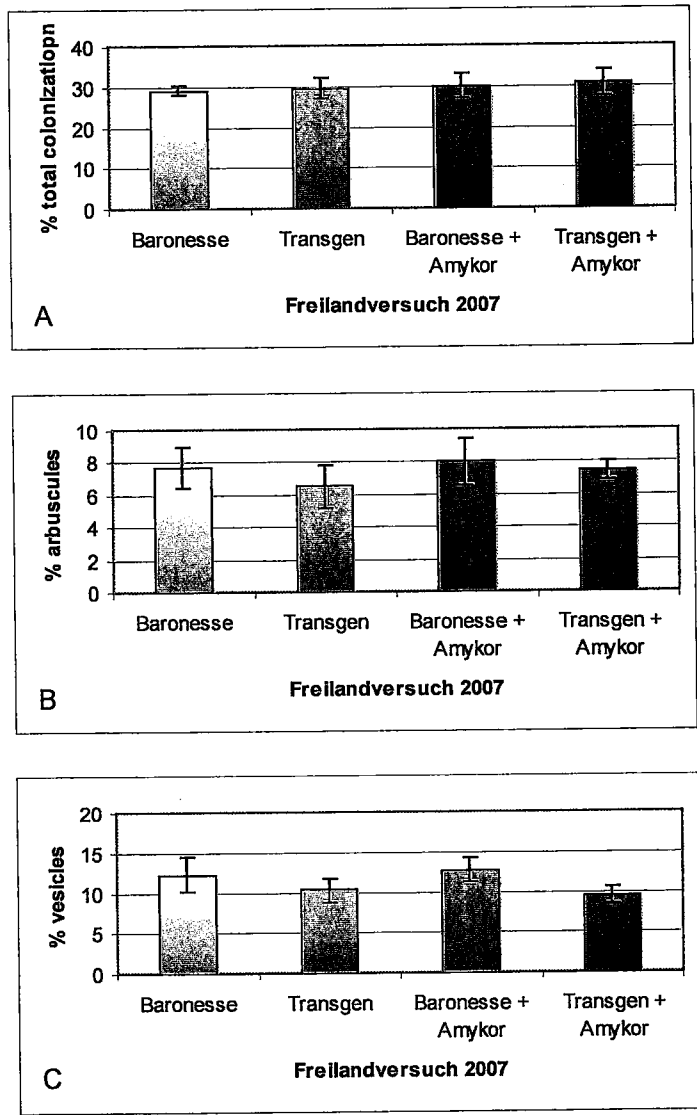


Abbildung 13: Erfolgreiche Mykorrhizierung von Glucanase-überexprimierenden Gerstenlinien in Freilandversuch: Es wurde kein signifikanten Unterschied in der Bildung von interradikalen Hyphen (A), Arbuskeln (B) und Vesikeln (C) in den Gerstenlinien gefunden.

Gewächshausversuch

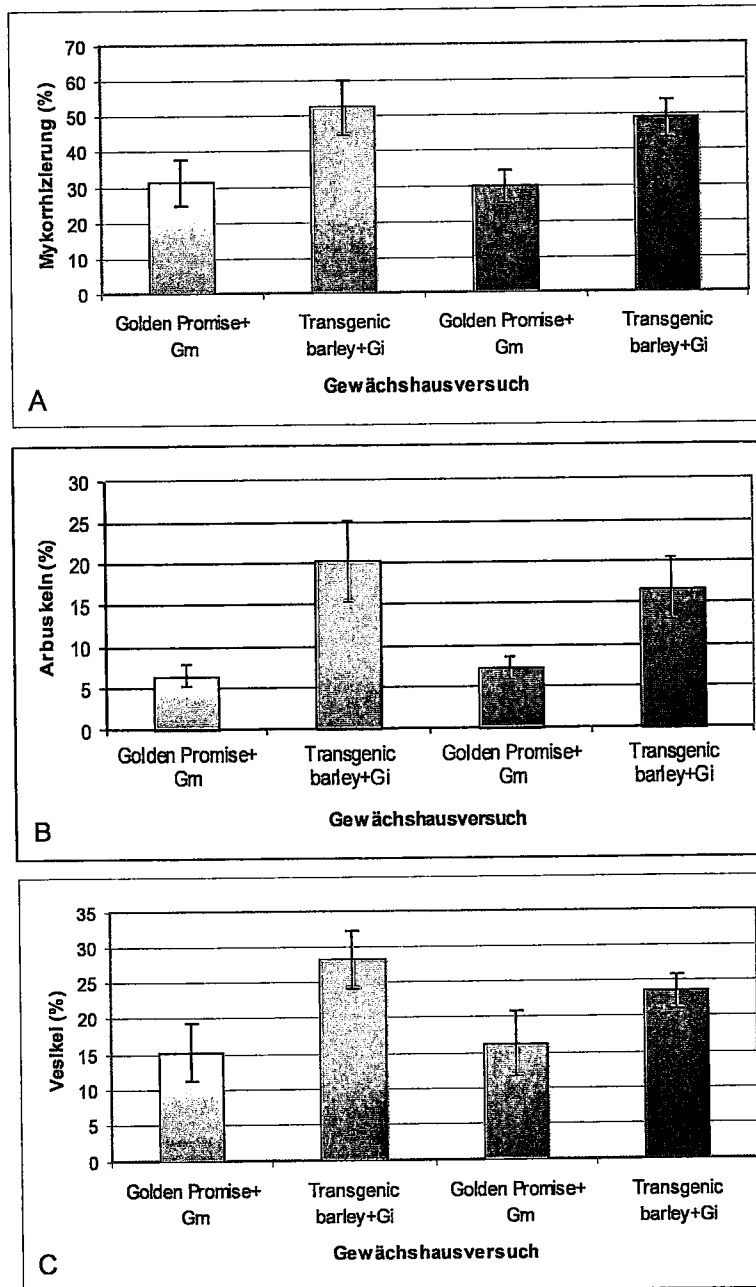


Abbildung 14: Erfolgreiche Mykorrhizierung von Gerstenlinien im Gewächshausversuch durch die beiden AM Gattungen *Glomus intraradices* (Gi) und *Glomus mosseae* (Gm). Es wurde kein signifikanten Unterschied in der Bildung von interradikalen Hyphen (A), Arbuskeln (B) und Vesikeln (C) in den Gerstenlinien gefunden.

Feldversuch: Molekulare Analyse

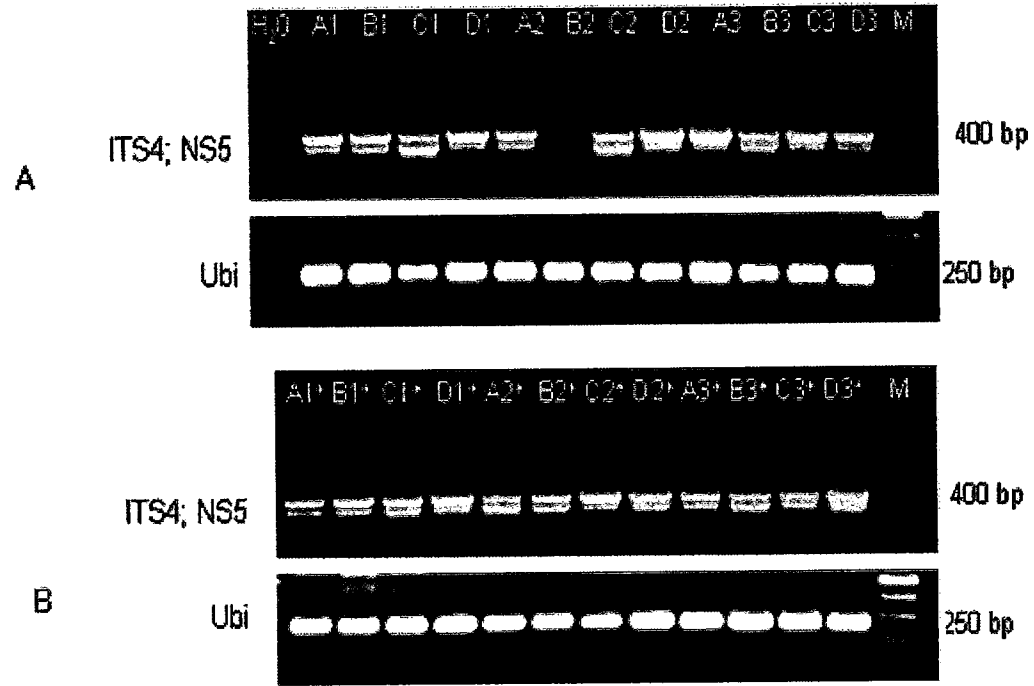


Abbildung 15: PCR Analyse der Versuchsglieder A (ohne Amykor-Zugabe) und B (mit Amykor-Zugabe) mit pilzspezifischen Primern. Alle untersuchten Linien zeigen eine erfolgreiche Mykorrhizierung. PCR-Signale sind bei allen Proben vorhanden. A oben: NS5 und ITS4 Primer; unten Ubiquitin Primer. B: oben: NS5 und ITS4 Primer; unten Ubiquitin Primer.

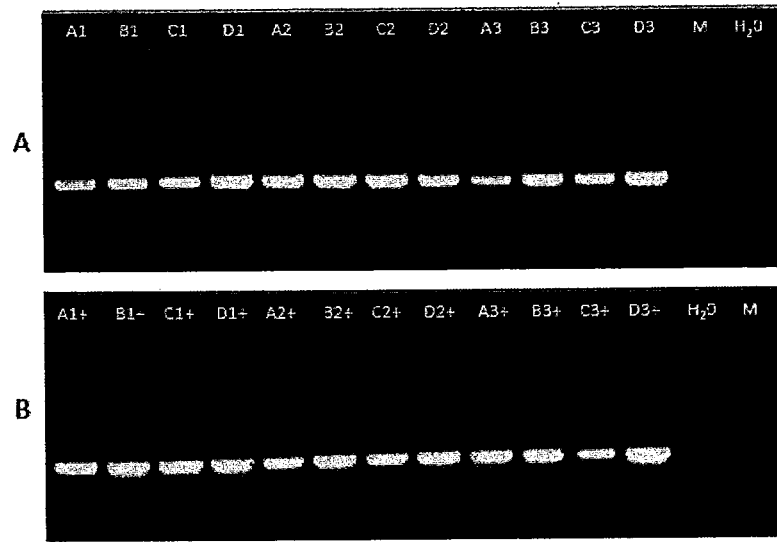


Abbildung 16: PCR Analyse der Versuchsglieder A (ohne Amykor-Zugabe) und B (mit Amykor-Zugabe) mit Mykorrhiza-spezifischen Primern NS31/ AM1Rev. Alle untersuchten Linien zeigen eine erfolgreiche Mykorrhizierung. PCR-Signale sind bei allen Proben vorhanden. .

2008

In den Jahren 2006 und 2007 wurden die Freilandversuche am Standort Gießen durch gewaltsame Einwirkung Dritter in erheblichem Maße behindert. Da uns Informationen zur Verfügung standen, dass auch im Jahr 2008 mit massiven und gewalttätigen Angriffen auf die wissenschaftlichen Versuche am Standort Gießen zu rechnen sei, wurde bereits frühzeitig entschieden, keine Freilandexperimente am Standort Gießen durchzuführen. Auf Grund dieser Situation wurde der Arbeitsplan zur Erzielung wissenschaftlich belastbarer Ergebnisse folgendermaßen angepasst:

1. Es wurden ergänzende Freilandversuche in den USA angelegt. Die Finanzierung dieser Versuche erfolgte komplett aus dem Etat von Partner 3, der nicht von Seiten des BMBFs finanziert wurde.
2. Es wurden zusätzliche Gewächshausversuche unter S1 Bedingungen am Standort Gießen durchgeführt (siehe auch Tabelle 2).
3. Die quantitative Analyse des Freilandversuches wurde fortgesetzt.
4. Es wurde ein Freisetzungsantrag an BVL für den Standort Thulendorf für 2009-2010 gestellt.

Gewächshausversuche

Die Phosphat-Nährstoffversorgung von Pflanzen hat einen großen Einfluss auf den Grad der Mykorrhizierung. Deshalb wurden 2008 die Gewächshausversuche mit und ohne P-Düngung durchgeführt, um evtl. Einflüsse der Transgene unter versch. Nährstoffangebot zu detektieren.

Tabelle 2: Versuchsplan unter Gewächshausbedingungen

Töpfe mit 2 l Volumen wurden mit einer Mischung aus 33% Kleinlindener Bunterboden (P-Mangelboden), 33% Sand und ca. 33% Substrat mit arbuskulärer Mykorrhiza (BEG 12) (Kontrolle mit autoklavierter BEG 12) befüllt. Pro Topf wurden 4 vorgekeimte Gerstenpflanzen eingepflanzt und pro Versuchsglied wurden 4 Wiederholungen durchgeführt.

	Endophyt	Linie, Sorte	Phosphat-Düngung (Hyperphosphat (32% P ₂ O ₅ , 2,15g je Topf))	Entnahme (Wochen)
1	Kontrolle	pYW210-9-(4001-4360)	-	4
2	Kontrolle	pYW210-9-(4001-4360)	+	4
3	<i>Glomus mosseae</i>	pYW210-9-(4001-4360)	-	4
4	<i>Glomus mosseae</i>	PYW210-9-(4001-4360)	+	4
5	Kontrolle	Golden Promise (Gp)	-	4
6	Kontrolle	Golden Promise (Gp)	+	4
7	<i>Glomus mosseae</i>	Golden Promise (Gp)	-	4
8	<i>Glomus mosseae</i>	Golden Promise (Gp)	+	4

48 Töpfe à 4 Pflanzen wurden im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen auf P-Mangelboden aus Kleinlinden Stadtteil Gießen mit und ohne Bodenzpilz kultiviert. Zu jeder der 8 Varianten (1-8) waren je 4 Wiederholungen angelegt worden. (+) Wurzelbesiedlung mit Mykorrhiza durch *Glomus mosseae* (BEG 12), (+) P-Düngung.

In den Prüfgliedern (PG) ohne künstliche Inokulation mit dem AM Pilz (*Glomus mosseae*, PGs 1, 2, 5 und 6) fand in allen geprüften Genotypen nur eine sehr schwache Verpilzung mit sehr feinen Hyphen und kleinen Sporen ("fine endophyte") statt (Abbildung 17). Eine hohe Verpilzung ist in den Prüfgliedern mit AM Inokulum (PG 3, 4, 7 und 8) erreicht worden. Es sind keine signifikanten Unterschiede in der AM Besiedlung zwischen Wurzeln von Transgen und Wildtyp (Golden Promise) festgestellt worden. Dies betrifft sowohl die Gesamtverpilzung (Abbildung 17) als auch die Bildung von Arbuskeln (Abbildung 18) und Vesikel (Abbildung 19) als pilzliche Strukturen. Unter Phosphat (P-Düngung) ist – wie zu erwarten – die Verpilzung in beiden Pflanzen, Transgen und Wildtyp, geringer als ohne P-Düngung (Abbildung 15-17). Die Ergebnisse dieser

zytologischen Analyse wurden durch molekularbiologische Untersuchungen bestätigt. In Abbildung 20 werden die Daten zur Quantifizierung des AM Pilzes mittels RT-qPCR gezeigt.

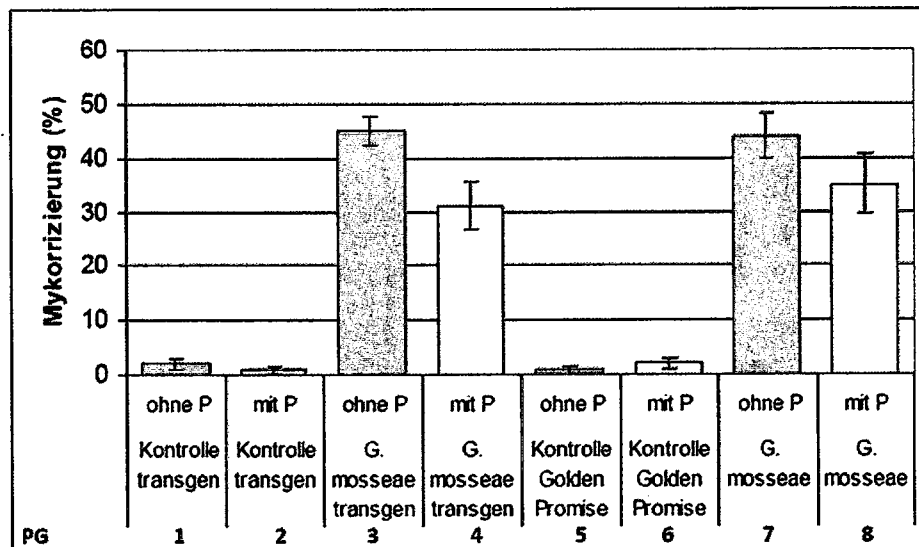


Abbildung 17: Mikroskopische Auswertung des Einflusses von transgener Endochitinase (ThEn42 Gerste) auf die Wurzelbesiedlung durch arbuskuläre Mykorrhiza (*Glomus mosseae*) unter hoch und niedrig Phosphat. Jedes Prüfglied umfasst die Wurzeln von 16 Pflanzen (s. Tabelle 1 und Tabelle 3 für technische Informationen). Die prozentualen Angaben beziehen sich auf der Pilzbesiedlung von 100 Wurzelsegmenten.

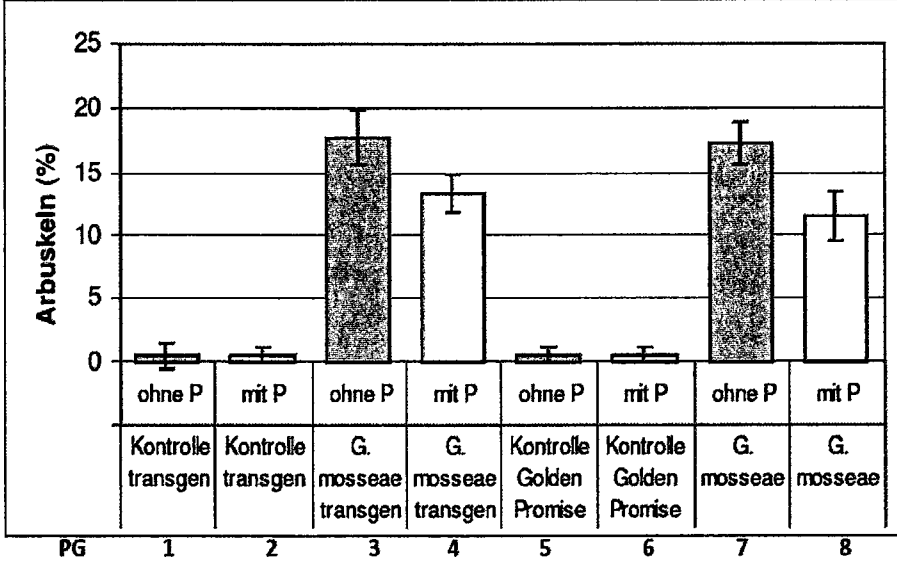


Abbildung 18: Mikroskopische Auswertung des Einflusses von transgener Endochitinase (ThEn42 Gerste) auf die Bildung von Arbuskeln durch *Glomus mosseae* bei hoher und niedriger Phosphatdüngung. Jedes Prüfglied umfasst die Wurzeln von 16 Pflanzen. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf der Pilzbesiedlung von 100 Wurzelsegmenten.

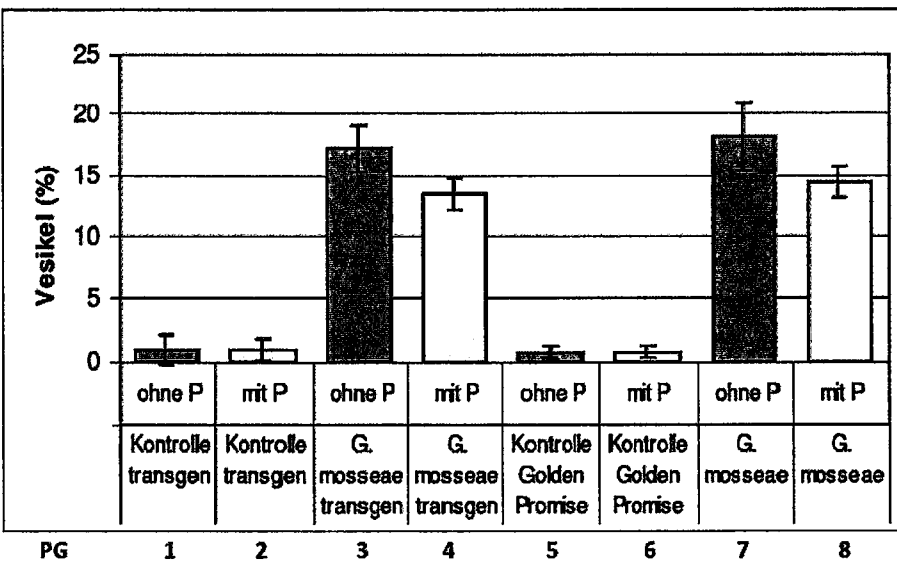


Abbildung 19: Mikroskopische Auswertung des Einflusses von transgener Endochitinase (ThEn42 Gerste) auf die Vesikelbildung durch *Glomus mosseae* bei hoher und niedriger Phosphatdüngung. Jedes Prüfglied umfasst die Wurzeln von 16 Pflanzen. Die prozentualen Angaben beziehen sich auf der Pilzbesiedlung von 100 Wurzelsegmenten.

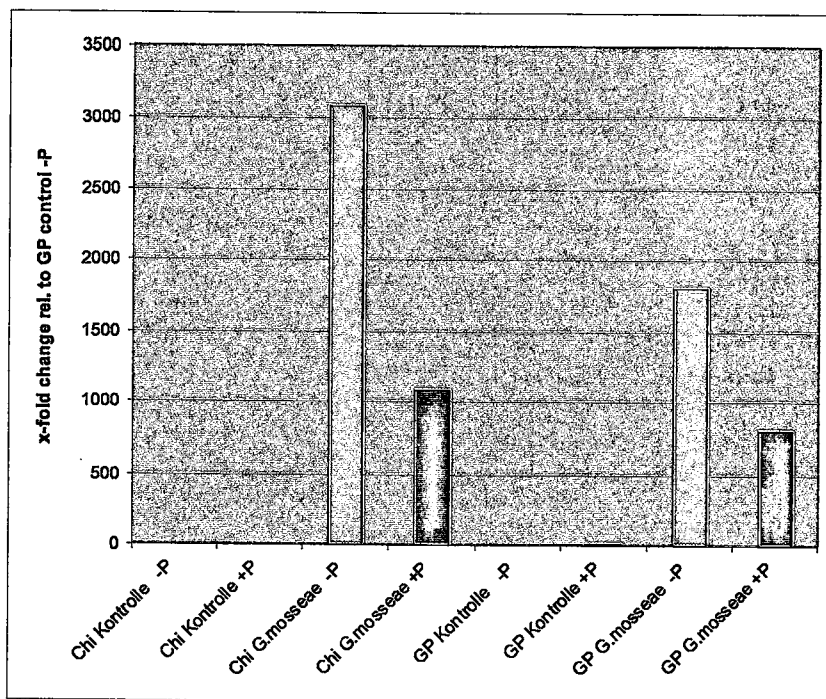


Abbildung 20: Quantitative Bestimmung des Verpilzungsgrads durch Q-PCR. Unter Gewächshausbedingungen erfolgt eine erfolgreiche Mykorrhizierung (*Glomus mosseae*) der ThEn42 Endochitinase (Chi) Gerste. Es wurde kein signifikanter Unterschied im Grad der Verpilzung im Vergleich zum Wildtyp Golden Promise (GP) gefunden. Eine P-Düngung führte wie zu erwarten zur Reduktion der Mykorrhizierung.

Quantitative Analyse des Freilandversuches

Zur Quantifizierung der Mykorrhizierung durch AM Pilze wurde Real-time PCR (Q-PCR) verwendet.

Es wurden Gerstenwurzeln von 6-8 Pflanzen pro Parzelle in flüssigem Stickstoff gemörsert. Die Gesamt-DNA (Pilz/Pflanze) wurde mittels Qiagen DNeasy Plant Mini Kit isoliert. Für die Amplifizierung der 28S rDNA von AM-Pilzen (GenBank-Nr. AY541918) wurden das spezifische Primerpaar Mos-F 5'-GAAGTCAGTCATACCAACGGGAA-3' und Mos-R 5'-CTCGCGAATCCGAAGGC-3' verwendet. Gerste Ubiquitin wurde zur Normalisierung verwendet (Abbildung 20).

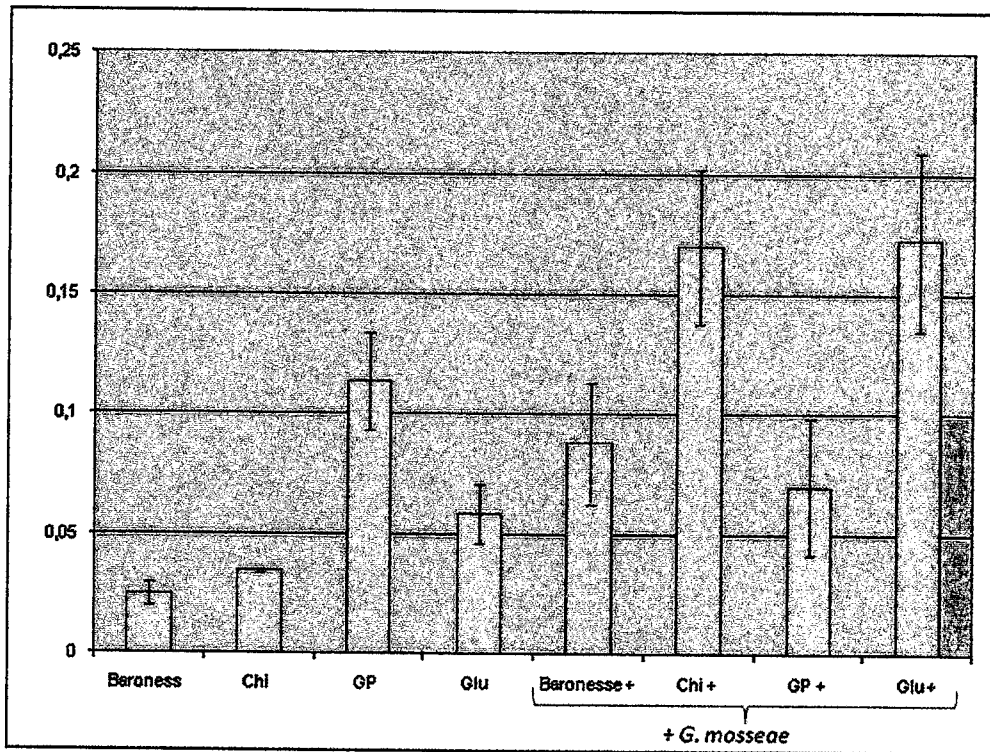


Abbildung 21: Quantitative Bestimmung des Grads der Verpilzung durch Q-PCR. Unter Feldbedingungen erfolgte eine erfolgreiche Mykorrhizierung (*Glomus mosseae*) sowohl der Wildtyp als auch der transgenen Linien. Insgesamt ist erwartungsgemäß eine erhöhte Mykorrhizierung in der mit Amykor behandelten Parzelle erkennbar. GP - Golden Promise, Chi - Chitinase, Glu, Glucanase, + Amykor® behandelt.

2009 (Thulendorf)

Auch im Jahr 2009 erfolgte eine Feldzerstörung, die zusätzlich in physische Gewalt gegenüber einer im Freisetzungsbereich sich aufhaltenden Person eskalierte. Dabei wurde das gerade angelegte Versuchsfeld so stark beschädigt, das in Absprache mit den entsprechenden Behörden eine Neuaussaat erfolgte. Ein weiterer Versuch der Aktivisten, die Neuaussaat zu zerstören, misslang aufgrund der sehr guten Sicherheitsvorkehrungen der InnoPlanta. Allerdings wurde dabei ein Teil der Fläche mit einem chemischen Gift kontaminiert.

Der Freisetzungsversuch 2009 in Thulendorf basierte auf einer randomisierten Spaltanlage mit drei Wiederholungen pro Prüfglied (Baronesse, Golden Promise, pYW210-9-(4001-4360), pJH271-Beta-Glu-307) und Behandlung (Abbildung 22). Der Boden der Parzellen A+, B+, C+, D+ wurde mit einem kommerziellen Mykorrhiza-Präparat (Amykor® Wurzel-Vital, AMYkor GmbH) vor Versuchsbeginn behandelt. Unterschiede in der pflanzlichen Entwicklung, Pathogenese und Epidemiologie wurden einerseits zwischen den transgenen Linien und deren Elternpflanzen bzw. zwischen behandelten (A+, B+, C+, D+) und Kontrollparzellen (A, B, C, D) evaluiert. Die

Dieser Randstreifen wurde von einem 5 m breiten Streifen Schwarzbrache umgeben. Der Abstand zwischen den Parzellen und zum Randstreifen betragen 0,5 m. Der Freisetzungsversuch inklusive des Randstreifens mit konventioneller Gerste hatte eine Grundfläche von 777,6 m² inklusive Mantelsaat und Brache (= Versuchsfläche). Das Versuchsfeld (= Fläche aller Parzellen mit transgener und konventioneller Gerste) hatte eine Grundfläche von 4 m x 8,1 m = 32,4 m², während der Freisetzungsfläche (= mit GVP bestanden Fläche) 9,6 m² einnahm.

Epidemiologische Studien:

- bonitiert wurden 20 Pflanzen je Parzelle
- die nicht mit Krankheiten befallenen Halme lagen in der Regel im Außenbereich der Parzellen
- der geringe Infektionsdruck im Mantel ist auf eine geringere Bestandesdichte zurück zu führen.
- der Insektenbefall wurde nur als Zusatzinformation bei der Bonitur der Krankheiten vermerkt und gibt nur Tendenzen an.

Die Entwicklungsstadien (EC) wurden mit Hilfe der unten dargestellten Tabelle ermittelt.

Landwirtschaftskammer
Nordrhein-Westfalen

Entwicklungsstadien im Getreide

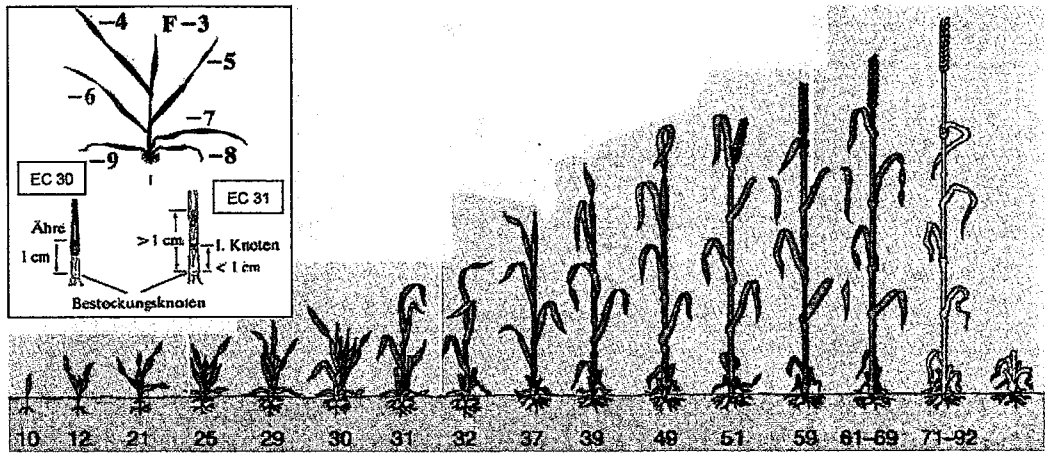


Abbildung 23

Code	EC Stadium	Beschreibung	Bemerkung
0 Keimung	0-9	Keimung bis Auflaufen	
1 Blattentwicklung	10	Blatt spitzen	Blattspitzen des nächsten Blattes jeweils sichtbar
	11	1. Blatt entfaltet	
	12 - 19	2. Laubblatt entfaltet usw.	
2 Bestockung	21	1. Bestockungstrieb sichtbar	Bestockung kann ab Stadium 13 erfolgen
	22 / 23	2. / 3. Bestockungstrieb sichtbar usw.	
3 Schossen (Haupttrieb)	30	Haupttriebe beginnen sich zu strecken	Ähre min. 1 cm vom Bestockungsknoten entfernt
	31	1-Knoten-Stadium	1. Knoten min. 1 cm vom Bestockungsknoten entfernt
	32 - 34	2-Knoten-Stadium usw.	2. Knoten min. 2 cm vom 1. Knoten entfernt
	37	Erscheinen des letzten Blattes (Fahnenblatt)	letztes Blatt noch eingerollt
	39	Fahnenblatt voll entwickelt	Blatthäutchen sichtbar
5 Ährenschieben	51 / 55	Beginn / Mitte Ährenschieben	
	59	Ende Ährenschieben	Ähre vollständig sichtbar
6 Blüte	61 / 65	Beginn / Mitte der Blüte	
	69	Ende der Blüte	
7 Fruchtbildung	71	Beginn Kornbildung	Korninhalt wässrig
	75	Mitte Milchreife	Korninhalt milchig
8 Reife	85	Teigreife	Korninhalt weich und trocken
	87	Gelbreife	Fingernageleindruck bleibt
	89	Vollreife	Korn hart; kaum zu brechen
9 Absterben	92	Totreife	Körner nicht mehr zu brechen
	97	Pflanzen abgestorben	Halme brechen zusammen
	99	Erntegut	

S. Leivermann / LWK NRW; PSD Münster

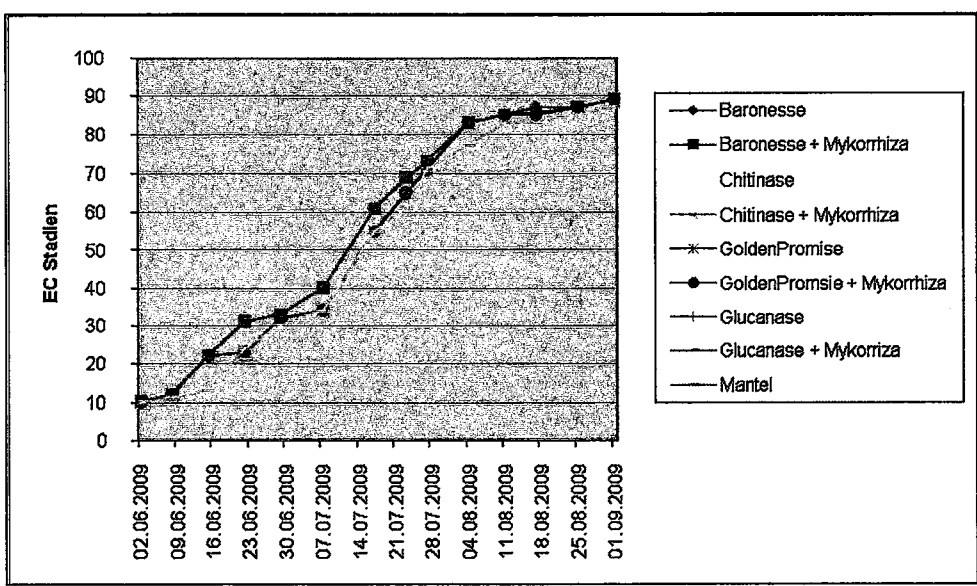


Abbildung 24: Entwicklungsverlauf der verschiedenen Gerstenlinien am Standort Thulendorf 2009.

Insgesamt war das Wachstum der Pflanzen in den einzelnen Prüfgliedern sehr ähnlich.

- Mehлтаubefall

Zum Zeitpunkt 29.06.2009 wurde starker Mehлтаubefall bei allen Pflanzen im Bestand festgestellt und durch Applikation von Capalo (2 l/ha, Breitband-Fungizid) und Biscaya (0,3 l/ha, Insektizid) am 2.7.2010 bekämpft. Im weiteren Versuchsverlauf trat kein erneuter Mehлтаubefall auf (ohne Abbildung).

- Befall durch Netzfleckenerreger

Am Standort Thulendorf wurde ab dem 7. Juli ein Befall mit *Drechslera teres*, dem Netzfleckenerreger der Gerste, festgestellt, wobei jeweils die Befallshäufigkeit (Prozent befallener Pflanzen) und die Befallsstärke (Prozent befallener Blattfläche) bonitiert wurden (Abb. 25, 26).

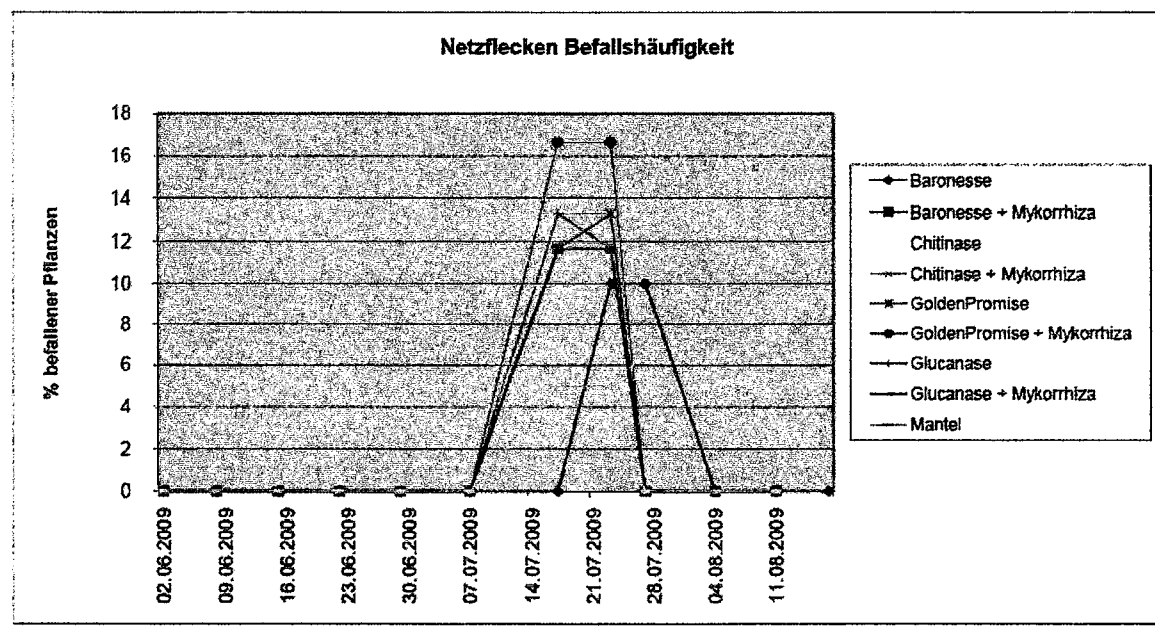


Abbildung 25: Entwicklung von *Drechslera teres* (Netzfleckenerkrankung) im Bestand.

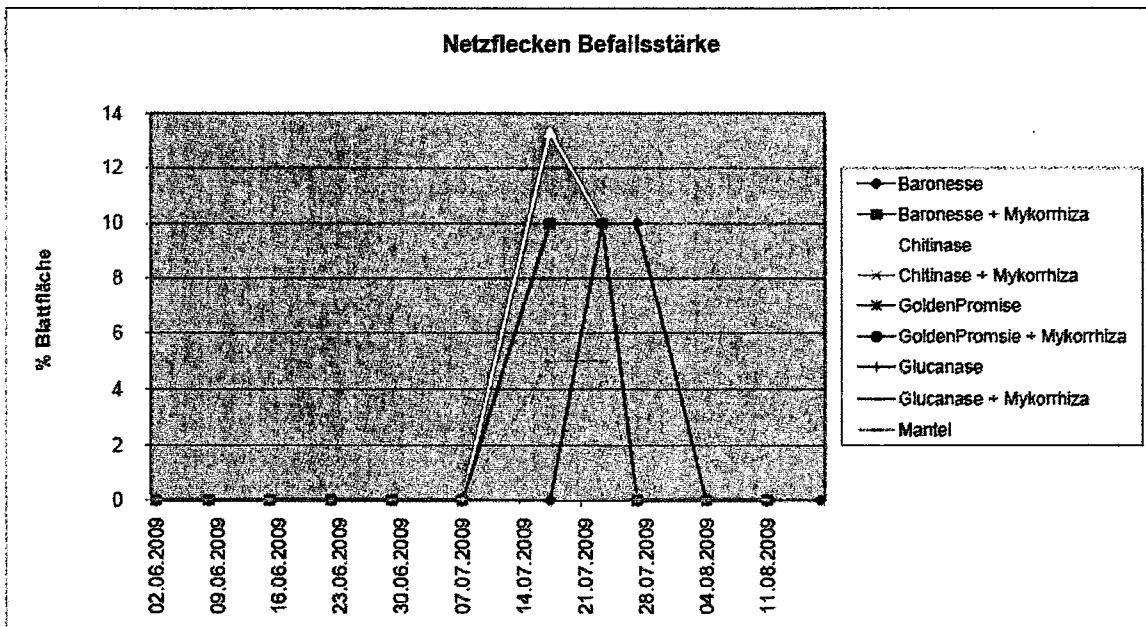


Abbildung 26: Entwicklung von *Drechslera teres* (Netzfleckenerkrankung) im Bestand.

Alle Pflanzen der verschiedenen Prüfglieder zeigten einen ähnlich starken Befall, einzig die Mantelsaat (Sorte Scarlett) wies einen niedrigeren Befall auf. Die Ursache hierfür ist ihre gute Widerstandsfähigkeit (mittel bis hoch) gegen Blatt- und Netzflecken. Außerdem weist der Mantel eine geringere Bestandsdichte auf.

- Befall durch Zwergrost
Am Standort Thulendorf wurde ab dem 21. Juli ein Befall mit *Puccinia hordei*, dem Zwergrost der Gerste, festgestellt, wobei jeweils die Befallshäufigkeit (Prozent befallener Pflanzen) und die Befallsstärke (Prozent befallener Blattfläche) bonitiert wurden (Abb. 27, 28).

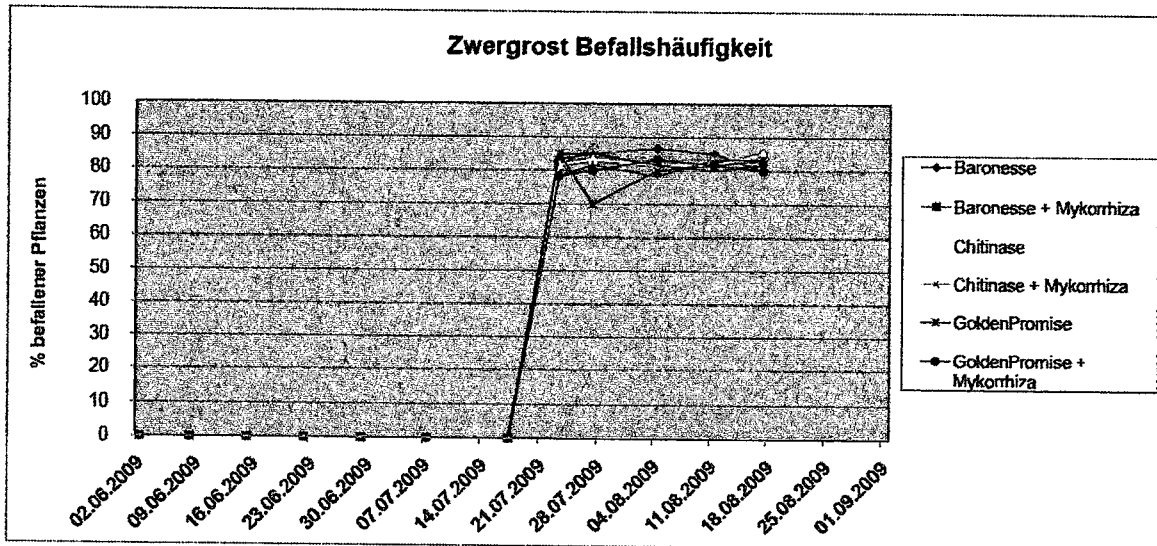


Abbildung 27: Entwicklung von *Puccinia hordei* (Zwergrosterkrankung) im Bestand.

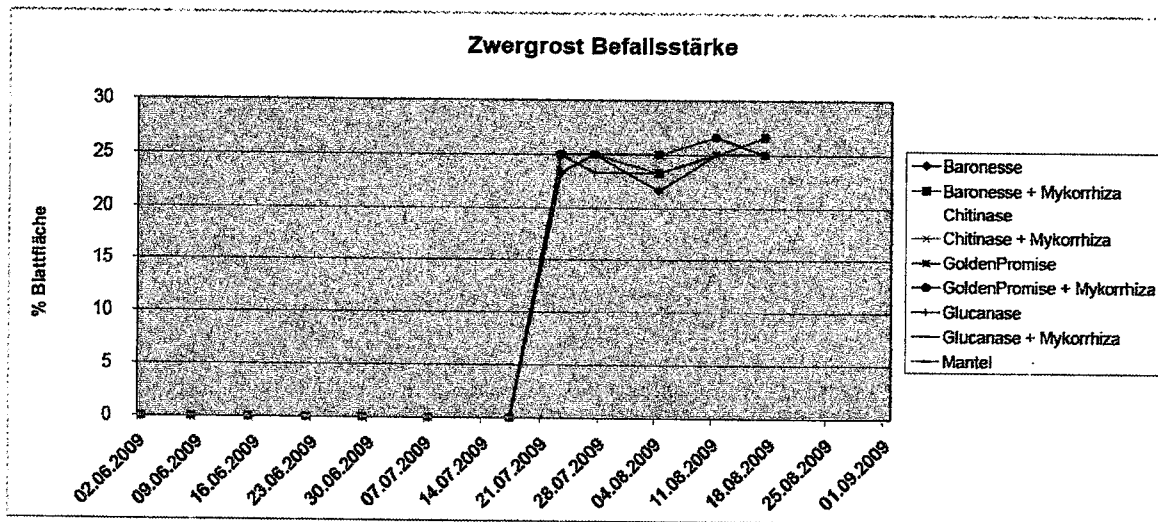


Abbildung 28: Entwicklung von *Puccinia hordei* (Zwergrosterkrankung) im Bestand.

Alle Pflanzen der verschiedenen Prüfglieder zeigten einen ähnlich starken Befall, einzig die Mantelsaat (Sorte Scarlett) wies einen niedrigeren Befall auf. Wahrscheinliche Ursache hierfür ist die geringere Bestandsdichte, da die Sorte Scarlet nur eine als niedrig bis mittel eingestufte Resistenz gegen Zwergrost besitzt.

• Blattlausbefall

Zum Zeitpunkt 29.06.2009 wurde eine Zunahme des Blattlausbefalls (und starker Mehltaubefall) bei allen Pflanzen im Bestand festgestellt und durch Applikation von Capalo (2 l/ha, Breitband-Fungizid) und Biscaya (0,3 l/ha, Insektizid) am 2.7.2010 bekämpft. Weitere

Pflanzenschutzmaßnahmen wurden nicht durchgeführt. Alle Prüfglieder zeigten im weiteren Verlauf wieder einen relativ gleich starken Neubefall, einzig der Mantel war etwas weniger befallen (Abb. 29).

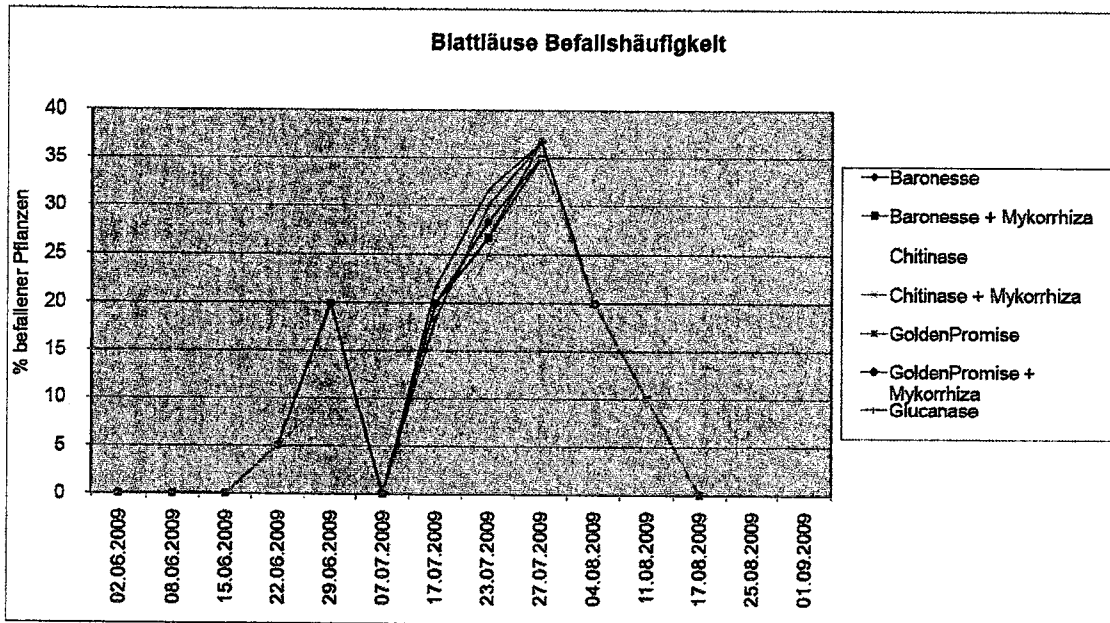


Abbildung 29: Entwicklung von Blattläusen im Bestand.

• Ermittlung von TKG

Die Masse von 1000 trockenen Samenkörnern wurde in 3 Wiederholungen pro Prüfglied bestimmt. Die TKGs der moderneren Sorte Baronesse waren, unabhängig vom Vorhandensein des eingekreuzten Transgens oder der Mykorrhizierung, immer größer als bei der älteren Sorte Golden Promise.

Variante	TKG (g)
Baronesse (B)	52,3
Glucanase-B	43,1333333
Golden Promise (GP)	38,8666667
Chitinase-GP	38,1
Baronesse (B) + Mycor.	51,1333333
Glucanase-B + Mycor.	46,7666667
Golden Promise (GP) + Mycor	40,9
Chitinase-GP + Mycor.	37,7666667

Quantitative Analyse des Mykorrhiza-Befalls an Freilandpflanzen

Wie oben in der Versuchsbeschreibung dargelegt, wurden in beiden im Jahr 2009 durchgeführten Versuche, von denen einer bereits im Anfangsstadium zerstört wurde, auch mit dem Mykorrhiza-Präparat (Amykor® Wurzel-Vital, Amykor GmbH) behandelt. Zur Quantifizierung der Mykorrhizierung durch den Pilz *Glomus mosseae* wurde Real-time PCR (qRT-PCR) verwendet. Die gesammelten Wurzelproben wurden direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf Trockeneis zur Analyse nach Gießen transportiert.

In den Laboratorien in Gießen wurden Gerstenwurzeln von 6 bis 8 Pflanzen pro Parzelle in flüssigem Stickstoff gemörsert. Die Gesamt-DNA (Pilz/Pflanze) wurde mittels Qiagen DNeasy Plant Mini Kit isoliert. Für die Amplifizierung der 28S rDNA von AM-Pilzen (GenBank-Nr. AY541918) wurde das spezifische Primerpaar Mos-F 5'-GAAGTCAGTCATACCAACGGGAA-3' und Mos-R 5'-CTCGCGAATCCGAAGGC-3' verwendet. Gerste-Ubiquitin wurde zur Normalisierung verwendet.

Nach Aufarbeitung der DNA konnte in den Proben lediglich eine insgesamt schwache Mykorrhizierung festgestellt werden. Es konnte aber eine erhöhte *Glomus* Konzentration in den Proben, die aus Amykor-behandelten Parzellen stammten, nachgewiesen werden. Ein Unterschied zwischen Wurzeln von transgenen und nichttransgenen Gersten war statistisch nicht nachweisbar. Insgesamt war eine hohe Heterogenität des Mykorrhiza-Befalls festzustellen. Ein Grund könnte in den Bodenverhältnissen der Thulendorf Flächen liegen. Aufgrund der hohen Heterogenität der Proben und einer nicht mit letzter Sicherheit auszuschließenden Beeinflussung der Versuche durch eine von den Feldzerstörern herbeigeführten chemischen Kontamination der Versuchsfläche wurden die hier erzeugten Daten nicht in der Publikation Kogel et al. 2010 (PNAS, siehe Anhang) verwendet.

Reihe	Baroness 1+	Chi 1+	GP 1+	Glu 1+	Glu 1	GP 1	Chi 1	Baroness 1
1	4,6363E-05	0,00108607	0,00193516	0,013570961		0,00181393	0,00226962	0,000392959
2	Glu 1	GP 1	Chi 1	Baroness 1	Baroness 1+	Chi 1+	GP 1+	Glu 1+
	0,000389344	0,00034847	0,00230663	0,036146506	0,00669206	0,00043501	0,01310868	0,000764427
3	Baroness 1+	Chi 1+	GP 1+	Glu 1+	Glu 1	GP 1	Chi 1	Baroness 1
	0,045647089	2,3944E-05	0,00218725	0,000824991	0,00034209	0,00345603	0,00138746	0,010356402

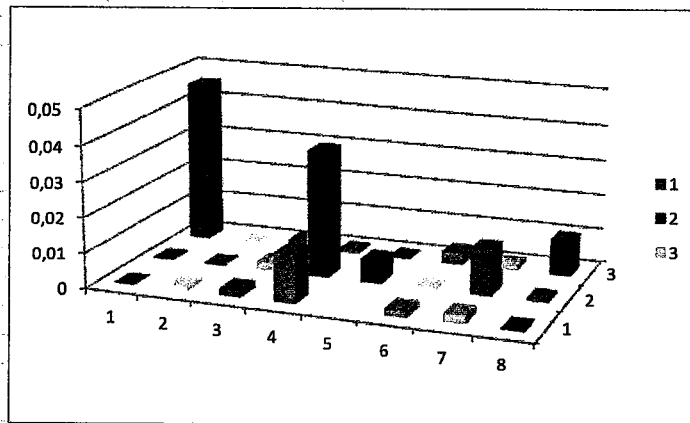


Abbildung 30: Quantifizierung des Mykorrhizierungsgrads im Thulendorf Experiment. Es zeigen sich heterogene Messdaten der Replikate. Eine eindeutige Aussage über die Mykorrhizierung Transgen –vs. nichttransgen ist nicht möglich. Insg. Wurde in linken Prüfgliedern 50% mehr Mykorrhiza als rechts detektiert (Summe aller Prüfglieder). Farbcode: Rot Baroness, gelb Chi, grün GP, blau Glu.

Hier muss beachtet werden, dass die Versuchspflanzen von einer Fläche stammen, die partiell chemisch kontaminiert wurde. Die Daten fließen deshalb in keine Publikation ein.

Mikroskopische Analysen der Thulendorf Proben

Die Kolonisierung der Wurzeln von ihm Freiland gewachsener Gerste wurde wie in den Jahren zuvor auch mit mikroskopisch-zytologischen Methoden überprüft. Zur Visualisierung des Pilzes wurden die Farbstoffe WGA-Alexa Fluor 488 bzw. Trypan Blau verwendet. Übereinstimmend mit den qRT-PCR-Ergebnissen lieferten die zytologischen Untersuchungen keine statistisch abzusichernden Unterschiede zwischen transgenen und nichttransgenen Pflanzen. Insgesamt bestätigten die zytologischen Untersuchungen die oben dargestellten molekularen Analysen, nach denen in Thulendorf ein sehr heterogener Befall mit Mykorrhiza erfolgte.

Gewächshausversuche 2009

Da aufgrund der Verwüstung und möglichen bewusst herbeigeführten chemischen Kontamination der Freilandfläche durch Aktionisten im Jahr 2008 Versuche wie sie im ursprünglichen Antrag

dargelegt wurden, nicht durchgeführt wurden, haben zur Kompensation auch im Jahr 2009 Gewächshausversuche mit den beiden transgenen Pflanzen stattgefunden. Es muss festgestellt werden, dass Gewächshausversuche in keinem Fall eine vollwertige Kompensation für Freisetzungsversuche zur Klärung von Biosicherheitsfragen darstellen, sondern lediglich geeignet sind, spezifische Teilfragen substantziell zu klären. So wurden, wie in den Jahren zuvor, im Gewächshaus keine epidemiologischen Analysen, noch Ertragsanalysen durchgeführt. Sattdessen wurden wieder Teilfragen zur spezifischen Mykorrhizierung transgener und nichttransgener Pflanzen unter Einsatz definierter AM Pilze durchgeführt.

Der Grad der Verpilzung wurde wie in den Jahren zuvor mittels qRT-PCR und Mikroskopie analysiert. Zur Bewertung des Befalls wurde ein Versuch unter Gewächshausbedingungen mit den pYW210-9-(4001-4360) Endochitinase-Gerstenlinien durchgeführt. Zur Visualisierung des Pilzes wurden die Farbstoffe WGA-Alexa Fluor 488 bzw. Trypan Blau verwendet.

Versuchsplan:

PG	Endophyt	Linie, Sorte	Entnahme (WAT)
1	<i>Glomus etunicatum</i> (INOQ)	pYW210-9-(4001-4360)	1,2,3,4
2	<i>Glomus intraradices</i> (Mycosym)	pYW210-9-(4001-4360)	1,2,3,4
3	<i>Gigaspora rosea</i>	pYW210-9-(4001-4360)	1,2,3,4
4	<i>Glomus etunicatum</i> (INOQ)	Golden Promise	1,2,3,4
5	<i>Glomus intraradices</i> (Mycosym)	Golden Promise	1,2,3,4
6	<i>Gigaspora rosea</i>	Golden Promise	1,2,3,4

Inokulation:

Zumischen von ca. 20% arbuskuläre Mykorrhiza (siehe Tab.) zum Substrat.

Substrat: Oil dri / Seramis (1:1), autoklaviert

Anlage:

Vorkeimen Gerste auf Filterpapier, dann übersetzen in inokuliertes Substrat:

Entnahme-Termine: 1-4 WAT (weeks after treatment)

Wiederholung: 4 x (je 2 Pflanzen/Topf)

Bonitierung:

1. Gesamtverpilzung (Besiedlungsgrad %, Intensität der Mykorrhizierung %)
2. Arbuskeln
3. intraradikale Hyphen
4. Vesikel
5. Genomische DNA der AM (Entnahme 3 und 4 WAT)
6. RNA-Phosphattransporter (Entnahme 3 und 4 WAT)

Wurzelbonitur wahlweise Gridline-Methode oder Wurzelsegmente.

Ergebnisse:

Es wurden 100 Wurzelsegmente pro Wiederholung untersucht. Dabei wurde die Gesamtverpilzung (Häufigkeit, Intensität) ermittelt. Zusätzlich wurde der Anteil spezifischer Pilzstrukturen (interradikale Hyphen, Arbuskel, Vesikel) bonitiert (Abbildungen 31).

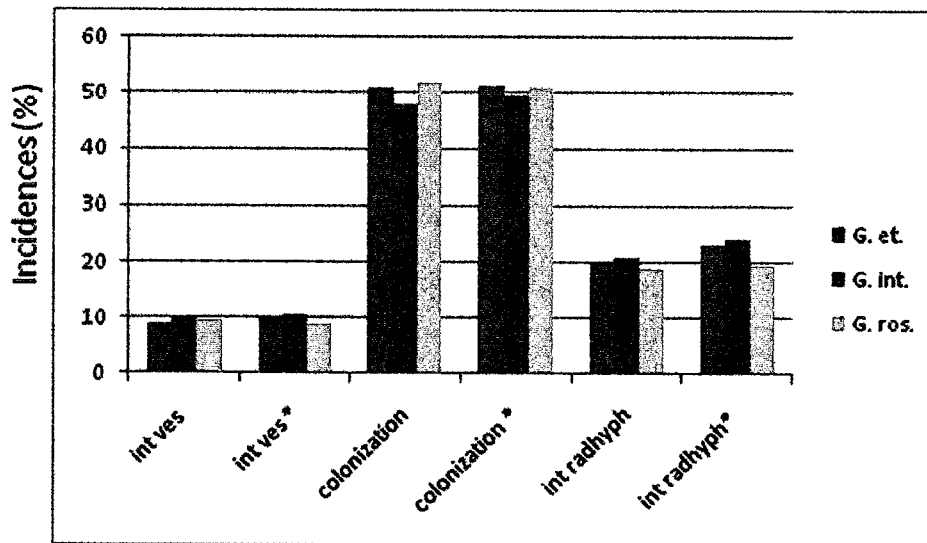


Abbildung 31: Besiedlungsintensität und Qualität der Wurzeln transgener (* = pY210-9-(4001-4360 [Endochitinase]) und nichttransgener Gerste durch verschiedene AM Pilze. Die Abbildung zeigt keinen signifikanten Unterschied (t -test; $p = 0,001$) in der Bildung von intrazellulären Vesikeln (int ves), interradikalen Hyphen (int radhyph) und Gesamtkolonisierung (colonization) zwischen transgener (*) und nichttransgener Gerste.

2010

In den Monaten November 2009 bis März 2010 wurde zusätzliche Gewächshausversuche zur Beeinflussung des AM Grades durch das Transgenes (Endochitinase) durchgeführt, um die Daten aus 2009 abzusichern (Abb. 31). Dies wurde notwendig, um die Publikation Kogel et al. 2010 fertigzustellen. Die Ergebnisse dieser Versuche konnten die Ergebnisse des Jahres 2009 voll bestätigen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Zudem wurde in einem intensiven Austausch zwischen den Partnern die Publikation Kogel et al. 2010 fertiggestellt bzw. redigiert. Bei mehreren Treffen in Gießen erarbeiteten die Partner einen Plan zur zukünftigen Fortsetzung von Biosicherheitsanalysen in USA, Chile und Brasilien.

II.2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die JLU übergibt hiermit einen Gesamtfinanzierungsplan bei Kostenabschluss über die Zeit vom 01.04.2005 bis 31.03. 2010 von 653.621,44 EURO. Diese Summe setzt sich zusammen aus einer ersten Bewilligung von 352.301,44 EURO für die Haushaltjahre 2005 bis 2008 und einer

Ergänzung vom 19.02.2008 für die Haushaltsjahre 2008 bis 2010 für zusätzliche experimentelle Feldarbeiten. Diese wurden aus wissenschaftlicher Sicht unumgänglich wegen den Feldzerstörungen in den Jahren 2006 und 2007. Ohne diese Ergänzungsfinanzierung hätten keine internationalen Veröffentlichungen – in der jetzt vorliegenden sehr hohen Qualität - erfolgen können.

Nach Beantragung beim Projektträger wurden die für das Haushaltsjahr 2008 bewilligten Mittel (130.031,90 EURO) für die wegen der Feldzerstörung notwendig gewordenen, im Ergebnisteil beschriebenen Gewächshausexperimente verwendet.

II.3. Notwendigkeit, Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Mittel sind entsprechend der unter II.1. dargelegten Arbeiten unter Einhaltung der guten wissenschaftlichen Praxis und eines möglichst sorgsamem Umgangs mit öffentlichen Geldern verwendet worden. Alle Arbeiten waren notwendig und angemessen. Insbesondere wurden die durch Feldzerstörungen notwendig gewordenen Maßnahmen – die zu einer erheblichen Kostensteigerung geführt haben, sehr sorgfältig geplant und stets in enger Absprache mit dem Projektträger, dem BvL und dem Regierungspräsidenten Gießen durchgeführt.

Die hochwertige Qualität der Arbeit ist in einem peer-review Verfahren durch die Annahme der Veröffentlichung Kogel et al. 2010 durch die international renommierte Zeitschrift PNAS bestätigt worden.

Ärgerlicherweise sind der Universität Gießen und dem Steuerzahler durch die wiederholten Zerstörungsversuche und Verwüstungen der Freiflächen durch die Saasener Gruppe erhebliche Zusatzkosten entstanden, die der öffentlichen Hand für andere dringend notwendige gesellschaftliche Maßnahmen fehlen werden.

II.4. voraussichtlicher Nutzen

Ziel der Arbeiten war nicht die Produktentwicklung, sondern die Sicherheitsbewertung transgener bzw. herkömmlicher Gerstensorten bezüglich ihrer Interaktion mit Pilzen und ihren Inhaltsstoffen. Die Arbeitsergebnisse konnten der Öffentlichkeit zugänglich gemacht werden, was m.E. den größten Nutzen dieses Projektes darstellt.

Die Befunde sind für die biologische Sicherheitsforschung von großem Nutzen, denn der Öffentlichkeit stehen nun erste Ergebnisse zum Verhalten von Gerstenpflanzen im Freilandversuch zur Verfügung. Es handelte sich um die ersten Versuche dieser Art weltweit. Deshalb haben die Ergebnisse auch eine erhebliche Aufmerksamkeit in der internationalen Presse und Wissenschaft erfahren. Zahlreiche Zitate über die Arbeit erschienen in wissenschaftlichen Journalen wie Nature und Science, aber auch in vielen internationalen Zeitschriften und Rundfunksendern (eine Auswahl unter www.uni-giessen.de).

Mit diesem Projekt konnte sich die Bundesrepublik als eine der ökologischen Biosicherheitsforschung führenden Nationen behaupten. Aufgrund der kontinuierlichen Diskussion in diesem Bereich und der Größe der Märkte ist diese Vorreiterrolle in der ökologischen

Bewertung transgener Pflanzen von kaum abschätzbarem wissenschaftlichem und ökonomischem Nutzen.

Die beteiligten Partner haben durch dieses Projekt einen erheblichen Kompetenzzuwachs in biosicherheitsrelevanten Fragen erzielen können. Diese Erfahrungen könne (und werden) in internationalen Gremien weitergegeben und ergänzt werden.

Nicht zuletzt dienen die neu gewonnenen Erfahrungen auch der kompetenten Bearbeitung neuer Projekte, die zukünftig auch unter biotechnologischen Gesichtspunkten geplant sind.

Schließlich konnte dieses Projekt auch die Qualität der universitären Lehre in erheblichem Maße verbessern, da die Studierenden die Gelegenheit hatten, vor Ort Erfahrung zu machen und zu Lernen. Sehr wichtig war für diese jungen Menschen auch die Erfahrung im Umgang mit der Saasener Gruppe.

Insgesamt ist bei diesem Projekt also ein hoher wissenschaftlicher, aber auch gesellschaftspolitischer Nutzen festzustellen.

II.5. bekanntgewordene Fortschritte

Der Stand des Wissens in dem bearbeiteten Bereich ist nochmals aktuell in der Publikation Kogel et al. 2010 referiert. Uns sind darüber hinaus keine relevanten Feldversuche zu ökologischen oder biosicherheitsrelevanten Fragestellungen in der Kulturpflanzen Gerste bekannt geworden.

II.6. Publikationen, Abstracts, Poster, Teilnahmen an Veranstaltungen

Mechanismen der Kompatibilität: 4th International Workshop Rauischholzhausen, September 30 - October 2, 2010; Novel Molecular Targets for Improvement of Crop Resistance as a Measure against Global Famine.

Weitere Informationen unter: www.uni-giessen.de/cms/for666workshop2010.

Prof. Dr. K.-H. Kogel, Invited Speaker: PSC PhD Symposium - Plants Meeting Future Challenges - Food and Energy for the Society in a Changig Environment, ETH Zürich, Schweiz, 10.09.2010: Vortrag: Biosafety Research in Europe.

Karl-Heinz Kogel, Lars M. Voll, Patrick Schäfer, Carin Jansen, Yongchun Wu, Gregor Langen, Jafargholi Imani, Jörg Hofmann, Alfred Schmiedl, Sophia Sonnewald, Diter von Wettstein, R. James Cook, and Uwe Sonnewald (2010). Transcriptome and metabolome profiling of field-grown transgenic barley lack induced differences but show cultivar-specific variances. Proc. Nat. Acad. Sci USA 107, 6198-6203.

Schäfer P, Kogel KH (2009) The Sebacinoid Fungus *Piriformospora indica*: An Orchid Mycorrhiza With a Robust Endophytic Potential for Reprogramming Host Plants for Increased Reproduction and Fitness. In: The Mycota V, Plant Relationships V, eds. K. Esser, H. Deising, Springer Berlin, Heidelberg, pp. 99-112.

Jansen C, von Wettstein D, Schäfer W, Kogel KH, Felk F, Maier FJ (2005) Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. Proc. Nat. Acad. Sci USA 102, 16892-16897.

Mitgliederversammlung Arbeitskreis Deutsche *In Vitro* Kulturen" (ADIVK), 25.-26. September 2008, Bad Bevensen. Vortrag von Dr. J. Imani zum Projekt „Biosicherheit Gerste“.

Workshop in RLP AgroScience Neustadt/Weinstraße, 12.-13. Juli 2007. Vortrag von Dr. J. Imani im Rahmen der Sektion „Neue Impulse aus der Grundlagenforschung für die angewandte Pflanzenbiotechnologie“.

Einladung von EU Marie Curie Chair, ICAM, University of Évora, Portugal 19.04.2007. Vortrag von Dr. J. Imani zum Thema „Somatic embryogenesis and transgenic plants“.

Poster bei der “International Conference: Plant Transformation Technologies (PTT) 4.-7. Februar 2007” Wien, Austria. Imani, J., Doil, A., Winkelmann, T. and K.-H. Kogel: Enhancement of genetic transformation rates in plants using cell cycle synchronized suspension cultures. pp 62.

11.11.2008 – Bonn – Sitzung des Informationskreises Gentechnik Dr. Imani.

07.-08.03.2007 – Berlin – Statusseminar Biol. Sicherheit gentechn. veränderter Pflanzen (Dr. Imani und Prof. Sonnewald).

27.11.2007 – Bonn – Sitzung des Informationskreises Gentechnik (Dr. Imani).

27.11.2006 – Bonn – Sitzung des Informationskreises Gentechnik (Dr. Imani).

17.-18.05.2006 – Berlin (Dahlem) – Statusseminar Biol. Sicherheit gentechn. veränderter Pflanzen (Prof. Kogel).

III. Erfolgskontrollbericht

III.1. Beitrag zu förderpolitischen Zielen

Gemäß Bekanntmachung der Förderrichtlinien waren die Ziele des Förderschwerpunkts „die Verbesserung der Sicherheit gentechnisch veränderter Pflanzen und die Förderung der Sicherheitsforschung zur Begleitung von Freilandversuchen mit gentechnisch veränderten Pflanzen.“ Einer der hierbei ausgeschriebenen Förderschwerpunkte waren „die Untersuchungen zur biologischen Sicherheit von Auswirkungen gentechnischer Veränderungen – insbesondere Pilzresistenz bei Getreiden“. Gemäß dieser Ziele sind die Beiträge des nun abgeschlossenen Projekts: (i) der Nachweis der substantiellen Äquivalenz transgener Gerstenpflanzen und nicht transformierten Kontrollpflanzen nach Besiedelung mit nützlichen Bodenpilzen (Varianten: ohne/mit Mykorrhizierung), (ii) der Nachweis, dass die Sortenunterschiede zwischen Baroness und Golden Promise den Einfluss der untersuchten Transgene bei weitem übersteigen und (iii.) das globale und gezielte Metabolom- und Transkriptomanalysen zur Sicherheitsbewertung transgener

Pflanzen herangezogen werden können. Diese Ergebnisse bestätigten die anfänglich von uns auf Basis des nun umfassenden molekularbiologischen Wissen bzw. der fast 30-jährigen Erfahrung mit transgenen Pflanzen aufgestellten Hypothesen. Der signifikante Einfluss anderer biotischer und abiotischer Faktoren, wie Mykorrhizabesiedlung, und der Einfluss klassischer Züchtung waren beeindruckend hoch und übertrafen den Einfluss von Transgenen um ein Vielfaches. Deshalb können unsere Ergebnisse auch zu einem rationaleren Umgang mit Fragen zur Sicherheit von transgenen Pflanzen beitragen.

III.2. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse, Erfahrungen

Zentrale Ergebnisse des Vorhabens wurden im Jahr 2010 in dem internationalen Journal „*Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*“ publiziert.

Ziel der gemeinsamen Arbeiten der JLU und FAU war es, transgene Pflanzen auf substantielle Äquivalenz zu untersuchen. Dazu wurden eine begrenzte Metabolomanalyse anhand eines Spektrums von Primär- und Sekundärmetaboliten sowie vergleichende Analysen der Transkriptome der unterschiedlichen Genotypen durchgeführt. So wurden im Jahr 2006 und 2007 mit den etablierten Methoden die Messungen von Zuckermetaboliten, Antioxidantien, Aminosäuren, Citratzyklus Intermediaten und Pigmenten vorgenommen. Im Berichtszeitraum 2008 wurden unsere Analysen durch eine neu entwickelte Methode zur Erstellung metabolischer Fingerprints erweitert. Darüber hinaus wurde mit der Firma Agilent ein Gersten DNA-Chip entwickelt, der ca. 42.000 Gerstengene und ESTs repräsentiert und damit ca. doppelt so viele Gene adressiert wie der kommerziell erhältliche Affymetrix Chip.

Nach Optimierung und zum Teil Neuentwicklung unserer Messverfahren liegen nun gesicherte Daten zu 72 bekannten Pflanzenmetaboliten vor. Darüber hinaus wurden >300 Massenpeaks mittels ungerichteter Metabolomanalyse reproduzierbar detektiert und in den Sortenvergleich einbezogen.

Basierend auf den Metabolom- und Transkriptomdaten ergaben sich keine statistisch signifikanten Abweichungen zwischen nicht-transgenen und transgenen Gerstenpflanzen. Darüber hinaus konnte kein Einfluss der Transgenexpression auf die Besiedelung der Gerstenpflanzen durch *Glomus mosseae* beobachtet werden. Überraschenderweise wurden allerdings große Unterschiede zwischen den beiden verwendeten nicht-transgenen Gerstenlinien, Golden Promise und Baroness, festgestellt. Die Transkriptomanalyse ergab, dass mehr als 2000 Gene in beiden Sorten unterschiedlich stark exprimiert werden. Es war auffällig, dass eine große Anzahl Abwehr-assoziiertes Gene in Golden Promise erhöht exprimiert wurden. Dies könnte mit der erhöhten Suszeptibilität dieser Sorte im Vergleich zu Baroness erklärt werden. Die Besiedelung der Wurzeln mit *Glomus mosseae* führte bei Golden Promise zu transkriptionellen und metabolischen Änderungen im Blatt. Diese Veränderungen konnte im Fall von Baroness nicht eindeutig festgestellt werden. Dies kann mit einer eventuell niedrigeren Besiedelung durch den Mykorrhiza Pilz erklärt werden.

Die epidemiologischen Versuche ergaben, dass alle Pflanzen der verschiedenen Prüfglieder einen ähnlich starken Befall durch Zwergrost (*Puccinia hordei*) bzw. Netzflecken (*Drechslera teres*) vorwiesen. Die Mantelsaat (Sorte Scarlett) wies einen niedrigeren Befall auf. Die Ursache hierfür ist mittel bis hoch eingestufte Resistenz von cv. Scarlett gegen Zwergrost/Netzflecken und auch die geringe Bestandsdichte.

Die TKGs der moderneren Sorte Baronesse waren, unabhängig vom Vorhandensein des eingekreuzten Transgens oder der Mykorrhizierung, immer größer als bei der älteren Sorte Golden Promise

III.3. Fortschreibung des Verwertungsplans

III.3.1. Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte

Aus dem Projekt sind keine Patente hervorgegangen. Ziel des Vorhabens war eine Risikobewertung schon entwickelter, transgener Gerstenpflanzen, nicht die Generierung von neuen Pflanzen.

III.3.2. Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende

Im Rahmen des Projektes wurden keine Transgen-induzierten Veränderungen in der Zusammensetzung von Metaboliten oder Transkripten beobachtet. D.h. einer Verwertung der Chitinase bzw. Glucanase-exprimierenden Gerstenpflanzen stehen die Ergebnisse des Projektes nicht entgegen.

Die Einbindung dieser oder ähnlicher Pflanzen mit gleichem Resistenzprinzip in zukünftige Maßnahmen des Pflanzenbaus könnte zu einer verbesserten umweltschonenden Produktion beitragen. Die Nutzung transgener Pflanzen birgt weltweit gesehen ein hohes wirtschaftliches Potential.

III.3.3. Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende

Zentrale Ergebnisse des Vorhabens wurden im Jahr 2010 in dem internationalen Journal „*Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*“ publiziert.

Es wurde kein Nachfolgeantrag beim BMBF gestellt. Jedoch werden die Arbeiten in Kooperation mit dem amerikanischen Partner fortgeführt. Freilandexperimente mit den hier verwendeten spezifischen Genotypen werden nur noch in USA geplant. In Zukunft sind Freisetzungen weiteren Getreidepflanzen mit verbesserten Resistenzeigenschaften von unserer Seite auch in Deutschland geplant.

III.3.4. Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Die Arbeiten zeigen, dass die eingesetzten Methoden zur Metabolom- und Transkriptomanalytik geeignet sind, genotypische und umweltbedingte Veränderungen in Freilandpflanzen hochspezifisch und hochsensitiv nachzuweisen. Diese Methoden werden in anderen Projekten wie z.B. BioEnergie-OPTIMAS eingesetzt und besitzen das Potential, sowohl wissenschaftlich, als auch wirtschaftlich (Biomarker) Ergebnisse zu liefern, die in künftigen Projekten genutzt werden können.

III.4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Wegen der Feldzerstörungen sind epidemiologische Untersuchungen bzw. Ertragsserhebungen aus diesem Projekt nicht publikationsreif. Die Arbeiten dazu werden in USA fortgesetzt. Eine detaillierte Begründung für die nicht erfolgten Erhebungen wird in II.1. gegeben.

III.5. Präsentationsmöglichkeiten für Anwender

Nicht zutreffend

III.6. Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplan

Die Ausgaben- und Zeitplanung wurde gemäß dem ursprünglichen Antrag bzw. den angezeigten Veränderungen im Laufe der Projektbearbeitung eingehalten. Die wichtigsten wissenschaftlichen Ergebnisse des Projektes wurden veröffentlicht.

Im Wesentlichen ergab sich durch Zerstörungen von Feldversuchen durch die Saasener Gruppe eine Zusatzfinanzierung für Experimente in den Jahren 2008 bis 2010.

Im Jahr 2008 konnte kein Feldexperiment stattfinden, weil die Freisetzungsfelder besetzt, verwüstet und möglicherweise chemisch kontaminiert wurden.

Im Jahr 2009 fand, anders als ursprünglich geplant, ein Feldversuch in Thulendorf statt, welcher teilzerstört wurde.

IV. Berichtsblatt 1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart Abschlussbericht
3a. Titel des Berichts Auswirkungen der transgenen Pflanzen auf nützliche pilzliche Mikroorganismen	
4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n)) Karl-Heinz Kogel, Diter von Wettstein, Uwe Sonnewald	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.03.2010
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n)) Karl-Heinz Kogel, Lars M. Voll, Patrick Schäfer, Carin Jansen, Yongchun Wu, Gregor Langen, Jafargholi Imani, Jörg Hofmann, Alfred Schmiedl, Sophia Sonnewald, Diter von Wettstein, R. James Cook, and Uwe Sonnewald	6. Veröffentlichungsdatum April 2010
	7. Form der Publikation Artikel in Fachzeitschrift
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Research Centre for Biosystems, Land Use, and Nutrition (IFZ), Justus Liebig Universität, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen, Germany Lehrstuhl für Biochemie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Staudtstr. 5, 91058 Erlangen, Germany Department of Crop & Soil Sciences, Washington State University, Pullman, WA 99164-6420, USA	10. Förderkennzeichen 0313282A
	11a. Seitenzahl Bericht 63 Seiten
	11b. Seitenzahl Publikation >6
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	12. Literaturangaben (50)
	14. Tabellen > 4
	15. Abbildungen (31)
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt von Prof. Dr. Karl-Keinz Kogel, 20.01.2011	

18. Kurzfassung Ziel der Studien war mögliche negative Effekte der Expression zweier Transgene, einer Chitinase und einer Glukanase, auf Nicht-Ziel Organismen unter besonderer Berücksichtigung der nützlichen Mykorrhiza-Pilze an der Wurzel zu überprüfen. Parallel wurden Änderungen von Metaboliten und des Transkriptom an Blättern transgener Pflanzen analysiert. Dazu wurden erstmals in Deutschland und an zwei verschiedenen Standorten Freilandexperimente mit transgenen Gerstenpflanzen durchgeführt. Transkriptom- und Metabolomanalyse sowie ein Metabolit „fingerprinting“ wurden in Kooperation mit dem Verbundpartner (Prof. Sonnewald) durchgeführt. Wildtyp Kontrollpflanzen (Golden Promise, GP; Baronesse, B) wurden mit transgenen Pflanzen verglichen, die eine codon-optimierte Endochitinase des Pilzes <i>Trichoderma harzianum</i> (ChGP) bzw. samenspezifisch eine (1,3-1, 4)- β -Glucanase (GluB) exprimieren. Die Analysen zeigten deutliche Unterschiede zwischen GP und B, jedoch nicht zwischen GP und ChGP. B und GluB zeigten signifikant unterschiedliche Mengen an 22 Transkripten bzw. 4 Metaboliten. Die Ko-Regulation der 22 Gene in GluB und GP ließ vermuten, dass die beobachteten Unterschiede nicht durch das Transgen, sondern durch vorangegangene Kreuzungen zwischen transgenen GluGP und B verursacht wurden, was mithilfe eines SSR Markers bestätigt werden konnte. Eine erfolgreiche Mykorrhizierung der Pflanzen wurde unter Freilandbedingungen als auch in begleitenden Gewächshausuntersuchungen festgestellt. Die Mykorrhizierung spiegelte sich auch in einem veränderten Blattmetabolismus wider.	
19. Schlagwörter barley, chitinase, glucanase, transgene effects, mykorrhiza, transcriptome, metabolome, genetic variability	
20. Verlag	21. Preis

Gießen, 20.01.2011


Prof. Dr. K.-H. Kogel

Anlage II

669
571

ANHANG

FORMULAR FÜR DIE DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE DER ABSICHTLICHEN FREISETZUNG GENETISCH VERÄNDERTER HÖHERER PFLANZEN IN DIE UMWELT GEMÄSS ARTIKEL 10 DER RICHTLINIE 2001/18/EG

Betreiber: Justus-Liebig-Universität Gießen

Ausführende Stelle: Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie

Das Berichtsformular ist vom Anmelder auszufüllen.

Der Anmelder hat das Berichtsformular entsprechend den Vorgaben auszufüllen (entsprechende Kästchen ankreuzen und/oder, soweit möglich, die spezifischen Stichworte in den Textfeldern verwenden).

Der Anmelder hat die im Bericht enthaltenen Daten möglichst mittels Diagrammen, Zahlen und Tabellen zu veranschaulichen. Auch statistische Daten können, sofern von Bedeutung, angegeben werden.

Bei Freisetzungen an mehreren Standorten, von verschiedenen GVO und/oder bei Freisetzungen über mehrere Jahre hat der Anmelder für die gesamte Geltungsdauer der Zustimmung einen allgemeinen Überblick über die ergriffenen Maßnahmen und beobachteten Auswirkungen zu geben.

Der nach jeder Position freigelassene Platz beinhaltet keine Vorgabe für den Umfang der in diesem Bericht geforderten Informationen.

1. Allgemeine Informationen

1.1. Europäische Anmeldeungsnummer: B/DE/07/200

1.2. Mitgliedsstaat, in dem die Anmeldung erfolgt ist: Deutschland

1.3. Datum und Nummer der Zustimmung: 04. Mai 2009; Az. 6786-01-0200

2. Berichtsstatus

2.1.1. Geben Sie bitte entsprechend Artikel 3 dieser Entscheidung an, worum es sich bei dem vorliegenden Bericht handelt:

- Abschlussbericht
- Bericht über die Überwachung nach der Freisetzung

X Abschlussbericht Zwischenbericht

3. Einzelheiten der Freisetzung

3.1. Wissenschaftliche Bezeichnung des Empfängerorganismus: *Hordeum vulgare* L.

3.2. Transformationsereignis(se), (Akronym(e)) oder verwendete Vektoren (¹) (falls die Identität des Transformationsereignisses nicht verfügbar): pYW210; pJH271

3.3. Eindeutiger Identifizierungscode, falls vorhanden: pYW210-9-(4001-4360); pJH271-Beta-Glu-307

3.4. Tragen Sie bitte die folgenden Angaben in die entsprechenden Felder ein:

Ort der Freisetzung (Verwaltungsgebiet und gegebenenfalls Koordinaten):	Größe der Freisetzungsfächen (¹) (m ²)	Identität (²) und geschätzte Zahl der genetisch veränderten höheren Pflanzen, je tatsächlich freigesetztem Transformationsereignis (Zahl der Samen/Pflanzen je m ²)	Dauer der Freisetzung(en): (von ... (Tag/Monat/Jahr) bis ... (Tag/Monat/Jahr))
Gemeinde 18184 Thulendorf in Mecklenburg-Vorpommern Gemarkung: Klein Lüsewitz, Flur: 2, Flurstück: 46, 47, 49, 50,	9,6	4,8 m ² GV-Gerste pYW210 -9- (4001-4360) 4,8 m ² GV-Gerste (Beta Glucanase)	Von 12/05/2009 (1. Aussaat) und 25/05/2009 (2. Aussaat) bis 07/09/2009

¹ Bei kleinmaßstäblichen Feldversuchen, bei denen mehrere Linien getestet werden können, sind die Vektoren anzugeben, die Aufschluss über die eingeführten Merkmale und/oder genetischen Elemente geben. Bei Versuchen in großen/größerem Maßstab beschränkt sich die Zahl der angemeldeten Transformationsereignisse auf nur ein oder wenige Transformationsereignisse.

51, 52, 54; Flur 1, Flurstück: 18, 19, 54		jeweils 400 Samen pro m ² / Transformationsereignis	

⁽¹⁾ Geben Sie die Größe der GV-Fläche sowie gegebenenfalls die Größe der Fläche an, auf der keine GVO freigesetzt wurden (z.B. Randstreifen).

⁽²⁾ Verwendete Vektoren

4. **Alle Arten von Produkten, die der Anmelder zu einem späteren Zeitpunkt anmelden will.**

4.1. **Beabsichtigt der Anmelder, das/die freigesetzte(n) Transformationsereignis(se) nach dem Gemeinschaftsrecht für ein Inverkehrbringen als Produkt zu einem späteren Zeitpunkt anzumelden?**

Ja

Nein

Noch nicht bekannt

Falls zutreffend, bitte das/die Land/Länder der Anmeldung angeben:

Falls zutreffend, bitte Verwendungszweck angeben:

- Einfuhr
- Anbau (z.B. Produktion von Saatgut/Pflanzgut)
- Lebensmittel
- Futtermittel
- pharmazeutische Verwendung (oder Verarbeitung für pharmazeutische Zwecke)
- Weiterverarbeitung für
 - die Verwendung als Lebensmittel/in Lebensmittel
 - die Verwendung als Futtermittel/in Futtermittel
 - die Verwendung in der Industrie
- Sonstige (bitte erläutern):

5. **Art(en) der absichtlichen Freisetzung(en)**

Kreuzen Sie bitte (in den entsprechenden Feldern) die jeweilige(n) Art(en) der Freisetzung(en) sowie die Spezifizierung an. Geben Sie bei Freisetzungen an mehreren Standorten, von verschiedenen Transformationsereignissen und/oder bei Freisetzungen über mehrere Jahre einen allgemeinen Überblick über die Art(en) der absichtlichen Freisetzung(en), die über die gesamte Geltungsdauer der Zustimmung durchgeführt wurden. Zutreffende Art(en) bitte ankreuzen:

5.1. **Absichtliche Freisetzung(en) für Forschungszwecke**

5.2. **Absichtliche Freisetzung(en) für Entwicklungszwecke**

- Screening von Transformationsereignissen
- Prüfung des Konzepts (²)
- Verhalten beim Anbau (z.B.: Effizienz/Selektivität eines Pflanzenschutzmittels, Ertrag, Keimfähigkeit, Bestandsentwicklung, Wüchsigkeit, Pflanzenhöhe, Anfälligkeit gegenüber klimatischen Faktoren/Krankheiten usw.) (bitte spezifizieren)
- Geänderte agronomische Eigenschaften (z.B. Resistenz gegen Krankheiten/Schädlinge/Trockenheit/Frost usw.) (bitte spezifizieren)
- Geänderte qualitative Eigenschaften (längere Haltbarkeit, höherer ernährungsphysiologischer Wert, veränderte Zusammensetzung usw.) (bitte spezifizieren)
- Stabilität der Expression
- Vermehrung von Linien
- Wüchsigkeit von Hybriden
- „Molecular Farming“ (³)
- Phytosanierung
- Sonstige:(Bitte angeben)

² Z.B. die Erprobung des neuen Merkmals unter Umweltbedingungen.

³ „Molecular Farming“ bezeichnet die Erzeugung von Stoffen (z.B. von Proteinen und Arzneimitteln) durch Pflanzen, die gezielt gentechnisch verändert wurden. „Molecular Farming“ könnte gleichermaßen bezeichnet werden als die Erzeugung von durch Pflanzen synthetisierten Arzneimitteln, von aus Pflanzen hergestellten Arzneimitteln, als Proteinproduktion mithilfe von Pflanzen usw.

UB1
573

- 5.3. **Amtliche Sortenprüfung**
- Eintragung der Sorte in einen nationalen Sortenkatalog
 - Unterscheidbarkeit, Homogenität, Beständigkeit
 - Landeskultureller Wert
 - Sonstige: (bitte angeben)
- 5.4. **Herbizidzulassung**
- 5.5. **Absichtliche Freisetzung(en) zu Demonstrationszwecken**
- 5.6. **Saatgutvermehrung**
- 5.7. **Absichtliche Freisetzung(en) für die Biosicherheits-/Risikoforschung**
- Untersuchung des vertikalen Gentransfers
 - Einkreuzung in herkömmliche Kulturpflanzen
 - Einkreuzung in verwandte Wildformen
 - Untersuchung des horizontalen Gentransfers (Gentransfer in Mikroorganismen),
 - Behandlung von Durchwuchs
 - mögliche Veränderung der Persistenz oder der Verbreitung
 - mögliche Invasivität
 - **X** mögliche Auswirkungen auf Zielorganismen
 - **X** mögliche Auswirkungen auf Nicht-Zielorganismen
 - Beobachtung resistenter verwandter Pflanzen
 - Beobachtung resistenter Insekten
 - Sonstige: (bitte angeben)
- 5.8. **Sonstige Art(en) der absichtlichen Freisetzung(en):**
(Bitte erläutern)
6. **Verfahren, Ergebnis(se) der Freisetzung, Management und Überwachungsmaßnahme(n) in Bezug auf die Risiken für die menschliche Gesundheit oder die Umwelt**
- 6.1. **Maßnahme(n) des Risikomanagements**
- Bitte erläutern Sie die Maßnahmen des Risikomanagements, die zur Vermeidung oder Eingrenzung der Ausbreitung der GVO außerhalb des Freisetzungsgeländes ergriffen wurden, insbesondere Maßnahmen,
- **X** die im ursprünglichen Antrag nicht angemeldet wurden,
 - **X** die zusätzlich zu den in der Zustimmung enthaltenen Auflagen ergriffen wurden,
 - die in der Zustimmung nur unter bestimmten Bedingungen gefordert wurden (z.B.: Trockenperioden, Überschwemmungen),
 - bei denen der Anmelder laut Zustimmung eine Wahl zwischen verschiedenen Maßnahmen hat.
- Zutreffendes ankreuzen:
- Einsatz von doppeltem Thermotexnetz zum Ersatz der teilweise zerstörten Mantelsaat (Bestätigung durch die zuständige Überwachungsbehörde, LALLF Rostock vom 10.07.2009); **Detaillierte Informationen zu allen Maßnahmen im Zusammenhang mit der Freisetzung sind der beiliegenden Betriebsanweisung zu entnehmen**
- 6.1.1. **Vor Aussaat/Pflanzung:**
- **X** Klare Kennzeichnung des genetisch veränderten Saatguts/Pflanzguts (deutlich zu unterscheiden von sonstigem Saat- und Pflanzgut): s. Betriebsanweisung
 - **X** Getrennte Bearbeitung und Transport des Saat- und Pflanzguts (Verfahren bitte erläutern. Nennen Sie Beispiele für die Vorkehrungen zur Isolierung während der Bearbeitung und des Transports): s. Betriebsanweisung
 - **X** Vernichtung nicht benötigten Saatguts/Pflanzguts: s. Betriebsanweisung
 - Zeitliche Isolierung (bitte angeben)
 - Fruchtfolge (Vorfrucht angeben)

- Sonstige: (bitte angeben)

6.1.2. Während der Aussaat/Pflanzung:

- X Verfahren der Aussaat/Pflanzung
- X Entleeren und Säubern der Saat- und Pflanzmaschinen auf dem Freisetzungsgelände
- X Trennung während der Aussaat und des Pflanzens (Nennen Sie Beispiele für die Vorkehrungen zur Isolierung bei Aussaat und Auspflanzen).
- Sonstige: (bitte angeben)

6.1.3. Während des Freisetzungszeitraums:

- X Isolierungsabstand (-abstände) (x Meter)
 - X zu geschlechtlich kompatiblen Kulturpflanzen,
 - X zu geschlechtlich kompatiblen Wildpflanzen
- X Randstreifen (mit der gleichen oder einer anderen Kulturpflanze, mit einer nicht transgenen Kulturpflanze, x Meter, usw.) (Siehe Nebenbestimmung BvL Bescheid II.8 und II.9)
- X Käfig/Netz/Zaun/Beschilderung (s. Betriebsanweisung)
- X Pollenfalle (s. oben und Betriebsanweisung: Ersatz der teilweise zerstörten Mantelsaat durch Thermotexnetz)
- Entfernen von GV-Blütenständen vor dem Blühen (Häufigkeit des Entfernens angeben)
- X Entfernen von Schossem/verwandten Pflanzen/Kreuzungspartnern (Häufigkeit des Entfernens angeben, x Meter um das GV-Feld, usw.)
- Sonstige: (bitte angeben)

6.1.4. Am Ende der Freisetzung:

- X Verfahren der Ernte/Vernichtung (des Bestands oder eines Teils davon) oder andere Verfahren (z.B. Probenahme und Analyse von Zuckerrübenschnitzeln) (s. Betriebsanweisung)
- X Ernte/Vernichtung vor Abreife der Samen
- X Wirksame Entfernung von Pflanzenteilen
- X Getrennte Lagerung und Transport des Ernteguts/Abfalls (nennen Sie Beispiele für Vorkehrungen zur Verhinderung des Herabfallens von Saatgut/Abfall und Erntegut) (s. Betriebsanweisung)
- X Säubern der Maschinen auf dem Freisetzungsgelände
- X Bestimmungsort des Abfalls, Behandlung des Abfalls/überschüssigen Ernteguts/von Pflanzenresten (s. Betriebsanweisung)
- X Maßnahmen zur Behandlung und Bearbeitung der Freisetzungsfäche nach der Ernte (Verfahren für die Vorbereitung und Bearbeitung der Freisetzungsfäche nach Abschluss der Freisetzung einschließlich der Anbaupraktiken erläutern) (s. Betriebsanweisung)

Sonstige (bitte erläutern): In Absprache mit der Überwachungsbehörde wurden die Samen und das Stroh (Ährenstroh) der GVO- Versuchsfläche und der Mantelsaat geerntet (07.09.2009) und anschließend durch Autoklavieren inaktiviert. Alle verbleibenden Pflanzenreste wurden durch Fräsen zerkleinert und flach in den Boden eingearbeitet.

6.1.5. Maßnahmen nach der Ernte

Bitte geben Sie die Maßnahmen an, die nach der Ernte auf der Freisetzungsfäche ergriffen wurden:

- X Häufigkeit der Inspektionen (im Durchschnitt): alle zwei Wochen
- Folgefrucht (bitte erläutern)
- Fruchtfolge (bitte erläutern)
- Brache/kein Anbau (bitte erläutern)
- X Oberflächliche Bodenbearbeitung/kein Tiefpflügen
- veränderte Saatrichtung
- X Kontrolle des Durchwuchses (bitte Zeitabstände und Dauer angeben): alle zwei Wochen
- X Geeignete chemische Behandlung(en) (bitte angeben): Roundup
- Sonstige (bitte angeben)

6.1.6. *Sonstige Maßnahmen: (bitte erläutern)*6.1.7. *Noteinsatzplan/-pläne*

Bitte angeben

Verlief die Freisetzung wie vorgesehen?

- ja

- nein (bitte Gründe erläutern, z.B. Vandalismus, Wetter usw.): Zerstörung durch Vandalismus am 17./18.05.2009, s. bitte Änderungsmitteilung gem. § 16a (2) GenTG vom 19.05.2009; partielle Zerstörung am 02.07.2009, s. Kurzbericht vom 07.07.2009

a)

Mussten Maßnahmen gemäß dem/den Noteinsatzplan/-plänen nach Artikel 6 Absatz 2 Buchstabe a) Ziffer VI) und Anhang III.B der Richtlinie 2001/18/EG ergriffen werden?

- Nein

- Ja (bitte erläutern): s. Betriebsanweisung („Partielle Zerstörung“) und Mitteilungen vom 19.05.2009 (Az.: B 3.3 -GenTG Freisetzung Freisetzung IPAZ-BVL23) und 07.07.2009 (Az.: B 3.3 -GenTG Freisetzung Freisetzung IPAZ-BVL24) für getroffene Maßnahmen (s. Anlage).

6.2. *Maßnahmen zur Überwachung nach Beendigung der Freisetzung*

Da das vorliegende Berichtsformular sowohl für den Abschlussbericht als auch für den/die Berichte über die Überwachung nach Beendigung der Freisetzung (Nachkontrolle) verwendet werden kann, wird der Anmelder gebeten, in diesem Abschnitt 2 von Kapitel 6 klar zwischen beiden Berichtsformen zu unterscheiden. Bitte geben Sie an, ob

- **der Überwachungsplan für den Zeitraum nach der Freisetzung anläuft** (im Falle eines Abschlussberichts nach der letzten Ernte von genetisch veränderten höheren Pflanzen),
- **der Überwachungsplan für den Zeitraum nach der Freisetzung bereits läuft** (im Falle eines Zwischenberichts über die Überwachung nach Beendigung der Freisetzung),
- **X der Überwachungsplan für den Zeitraum nach der Freisetzung bereits abgeschlossen ist** (im Falle eines Abschlussberichts über die Überwachung nach Beendigung der Freisetzung),
 - a) Nach der Zerstörung der ersten Aussaat vom 12.05.2009 wurden die Durchwuchskontrollen wöchentlich durchgeführt. In dem Zeitraum von 18.5.-19.6.2009 waren die Pflanzen (Versuchsfläche und Mantelsaat) ca. 100% aufgelaufen, so dass anschließend am 19.06.2009 eine Behandlung mit einem nicht-selektiven Herbizid (Wirkstoff: Glyphosat) erfolgte. Bei der zweiwöchigen Nachkontrolle bis Einbruch der Kälteperiode (23.11.2009) wurden keine Durchwuchspflanzen beobachtet.
 - b) Bei der 2. Aussaat des Freisetzungsversuchs, wie in der Betriebsanweisung ausgeführt, wurden nach der Ernte die Durchwuchskontrollen alle 2 Wochen durchgeführt. Die Kontrollen wurden bis Einbruch der Kälteperiode (23.11.2009) fortgeführt. Es wurden 46 Durchwuchspflanzen am 14.09.2009 und 53 am 21.09.2009 beobachtet. Diese wurden am 21.09.2009 mit Breitbandherbizid Glyphosat behandelt. Die nächste Kontrolle fand am 22.04.-02.09.2010 erneut statt. Bei diesem Kontrollgang wurde kein Gerstendurchwuchs festgestellt.

Anhand der Ergebnisse dieser Überwachung sollen frühere Annahmen der Risikobewertung bestätigt oder falsifiziert werden.

Bitte geben Sie, je nachdem welcher der genannten Fälle auf Sie zutrifft an, welche Überwachungsmaßnahmen ergriffen wurden oder werden und wo (auf der Freisetzungsfäche/in der Nähe dieses Geländes (z.B. an den Feldrändern)). Bitte beachten Sie, dass alle über den gesamten Zeitraum der Überwachungsphase nach der Freisetzung ergriffenen Maßnahmen hier anzugeben sind.

Bitte angeben:

- die am Ort der Freisetzung ergriffenen Überwachungsmaßnahmen
Dauer:
 - Häufigkeit der Inspektionen (im Durchschnitt): alle zwei Wochen
 - Beobachtung resistenter verwandter Pflanzen
 - Beobachtung resistenter Insekten
 - Kontrolle des Durchwuchses (bitte Zeitabstände und Dauer angeben):
Für die 1. Aussaat wurde bis zum Auflauf der Gerstenpflanzen wöchentlich und nach der Herbizidbehandlung am 19.06.2009 bis Einbruch der Kälteperiode (23.11.2009) alle zwei Wochen die Kontrolle durchgeführt.
- Bei der 2. Aussaat des Freisetzungsversuchs wurden nach der Ernte die Durchwuchskontrollen alle 2 Wochen durchgeführt. Die Kontrollen wurden bis Einbruch der Kälteperiode (23.11.2009) durchgeführt. Es wurden 46

Durchwuchspflanzen am 14.09.2009 und 53 am 21.09.2009 beobachtet, welche mit Breitbandherbizid Glyphosat behandelt wurden. Auch hier wurde alle zwei Wochen bis zum Einbruch der Kälteperiode (23.11.2009) die Kontrolle durchgeführt. Die nächste Kontrolle fand am 22.04.-02.09.2010 erneut statt. Bei diesem Kontrollgang wurde kein Gerstendurchwuchs festgestellt.

- Überwachung des Genflusses (bitte angeben)
- Geeignete chemische Behandlungen mit einem nicht-selektiven Herbizid (Wirkstoff Glyphosat) und/oder Bodenbearbeitung(en). Alle verbleibende Pflanzenreste wurden durch Fräsen zerkleinert und flach im Boden eingearbeitet.
- Sonstige: (bitte angeben)
- für die angrenzenden Flächen ergriffenen Überwachungsmaßnahmen
Dauer:
Häufigkeit der Inspektionen (im Durchschnitt): alle zwei Wochen
Überwachte Flächen: Versuchsfeld, Fläche der Mantel- und Randsaat
 - Beobachtung resistenter verwandter Pflanzen
 - Beobachtung resistenter Insekten
 - Kontrolle des Durchwuchses und/oder Überwachung von Wildpopulationen (bitte Zeitabstände und Dauer angeben)
 - Überwachung des Genflusses (bitte erläutern)
 - Geeignete chemische Behandlung(en) und/oder Bodenbearbeitung(en)
 - Sonstige: (bitte angeben)

6.3. Plan und Verfahren für die Beobachtung(en)

In diesem Abschnitt sind der Überwachungsplan und die Verfahren zu erläutern, die zur Feststellung der Auswirkungen verwendet wurden, die gemäß dem nächsten Abschnitt (Abschnitt 6.4) mitgeteilt werden müssen. Jegliche Ergänzungen oder Änderungen des in der Anmeldung und dem SNIF ⁽⁴⁾ Teil B vorgelegten Plans sind zu erläutern.

In dem Zeitraum zwischen der Anmeldung und der Vorlage des Abschlussberichts wurden möglicherweise neue wissenschaftliche Erkenntnisse gewonnen oder Verfahren entwickelt, die zu einer Änderung der verwendeten Verfahren führen. Insbesondere diese Änderungen sind in diesem Abschnitt anzugeben.

Der Überwachungsplan folgte den Maßnahmen, die in der Betriebsanweisung festgelegt wurden und sind dieser zu entnehmen.

6.4. Beobachtete Auswirkung(en)

6.4.1. Erläuterung

Es sind alle Ergebnisse aus der/den absichtlichen Freisetzung(en) einzutragen, die sich auf Risiken für die menschliche Gesundheit oder die Umwelt beziehen, unabhängig davon, ob die Ergebnisse auf ein erhöhtes, verringertes oder unverändertes Risiko schließen lassen.

Mit den in diesem Abschnitt gemachten Angaben sollen vor allem folgende Ziele verfolgt werden:

- Bestätigung bzw. Falsifizierung der Annahmen in der Umweltverträglichkeitsprüfung über das Auftreten und die Folgen möglicher Auswirkungen des/der GVO.
- Feststellung von Auswirkungen des/der GVO, die in der Umweltverträglichkeitsprüfung nicht antizipiert wurden.

Die im Antrag auf Freisetzung von gentechnisch modifizierter Gerste vom 15.10.2008 gemachte Risikoabschätzung sieht sich durch den Freisetzungsversuch bestätigt. Es konnte kein Einfluss der Transgenexpression auf die Besiedelung der Gerstpflanzen durch *Glomus mosseae* beobachtet werden. Die Besiedelung der Wurzeln mit *Glomus mosseae* führte bei dem Kultivar Golden Promise zu transkriptionellen und metabolischen Änderungen im Blatt. Diese Veränderungen konnte im Fall von Kultivar Baroness nicht eindeutig festgestellt werden. Dies kann mit einer eventuell niedrigeren Besiedelung durch den Mykorrhiza-Pilz erklärt werden. Die epidemiologischen Versuche ergaben, dass alle Pflanzen der verschiedenen Prüfglieder einen ähnlich starken Befall durch Zwergrost (*Puccinia hordei*) bzw. Netzflecken (*Drechslera teres*) vorwiesen. Die Mantelsaat (Sorte Scarlett) wies einen niedrigeren Befall auf. Die Ursachen hierfür sind die mittel bis hoch eingestufte Resistenz von Kultivar Scarlett gegen Zwergrost/Netzflecken und auch die geringere Bestandsdichte. Die Tausendkorngewichte (TKG) der moderneren Sorte Baroness waren, unabhängig vom Vorhandensein des eingekreuzten Transgens oder der Mykorrhizierung, immer größer als bei der älteren Sorte Golden Promise. Zentrale Ergebnisse des Vorhabens wurden im Jahr 2010 in dem renommierten internationalen Journal „*Proceedings of the National Academy of Science* (PNAS)“ publiziert (Karl-Heinz Kogel, Lars M. Voll, Patrick Schäfer, Carin Jansen, Yongchun Wu, Gregor Langen, Jafargholi Imani, Jörg Hofmann, Alfred Schmiedl, Sophia Sonnewald, Diter von Wettstein, R. James Cook, and Uwe Sonnewald (2010) Transcriptome and metabolome profiling of field-grown transgenic barley lack induced differences but show cultivar-specific variances. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 107, 6198-6203 and 9 pages supporting information.

⁴ Summary Notification Information Format (= SNIF).

Beobachtete Auswirkung(en)/Wechselwirkung(en) der GVO

- in Bezug auf Risiken für die menschliche Gesundheit,
- in Bezug auf Risiken für die Umwelt

sind in diesem Abschnitt anzugehen.

Besonderes Augenmerk gilt den unerwarteten und unbeabsichtigten Auswirkungen.

Nachstehend wird erläutert, welche Angaben der Anmelder zu den Auswirkungen machen soll. Bei den Auswirkungen sind natürlich die Art der Kulturen, das neue Merkmal, die den GVO aufnehmende Umwelt sowie die Ergebnisse der Umweltverträglichkeitsprüfung, die für jeden Einzelfall durchgeführt wird, zu berücksichtigen. Zur Strukturierung der Angaben und zur Erleichterung einer effizienten Suche in den Informationen hat der Anmelder weitest möglich spezifische Stichworte für das Ausfüllen der Textfelder in Kapitel 6, insbesondere in den Abschnitten 6.4.2, 6.4.3 und 6.4.4 zu verwenden. Ein aktuelles Verzeichnis dieser Stichworte ist über das Internet unter <http://gmoinfo.jrc.it> abrufbar.

6.4.2. Erwartete Auswirkung(en)

Dieser Abschnitt betrifft „Erwartete Auswirkungen“, d.h. mögliche Auswirkungen, die bereits in der Umweltverträglichkeitsprüfung der Anmeldung genannt wurden und deshalb antizipiert werden konnten.

Die Anmelder sollten Daten aus der/den absichtlichen Freisetzung(en) vorlegen, die die Annahmen der Umweltverträglichkeitsprüfung bestätigen.

Keine Auswirkungen auf Nichtzielorganismen (z.B. herbivore Insekten).

Eine veränderte Auswirkung auf pilzliche Blattpathogene konnte nicht festgestellt werden.

-Keine höhere Persistenz oder Invasivität in natürliche Habitate

-Keine Auswirkung auf geochemische Prozesse auf der Grundlage des Abbaus pflanzlicher Bestandteile von GVO und Elternpflanze.

6.4.3. Unerwartete Auswirkung(en) ⁽⁵⁾

„Unerwartete Auswirkungen“ sind Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit oder die Umwelt, **die nicht vorhergesehen wurden bzw. in der Umweltverträglichkeitsprüfung der Anmeldung nicht festgestellt wurden**. In diesem Teil des Berichts sollten Angaben zu unerwarteten Auswirkungen oder Beobachtungen gemacht werden, die für die ursprüngliche Umweltverträglichkeitsprüfung von Bedeutung sind. Unerwartete Auswirkungen oder Beobachtungen sollten in diesem Abschnitt so detailliert wie möglich angegeben werden, um eine angemessene Interpretation der Daten zu ermöglichen.

6.4.3. Sonstige Informationen

Die Anmelder werden gebeten, Informationen weiterzugeben, die in der Anmeldung zwar nicht gefordert werden, die aber für die jeweiligen Feldversuche von Bedeutung sein könnten. Hierzu gehören auch Beobachtungen über günstige Auswirkungen.

7. Schlussfolgerung

In diesem Kapitel sollte der Anmelder seine Schlussfolgerungen darlegen und erläutern, welche Maßnahmen er auf der Grundlage der Ergebnisse der Freisetzung im Hinblick auf künftige Freisetzungen ergriffen hat oder ergreifen wird und gegebenenfalls Angaben zu allen Arten von Produkten machen, die er zu einem späteren Zeitpunkt anmelden will.

Die mit diesem Bericht übermittelten Informationen werden nicht vertraulich im Sinne von Artikel 25 der Richtlinie 2001/18/EG behandelt.

Unabhängig davon kann die zuständige Behörde vom Anmelder zusätzliche Informationen – vertrauliche wie auch nicht vertrauliche – verlangen.

⁵ Unbeschadet Artikel 8 der Richtlinie 2001/18/EG über die Verfahren bei Änderungen und neuen Informationen

Vertrauliche Angaben sollten dem Berichtsformular in einem Anhang zusammen mit einer nicht vertraulichen Zusammenfassung oder einer allgemeinen Beschreibung dieser Angaben beigefügt werden, die veröffentlicht werden kann.

Die Freisetzungen im Jahr 2009 haben keine Abweichung zu der im Antrag auf Freisetzung gentechnisch modifizierter Gerste vom 15.10.2008 erläuterten Risikoabschätzung ergeben. Die in der Betriebsanweisung und in Abstimmung mit der Überwachungsbehörde festgelegten Maßnahmen zeigten sich als praktikabel und unter dem Aspekt der biologischen Sicherheit als angemessen. Hinsichtlich der Vermeidung vom Durchwuchs wurde das generative Pflanzenmaterial (Ährenstroh) der Versuchsfläche und der Mantelsaat abgeerntet und in S1-Anlagen durch Autoklavieren inaktiviert. In den Nachkontrollen wurden Durchwuchspflanzen laut Betriebsanweisung mit einem nichtselektiven Herbizid behandelt und flach eingefräst.



Prof. Dr. K.-H. Kogel

Gießen, den 25.07.2011