

**Technikfolgen des Einsatzes  
gentechnisch veränderter  
krankheitsresistenter  
Nutzpflanzen**

**Teil Apfel**

**Bernhard Koller  
Cesare Gessler**

Institut für Pflanzenwissenschaften, Bereich Phytomedizin, Gruppe Patho-  
logie, Universitätstr. 2, 8092 Zürich

**Co-Autoren:**

**Lukas Bertschinger  
Markus Kellerhals**

Eidgenössische Forschungsanstalt für  
Obst-, Wein- und Gartenbau Wädenswil, 8820 Wädenswil

Zürich, 12. Oktober 1995

## Inhaltsverzeichnis

Auftrag an die Autoren der Studie .....	2
Einleitung .....	3
Transformations-Techniken.....	3
Apfel .....	4
a) Herkunft der heutigen Apfelsorten .....	4
b) Vermehrung und Anbau .....	4
c) Pflege / Ernte .....	4
1. Bisher durchgeführte Arbeiten mit dem allgemeinen Ziel der Transformation von Apfelpflanzen .....	6
a) Zusammenfassungen der publizierten Arbeiten .....	6
b) Gegenwärtige Projekte .....	9
2. Analyse der bisher publizierten Arbeiten .....	11
a) Transformation von Apfelpflanzen mit dem lytischen Protein Attacin E .....	11
b) Transformation von Apfelpflanzen mit dem <i>B.-thuringiensis</i> -Toxin .....	14
3. Situationsanalyse des Pflanzenschutzes im Schweizer Apfelanbau.....	16
a) Integrierte Produktion.....	17
b) Biologische Produktion .....	18
c) Resistente Apfelsorten.....	19
4. Einsatz von Krankheits-Resistenzen in der traditionellen Züchtung .....	20
a) Apfelschorf .....	20
b) Mehltau .....	24
c) Feuerbrand.....	25
5. Typisierung von durch Transformation entstehenden Apfel-Genomen .....	27
a) DNA aus <i>Malus x domestica</i> .....	27
b) DNA aus anderen <i>Malus</i> -Arten.....	28
c) Nicht- <i>Malus</i> -DNA .....	29
6. Beurteilung des toxischen Risikos von Apfeltransformationen .....	30
a) Transformationen mit <i>Malus</i> -DNA .....	30
b) Transformationen mit Nicht- <i>Malus</i> -DNA.....	30
c) Allergene Wirkungen .....	31
7. Beurteilung des ökologischen und biologischen Risikos von Apfeltransformationen.....	33
8. Beurteilung der ökonomischen Auswirkungen von Apfeltransformationen .....	37
9. Fallszenarien.....	40
Erläuterung zur Darstellung der Fallszenarien .....	41
Zusammenfassung der Szenarien .....	46
Schlussfolgerungen .....	47
Zusammenfassung .....	49
Literatur .....	51
Adressliste .....	55

## **Auftrag an die Autoren der Studie**

Aufgrund der vom BATS zusammengestellten Leitlinien und Untersuchungsbereiche wurde ein Themenkatalog für diese Studie zusammengestellt. Diese Studie widmet sich der landwirtschaftlichen Kultur Apfel. Der Themenkatalog enthält die folgenden neun Punkte:

1. **Inventarisierung.** Anhand von Literatur, Forschungsdatenbanken und mündlichen Mitteilungen von Kollegen werden i) die aktuellen erfolgreichen Transformationen von Apfelpflanzen mit gentechnischen Methoden erfasst, ii) welche Methoden dabei angewandt wurden (inkl. Markergene) und iii) Ursprung des eingebauten Genmaterials. Die Thematik wird nicht auf Krankheitsresistenz limitiert.
2. **Analyse des Inventars.** Zusammenfassen und Anführen einer limitierten Anzahl von Musterbeispielen, wobei präferenziell die Krankheits- und Schädlingsresistenz berücksichtigt werden sollten.
3. **Situationsanalyse bezüglich Pflanzenschutz im Apfelanbau in der Schweiz in den drei Systemen** “konventionell”, integriert und biologisch. Angaben der durchschnittlichen Pestizideinsätze und Strategien. Hier ist nur ein grobes Raster erforderlich. Als Informationsquellen dienen Pflanzenschutzberatungsliteratur der offiziellen Bundesstellen der Kantone und der privaten Beratung sowie gezielte Nachfrage bei geeigneten Stellen.
4. **Einsatz von Resistenz, die durch “traditionelle” Züchtung eingeführt wird:** Forschung und Entwicklung und tatsächlicher Einsatz in der heutigen Praxis. Hier wird nicht nur eine Auflistung erwartet, sondern auch kurze Begründung über den Ist-Zustand. Informationen durch Interviews.
5. **Vergleichende Beurteilung der Genome, die durch “konventionelle” Züchtung und durch Einbau von Genen durch gentechnische Methoden entstanden.**
6. **Analyse des toxischen Risikos für den Konsumenten (soweit möglich auch Produzenten) ausgehend von transformierten Genomen.** (Literatur mit gezielter Nachfrage).
7. **Positive/negative ökologische Auswirkungen mit möglichen langfristigen Konsequenzen.**
8. **Ökonomische Auswirkungen, unter spezieller Berücksichtigung der Produzenten.**
9. **Szenarien:** Verarbeitung der aus den obigen Punkten hervorgegangenen Information zu Fallszenarien. Dabei werden bestimmte Umfelder postuliert (zum Beispiel: Konsumenten haben, im Gegensatz zu biologischen Produzenten, keine generellen oder partiellen Vorbehalte gegen transgene Pflanzen).

## Einleitung

Zum besseren Verständnis soll zuerst eine kurze Einleitung zur Transformationstechnik sowie zur Kultur "Apfel" gegeben werden.

### Transformations-Techniken

Somatische Pflanzenzellen können fremde DNA funktionell und stabil in ihr eigenes Genom einbauen. Dies ist die Grundlage für die Erzeugung von chimären oder echt transgenen Pflanzen. Um echt transgene Pflanzen zu produzieren, müssen die transformierten Zellen totipotent sein, das heißt fähig sein, zu einer ganzen, differenzierten Pflanze zu regenerieren. Bevor die gewünschten DNA-Sequenzen in Pflanzenzellen transferiert werden, können sie durch Rekombinations-Techniken geeignet zusammengestellt werden. Dazu gehören insbesondere die Regulations-Sequenzen. Dafür sind starke, konstitutiv exprimierende Faktoren erhältlich sowie gewebespezifische Sequenzen oder solche, die durch bestimmte Umwelteinflüsse stimuliert werden. Die regulatorischen und die eigentlichen, Protein-codierenden Sequenzen werden fusioniert und als Teil von Plasmid- oder Cosmid-Vektoren in die Pflanzenzellen transferiert. Direkte Transfer-Methoden erlauben die Einführung von nativen, nicht-klonierten Nukleinsäuren (Review in Bilang and Schrott 1995).

Von den verschiedenen DNA-Transfer-Methoden wird hier nur die Methode mittels *Agrobacterium* beschrieben, da dies die bisher wichtigste Transformations-Art für den Apfel ist. Ein anderer Ansatz wäre die ballistische Methode, bei der mit der gewünschten DNA beschichtete Partikel in Pflanzenzellen geschossen werden. Microinjektion von DNA in Zellen und Elektroporation sowie chemische Methoden ständen als Alternativen zur Verfügung. Jede dieser Methoden hat ihre Vor- und Nachteile, die Bilang und Schrott (1995) zusammengefasst haben. *A. tumefaciens* und *A. rhizogenes* können DNA-Fragmente - die sogenannte T-DNA - mittels ihrer Tumor (Ti)- oder Wurzel (Ri)-induzierenden Plasmide in das Genom ihrer Wirtszellen einschleusen. Einige Genprodukte der T-DNA beeinflussen die Regulation der Wirtspflanze, wodurch Tumore oder starke Wurzelbildung ausgelöst werden können. Die Virulenz und das Wirtsspektrum eines *Agrobacterium*-Stammes hängt unter anderem von den sogenannten *vir*-Genen auf den Ti- oder Ri-Plasmiden ab. Der eigentliche DNA-Transfer geschieht in Protoplasten oder verletztem Gewebe. Um die nachteiligen Effekte - etwa der Tumorbildung - zu verhindern, wurden Vektoren entwickelt, aus denen die entsprechenden Sequenzen entfernt und durch die gewünschten Gene ersetzt wurden. Das System der binären Vektoren umfasst ein Plasmid mit der veränderten (ersetzen) T-DNA sowie ein Ti-Plasmid mit den notwendigen *vir*-Faktoren.

Das durch die *Agrobacterium*-Infektion transformierte Pflanzengewebe kann anschließend auf geeigneten (Selektions-)Medien zu ganzen Pflanzen regeneriert werden. Am häufigsten wird dabei das Antibiotikum Kanamycin als Selektionsfaktor eingesetzt. In den Vektoren wird als Selektionsfaktor ein Gen für Kanamycin-Resistenz miteingebaut. Dieses erlaubt nur dem transformierten Gewebe, auf dem Antibiotika-haltigen Medium zu wachsen. Sogenannte Reportergene wie die  $\beta$ -Galacturonidase (GUS) erlauben eine histochemische Detektion von transformiertem Gewebe sowie die Bestätigung der Expression in den (vermutlich) transformierten Pflanzen.

## Apfel

### a) Herkunft der heutigen Apfelsorten

Die Ursprünge der heutigen Apfelsorten, die in der Botanik allgemein als *Malus x domestica* Bork. bezeichnet werden, sind unsicher. Ursprünglich wurde angenommen, dass sie sich von *M. pumila* Mill. ableiten, vieles deutet aber darauf hin, dass sie Nachkommen von *M. orientalis* (Kaukasus-Apfel) und *M. sieversii* sind. Die Bezeichnung *Malus x domestica* (gegenüber *Malus domestica*) geht auf einen Vorschlag von Korban und Skirvin (1984) zurück, die damit den "formenreichen Hybridkomplex" des Kultur- oder Gartenapfels bezeichnen. Eine detaillierte Geschichte des Apfels, seiner Ursprünge, der Entstehung und der Züchtung der Kultursorten findet sich bei Götz und Silbereisen (1989) sowie Morgan and Richards (1993).

### b) Vermehrung und Anbau

Obwohl bis heute mehrere Tausend Apfelsorten beschrieben worden sind, werden heute nur relativ wenige Sorten kommerziell angebaut. Diese Sorten werden vegetativ vermehrt, was heute durch Okulation (=Einsetzen eines "Auges") auf sogenannte Unterlagen geschieht. Die Unterlage bildet im wesentlichen das Wurzelwerk einer Apfelsorte und überträgt gewisse Eigenschaften auf die darauf okulierte Sorte, wie zum Beispiel Wuchsstärke oder Blütezeitpunkt. Gewisse Unterlagen sind auch resistent gegen Krankheiten wie Feuerbrand oder *Phytophthora*-Kragenfäule, übertragen diese Eigenschaften aber nicht auf die okulierte Sorte. Durch die vegetative Vermehrungsweise von Apfelsorten sind alle Bäume einer bestimmten Sorte genetisch identisch, wobei dies natürlich nur für den ertragsbildenden Teil der Bäume gilt und nicht für die Unterlage.

Im Erwerbsanbau bestehen heute auch die Unterlagen aus vegetativ vermehrten, speziellen Typen, während früher oftmals auf Apfelsämlinge gepfropft wurde. Der Vorteil der klonalen Vermehrung liegt beispielsweise in einem konstanten Wuchsverhalten. Die am meisten verwendeten Unterlagen sind sogenannte "M"-Unterlagen, wobei "M" für die Herkunft (East Malling, UK) steht. In West-Europa werden heute für Erwerbs-Obstanlagen vor allem schwachwüchsige Unterlagen wie M.9 verwendet.

Apfelbäume sind stark heterozygote Pflanzen mit einem Chromosomensatz von  $n=17$ . Während die meisten Sorten diploid sind, gibt es auch triploide Sorten, z.B. Boskoop. Da Apfelbäume in grossem Masse selbstinkompatibel sind, müssen in Obstanlagen sogenannte Befruchter eingesetzt werden, d.h. Apfelbäume anderer Sorte, die mit der eigentlichen Anbausorte kreuzbar sind und eine ähnliche Blütezeit haben.

### c) Pflege / Ernte

Apfelbäume tendieren allgemein dazu, zu viele Früchte zu tragen. Dies würde bei vielen Sorten zu kleineren Früchten, schlechter innerer Fruchtqualität und einer ausgeprägten Alternanz führen. Unter Alternanz versteht man den zweijährlichen Wechsel zwischen hohem Fruchtertrag und geringem oder ausbleibendem Fruchtertrag. Diese Qualitäts- und Ertragsschwankungen bringen einen Ertragsausfall mit sich. Um diese nachteiligen Auswirkungen zu verhindern, sind zweierlei Massnahmen notwendig. Einerseits müssen die Bäume alljährlich geschnitten werden. Dies wird von Hand gemacht und nimmt einen wesentlichen Arbeitsaufwand im Apfelanbau ein. Durch richtigen Schnitt erreicht man die Auflockerung des Baumes und damit einen besseren Lichteinfall, die bessere Zugänglichkeit für Arbeitskräfte und eine gezielte Erneuerung des fruchtbildenden Holzes. Die Art des Schnittes, die nötig ist, um diese Ziele zu erreichen, variiert mit der angebauten Apfelsorte. Die zweite Massnahme ist das Ausdünnen. Darunter versteht man das gezielte Entfernen eines Teils der Früchte

dünnen. Darunter versteht man das gezielte Entfernen eines Teils der Früchte in einem frühen Stadium der Fruchtreife. Dies kann von Hand oder durch den Einsatz von chemischen Mitteln geschehen. Das Ausdünnen von Hand ist ein sehr zeitintensiver Arbeitsgang. Ebenfalls sehr zeitaufwendig ist die Ernte, die für Tafeläpfel immer von Hand gemacht wird. Sie erfolgt bei Früchten, die für schnelle Konsumation vorgesehen sind, bei Reife der Früchte. Äpfel, die eingelagert werden sollen, werden etwas früher geerntet und zur Erhaltung ihrer Qualität möglichst schnell kühl (0-4 °C) gelagert. Der Pflanzenschutz wird in der Regel maschinell ausgeführt und beansprucht so keinen grossen Arbeitsaufwand. Vielmehr bestehen die Kosten des Pflanzenschutzes vor allem aus den Kosten für Fungizide und Pestizide. In der Schweiz wird die bei weitem grösste Menge an Pflanzenschutzmitteln für die Bekämpfung des Apfelschorfs benötigt. Weitere wichtige Krankheiten sind der Echte Mehltau und der Feuerbrand (siehe auch Kapitel 3 und 4 dieser Arbeit).

# 1. Bisher durchgeführte Arbeiten mit dem allgemeinen Ziel der Transformation von Apfelpflanzen

## a) Zusammenfassungen der publizierten Arbeiten

**Cheng J.S., Dandekar A.M., Uratsu S.L.**

**A preliminary study on *Agrobacterium*-mediated gene transformation in apple**

Acta Horticulturae Sinica 19(2):101-104, 1992

Blattstreifen der Apfelsorte "Greensleeves" wurden mit *A. tumefaciens* Stamm EHA101 inokuliert. Dieser trug den binären Vektor pCGN7001. Calli und Sprosse konnten regeneriert werden, die bis auf einen Fall alle GUS-positiv waren.

**Dandekar A.M., McGranahan G.H., Uratsu S.L., Leslie C., Vail P.V., Tebbets S.T., Hoffmann D., Driver J., Viss P., James D.J.**

**Engineering for apple and walnut resistance to codling moth**

Brighton crop protection conference. Pests and Diseases. 2, 741-747, 1992

Das *Bacillus thuringiensis* (HD-73)-Toxin-Gen *cryIA(c)* wurde in somatische Walnuss-Embryos und Apfel-Blatt-Rondellen (keine Sorten angegeben) mittels *Agrobacterium tumefaciens* transferiert. *CryIA(c)* codiert für ein insektizides kristallines Protein, das für viele Lepidopteren, im speziellen für *Cydia pomonella* (codling moth) toxisch ist. Der Vektor (pWB139) enthielt *cryIA(c)* sowie das bakterielle Kanamycin-Resistenz-Gen APH(3<sup>II</sup>) unter Kontrolle des CaMV35S Promotors und Teilen des Protease-Inhibitors-I-Gens der Tomate. Letzteres vermittelt die Verletzungs-Induzierbarkeit der Transkription. Im Frühling 1992 wurden erste Feld-Tests begonnen.

**De Bondt A., Eggermont K., Druart P., Vil M. de, Goderis I., Vanderleyden J., Broekaert WF.**

***Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Bork.): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps.**

Plant Cell Reports 13:587-593, 1994

Es wurden Faktoren untersucht, welche in den frühen Stadien einer *A. tumefaciens*-gestützten Transformation den Transfer eines GUS-Gens in Apfelpflanzen beeinflussen. Die drei verwendeten *A. tumefaciens*-Stämme waren LBA4404, C58C1 und EHA101. Der binäre Expressions-Vektor war pFAJ3000, welcher das *nptII*-Gen (Selektions-Gen) sowie eine GUS-A-Intron Kasette enthielt. Das Pflanzenmaterial stammte von *Malus pumila*. Die Transformation geschah durch Cocultivation von Blättern mit *A. tumefaciens*. Die Blätter wurden vorgängig durch Einschnitte verwundet. Nach Infektion mit *A. tumefaciens* wurden die Blätter auf Kanamycin-haltiges Medium gelegt und die GUS-Aktivität während der ersten Tage gemessen. Stamm EHA101 erwies sich als am effizientesten für eine Apfel-Transformation. Ein hoher Cytokinin-Gehalt im Medium förderte den Gentransfer mehr als ein hoher Auxin-Gehalt.

**James D.J., Passey A.J., Barbara D.J., Bevan M.**

**Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector**

Plant Cell Reports 7:658-661. 1989

Apfel-Blattstücke wurden mit *A. tumefaciens* transformiert. Der Vektor war pBIN6, der sowohl *nos* (Nopalalin-Synthase) und ein chimäres Gen [bestehend aus regulatorischer Sequenz des *nos*-Gens und den codierenden Sequenzen der bakteriellen Neomycin-Phosphotransferase NPTII (Kanamycin-Resistenz)]. Die Nopalalin-Synthase konnte in Blättern, Stengeln, Wurzeln und Sprossen von regenerierten *in-vitro*-Pflanzen nachgewiesen werden. Pflanzen einer Transformations-Linie wurden im Gewächshaus angepflanzt. Auch in diesen wurde das *nos*-Gen (mittels Southern-blotting) und die NOS-Aktivität nachgewiesen.

**James D.J., Passey A.J., Easterbrook M.A., Solomon M.G., Barbara D.J.**

**Progress in the introduction of transgenes for pest resistance in apples and strawberries.**

Phytoparasitica 20:suppl. 83-87, 1992

Der Cowpea-Trypsin-Inhibitor (CpTI) hat eine breite antimetabolische Wirkung gegen viele Lepidopteren und Coleopteren. Es wirkt vermutlich durch die Hemmung essentieller Verdauungsenzyme in den Insektenlarven.

Blattstücke der Sorte "Greensleeves" wurden mit *A. tumefaciens* (Stamm LBA4404), welcher das CpTI-Gen trägt, transformiert. Genaue Angaben über das verwendete Konstrukt sind nicht angegeben. 59 Klone konnten regeneriert werden. 26 davon konnten auf Kanamycin-haltigem Medium bewurzeln. Diese Klone werden zur Zeit weiter vermehrt.

Um die intrinsische Toxizität des Inhibitors zu ermitteln, wurde aus "cowpea" extrahiertes, gereinigtes CpTI als Bestandteil einer künstlichen Nahrung an Insekten-Larven von *Cydia pomonella* und *Adoxophyes orana* verfüttert. Erstaunlicherweise zeigte dabei auch ein 10 prozentiger CpTI-Gehalt keine toxische Wirkung. Die Autoren führen dies auf einen möglichen Maskierungs-Effekt durch den hohen Protein-Gehalt der Nahrung zurück.

**James D.J., Passey A.J., Webster A.D., Barbara D.J., Dandekar A.M., Uratsu S.L., Viss P.**

**Transgenic apples and strawberries: advances in transformation, introduction of genes for insect resistance and field studies of tissue cultured plants.**

Acta Horticulturae 336:179-184, 1993

Eine Anzahl von Faktoren, von denen vermutet wird, dass sie die Transkription der Virulenz (*vir*)-Gene von *A. tumefaciens* beeinflussen, wurde untersucht. Dafür wurde der Stamm C58C1::pGV3850 mit dem binären Vektor pKIWI105 verwendet. Dieser Vektor trägt ein GUS-Gen unter CaMV35S Promotor-Kontrolle sowie das Gen *nptII* unter Kontrolle des *nos*-Promotors. Acetosyringon und Betain-Phosphat erhöhten die Transformierungs-Effizienz.

Der Bericht behandelt die schon beschriebenen Transformationen von Apfelpflanzen mit Genen für CpTI und CRYIA(c). Es wird auch erwähnt, dass in den USA Feldversuche mit transgenen Apfelbäumen im Gang sind. Diese Versuche beinhalten Bäume mit verschiedenen Kombinationen des Marker-Gens *nptII*, der Reporter-Gene GUS und *nos* sowie dem *cryIA(c)*-Gen aus *Bacillus thuringiensis*.

**James D.J., A.J. Passey, S.A. Baker**

**Stable gene expression in transgenic apple tree tissues and segregation of transgenes in the progeny - Preliminary evidence**

Euphytica 77(1-2):119-121, 1994

Transgene Apfel-Pflanzen der Sorte "Greensleeves" (*nptII* mit *nos*-Promotor in *A. tumefaciens*) wurden 1987 in Erde gepflanzt und 1989 auf M27 gepfropft. Die Beobachtungen wurden seit 1987 durchgeführt. Alle 6 gepflanzten Klone sehen normal aus. NOS-Aktivität konnte immer in Fruchtfleisch sowie in Calli (aus Fruchtfleisch kultiviert) nachgewiesen werden. Die Neomycin-Phosphotransferase war nachweisbar (ELISA). Fruchtfleisch-Calli konnten auf Kanamycin wachsen (im Gegensatz zu untransformierten Pflanzen). In Kreuzungsversuchen wurden zwei Klone mit Pollen der Apfelsorte "Baskatong" gekreuzt. Es werden keine Angaben über die umgekehrte Kreuzung mit Pollen von "Greensleeves" gegeben. Entstehende unreife Embryos wurden untersucht. Diese Nachkommenschaft spaltete sich 1:1 auf in Bezug auf NOS-Aktivität (biochemischer Nachweis des Produkts). Gemäss James (persönliche Mitteilung) wurden seit 1989 Tests bezüglich Stabilität der *nptII*-Expression gemacht. Das Enzym konnte dabei jeweils in Blättern, Stamm und Wurzeln nachgewiesen werden, jedoch nicht in den Früchten.

**Lambert C., Tepfer D.**

**Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create transgenic apple trees having an altered organogenic response to hormones**

Theoretical and Applied Genetics 85:105-109, 1992

Der Apfel-Wurzelstock M26 wurde mittels einem *Agrobacterium-rhizogenes*-Wildstamm (A4) transformiert, um die Wurzelbildung zu erhöhen. Dabei wurde die wurzelinduzierende (Ri) T-DNA von *A. rhizogenes* transferiert. Transformierte Wurzeln synthetisierten die Opine Agropin und Mannopin. Die Produktion dieser Stoffe wird als Marker für die Präsenz der Ri TR-DNA angesehen. Die Präsenz der Ri T-DNA wurde mittels Hybridisation überprüft.

Durch Kultur in Hormon-freiem Medium wurden nicht-transformierte Pflanzen ausselektiert. Wurzeln von transformierten Pflanzen wurden dann zu ganzen Pflanzen regeneriert. Auch diese Pflanzen zeigten eine Opine-Produktion.

Die Transformation bewirkte ein verändertes Verhalten gegenüber Pflanzenhormonen. Sprossbildung bedingte eine hohe Cytokinin-Konzentration. Weiteres Wachstum und Wurzelbildung geschahen aber



nur bei niedrigeren Cytokinin-Konzentrationen (welche in Kontrollpflanzen die Wurzeldifferenzierung hemmte). Ausserdem bewirkten Auxin-Konzentrationen, die in den Kontrollen die Bewurzelung förderten, Nekrosen in transformierten Pflanzen.

**Maheswaran G., Welander M., Hutchinson J.F., Graham M.W., Richards D.**

**Transformation of apple rootstock M26 with *Agrobacterium tumefaciens*.**

Journal of Plant Physiology 139(5):560-568, 1992

Verschiedene Vektoren und *Agrobacterium*-Stämme wurden verwendet: pBI121 in Stamm LBA4404, pCGP257 in den Stämmen CZ707 und EHA101. Der Vektor pCGP257 enthält die Gene *nptII* und GUS, welche beide vom CaMV35S-Promotor reguliert werden, während in pBI121 *nptII* vom *nos*-Promotor und GUS vom CaMV35S-Promotor reguliert werden.

Es wurden Gewebe von Blatt, Stamm und Petiolen inokuliert. Gallenbildung wurde nur in Versuchen mit Blatt-Stücken festgestellt. Sprosse konnten auf Kanamycin-haltigen Medien regeneriert werden. Die histochemische GUS-Analyse ergab maximal vier Prozent transformierte Sprosse. Die Analyse der NPTII-Aktivität in Blättern dieser Sprosse zeigte, dass der CaMV35S-Promotor eine stärkere Expression bewirkt als der *nos*-Promotor.

**Mooney P.A., Goodwin P.B.**

**Presumptive transformation of apples by co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens***

Acta Horticulturae 240:59-61, 1989

Blattrondellen von "Red Delicious" wurden mit *A. tumefaciens* cocultiviert. Als Vektor diente pGV3850::1103neo, der offenbar die Gene *nptII* sowie *nos* enthielt. Der Vektor ist im Artikel allerdings nicht näher beschrieben, und während im Abstract von Nopaline-Synthase-Aktivität gesprochen wird, finden sich danach nur noch Angaben über Nopaline-Dehydrogenase. Die Rondellen wurden auf Kanamycin-haltiges Selektions-Medium gelegt. Ungefähr 10 Prozent der Blattstücke bildeten Calli. Aus etwa 1 Prozent der Calli konnten Sprosse regeneriert werden. Die Transformationen konnten nicht definitiv bestätigt werden, da Sprosse und Calli nach einigen Wochen abstarben.

**Norelli J.L., H.S. Aldwinckle, L. Destéfano-Béltran, J.M. Jaynes**

**Transgenic "Malling 26" apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora***

Euphytica 77(1-2): 123-128, 1994

Die Puppen der Seiden-Motte produzieren Attacin E, wenn sie mit Bakterien inokuliert werden. Attacin E ist ein Protein (mit sechs Isoformen, ca. 20000-23000 Dalton) und wirkt lytisch gegen viele pathogene Bakterien, so zum Beispiel gegen *Erwinia amylovora*. Als Vektor wurde ein modifiziertes cDNA-Plasmid verwendet: Promotor und Terminator für das Attacin-E-Gen wurden vom Proteinase-II-Inhibitor der Kartoffel übernommen. Das Konstrukt wurde kloniert in pBI121 (*A. tumefaciens* binary plasmid vector). Zur Transformation wurde *A. tumefaciens* Stamm LBA4404 verwendet. Als Selektions-Marker wurden  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) und Kanamycin-Resistenz (*nptII*) verwendet. Der Nachweis der Transformation erfolgte mittels Southern-Analyse. Die Attacin-E-Expression wurde durch Northern-Analyse nachgewiesen. Resistenz gegen *E. amylovora* wurde sowohl *in vitro* als auch an den ganzen Pflanzen im Gewächshaus getestet. Von 648 inokulierten Blattstücken regenerierten 36. Davon hatte 1 Pflanze (T1) GUS- und NPTII-Aktivität, was mit den restlichen 35 Pflanzen geschah, wird nicht angegeben. 72 Stunden nach Infektion zeigte T1 Attacin-E-mRNA, die in untransformierten Pflanzen nicht vorhanden war. Diese Pflanze zeigte eine erhöhte Toleranz gegenüber *E. amylovora*.

**Sriskandarajah S., Goodwin P.B., Speirs J.**

**Genetic transformation of the apple scion cultivar "Delicious" via *Agrobacterium tumefaciens***

Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36:317-329, 1994

Blattstücke von "Delicious" Bäumen wurden mit verschiedenen Stämmen von *A. tumefaciens* transformiert. Die dabei verwendete Vektoren trugen Kombinationen von *nptII* (mit *nos*-Promotor) und *gus* (mit CaMV35S- oder P35S-Promotor). Die erfolgte Transformation wurde durch Kanamycin-Resistenz, dem Glucuronidase-Assay, Nopalin-Synthese und Southern-Analyse überprüft und bestätigt.

**Trifonova A., Savova D., Ivanova K.**

***Agrobacterium*-mediated transformation of the apple cultivar Granny Smith**

Progress in Temperate Fruit Breeding (Schmidt and Kellerhals, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. p. 343-347, 1994

Blattstücke von "Granny Smith" wurden mit *A. tumefaciens* Stamm C58C1. Die verwendeten Vektoren (pGV2449 und pGV2492) enthielten das *nptII*-Gen und das IPT-Gen (Isopentenyl-Transferase). Isopentenyl-Transferase ist Bestandteil der Cytokinin-Biosynthese. IPT-transgene Pflanzen zeigen eine verminderte apikale Dominanz und können keine Wurzeln bilden. Unter optimierten Bedingungen konnten 69 Prozent der Calli zu Sprossen regeneriert werden, wobei pro Explantat durchschnittlich 5,1 Sprosse gebildet wurden. Zur Regeneration von ganzen Pflanzen wurden die Sprossen auf Anticytokinin-haltige Medien verbracht. In diesen Pflanzen wurde das *nptII*-Gen durch PCR nachgewiesen, die NPTII-Aktivität durch biochemische Tests.

**Yao J.L., Cohen D., Atkinson R., Richardson K., Morris B.**

**Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala**

Plant Cell Reports 14:407-412, 1995

Für die Apfelsorte Royal Gala wurde ein Transformations- und Regenerations-System entwickelt. Es benutzt *A. tumefaciens* zur Transformation und beinhaltet die binären Vektoren pKIWI105 oder pKIWI110. Die T-DNA-Region dieser Plasmide enthält das *nptII*-Gen, kontrolliert von einem *nos*-Promotor, sowie ein *uidA*-Gen, das für  $\beta$ -Glucuronidase codiert und von dem CaMV35S-Promotor gesteuert wird. Das Plasmid pKIWI110 enthält zusätzlich das Acetolactat-Synthase-Gen (ALS) mit seinem natürlichen Promotor, wodurch Resistenz gegen Chlorsulfuron (Herbizid) erreicht wird. Die Autoren weisen auf die speziellen Bedingungen hin, die beim Apfel offenbar je nach Sorte variieren. In drei Experimenten konnten durchschnittlich 2.8 % Kanamycin-resistente Sprosse regeneriert werden. Die mit pKIWI110 transformierten und regenerierten Pflanzen wurden mit dem Herbizid "Glean" behandelt. Nach 3 Wochen waren alle Kontrollpflanzen abgestorben, während 13 transgene Pflanzen überlebten (keine Prozent-Rate angegeben).

## b) Gegenwärtige Projekte

Während eines Besuches an der ETH Zürich berichtete David James (Horticulture Research International, East Malling) ausser über die BT-Transformation (siehe oben) von Äpfeln auch über die gegenwärtigen Arbeiten am HRI East Malling, England, die sich mit der Transformierung von Äpfeln befassen. Diese Arbeiten sind bisher noch nicht publiziert worden. Der Einbau folgender Gene wird dabei in Betracht gezogen:

- |                         |   |                          |
|-------------------------|---|--------------------------|
| - bakterielle Chitinase | ⇒ | Krankheitsresistenz      |
| - ACC-oxidase           | ⇒ | Ethylen-Synthese-Hemmung |
| - Rol C                 | ⇒ | Wurzelbildung            |
| - Phy A (Phytochrom)    | ⇒ | Wachstumsregulation (?)  |

Ein besonderes Gewicht hat dabei sicher die Hemmung der Ethylen-Synthese, denn dies erlaubte eventuell eine Verlängerung der Lagerzeit gewisser Apfelsorten, die bisher nur eine bedingte Lagerfähigkeit haben. Ein solcher Eingriff in den Ethylen-Stoffwechsel muss aber durchaus kritisch beurteilt werden. Als Pflanzenhormon spielt das Ethylen in der Apfelpflanze auch eine Rolle bei der Ausprägung etwa des Baumwachstums oder der Fruchtungstendenz.

Wie James weiter mitteilte, wird in den gegenwärtigen Transformationen der pSC Vector (Shell Clean Vector) verwendet. Dieser hat die Besonderheit, dass der Mobilitätsfaktor entfernt wurde. Dies verunmöglicht einen ungewollten Plasmid-Transfer in andere Bakterien als *A. tumefaciens*.

Als mögliche zukünftige Transformations-Objekte erwähnte James die ACC-Synthetase und die SAM-Synthetase (Reifung), die Sucrose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Geschmack), die Polygalacturonase (Zellwandabbau) sowie die Polyphenol-Oxidase (Fruchtfleisch-Bräunung).

Wie James weiter ausführte, sollen im Herbst 1995 in der Gegend von Derby (UK) Feldtests mit transgenen Apfelbäumen begonnen werden. Darin werden 3 Typen von Pflanzen enthalten sein: a) Bäume der Sorten Greensleeves und Jonagold, welche die Gene für NPTII, NOS und GUS enthalten. b) Bäume der Sorte Greensleeves, welche die Gene für CpTI (James *et al.* 1992) und NPTII enthalten. c) Bäume der Sorte Jonagold mit den Genen für NPTII und Rs-AFP2 (*Raphanus sativus* antifungal protein 2). Die Transformationen von Apfelbäumen mit dem Gen für antifungische Proteine wurden laut dem Ausführenden noch nicht publiziert, doch existiert eine Publikation über Rs-AFP2-transgene Tabakpflanzen (Terras *et al.* 1995).

Das United States Department of Agriculture führt in seiner Datenbank zwei Anträge für Feldtests mit transgenen Apfelpflanzen auf, die aber nicht als volles Dokument vorliegen. Die Cornell University, New York, beantragte Tests (Permit 95-088-01) mit Pflanzen, die mit dem Gen für eine Polygalacturonase und ACC-Oxidase Antisense-DNA transformiert wurden. Über diese Arbeiten war von der Cornell University nichts genaueres zu erfahren. Beabsichtigt wird gemäss der Datenbank eine erhöhte Feuerbrand-Resistenz. Der andere Antrag (Permit 95-093-01) stammt von der kalifornischen Firma "Dry Creek Laboratories", welche schon Feldversuche mit den transgenen Apfelpflanzen von Dandekar *et al.* durchführen. In diesem zweiten Test sollen weitere Insekten-resistente Apfelbäume eingesetzt werden.

## 2. Analyse der bisher publizierten Arbeiten

Alle unter Punkt 1 aufgelisteten Arbeiten verwendeten *Agrobacterium tumefaciens*, um Stücke von Apfelblättern zu transformieren. Transformationen, welche Protoplasten als Arbeitsschritt beinhalten, zum Beispiel "particle bombardment", wurden bisher nicht publiziert. Patat-Ochatt *et al.* (1988) war es erstmals gelungen, ganze Apfelpflanzen aus Protoplasten verschiedener Unterlagen und Apfelsorten zu regenerieren. Als Problem zeigte sich dabei, dass jede Sorte unterschiedliche Regenerations-Bedingungen braucht. Nur bei wenigen Sorten konnten Kallus-Knospen zur Wurzelbildung angeregt werden. Dies scheint auch das grösste Problem bei der Pflanzenregeneration aus Protoplasten zu sein, während die Kallusbildung aus Protoplasten selbst offenbar kein grosses Problem ist. Ebenso konnte für die Knospenbildung aus Kalli eine hohe Regenerations-Rate gefunden werden. Im Falle der Sorte Spartan beispielsweise produzierten 60 Prozent der Kalli durchschnittlich 8 Sprosse. Rund 30 Prozent dieser Sprosse konnten dann auch bewurzelt werden.

Ai-Ping *et al.* (1995) regenerierten aus Zell-Suspensionen von Apfel-Protoplasten ganze Pflanzen. Dabei konnten 33 Prozent der Kallus-Knospen bewurzelt und zu Pflanzen aufgezogen werden.

Obwohl die Verwendung von Protoplasten in der Apfelzüchtung generell von grossem Nutzen wäre, konnten keine Berichte gefunden werden, in denen diese Technik auch angewendet wurde. Ein solcher Nutzen läge beispielsweise in der Möglichkeit der somatischen Hybridisation von Apfelsorten. Patat-Ochatt *et al.* (1988) schlagen eine Hybridisation eines Wurzelstocks (Unterlage) mit einer etablierten Sorte vor. Dadurch könnte eine geschlechtliche Hybridisation (durch konventionelle Kreuzung) und damit die Aufspaltung der erwünschten Eigenschaften auf die Nachkommenschaft umgangen werden. In der Züchtung erlaubte die Protoplasten-Technologie die Herstellung von homozygoten Apfelbäumen, die als Eltern in Vererbungsstudien ausserordentlich wertvoll wären und auch als Ausgangsmaterial für Kreuzungen verwendet werden könnten. Die Bedingungen zur Regeneration der Protoplasten sind gemäss der Literatur sehr variabel und müssen mehr oder weniger für jede Sorte einzeln bestimmt werden. Dies bedeutet jedoch einen zu grossen Aufwand, insbesondere weil mit Blattstücken / *A. tumefaciens* ein alternatives Transformations-System zur Verfügung steht.

Doch auch in letzterem System sind die Bedingungen für die Transformation wie auch für die Regeneration von Apfelpflanzen von Sorte zu Sorte unterschiedlich beziehungsweise die Bedingungen müssen jeweils für eine Sorte optimiert werden. Untersuchungen über Faktoren, welche die Transformation von Äpfeln mit *A. tumefaciens* und ihre Regeneration beeinflussen, finden sich zum Beispiel bei Ai-Ping *et al.* (1995), Dandekar *et al.* (1990), DeBondt *et al.* (1994), Norelli and Aldwinckle (1993) sowie Patat-Ochatt *et al.* (1988).

### a) Transformation von Apfelpflanzen mit dem lytischen Protein Attacin E

Der Feuerbrand des Apfels wird durch das Bakterium *Erwinia amylovora* verursacht. Das Bakterium befällt viele Rosaceen, darunter Apfel- und Birnbäume, aber auch Zierpflanzen wie Cotoneaster. *E. amylovora* wird mechanisch, zum Beispiel durch Insekten, verbreitet und gelangt so in die Apfelblüte. Es ist aber auch möglich, dass die Bakterien durch Wunden in den Stamm eindringen können, wodurch auch die Unterlage befallen werden kann. Die Krankheit kann innert kürzester Zeit einen Apfelbaum zum Absterben bringen. Gegen einen *Erwinia*-Befall können Antibiotika eingesetzt werden. Dies wird in den USA und neuerdings auch in Europa (z.B. Deutschland) praktiziert. In

der Schweiz ist der Einsatz von Antibiotika (Streptomycin) aber nicht erlaubt. Eine Bekämpfung am Baum ist bei uns deshalb nicht möglich. Behandlungen mit Antibiotika scheinen ausserdem nicht sinnvoll, da die Bakterien sehr rasch Resistenzen bilden. Insbesondere sind auch Auswirkungen der von den Bakterien gegen das Streptomycin gebildeten Resistenzen auf den Humanbereich denkbar. Das Bundesamt für Gesundheitswesen macht zur Zeit Untersuchungen zu diesem Thema. Aufgrund des grossen Schadenpotentials dieser Krankheit gilt *E. amylovora* als Quarantäne-Schadorganismus, weshalb Wirtspflanzen vor der Einfuhr in die Schweiz in Quarantäne ihre Befallsfreiheit erweisen müssen.

In der Schweiz tauchte der Feuerbrand 1989 erstmals an Cotoneaster-Pflanzen auf und verursachte 1994 erstmals Schäden in einer Obstanlage beziehungsweise Baumschule. Befallene Bäume werden nach dem Prinzip der Tilgung in der Regel sofort und an Ort und Stelle verbrannt, um eine weitere Ausbreitung zu verhindern. Gegebenenfalls müssen auch nahe stehende, noch gesunde Bäume gerodet werden. Dies bedeutet für den Bauern beziehungsweise Baumschulisten natürlich einen grossen Schaden, denn er verliert nicht nur die Bäume und muss Neupflanzungen finanzieren, er muss auch wieder einige Jahre warten, bis die neuen Bäume erste Erträge bringen werden. 1995 beliefen sich die Entschädigungen an Schweizer Bauern bereits auf rund 1 Million Franken, wobei der Bund ca. 660'000 Franken übernahm. Die Entschädigungspraxis sowie das Prinzip der Tilgung als Bekämpfungsmassnahme werden in nächster Zeit wohl neu bedacht werden.

In verpuppten Seidenraupen (*Hyalophora cecropia*) kann durch Inokulation mit Bakterien eine Anzahl von antibakteriell wirksamen Proteinen induziert werden. Eines dieser Proteine ist das Attacin, welches in sechs Isoformen (A bis F) vorliegen kann. Attacin schädigt offenbar die äussere Membran der Bakterien (Engström *et al.* 1984). Für Tabak wurde bereits gezeigt, dass ein solches induziertes, lytisches Protein (Shiva-1) die Resistenz gegen *Pseudomonas solanacearum* erhöht (Jaynes *et al.* 1993). Norelli *et al.* transformierten Apfelpflanzen der Sorte "Malling 26" (M.26) mit dem Gen für Attacin E. Diese Unterlage wird weltweit häufig benutzt und gilt unter den Apfelsorten als relativ einfach zu transformieren.

Von 648 mit *A. tumefaciens* inokulierten Apfelblatt-Segmenten konnten 36 Pflanzen auf einem Paromomycin-haltigen Medium regeneriert werden. Davon zeigte aber nur gerade eine Pflanze (mit T1 bezeichnet) sowohl NPTII- als auch  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität. Die Transformation von T1 wurde mittels Southern- und Northern-Analysen untersucht, die zeigten, dass das Attacin-E-Gen in die genomische DNA von M.26 integriert worden ist. Resistenztests zeigten eine deutlich erhöhte Resistenz (eigentlich: Toleranz) gegen *Erwinia amylovora* im Vergleich zu nicht transformierten M.26-Pflanzen. Dies ergab sich aus der verlangsamten Zunahme des befallenen Gewebes auf infizierten Zweigen.

Norelli *et al.* haben bisher nicht untersucht, ob das Genprodukt innerhalb der Pflanze transportiert wird. Gemäss mündlicher Mitteilung von Norelli sind solche Untersuchungen aber geplant. Wie er auf Anfrage mitteilte, erwartet er jedoch aus folgenden Gründen keinen solchen Transport: erstens werde das Protein offenbar nicht aus den Zellen heraus transportiert, und, sollte dies doch geschehen, sei die "source/sink"-Richtung in der Zeit der Fruchtbildung von den Blättern zu Wurzeln oder Früchten, aber nicht von Wurzeln zu Früchten. Früchte würden dementsprechend kein Attacin enthalten. Dazu ist zu bemerken, dass die von Norelli erwarteten Richtungsverhältnisse im Saftstrom wohl für das Phloem richtig sind, im Xylem herrscht jedoch immer, also auch während der Fruchtreifung, ein Strom von den Wurzeln zu den Früchten.

Das Wissen um die Mobilität des Proteins ist wichtig, um eine eventuelle Toxizität für den Konsumenten zu ermitteln. Falls das Protein nicht in die aufgepfropfte Sorte transportiert wird, muss auch keine toxische Wirkung befürchtet werden. Für das Protein wurden nach Auskunft von Norelli (persönliche Mitteilung) keine Human-Toxizitätstests ausgeführt. Dies war übrigens auch nicht erforderlich, um die Erlaubnis für Feldtests zu erhalten, da die Pflanzen während der Versuchszeit keine Früchte produzieren werden.

Im Gewächshaus gehaltene Pflanzen sollen weitergekreuzt werden, um die Vererbung der erhöhten Resistenz zu untersuchen.

Allerdings muss hier erwähnt werden, dass die antibakterielle Wirkung der Abwehr-Proteine der Insekten nur zum Teil auf Attacin beruht. Offenbar unterstützt Attacin vor allem die Wirkungsweise von Cecropinen und Lysozym, so dass diese drei Proteine synergistisch wirken (Boman and Hultmark, 1987). Eine zusätzliche Transformation mit diesen anderen Proteinen würde wohl die Resistenz gegen *Erwinia* noch wesentlich erhöhen. Jedoch wird in diesem Fall wohl die Abstimmung der Regulation für die verschiedenen Proteine schwieriger zu handhaben sein.

Schliesslich bleibt die Frage nach einer Resistenzbildung gegen diese anti-mikrobiellen Faktoren. Es konnten diesbezüglich keine Arbeiten gefunden werden.

Die USDA/APHIS erteilte 1993 die Bewilligung (Permit 92-365-07) für einen Feldtest mit 90 transformierten ganzen M.26-Bäumen (T1), die Pflanzen wurden also nicht einfach als Unterlage gebraucht. Im Feldtest wurden zur Kontrolle auch "M.7"-Bäume (moderat resistent) sowie "T791"-Bäume (transformierte M.26, das Vektor Plasmid enthält aber nicht das Attacin-E-Gen) einbezogen. Die Versuche wurden im Mai 1993 begonnen. Im Rahmen der Beurteilung potentiellen Umwelteinflüssen wurde betont, dass die gepflanzten Apfelbäume keine Pollen produzieren werden, da die Blütenbildung erst in drei bis vier Jahren erfolge und auch dann die Blütenbildung durch geeigneten Schnitt unterdrückt werde. Eine eventuelle Auskreuzung des Attacin-E-transgenen Pflanzen soll dadurch verunmöglicht werden.

Im Juni 1994 wurden die Pflanzen im Feld künstlich mit *E. amylovora* infiziert, indem mit einer Spritze Bakterienlösung in die Zweigspitzen injiziert wurde. Danach wurde der Zuwachs an nekrotisierter Fläche gemessen. Dabei zeigte sich, dass die T1-Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegen *E. amylovora* aufweisen (Momol *et al.* 1994). Eine Anwendung dieser Pflanzen als Unterlagen würde also zwar das Wurzelwerk schützen. Da das Protein aber offenbar nicht in die okulierte Sorte transportiert würde, wäre diese weiterhin anfällig.

In einer persönlichen Mitteilung teilte H. Aldwinckle mit, dass die T791-Kontrollpflanzen unerwarteterweise eine wesentlich gesteigerte Anfälligkeit gegen *E. amylovora* aufweisen. Er konnte diesen Effekt jedoch nicht erklären. Weiter war zu erfahren, dass die Feldversuche nicht durch weitergehende Beobachtungen begleitet werden. So wird zum Beispiel nicht untersucht, welchen Einfluss das Attacin auf die bakterielle Mikroflora des Bodens hat.

Zum Testvorgehen ist anzumerken, dass das Einspritzen von Bakterien in Zweigspitzen nicht unbedingt mit dem Resistenzverhalten des Stammes und der Wurzeln übereinstimmt.

In einem weiteren Feldtest werden Apfelpflanzen getestet, die mit Genen für Cecropin und Lysozym transformiert wurden (USDA 1994). Über die entsprechenden Versuche konnten aber keine Publikationen gefunden werden, und von der ausführenden Institution (Cornell University, USA) waren auch keine Auskünfte dazu zu erhalten. Cecropine werden wie Attacin von Insekten gebildet und haben eine antibakterielle Aktivität.

Lysozym ist ein in der Natur weitverbreitetes Enzym, das Bakterienzellwände auflöst und auch eine gewisse Chitinase-Aktivität hat.

### **b) Transformation von Apfelpflanzen mit dem *B.-thuringiensis*-Toxin**

Dandekar *et al.* sowie James *et al.* transformierten mittels *A. tumefaciens* Apfelpflanzen mit dem *cryIA(c)*-Gen von *Bacillus thuringiensis*, welches für ein insektizides Toxin kodiert. Obwohl Insekten als Schädlinge gelten und nicht als eigentliche Krankheiten, soll diese Arbeit hier näher diskutiert werden, da Insekten-Resistenz bei Äpfeln ein erwünschter Faktor ist. Die oben genannten Autoren erhielten vom USDA/APHIS (1991) die Erlaubnis, mit diesen Pflanzen Feldversuche in Kalifornien (USA) durchzuführen. Diese wurden im April 1992 begonnen und endeten im Januar 1995. Insgesamt wurden rund 300 transgene Apfelbäume gepflanzt. In diesen Versuchen sollte primär die Variation zwischen einzelnen Pflanzen und die Variation innerhalb einer Pflanze untersucht werden. Die Pflanzen wurden nach Beenden des Versuchs aus den Feldern entfernt. Während der Versuchszeit wurden alle entstehenden Blüten von den Bäumen entfernt, um die Bildung von Früchten zu unterbinden. Die Feldversuche wurden von einer Privatfirma ausgeführt (Dry Creek Laboratories, Modesto CA, USA). Nach Auskunft des Direktors der Firma zeigten alle gepflanzten transgenen Bäume normale Charakteristika. Weitergehende Informationen teilte er jedoch nicht mit, und die Resultate sollen nach Auskunft von Dandekar (aus uns unbekanntem Gründen) auch nicht veröffentlicht werden. Es ist uns deshalb nicht bekannt, ob die transgenen Bäume besser gegen Lepidopteren geschützt waren.

Gemäss Dry Creek Labs. konnten keine von diesen Versuchen ausgehende Risiken oder "technical impacts" festgestellt werden. Wie allfällige Risiken abgeschätzt oder bestimmt wurden, wurde nicht gesagt. Nach Auskunft von James (persönliche Mitteilung) sollte bei den Feldtests primär die Stabilität der Expression der Transgene ermittelt werden. Diese Stabilität ist bei einer mehrjährigen Pflanze von besonderem Interesse.

Der praktische Nutzen transgener Apfelbäume, die das BT-Toxin produzieren, ist fraglich. Neben anderen zeigten Gould *et al.* (1992) die Bildung einer Toxinresistenz in Insekten, denen ein Nährsubstrat mit *CryIA(c)* verabreicht wurde. Nach 17 Generationen lag die Rate der LC50 bei den selektierten Stämmen 50 mal höher als bei Kontrollstämmen. Die Insekten zeigten auch eine Kreuzresistenz gegenüber *CryIA(b)*, welches eine ähnliche Struktur wie *CryIA(c)* hat, sowie gegen *CryIIA*, das sich in seiner Aminosäuresequenz wesentlich von *CryIA(c)* unterscheidet. Die Anwendung transgener, *CryIA(c)* produzierender Apfelbäume könnte darum schnell zu (mehrfach) resistenten Insektenstämmen führen, wodurch das Wirkungspotential der BT-Toxine verloren ginge. Die Bildung von Kreuzresistenzen verunmöglicht grösstenteils auch eine zeitlich sequentielle Anwendung von verschiedenen BT-Toxinen. Dies wäre im Apfelanbau aber ohnehin kaum möglich, da die Bäume nicht kurzfristig ausgetauscht werden können, wie das bei einjährigen Kulturpflanzen der Fall ist.

Verschiedene Autoren diskutieren eine Pyramidisierung von insektiziden Faktoren in Pflanzen. Gatehouse *et al.* (1993) dabei an Resistenzfaktoren aus Pflanzen wie zum Beispiel der Cowpea-Trypsin-Inhibitor oder das *Galanthus-nivalis*-Lectin. Ob einem solchen Vorgehen ein grösserer Erfolg zur Vermeidung von Resistenzbildung beschieden wäre, hängt wesentlich von der Wirkungsweise der Genprodukte ab. Das Beispiel BT-Toxin zeigt, dass offenbar schon kleine Mutationen an den Rezeptorstellen die Bindung des Toxins vermindern und so auch dessen Wirkung schmälern.

Ein Problem in der Pyramidisierung von Resistenzfaktoren allgemein vermuten zum Beispiel Kahl und Winter (1995) in der Störung des Energiehaushalts in der Pflanze und darausfolgenden negativen Effekten. Zur Lösung dieses Problems erwähnen sie die Verwendung von Wund-induzierbaren Promotern. Dies ist jedoch im Falle des Apfels eine problematische Lösung, denn bereits der Probefrass der Insekten verursacht auf den Äpfeln einen Schaden, der als Qualitätsminderung eingestuft wird. Ein solcher Frass würde aber durch Wund-induzierbare Promotoren nicht verhindert.

Wearing und Hokkanen (1994) diskutierten eine allfällige Einführung von BT-transgenen Äpfeln und Kiwis in Neuseeland. Eine Hauptaussage ihrer Publikation ist es, dass solche transgenen Sorten nur als Teil eines integrierten Krankheits-Managements (integrated pest management, IPM) angewendet werden sollten, um eine rasche Resistenzbildung gegen die BT-Toxine zu verhindern. Ein solches Management muss so ausgelegt sein, dass Toxin-anfälliger Insekten (und damit der Influx ihrer Gene) in eine Anlage einfliegen können und sich mit resistenten Mutanten kreuzen. Dies soll erreicht werden, indem zum Beispiel alternative Wirtspflanzen im Unterwuchs belassen werden oder indem Refugien (in Form nicht-transformierter Bäume) für anfällige Insekten vorhanden sind. Darüberhinaus könnte auch die Verwirrungstechnik eine Verzögerung der Resistenzbildung bewirken. Es ist jedoch fraglich, ob Landwirte solche Strategien auch tatsächlich anwenden würden, da Refugien-Bäume wenig oder keinen Ertrag bringen würden. Darüberhinaus würde der ständige Einflug von neuen Insekten insbesondere bei einer Transformation mit Wund-induzierbaren Promotern Schaden auf den transgenen Früchten verursachen. Dieses Beispiel zeigt die Notwendigkeit einer holistischen Betrachtungsweise anstelle einer sequenziellen.

Um den Selektionsdruck für BT-Resistenzen zu erniedrigen, diskutieren Wearing und Hokkanen (1994) auch die Entwicklung von Gewebe- und Zeit-spezifischen Promotern. Am Beispiel der Blatt-rollenden Insekten kommen sie zum Schluss, dass der Unterbruch der Toxin-Expression nach Fruchtreifung am vielversprechendsten wäre. Da diese Insekten auch auf anderen Wirtspflanzen fressen, entstünde so eine Winterperiode ohne Selektionsdruck. Gewebespezifische Promoter dagegen wären im Fall des Blattrollers problematisch, da damit ein starker Selektionsdruck für den Frass von nicht-transgenem Gewebe ausgeübt würde.

Schliesslich weisen Wearing und Hokkanen darauf hin, dass die Evaluation der Eignung einer Kultur zur Transformation mit BT-Genen davon ausgehen muss, dass in der Praxis ein minimales Resistenz-Management betrieben wird. Die Fähigkeiten und das Wissen um ein solches Management schwankt bei den vielen potentiellen Anwendern transgener Pflanzen stark und stellt somit eine Gefahr dar (Wearing und Hokkanen 1995).



### 3. Situationsanalyse des Pflanzenschutzes im Schweizer Apfelanbau

Die Vorgabe für diese Studie beinhaltet die drei Anbausysteme "konventionell" (System A), "integriert" (System B) und "biologisch" (System C). Im speziellen Fall des Apfelanbaus können jedoch System A und B als ein einziges System behandelt werden, da die Mehrheit der Anbaufläche gemäss den Richtlinien der SAIO (Schweizerische Arbeitsgruppe für Integrierte Obstproduktion) bewirtschaftet werden. 1982 wurden von der SAIO erstmals Richtlinien für die Integrierte Produktion (IP) herausgegeben. 1993 wurden 60 %, 1994 bereits 73 % der Apfelkulturen gemäss diesen Richtlinien angebaut und für das IP-Label angemeldet.

1993 wurden in der Schweiz 5058 Hektaren Äpfel angebaut (Schw. Obstverband 1995), davon rund 59 Hektaren Äpfel in Biobetrieben (Binggeli 1994). 1994 waren es ca. 5108 bzw. 60 Hektaren. Insgesamt entspricht diese Fläche etwa 70 % der totalen Obstproduktions-Fläche in der Schweiz. Betrachtet man das angebaute Sortenspektrum fällt die Dominanz der Sorte "Golden Delicious" auf. Sie wurde 1994 auf 1372 ha angebaut, was rund 27 % der Ertragsobst-Apfel-Fläche ist und rund das Dreifache der am zweithäufigsten angebauten Sorte Idared.

1994 wurden in der Schweiz rund 147240 Tonnen Äpfel produziert (Schw. Obstverband 1995). Etwa 61 % davon wurden als Tafeläpfel verkauft, während rund 37 % technisch verwertet wurden. Die restlichen ca. 2 % wurden auf den Betrieben selbst verbraucht. Die Ernteerträge schwanken von Jahr zu Jahr. Der Produzenten-Richtpreis für Äpfel der Sorte "Golden Delicious" (Klasse I) lag 1994 bei 1.25 Fr./kg, während er 1992 - einem sehr ertragreichen Jahr - nur 0.80 Fr./kg betrug.

1994 wurde eine Änderung des Landwirtschaftsgesetzes angenommen. Artikel 31B dieses geänderten Gesetzes erlaubt Direktzahlungen des Bundes an Bauern, die gewisse ökologische Auflagen erfüllen. Diese Auflagen sind zur Zeit noch in detaillierter Bearbeitung (gültig ab 1996), dürften aber schliesslich weitgehend identisch sein mit den IP-Richtlinien zur Erlangung des IP-Labels. Es kann davon ausgegangen werden, dass künftig der Anteil der nach diesen Richtlinien angebauten Äpfel weiter zunehmen wird. Durch die Einführung der IP-Richtlinien konnte der Einsatz von Insektiziden und Akariziden um etwa 45 % reduziert werden (Bühler 1995). Das grösste Problem im Pflanzenschutz von Apfelanlagen stellen jedoch Pilzkrankheiten dar (Kellerhals 1989). Unter diesen ist der Apfelschorf, verursacht durch den Ascomyceten *Venturia inaequalis*, die gefährlichste Krankheit. Die meisten Fungizid-Behandlungen in Apfelanlagen werden zur Bekämpfung von *V. inaequalis* vorgenommen. *V. inaequalis* überwintert in abgefallenem Laub und befällt im Frühling die jungen Blätter, später auch Früchte. Früher Fruchtbefall kann Fruchtfall auslösen. Starker Schorfbefall schwächt und schädigt die Apfelbäume. Befallene Äpfel können nicht mehr als Klasse-I-Obst sondern bestenfalls als Klasse-II-Obst verkauft werden, was einen wesentlichen Ertragsausfall bedeutet. Der Produzenten-Richtpreis für "Golden Delicious" betrug zum Beispiel 1994 1.25 Fr./kg für Äpfel der Klasse I, aber nur 0.70 Fr./kg für Klasse-II-Äpfel (Schw. Obstverband 1995). In Jahren mit hohem Infektionsdruck kann dieser Ausfall den Rohertrag für den Produzenten also drastisch verringern.

*V. inaequalis* kann auch als sogenannter Lagerschorf Schaden verursachen, da sich im Lager latente Infektionen zu Läsionen auswachsen können, wodurch die Fruchtqualität reduziert wird. Für den Konsumenten ist Schorfbefall primär ein "kosmetisches" Problem, da die Früchte auch bei stärkerem Befall ohne weiteres konsumiert werden können. Die Nachfrage nach makellosen Früchten ist einer der Hinderungsgründe eines reduzierten Pestizideinsatzes (Penrose 1995).

In den letzten Jahren ist der Feuerbrand, verursacht durch den bakteriellen Erreger *Erwinia amylovora*, in der Schweiz aufgetreten und hat grosse Schäden verursacht (siehe auch Punkt 2a). Die Bekämpfung dieser Krankheit beruht zur Zeit einerseits auf Quarantäne-Massnahmen, andererseits auf der Rodung befallener Bäume. Eine direkte Bekämpfung am Baum wäre prinzipiell durch Antibiotika möglich und wird im Ausland auch praktiziert, ist aber in der Schweiz nicht erlaubt und ausserdem nicht sinnvoll aufgrund von Resistenzbildung seitens der Bakterien.

Die Bedeutung von tierischen Schädlingen im Erwerbs-Apfelanbau ist verglichen mit den pilzlichen Krankheiten weniger gross. Wichtig sind in der Schweiz die Blattläuse sowie die Apfel- und Schalenwickler. Zu ihrer Bekämpfung stehen chemische Insektizide zur Verfügung. Als Alternative dazu bieten sich das Granulose-Virus-Verfahren sowie die Verwirrungstechnik an. Bei ersterem Verfahren verwendet man bei Insekten vorkommende Viren, die in Kapseln oder Granula eingebettet sind. Bei der Verwirrungstechnik kommen künstlich hergestellte Pheromone zum Einsatz. Diese werden - geeignet formuliert - in der Obstanlage plaziert und locken die Insekten-Männchen während des Paarungsflugs an, so dass die Vermehrung der Schädlinge deutlich eingeschränkt wird.

#### **a) Integrierte Produktion**

Bis zur Einführung der IP-Richtlinien erfolgte die Applikation von protektiv wirkenden Fungiziden in regelmässigen Zeitabständen. Die Einführung von kurativ wirkenden Fungiziden und die Berücksichtigung von meteorologischen Infektions-Parametern erlaubte eine Reduzierung der Anzahl Fungizidbehandlungen von durchschnittlich über 12 auf durchschnittlich 9 (Bühler 1995). Eine weitere Reduktion wird nur möglich, wenn auch biologische Parameter wie Inokulum-Dichte, Wirts-Anfälligkeit und Zeitpunkt des Sporenflugs in die Abschätzung der Befallsgefahr einbezogen werden. Solche Parameter wurden von Bühler (1995) untersucht. Ein auf diesen Parametern basierendes Prognose- und Fungizidapplikations-System würde wohl eine weitere Reduktion der ausgebrachten Fungizidmengen erlauben. Die möglichen Einsparungen durch auf Wetterdaten basierenden Prognosemodellen schätzten unter anderen Beresford und Manktelow (1994) für den Apfelanbau in Neuseeland ein. Sie berechneten ein Sparpotential von bis zu 25 Prozent, bevor der Krankheitsbefall den Ertrag schmälern würde. Bei geringerem Krankheitsdruck beurteilten sie das Potential sogar auf 56 Prozent. Prognose-Systeme sind jedoch noch relativ unsicher und bergen dementsprechend ein relativ grosses Ertrags-Risiko für den Bauern in sich. Letzteres ist auch der Grund, weshalb die existierenden Pflanzenschutzstrategien, welche den Fungizideinsatz im Apfelanbau weiter reduzieren könnten, nur zögernd angewendet werden. Denn während die Vorteile eines reduzierten Fungizidverbrauchs einer geringeren Umweltbelastung zu Gute kommen, trägt der Produzent den Nachteil des Risikos und erzielt für seine "ökologischer" produzierten Äpfel keinen höheren Preis. Es liegt deshalb nahe, Fungizide als relativ billige Versicherung gegen das Befallsrisiko einzusetzen.

Daten über die ausgebrachten Fungizidmengen werden nur grob erhoben. Gemäss einer Übersicht der Schweizerischen Gesellschaft für Chemische Industrie (SGCI 1995) wurden im Obstbau 1994 Pflanzenschutzmittel im Werte von 13,9 Millionen Franken verkauft. Da 70 % der Schweizer Obstanlagen aus Erwerbs-Apfelanlagen bestehen, kann für den Apfelanbau ein Verkaufswert von mindestens 10 Millionen Franken berechnet werden. Da der Apfel aber die bei weitem Pflanzenschutz-intensivste Obstkultur ist, dürfte diese Zahl eher noch etwas höher liegen. Ausgehend von diesen Zahlen berechnet sich der durchschnittliche reine Aufwand an Pflanzenschutzmitteln auf ca. 2000 Fr. pro Hektare, was etwa 10 % der Produktionskosten darstellt. Bei einem

durchschnittlichen Rohertrag von 20000-30000 Fr. pro Hektare wiegt ein verminderter Spritzmitteleinsatz demzufolge relativ wenig.

### **b) Biologische Produktion**

Die Fläche, die gemäss VSBLO-Richtlinien (VSBLO 1992) bewirtschaftet wird, nahm in den letzten Jahren relativ stark zu. 1994 wurden auf rund 59 Hektaren Äpfel biologisch angebaut, was ungefähr 1 Prozent der gesamten Apfelanbaufläche entspricht. Auch in diesem Anbausystem stellt der Apfel mit 74% Prozent Anbaufläche die Hauptobstart dar.

Die Richtlinien des VSBLO erlauben unter anderem den Einsatz von verschiedenen Pflanzenschutzmitteln, darunter 1,5 kg Kupfer pro Hektare und Jahr sowie Netzschwefel, der nur in raubmilbenschonender Konzentration ausgebracht werden soll. Allerdings finden sich in der Richtlinien-Broschüre keine Mengenangaben dazu, und tatsächlich gibt es darüber auch nur Empfehlungen des Forschungsinstitut für biologischen Landbau Oberwil (FiBL).

Um Aufschluss über tatsächlich ausgebrachte Pflanzenschutzmittel zu erhalten, untersuchte das FiBL zusammen mit der Eidg. Forschungsanstalt Wädenswil die Situation des Pflanzenschutzmittel-Einsatzes in Schweizer Bio-Obstbaubetrieben (Häseli und Bosshard 1994; Häseli *et al.* 1995). Dazu wurden von 1989 bis 1993 Daten in einer Anzahl ausgewählter Bio-Betriebe in der Deutschschweiz erhoben.

Erwartungsgemäss stellte auch hier der Apfelschorf das bei weitem grösste Problem dar. Andere Pflanzenkrankheiten wie Mehltau oder *Monilia* spielten nur eine untergeordnete Rolle. Bei den tierischen Schädlingen traten in einigen Betrieben Probleme mit dem Apfelwickler, der Apfelfaltenlaus sowie der Apfelsägewespe auf.

Dementsprechend nimmt auch die Bekämpfung des Apfelschorfs die Hauptrolle bei der Krankheitsregulierung ein. Im Durchschnitt wurden 12,8 Behandlungen pro Betrieb und Jahr durchgeführt. Dieser Durchschnitt ist gemäss den Autoren jedoch nicht sehr aussagekräftig, da die Anzahl Behandlungen je nach Betrieb und Jahr sehr stark variierte. So wurden in mehr als der Hälfte der 54 Einzelerhebungen der Studie zwischen 6 und 12 Behandlungen benötigt, während in 9 Erhebungen 16 und mehr Behandlungen gemacht wurden. Ebenso variierte die Menge der dabei ausgebrachten Wirkstoffe. Beim Schwefel wurden die von den Vertriebsfirmen empfohlenen Aufwandmengen (15 / 10 kg vor/nach Blüte pro ha) wesentlich unterschritten. In fast der Hälfte der Erhebungen genügten maximal 5 kg Netzschwefel pro Hektare und Jahr, in den restlichen Erhebungen wurden höchstens 10 kg ausgebracht. Die Anzahl Kupferbehandlungen variierte hier je nach Jahr und Betrieb zwischen 0 und 16. Meistens wurde das Kupfer mit dem Netzschwefel gemischt und gleichzeitig ausgebracht. Insgesamt wurden in 60 % der Erhebungen 1 kg oder weniger Kupfer pro Hektar und Jahr eingesetzt. In 13 % der Erhebungen wurde allerdings die von der VSBLO festgesetzte Höchstmenge von 1,5 kg Kupfer überschritten.

Die Anwendung von Kupfer und Schwefel als Pflanzenschutzmittel ist nicht unproblematisch. Das Schwermetall Kupfer reichert sich im Boden an und wirkt sich negativ auf Bodenmikroorganismen und somit die Bodenfruchtbarkeit aus (Anderson 1978). Schwefelbehandlungen wirken nicht nur gegen Pilzkrankheiten, sondern töten auch Milben ab. Es muss daher befürchtet werden, dass durch Schwefel-Applikationen auch Nützlinge wie Raubmilben abgetötet werden, was einen vermehrten Schädlingsbefall zur Folge haben kann.

Das Projekt "Förderung von Methoden des biologischen Apfelanbaues 1985-1993" untersuchte die Schorf- und Mehltau-Bekämpfungswirksamkeit von mehr als 50 Präparaten. Nur zwei Präparate, "Myco-San" (Schaette) und "Ulmasud" (Biofa) zeigten eine

dem Kupfer vergleichbare Wirksamkeit. Vor allem "Myco-San" kann im Frühling als Alternative zu Kupfer-Behandlungen eingesetzt werden. Es ist jedoch relativ teuer und dürfte deshalb für einen Einsatz während der ganzen Behandlungszeit zu kostspielig sein.

### c) Resistente Apfelsorten

Der Anbau von schorffresistenten Apfelsorten trägt sicherlich wesentlich zu einem reduzierten Fungizidaufwand bei. Eine der am schorffanfälligsten Sorten, "Golden Delicious", hatte aber auch 1993 einen Anteil von 27 Prozent der Anbaufläche. Resistente Sorten wurden bisher nur wenig angebaut, unter anderem wegen eines Mangels an resistenten Qualitätssorten. 1994 betrug der Flächenanteil schorffresistenter Sorten in der IP ca. 0,3 %, im biologischen Anbau etwa 7 %. Dabei machte die Sorte "Florina" den grössten Anteil aus, und nur wenige andere Sorten wurden verwendet. Inzwischen erwies sich "Florina" aber als nicht ideal, unter anderem wegen Ertrag, Wuchsform, Auskahlen der Äste und kurzem "shelf life" der Früchte.

Darüberhinaus hat man gesehen, dass durch den verminderten Fungizideinsatz andere, bisher unterdrückte Krankheitserreger vermehrt Schaden anrichten können. Sollte dieser Effekt Fungizidbehandlungen gegen solche Krankheiten nötig machen, ist die Ersparnis durch schorffresistente Sorten natürlich wesentlich vermindert.

In jüngster Zeit sind nun aber Sorten aus verschiedenen Ländern erhältlich, so zum Beispiel die sogenannten "Re"-Sorten wie "Rewena", "Reglindis" oder "Resi" aus Deutschland. Ein erster Erfolg der noch relativ jungen Resistenzzüchtung an der FA Wädenswil ist unter anderem die Zucht Nummer FAW7262, welche vermutlich 1996 aus der Sortenprüfung kommen wird. Nach Auskunft der FA Wädenswil ist auch die Sorte "Topaz" aus Tschechien vielversprechend. Durch dieses wesentlich vergrösserte Angebot an schorffresistenten Sorten ist mit einer Zunahme der prozentualen Anbaufläche in der Schweiz zu rechnen. Wie rasch diese Zunahme erfolgen wird, ist schwer abschätzbar. Eine Umstellung auf eine neue Sorte stellt immer einen grossen finanziellen Aufwand für den Bauern dar, denn es müssen nicht nur die neuen Bäume gekauft und gepflanzt werden, der Bauer hat in diesen Anlagen während 3 bis 4 Jahren auch keinen Vollertrag.

An der Eidgenössischen Forschungsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau Wädenswil (FAW) existiert ein Resistenzzüchtungs-Programm, in welchem pro Jahr rund 8000 Sämlinge erzeugt werden. Seit 20 Jahren prüft die FAW auch krankheitsresistente Sorten, darunter einige eigene Züchtungen, für den Anbau in der Schweiz. So standen beispielsweise 1995 107 Sorten und Neuzüchtungen in der Prüfung für einen Anbau ohne Fungizid-Einsatz.

In ergänzender Zusammenarbeit mit der FAW begann das FiBL 1994 die Prüfung von insgesamt 32 krankheitsresistenten Apfelsorten (Häseli und Bosshard 1994). Zusätzlich dazu werden auf ca. 10 Betrieben 6-8 krankheitsresistente Sorten auf grösseren Anbauflächen angebaut und geprüft. Dabei sollen arbeitswirtschaftliche Daten wie Aufwand für Baumschnitt, Erziehung erhoben werden wie auch Baumeigenschaften wie Ertragsleistungen, Alternanz und Insekten- und Krankheitsbefall.

## 4. Einsatz von Krankheits-Resistenzen in der traditionellen Züchtung

Die züchterische Arbeit mit Äpfeln unterliegt einigen besonderen Schwierigkeiten (Schuermann und Dandekar 1991). Bedingt durch die lange Generationszeit des Apfelbaumes (3-5 Jahre) ist die Einführung eines einzelnen Merkmals (z.B. Resistenz) sehr zeitaufwendig. Dazu kommt der hohe Grad an Selbst-Inkompatibilität, wie er bei mehrjährigen Pflanzen häufig vorkommt. Damit werden echte Rückkreuzungen verunmöglich, in denen die Nachkommenschaften mit einem Elternteil mehrmals rückgekreuzt werden. Für jeden Züchtungsschritt wird also in der Regel ein neuer Elter, das heisst eine Apfelsorte, in das Züchtungsprogramm eingeführt. Dies verunmöglicht praktisch die Verfolgung eines klaren Zuchtziels in dem Sinne, eine bekannte Sorte nur in einem bestimmten Merkmal (z.B. Krankheitsresistenz) zu verändern. Zwar können sogenannte "linkage drags" (unerwünschte, oftmals negative Erbeigenschaften), die aus wilden Sorten mit eingekreuzt werden, in den folgenden Züchtungsschritten reduziert werden. Doch entsteht aus jedem Züchtungsschritt eine neue Sorte, und die ursprüngliche Kultursorte kann nicht mehr "rekonstruiert" werden.

Zu diesen Problemen kommen noch die vielen verschiedenen Ansprüche an die Sorten seitens der Produzenten, des Handels und der Konsumenten. Diese Ansprüche sind zeitlich und regional unterschiedlich.

Krankheitsresistenz ist darum kein isoliertes Ziel, sondern eine wichtige Komponente in einem Apfel-Zuchtprogramm. Aufgrund eines veränderten Umweltbewusstseins ist aber der Wunsch nach resistenten Sorten in den letzten Jahren stark angewachsen. In wohl allen Zuchtprogrammen der Welt kommt der Krankheitsresistenz deshalb heutzutage eine grosse Bedeutung zu.

Am meisten Beachtung erlangen dabei Resistenzen gegen die agronomisch wichtigsten Krankheiten: Apfelschorf (*Venturia inaequalis*), Apfel-Mehltau (*Podosphaera leucotricha*) und Feuerbrand (*Erwinia amylovora*).

Gemäss Fried (1993) sind keine Programme zur Züchtung auf Apfel- und Schalenwickler-Resistenz bekannt. Hingegen werden in einigen Züchtungsprogrammen die Nachkommenschaften auf Anfälligkeit gegenüber diesen Schädlingen untersucht. Es wurden auch Untersuchungen über Spinnmilbenresistenz durchgeführt, und gegen die Blattlaus, *Dysaphis plantaginea*, ist ein einzelnes, dominantes Resistenzgen bekannt.

Für den Züchter ist es einfacher, einzelne Gene mit grosser Wirkung einzubauen und in der Nachkommenschaft zu selektionieren als eine Vielzahl einzelner Gene mit jeweils kleiner Wirkung. Somit steht die Verwendung von qualitativ wirksamen Erkennungsgenen im Vordergrund (siehe Kasten S. 21).

### a) Apfelschorf

Der Erreger des Apfelschorfes, *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., befällt Arten der Gattung *Malus* sowie einige *Sorbus*-Arten. Einige der *Malus*-Arten haben sich als resistent gegen *V. inaequalis* erwiesen. Diese Arten und die nach ihnen benannten Resistenzen wurden in der Folge auch in der Apfel-Züchtung verwendet.

Die fünf Resistenzfaktoren Vf, Va, Vr, Vb und Vbj gelten als unabhängig und dominant und codieren für eine vollständige Resistenz gegen alle bekannten *V.-inaequalis*-Rassen, wobei bei der Vf-Resistenz eine besondere Situation herrscht (siehe S. 21). Die Vm-Resistenzen wurden von der sogenannten Rasse 5 durchbrochen bzw. ineffizient gemacht und werden in der Züchtung nicht mehr verwendet.

**Memorandum:**

**Resistenzen** werden *allgemein in zwei Typen eingeteilt*: a) Sie sind wirksam gegen alle Isolate eines Pathogens und werden als **generelle** (horizontale) Resistenzen bezeichnet. b) Man kennt einzelne Isolate (Pathotypen), die eine bestimmte Resistenz durchbrechen können. Dies wird als **differenzielle** (vertikale) Resistenz bezeichnet. Sind solche differenziellen Resistenzen von verschiedenen Isolaten durchbrochen, gelten sie untereinander als funktionell verschieden. Die Genotypen des Pilzes werden als Rassen mit entsprechender Virulenz bezeichnet. Dieses System versucht man mit der sogenannten "Gen-für-Gen-Hypothese" zu erklären. Dabei wird angenommen, dass zu **jedem Resistenzgen** in der Pflanze ein **entsprechendes Avirulenzgen** im Krankheitserreger existiert. Treffen Wirt und Krankheitserreger zu sammen, welche beide die entsprechenden Gene besitzen, interagieren die Produkte von Resistenzgen und Avirulenzgen so, dass die Interaktion inkompatibel wird, und der Erreger kann die Pflanze nicht befallen. Fehlt aber einer der beiden Faktoren, kommt es zu einer kompatiblen Interaktion. Die **Rolle der Resistenzgene** ist also die **Erkennung** des Pathogens, man spricht deshalb auch von "**recognition genes**" oder R-Genen. Die Produkte dieser R-Gene lösen dann die Aktivierung einer Kaskade von Abwehrmechanismen aus (Produkte sogenannter "**defense-response genes**"). Dazu gehören beispielsweise Phytoalexine, hydrolytische Enzyme und sogenannte PR-Proteine ("pathogenesis-related proteins"). Generell kann davon ausgegangen werden, dass alle Sorten einer Wirtsart die Gene dieser Abwehrkaskaden besitzen. Hingegen wird angenommen, dass die Verteilung und die Präsenz der R-Gene in den verschiedenen Sorten unterschiedlich ist, und auch anfällige Sorten gewisse R-Gene besitzen. Diese wurden von entsprechenden Erreger-Rassen unwirksam gemacht. Das Modell erklärt diesen Effekt durch den Verlust der entsprechenden Avirulenzgene. Von der echten generellen Resistenz (nicht die noch nicht erkannte differenzielle Resistenz) wird angenommen, dass sie von vielen additiven Genen abhängig ist, wobei einige Fälle bekannt sind, die nicht diesem Schema entsprechen. Bis heute wird vermutet, dass diese Resistenz nicht auf einem Pathotyp-Erkennungssystem basiert.

Aufgrund von Kreuzungstests wurden die Resistenzen von 11 *Malus*-Arten als Allele des gleichen Locus (Vf) bezeichnet (Review Williams and Kuç 1969). In der Züchtung wird praktisch ausnahmslos die Vf-Resistenz von *M. floribunda* 821 verwendet. Dies beruht vor allem darauf, dass erste Kreuzungen mit diesem Baum schon 1914 gemacht wurden (Crandall 1926) und die Nachkommen dieser Kreuzungen seither in vielen weiteren Kreuzungen weiterverwendet wurden. Im Hinblick auf die lange Generationszeit des Apfels ist dies ein entscheidender Vorteil, denn durch das Weiterkreuzen wurde ein Grossteil des ursprünglichen, aber nicht erwünschten *M. floribunda*-Genoms ausgekreuzt.

Gegenwärtig sind ca. 50 schorfresistente Apfelsorten kommerziell erhältlich, davon ca. 40 mit der Vf-Resistenz, und auch die in der Schweiz im kommerziellen Obstbau angewendeten schorfresistenten Sorten tragen zur Zeit diese Resistenz.

**Tabelle 1.** *Malus*-Arten und Apfel-Sorten, die als Quellen von Schorf-Resistenz verwendet werden (nach Lespinasse 1989).

	Monogen	Polygen
Vf.	<i>M. floribunda</i> 821 <i>M. atrosanguinea</i> 804 <i>M. micromalus</i> 245-38 <i>M. prunifolia</i> 19 651 <i>M. prunifolia microcarpa</i> 782-26 <i>M. prunifolia xanthocarpa</i> 691-25 <i>M. species</i> MA. 4 <i>M. species</i> MA. 8 <i>M. species</i> MA. 16 <i>M. species</i> MA. 1255 Hansen's <i>baccata</i> No. 1	<i>M. baccata</i> <i>M. sargentii</i> 843 <i>M. sieboldii</i> 2982-22 <i>M. toringo</i> 852 <i>M. zumi calocarpa</i>  Alte europäische Sorten
Va.	Antonovka selection PI 172 623	
Vb.	Hansen's <i>baccata</i> No. 2	
Vbj.	<i>M. baccata jackii</i>	
Vr.	<i>M. pumila</i> R 127 40-7A	
Vm.	<i>M. micromalus</i> 245.38 <i>M. atrosanguinea</i> 804	

Die Konzentration der Züchtungsprogramme auf die Vf-Resistenz könnte sich jedoch als problematisch erweisen. Parisi (1993) beschreibt eine *V. inaequalis*-Rasse (die sogenannte Rasse 6), die Apfelbäume mit der Vf-Resistenz befallen kann. Interessanterweise kann die von Parisi beschriebene Rasse aber *M. floribunda* 821 selber nicht befallen. Dies weist darauf hin, dass während des langen Züchtungsprozesses gewisse Resistenzfaktoren verloren gingen, welche in *M. floribunda* 821 noch enthalten sind (Gessler 1989). Tatsächlich drückt sich die Resistenz in *M. floribunda* 821 als "class 1" Reaktion aus, worunter man sogenannte "pin point pits" ohne Sporulation versteht. Aber schon die F2-Pflanzen "26829-2-2" und "26830-2" reagierten mit einer "class 2" Reaktion (chlorotische oder nekrotische Läsionen ohne Sporulation) (Shay and Hough 1952). Gleichzeitig ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass die Vf-Resistenz in *M. floribunda* 821 nicht monogen von einem dominanten Allel kontrolliert wird, wie ursprünglich angenommen wurde (Hough *et al.* 1953). Vielmehr vermuteten Williams und Kúc (1969) eine Gruppe von nahe beieinanderliegenden Genen oder ein einzelnes qualitatives Gen, welches nahe bei einem oder mehreren modifizierenden Genen liegt. Die Vf-Resistenz kann also nicht mehr als dauerhaft bezeichnet werden, sondern muss zu den vergänglichen (englisch: ephemeral) Resistenzen gezählt werden. Es muss also davon ausgegangen werden, dass die Vf-Resistenz in den kommenden Jahren im Obstbau an Effizienz einbüßen wird, dies um so mehr, als künftig Vf-resistente Sorten in zunehmendem Masse angebaut werden und somit der Selektionsdruck für die Rasse 6 steigen wird.

Ein Züchtungsprogramm verwendet die Vr-Resistenz, die aus einem russischen Sämling stammt. Aus dem Programm ging die Sorte "Nova Easygro" hervor (Crowe 1975). Neueste DNA-Analysen legen aber nahe, dass sich die Resistenzgene Vr und Vf am gleichen Locus befinden (persönliche Mitteilung Gianfranceschi), obwohl ursprünglich angenommen wurde, dass diese beiden Resistenzen nicht gekoppelt sind. Dieser Befund macht einen Fehler bei der Züchtung von "Nova Easygro" wahrscheinlich.

*Venturia inaequalis* weist bezüglich Virulenz eine hohe Variabilität auf. In der Literatur finden sich Hinweise auf mindestens 19 Virulenzgene (Gessler 1989). Der jährliche sexuelle Zyklus von *V. inaequalis* gewährleistet die genetische Rekombination von (meist unabhängigen) genetischen Faktoren. Es besteht deshalb die Gefahr eines Durchbruchs einfach vererbter Resistenz. Dies führte zur Idee der Pyramidisierung von Resistenzen (Lespinasse 1989, Gessler 1989).

Die polygenen Resistenzen werden ebenfalls zum Teil in Züchtungsprogrammen verwendet, so auch an der FAW. Dabei scheint es jedoch einige Probleme zu geben. So berichtet Lespinasse (1989), dass die Korrelation zwischen Blatt- und Frucht-Resistenz schlecht sei und dass in manchen Jahren die Bäume trotz Blatt-Resistenz behandelt werden mussten, um Frucht-Befall zu verhindern.

In der Schweiz befasst sich die Eidgenössische Forschungsanstalt Wädenswil mit der Apfelzüchtung. Dort wurden Sorten wie der "Schweizer Orangenapfel", "Maigold", "Goro", "Arlet", "Iduna" und "Marina" gezüchtet. Das Ziel für künftige Sorten ist unter anderem eine dauerhafte Krankheits-Resistenz, wobei die Schorf-Resistenz klare Priorität hat. 1986 wurde in Wädenswil mit der Züchtung krankheitsresistenter Apfelsorten begonnen. Die Strategie stützt sich nicht mehr ausschliesslich auf die Vf-Resistenz ab. Es werden also auch die anderen, unter Tabelle 1 aufgelisteten Resistenzquellen in das Programm einbezogen. Darüberhinaus sollen aber auch "polygene" Resistenzen (von alten und neuen Sorten) und neue Resistenzquellen, wie zum Beispiel *Malus zumi calocarpa*, miteinbezogen werden. Leider ist an der Forschungsanstalt Wädenswil das finanzielle Potential nicht vorhanden, um gänzlich neue Quellen zu erschliessen. Solche Resistenzquellen könnten aus den vermuteten Ursprungsgebieten des Apfels, Asien oder Kleinasien, stammen. Durch internationale Kontakte wird aber versucht, diesen Nachteil auszugleichen.

Ein weiteres Ziel des Wädenswiler Zuchtprogrammes ist die Kombination von Schorf- und Mehltresistenz in einer Apfel-Sorte. Ebenso wird auch an einer Pyramidisierung von verschiedenen Schorf-Resistenzen gearbeitet. Dies soll insbesondere durch die Anwendung molekularer DNA-Marker (in Zusammenarbeit mit der ETH Zürich) ermöglicht werden (Koller *et al.* 1994, Kellerhals and Gessler 1995). Molekulare Marker erlauben gegebenenfalls das systematische Screening von Kreuzungsnachkommenschaften auf das Vorhandensein der notwendigen Resistenzen beziehungsweise ihrer Marker. Ein solches Screening wäre ohne Marker praktisch nicht durchführbar, vor allem wegen des extremen Arbeits- und Zeitaufwandes, aber auch wegen Fehlens entsprechender Testrassen des Pathogens. Ein effizientes Screening erlaubt dem Züchter, Kreuzungen mit sehr grosser Nachkommenschaft zu machen. Schon früh könnte dann die Anzahl Pflanzen, die weiter kultiviert werden muss, wesentlich reduziert werden, da Individuen ohne die notwendigen Resistenz-Marker aussortiert würden. Dies ist wesentlich, denn nur in grossen Nachkommenschaften kann ein Individuum erwartet werden, dass viele der erwünschten Eigenschaften kombiniert. In der Regel sind aber die finanziellen und personellen Mittel zum Unterhalt einer solch grossen Anzahl Pflanzen nicht vorhanden.



## b) Mehltau

Im Gegensatz zu Schorf, wo im Prinzip kein Befall toleriert wird, kann beim Apfel-Mehltau ein gewisser Befall zugelassen werden, bevor Fungizide appliziert werden müssen. Der Apfel-Mehltau befällt vor allem die Knospen und Blätter, die Früchte hingegen kaum. Hingegen kann er die sogenannte Berostung der Früchte bewirken und verursacht somit eine geringe Qualitätsverminderung.

Einige alte Apfelsorten weisen eine niedrige Anfälligkeit gegen Mehltau auf. Diese scheint jedoch polygener Natur zu sein und ist schwierig aufzuspüren. Deshalb erscheinen Resistenzen von Wildsorten einfacher verwendbar zu sein.

**Tabelle 2.** Apfel-Arten und -Varietäten, die als Quellen von Mehltau-Resistenz verwendet werden (nach Lespinasse 1989).

---



---

<i>Malus robusta</i> 59/9	PL1
<i>Malus zumi</i> 68/5	PL2

“MIS” (Apfel-Hybrid unbekannter Abstammung)

“White Angel”

“David”

*M. x robusta* 5 “R5”

*M. x robusta* “Korea”

*M. x robusta* “24-7-7, 8”

MA-8 (Apfel-Hybrid unbekannter Abstammung)

*M. sargenti*

*M. zumi calocarpa*

*M. baccata jackii*

---

*Malus robusta* und *M. zumi* sind Träger von zwei - bisher dauerhaften - Resistenzen. Sie werden als P11 (*M. robusta*) und P12 (*M. zumi*) bezeichnet (Alston 1977). Unklar ist bisher, ob diese Resistenzen von einem oder mehreren Genen codiert werden. Bei seinen Rückkreuzungsversuchen fand Alston signifikante 3:5-Aufspaltungen (resistent:anfällig) in den Nachkommenschaften von 3 Kreuzungs-Generationen. Dies könnte dafür sprechen, dass in *M. robusta* und *M. zumi* jeweils zwei Resistenzgene vorhanden sind und dass die anfälligen Eltern der Kreuzungen heterozygot für eines dieser Gene sind. Ein Beweis dafür ist bisher jedoch noch nicht gefunden worden.

Dayton (1977) beschrieb eine Mehltaresistenz eines Interspezies-Hybriden unbekannter Abstammung und nannte sie “mildew immune selection” (MIS). Diese schien ein dominantes Resistenzgen (“major resistance gene”) zu tragen. Bei der Suche nach Mehltau-Resistenz-Quellen in *Malus*-Arten fanden Korban und Dayton (1983) Resistenzen in Nachkommenschaften von MA-8, *M. zumi calocarpa*, *M. sargenti* und *M. baccata jackii*. Für MA-8 und *M. sargenti* konnte in Feldtests ein einzelnes dominantes Resistenzgen ermittelt werden.

Schliesslich beschrieben Gallott *et al.* (1985) Mehltaresistenzen in Sämlingen der Apfelbäume “David”, “White Angel”, Robusta 5 und *M. x robusta* “Korea”. Der Vererbungsmodus dieser Resistenzen ist aber ungeklärt.

Ein grosses Problem bei der Verwendung dieser Mehltaresistenzen ist die Auswahl eventueller resistenter Nachkommen. Es zeigte sich nämlich, dass die Nachkommen unterschiedliche Mehltau-Anfälligkeiten in Gewächshaus, Baumschule und im Feld aufwiesen und dass deshalb Mehltau-Tests im Gewächshaus nicht sehr aussagekräftig

sind. Worauf dieser Effekt beruht, ist im Falle des Apfel-Mehltaus bis heute nicht geklärt, wohl aber für andere Wirt-Pathogen-Verhältnisse wie zum Beispiel Braunrost/Weizen. Ein Grund könnte eine Veränderung des Resistenzverhaltens mit zunehmendem Alter der Pflanzen sein. Einen viel entscheidenderen Einfluss hat aber sicher das für Infektionen im Gewächshaus verwendete Inokulum. Da der Echte Mehltau ein obligat biotropher Pilz ist, kann er nicht auf künstlichen Medien gezogen werden. Deshalb muss für künstliche Infektionen Inokulum von befallenen Pflanzen verwendet werden. Beispiele von anderen Echten Mehltaupilzen zeigen die hohe Variabilität von Mehltaupopulationen bezüglich ihrer Virulenzen auf (Brändle 1994). Durch das Sammeln von Inokulum erhält man deshalb nur ein gewisses Pathogenspektrum, welches sich aber vom Spektrum im Feld unterscheidet.

### c) Feuerbrand

Der durch das Bakterium *Erwinia amylovora* verursachte Feuerbrand stellt eine grosse Gefahr im Apfel- und Birnenanbau dar. In der Schweiz tauchte der Feuerbrand 1989 erstmals an Zierpflanzen auf und verursachte 1994 erstmals Schäden in einer Obstanlage beziehungsweise Baumschule. Im Jahr 1995 beliefen sich die Entschädigungen an Schweizer Bauern auf rund 1 Million Franken, wobei der Bund ca. 660'000 Franken übernahm.

Da im Pflanzenbau gegen Bakterien keine sinnvollen kurativen Bekämpfungen möglich sind (siehe Punkt 2a dieser Studie) und der Feuerbrand in kürzester Zeit einen ganzen Baum abtöten kann, muss bei *Erwinia*-Befall sofort der betroffene Baum entfernt beziehungsweise verbrannt werden. Der Einsatz von *Erwinia*-resistenten Sorten wäre demzufolge eine äusserst sinnvolle Massnahme gegen diese Krankheit.

Bereits 1868 begann man in Amerika mit resistenzzüchterischen Arbeiten gegen Feuerbrand (Fischer *et al.* 1983). Als Resistenzträger nennen Aldwinckle und Zwet (1979) *M. robusta*, *M. sublobata*, *M. atrosanguinea*, *M. prunifolia* und *M. fusca*. Ausgehend von Kreuzungsversuchen geht man davon aus, dass die Resistenz gegen *E. amylovora* polygen vererbt wird, wobei eine dominante additive Genwirkung wahrscheinlich ist (Korban *et al.* 1988).

In den resistenten *Malus*-Arten *M. robusta* 5 und *M. x sublobata* konnte ein dominantes Resistenzgen nachgewiesen werden (Gardner *et al.*, 1980). Diese Pflanzen sind jedoch nicht absolut resistent. Vielversprechend für Züchtungsprogramme scheinen einige zum Teil schorffresistente Sorten zu sein (Aldwinckle and van der Zwet, 1979). Lamb *et al.* (1979) gelang es mit der Sorte "Liberty", Schorf- und Feuerbrand-Resistenz zu kombinieren (Fischer *et al.* 1983).

Ziel der Resistenzzüchtung ist die Erzeugung von dauerhaft resistenten Sorten. Eine hohe Dauerhaftigkeit ist aber mit einzelnen Resistenzgenen kaum zu erreichen, da die Anpassung der Krankheitserreger die Erfolge der Züchtung oftmals zunichte macht. Es existieren verschiedene Ansätze, wie die Dauerhaftigkeit erhöht werden kann. Einerseits kann man Resistenzen pyramidisieren, worunter man die Erzeugung einer Pflanze mit mehreren, funktionell verschiedenen Resistenzen versteht. Hier stellt sich, speziell im Falle des Apfelschorfs, das Problem der Erkennung der Resistenzen in den Nachkommenschaften der Züchtungsprogramme, da oftmals die dazu geeigneten Krankheitserreger (noch) nicht vorhanden sind. Um dieses Problem zu lösen, können molekulare Marker eingesetzt werden (Koller *et al.* 1994). Eine andere Strategie berücksichtigt das Management der resistenten Sorten in der Praxis (Wolfe and Gessler 1992). Modellrechnungen zeigten, dass bereits eine Mischung von drei Sorten den Infektionsdruck wesentlich senkt (Blaise and Gessler 1994). Um diese Idee zu überprüfen, führt die Forschungsanstalt Wädenswil in Zusammenarbeit mit der Migros

die Forschungsanstalt Wädenswil in Zusammenarbeit mit der Migros einen Feldversuch durch, in welchem resistente Apfelsorten zusammen mit anfälligen Sorten in einer Mischanlage gepflanzt wurden (Kellerhals and Goerre 1995).

Solche Ansätze eines Resistenz-Managements müssten auch mit gentechnisch veränderten, krankheitsresistenten Sorten verfolgt werden, um einen raschen Resistenzdurchbruch zu verhindern.

## 5. Typisierung von durch Transformation entstehenden Apfel-Genomen

Der Begriff “transgen” bezeichnet den Zustand einer künstlichen Einführung genomischen Materials in einen Organismus. Er bezeichnet aber nicht die Herkunft der übertragenen DNA. Für Transformations-Arbeiten mit Äpfeln drängt sich jedoch eine Unterscheidung anhand des Ursprungs der dabei verwendeten Genmaterials auf, wobei hier im wesentlichen unterschieden wird zwischen Gattungseigenen und -fremden Genen.

### a) DNA aus *Malus x domestica*

In der konventionellen Züchtung wird versucht, erwünschte Eigenschaften von verschiedenen, bestehenden Kultursorten in neuen Sorten zu kombinieren, so zum Beispiel Lagerfähigkeit, Geschmack, Farbe, Wuchsform usw. Von einigen dieser Eigenschaften weiss man, dass sie monogen vererbt werden (Alston und Watkins 1975).

Die meisten wichtigen quantitativen Eigenschaften sind jedoch unter Kontrolle von mehreren Genen (Brown 1960), wobei die einzelnen Gene oft nur einen kleinen Effekt haben und ihre additive, manchmal auch synergistische Wirkung schliesslich den Phänotyp bestimmt. Solche Eigenschaften werden als “Quantitative Trait Loci” (QTL) bezeichnet. Genetische Analysen von QTLs und ihre Integration in ein Zuchtprogramm sind sehr aufwendig. Mit Hilfe einer detaillierten Genkarte könnten aber die Regionen, die zu quantitativen Merkmalen beitragen, kartiert werden. 1990 wurde das European Apple Genome Mapping Project (EAGMAP) gestartet (King *et al.* 1991). Ziel dieses Projektes ist die Erstellung einer Genkarte, mit deren Hilfe agronomisch bedeutsame Eigenschaften kartiert werden können. Dies ist die Grundlage für eine eventuelle spätere Transformation von Äpfeln mit den diese Eigenschaften kodierenden Genen.

Apfelsorten beispielsweise, die keine sogenannten “major gene resistance” (qualitative Resistenz) besitzen, weisen unterschiedliche Grade der Anfälligkeit gegenüber Schorf auf. Einige dieser Sorten werden sogar so wenig befallen, dass wesentlich weniger Fungizidbehandlungen appliziert werden müssen. Diese Resistenztypen unterscheiden sich von den qualitativen, aber vergänglichen (englisch: ephemeral) Resistenzen. Die Wirksamkeit letzterer Resistenzen ist davon abhängig, ob am Standort der Pflanze entsprechende, die Resistenz durchbrechende Pilzrassen vorhanden sind. Quantitative Resistenzen dagegen verhalten sich an verschiedenen Standorten ähnlich oder gleich. Man nimmt an, dass beim Apfel quantitative Resistenz polygen vererbt wird und die Summe von Effekten mehrerer bisher unidentifizierter “minor genes” ist.

Wie schon erwähnt ist die Einführung der agronomisch wichtigen Eigenschaften theoretisch auch durch die klassische Züchtung möglich, in der Praxis jedoch erweisen sich Faktoren wie Selbst-Inkompatibilität, hoher Grad an Heterozygotie und lange Generationszeit als grosse Hindernisse. Insbesondere im Falle des Apfels wird die Einführung polygen vererbter Eigenschaften äusserst schwierig. Die Transformation von Apfelbäumen mit den erwähnten Erbfaktoren und ihren Regulationsgenen könnte den “Züchtungsprozess” wesentlich beschleunigen. Es bleibt zur Zeit allerdings dahingestellt, ob die Transformation des Apfels mit mehreren Genen überhaupt realisierbar ist.

*Malus-domestica*-transgene Apfelbäume würden sich idealerweise, das heisst bei der Verwendung von R-Genen (siehe Kasten S. 28), also nur dadurch von konventionell gezüchteten unterscheiden, dass der Einbau der Erbfaktoren nicht durch homologe Rekombination geschah und dass (beim derzeitigen Stand der Technik) auch Selektions- und/oder Reporter-Gene miteingeschleust würden, die nicht vom Apfel stammten.

**Memorandum**

*“Defense-response genes” sind in allen Malus-Arten vorhanden, werden in der Regel aber nur bei Bedarf (Infektion) exprimiert. Eine Transformation von Apfelsorten, die auf die Verwendung solcher Gene abzielt, besteht deshalb im Endeffekt aus dem Verändern der natürlichen Regulation, zum Beispiel durch konstitutive Expression. Bei einer solchen Transformation muss mit physiologischen Veränderungen der Pflanze gerechnet werden. Diese haben wahrscheinlich negative Nebeneffekte, da sonst ja die Pflanze evolutiv diese Strategie bereits verfolgt hätte.*

*“Recognition-genes” (R-Gene) entstanden in der Natur in verschiedenen Genotypen von Malus. Durch die sexuelle Rekombination werden diese Gene in verschiedenen Kombinationen auftreten. Erst durch die Fixierung einzelner Genotypen durch den Mensch (Klon-Vermehrung) wurden diese Neukombinierungen verunmöglicht.*

*Durch den antropogenen Einbau von R-Genen in Apfelsorten ist demzufolge keine physiologische Veränderung der Sorte zu erwarten ausser der erfolgreichen Erkennung eines Pathogens.*

Schliesslich muss auch erwähnt werden, dass die Anzahl der Kopien der durch die Transformation eingeführten Gene nicht kontrolliert werden kann. Daraus ergibt sich die Frage eines eventuellen Gen-Dosis-Effektes. Denkbar wäre zum Beispiel, dass der Einbau bzw. die Expression mehrerer Kopien des eingeführten Genmaterials unerwünschte Nebeneffekte haben kann (siehe Kasten).

Zusammenfassend kann angenommen werden, dass von auf diese Art transformierten Apfelbäumen - im Vergleich zu den im Folgenden beschriebenen Möglichkeiten - das kleinste Risiko für Umwelt und Konsumenten ausgeht.

**b) DNA aus anderen *Malus*-Arten**

Insbesondere in der Resistenzzüchtung werden wilde *Malus*-Arten als Quelle von Resistenzen verwendet. Solche Einkreuzungen geschehen offenbar bei uns unter natürlichen Bedingungen nicht. Zumindest gibt es keine Informationen über wild vorkommende Äpfel mit Merkmalen von *Malus x domestica* in der Schweiz.

Apfelbäume, welche mit interspezifischem *Malus*-Genmaterial transformiert würden, entsprächen einem Züchtungsprodukt, welches aus einer mehrmals wiederholten Rückkreuzung resultiert. Dieses käme sogenannten “near isogenic lines” (NILs) gleich, wie sie in anderen landwirtschaftlichen Kulturen erzeugt werden, und hätten den Vorteil, dass infolge des wegfallenden Züchtungsschrittes keine unerwünschten Gene mitgeführt würden. Durch den Einsatz der Transformation könnte für diesen Typ der DNA-Quelle die “Züchtung” wesentlich beschleunigt werden im Vergleich zur konventionellen Züchtung. Allerdings ist eine eigentliche Integration des Ergänzungsmittels Transformation in ein Züchtungsprogramm unrealistisch. Vielmehr wird man versuchen, bisherige bewährte Apfelsorten mit zusätzlichen gewünschten Erbfaktoren zu transformieren, wobei es entscheidend ist, welcher Typ von Genen in der Transformation eingesetzt wird (siehe Kasten).

Im Fall des Apfels, der vegetativ vermehrt wird, ist eine Integration in ein Züchtungsprogramm nicht unbedingt notwendig, da die DNA-Integration in den “background” des neuen Organismus nicht durch Kreuzungen stabilisiert werden muss.

Jedoch muss auch hier festgehalten werden, dass der Einfluss des nicht-homologen DNA-Einbaus durch eine Transformation unbekannt ist, und unerwünschte Gen-Dosis-Effekte sind auch hier nicht auszuschliessen (siehe Punkt 5b).

### c) Nicht-*Malus*-DNA

Alle bisher getätigten Transformationen von Äpfeln benutzten Gattungs-fremde DNA, wobei keine *R*-Gene oder “defense-response genes” aus Pflanzen verwendet wurden. Das Einführen von solcher DNA ins Genom des Apfels wäre mit der konventionellen Züchtung natürlich nicht möglich. Dadurch entstehen neue interspezifische Gen-Kombinationen, über deren Effekte in der Natur man aufgrund der zu kurzen Erfahrungszeit keine Kenntnis hat. Insbesondere in diesem Falle müssten bezüglich ökologischen Auswirkungen und der Toxikologie besondere Untersuchungen zur Voraussetzung für eine praktische Verwendung gemacht werden.

Es ist an dieser Stelle zu bemerken, dass diese ausschliessliche Verwendung von Gattungs-fremder DNA nicht einem Zufall entspringt. Vielmehr stehen im Falle des Apfels momentan noch keine *R*-Gene oder “defense-response genes” - monogen oder polygen - für eine Transformation zur Verfügung, da diese noch viel zu wenig genau erforscht sind. Das zeigt, dass die technische Machbarkeit von Transformationen dem Wissen um die genetischen Grundlagen von Krankheitsresistenzen um vieles voraus ist. Hier sind also Massnahmen nötig, um zu diesem Grundlagenwissen zu gelangen, denn dies ist die Voraussetzung für den Einsatz von (dauerhaften) Krankheitsresistenzen in Transformations-Projekten.

Bei der Diskussion von unter diesen Abschnitt fallenden transgenen Pflanzen sollte noch unterschieden werden zwischen DNA aus anderen Pflanzen oder aus Nicht-Pflanzen, das heisst Tiere, Bakterien, Pilze und Viren. Wie unter Punkt 8 erwähnt, ist die öffentliche Akzeptanz zumindest in den USA für Pflanzen, welche mit DNA aus Nicht-Pflanzen transformiert wurden, relativ klein. Wesentlich grösser ist die Akzeptanz für Pflanze-zu-Pflanze transgene Produkte.

## 6. Beurteilung des toxischen Risikos von Apfeltransformationen

Bei allen Transformationen von Pflanzen werden Selektions- und/oder Reporter-Gene in das Genom der Pflanze mit eingeführt. Die Abschätzung möglicher toxischer Effekte dieser Gene und ihrer Produkte ist nicht auf die Verwendung bei Äpfeln limitiert und wird deshalb hier nicht weiter diskutiert.

### a) Transformationen mit *Malus*-DNA

Über die Genprodukte der unter Punkt 4 erwähnten Krankheitsresistenzgene gibt es bisher keine toxikologischen Untersuchungen. Es ist hier deshalb nicht möglich, allfällige toxische Risiken für Konsumenten direkt zu bestimmen. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine Verwendung dieser Gene kein toxisches Risiko beinhaltet. Wie unter Punkt 4 erläutert, ist eine absolute, vertikale Resistenz eine Frage der Erkennung der Pathogene seitens der Pflanze. Eine sinnvolle Transformation von Apfelpflanzen beinhaltet demnach die Verwendung der entsprechenden Erkennungs-Gene. Solche Gene sind in allen Apfelsorten bereits vorhanden, doch sind sie durch Pathogenrassen zum Teil umgangen beziehungsweise unwirksam gemacht worden. Gegen andere, avirulente Rassen aber wirken die Erkennungsfaktoren und die von ihnen ausgelösten Abwehrmechanismen immer noch. Trotzdem sind über Äpfel abgesehen von allergischen Reaktionen (siehe unten) keine toxischen Effekte bekannt.

Eine Veränderung der Expression von einzelnen "defense-response genes" könnte hingegen aufgrund eines Dosis-Effektes unvorhersehbare Auswirkungen haben. Denkbar wäre, dass die konstitutive Expression eines für ein antimikrobielles Toxin kodierendes Gen in allen Zellen des transformierten Organismus zu humantoxischen Konzentrationen führt.

### b) Transformationen mit Nicht-*Malus*-DNA

Unter den bisher durchgeführten Apfel-Transformationen sind für dieses Kapitel nur die Arbeiten von Norelli *et al.*, Dandekar *et al.* und James *et al.* von Interesse, da sie neben den allgemein gebräuchlichen Selektions- und Reporter-Genen Kanamycin-Resistenz, GUS und NOS auch andere Faktoren transferierten.

Dandekar *et al.* transformierten Apfelpflanzen mit dem *B. thuringiensis*-Endotoxin [CRYIA(c)]. Native, kristalline  $\delta$ -Endotoxine gelten als in keiner Weise humantoxisch (Saik *et al.* 1990). Es soll hier jedoch darauf hingewiesen werden, dass sich bei Versuchen mit alkalisch gelösten Endotoxinen jedoch eine cytotoxische Wirkung auf fünf Säugetier-Zellkulturlinien ergab (Thomas and Ellar 1983). Cheung *et al.* (1985) wiesen neuromuskuläre Effekte von alkalischen Toxinlösungen in Insekten und Mäusen nach, wobei die Reaktion der Mäuse ähnlich der Reaktion auf Botulin war. Bei Toxinen von *B. thuringiensis* var. *israelensis* lag der LD<sub>50</sub> (injiziert ins Haemocoel) für Mäuse bei  $1,31 \pm 0,23$  mg/kg Körpergewicht. Verfüttertes solubilisiertes Toxin zeigte bis 30 mg/kg Körpergewicht keine toxischen Effekte. Unter ungünstigsten Umständen kann also das ansonsten als harmlos erachtete BT-Toxin auch für Säugetiere toxisch sein. Ob solche Umstände aber beim Konsumieren von frischen oder verarbeiteten Äpfeln eintreten können, ist zur Zeit nicht abzuschätzen.

Das Endotoxin beziehungsweise *B. thuringiensis* ist schon seit langem als Pflanzenschutzmittel in der Schweiz zugelassen (Anonymous 1994). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Human-Toxizität des Genprodukts ausreichend geprüft wurde. Allerdings muss auf den Unterschied zwischen dem Einsatz des Toxins als Spritzmittel oder dessen Produktion durch die Pflanze selbst in allen Geweben, insbe-

sondere der Frucht, hingewiesen werden, insbesondere die Dosis des Toxins betreffend. Bei der Verwendung als Spritzmittel sind vor der Ernte Wartezeiten einzuhalten, während derer die Rückstandsmenge unter einen festgelegten Richtwert sinkt. Demgegenüber enthalten transformierte Früchte auch nach dieser Zeit noch das Toxin, und es würde in grösseren Mengen aufgenommen. Diesbezüglich könnten Verwundungsinduzierte Promoter-Gene eine Reduktion des Toxin-Gehalts bewirken.

Nach Dandekar (persönliche Mitteilung) mussten keine Experimente zur Abklärung der Human-Toxizität des CRYIA(c)-Produkts ausgeführt werden. Sie führten jedoch Tests mit Larven des Apfelwicklers durch, bei denen ein Teil der Larven mit transgenen Apfelblättern gefüttert wurde, die anderen mit untransformierten Blättern. Dabei wurde nur ein relativ geringer Unterschied der Sterblichkeitsraten gemessen. Seit der oben erwähnten Publikation wurden nun Transformationen mit synthetisch erzeugten Genen für CRYIA(c) durchgeführt. Mit diesen Pflanzen durchgeführte Toxizitätstests zeigten eine sehr hohe Larven-Sterblichkeitsrate.

Die Arbeit von James *et al.* befasste sich mit der Apfel-Transformation mit einem Trypsin-Inhibitor aus Spargelbohnen (Cowpea). Auch hier sind keine Daten erhältlich über eventuelle humantoxische Wirkungen. Um die Toxizität des Produktes für Insekten zu ermitteln, wurden Larven des Apfelwicklers (*Cydia pomonella*) und des Schalenwicklers (*Adoxophyes orana*) mit einem künstlichen Nährsubstrat gefüttert. Dieses enthielt bis zu 10 Prozent des aus Cowpea extrahierten Inhibitors. Es konnte jedoch bei keiner Konzentration ein toxischer Effekt festgestellt werden (James *et al.* 1992). Wie James ausführte (persönliche Mitteilung), bestätigte sich dieses negative Resultat auch bei Fütterungsversuchen von Larven mit transformierten Blättern.

Norelli *et al.* transformierten die Apfel-Unterlage M.26 mit einem Gen, welches für ein lytisches Protein, Attacin E, codiert. In der unter Punkt 1 angegebenen Literatur ist nichts über humantoxische Effekte des Genprodukts erwähnt. Nur sehr spärliche Angaben finden sich in der Bewertung des Antrags für Feldversuche der USDA/APHIS (Permit 92-365-07 for Field Testing Genetically Engineered Apple Trees). Darin wird lediglich gesagt, dass es wenige toxikologische Daten über Attacin gibt. Nach Boman und Hultmark (1987) ist eine toxische Wirkung von Attacin in Vertebraten nicht bekannt.

### c) Allergene Wirkungen

Spezielle Aufmerksamkeit sollte dem allergenen Potential von transgenen Äpfeln gewidmet werden. Es ist bekannt, dass Apfelsamen und -Früchte allgemein Allergene enthalten können. Diese wurden zum Beispiel aus der Sorte "Granny Smith" extrahiert (Björkstén *et al.* 1980). Man vermutet, dass die Allergene proteinartiger Natur sind, und man fand interessanterweise allergische Kreuz-Reaktionen auf Birken-Pollen-Allergenen. Es waren aber keine Daten zu finden, welche über allergenische Reaktionen im Zusammenhang mit Kreuzungen von Äpfeln mit anderen *Malus*-Arten berichten. Das Beispiel "Granny Smith" gibt hier keine Auskunft, da diese Sorte ein Zufalls-sämling ist, dessen Eltern unbekannt sind.

Das allergische Potential von interspezifischem Genmaterial, welches durch eine Transformation eingeführt würde, sollte durch herkömmliche Methoden bestimmbar sein.

Aus der Tatsache, dass auch arteigene Apfel-Gene allergen sein können, ergibt sich kein potentieller Unterschied zu transgenen Äpfeln. Allerdings werden in traditionellen Kreuzungen Regulatorgene und "linked genes" mitvererbt, was zur Zeit in Transformationen nicht berücksichtigt wird. Ein Dosis-Effekt ist in letzterem Fall also denkbar.



Es ergibt sich, dass - theoretisch - auch aus konventionellen Kreuzungen mit anderen *Malus*-Arten Nachkommen mit allergenem Potential hervorgehen können. Streng genommen müssten also auch die Produkte der konventionellen Apfelnzucht einer immunologischen Abklärung unterworfen werden, wenn dies für transgene Äpfel zur Bedingung gemacht wird, was wiederum notwendig erscheint, könnten doch die transgenen Genprodukte in ihrem neuen Organismus und dem unterschiedlichen Stoffwechsel unvorhersehbare immunologische Effekte bewirken.

## 7. Beurteilung des ökologischen und biologischen Risikos von Apfeltransformationen

Verlässliche Aussagen bezüglich ökologischer Auswirkungen transgener Äpfel auf die Umwelt sind sehr schwierig zu machen. Dies vor allem deshalb, weil über verschiedene Teilaspekte keine Literatur erhältlich ist, beziehungsweise noch keine Erfahrungen gemacht wurden. Folgende Überlegungen können dennoch gemacht werden:

Es konnten keine Arbeiten gefunden werden, die sich mit dem Auskreuzungspotential von *Malus x domestica* mit anderen Pflanzenarten befassen. Es ist jedoch erwiesen, dass viele *Malus*-Arten untereinander hybridisieren können, denn, wie unter Punkt 4 erwähnt, werden zum Beispiel viele *Malus*-Arten in Kreuzungsprogrammen als Resistenzquellen verwendet. Einige *Malus*-Arten, zum Beispiel *Malus aldenhamensis* oder *Malus hillieri*, werden darüber hinaus auch als Befruchter in kommerziellen Obstanlagen verwendet. Es ist unbekannt, in welchem Masse die bei uns natürlich vorkommenden Wildäpfel (*Malus sylvestris*) bereits mit kultivierten Äpfeln genetisch durchmischt sind. In der Schweiz kommt gemäss Welten und Sutter (1982) *M. sylvestris* ausser in den Bergregionen überall natürlich vor (Fig. 1).

**Fig. 1.** Verbreitung von *Malus sylvestris* in der Schweiz. Aus: Welten M. und Sutter R. 1982. Verbreitungsatlas der Farn- und Blütenpflanzen der Schweiz. Ed: Geobotanische Kommission - Schweizerische Naturforschende Gesellschaft Basel u.a. Birkhäuser.

Auch für die *Malus x domestica* wird angenommen, dass er aus der Verschmelzung verschiedener wilder Apfelarten entstanden ist, wenn auch die genaue Abstammung unbekannt ist (Korban und Skirvin, 1984). Encke *et al.* (1984) führen 29 *Malus*-Arten auf. Alle diese Arten bilden Sträucher oder Bäume. In Bezug auf eine mögliche unkontrollierte, unbeabsichtigte Verbreitung ist zu bemerken, dass keine dieser Arten eine Tendenz zur Verunkrautung zeigt.

Zusammenfassend muss also davon ausgegangen werden, dass Pollen von transgenen Apfelbäumen auf kompatible *Malus*-Arten gelangen kann und daraus Früchte mit keimfähigen Samen entstehen.

Es ist aber unklar, welche Bedeutung dieser Tatsache zukommt. In Mitteleuropa ist *Malus x domestica* nicht einheimisch und kommt, abgesehen von einigen Verwilderungen, nur kultiviert vor (Hegi 1908). In den Ursprungsgebieten des Apfels, in China und Nordamerika kann *M. x domestica* aber wild wachsen, weshalb sich dort, im Gegensatz zu der Schweiz, transgene Apfelpflanzen eventuell unbeabsichtigt und unkontrolliert etablieren könnten. Krankheiten scheinen nicht der primäre limitierende Faktor für die Verbreitung von *M. x domestica* zu sein. Unbewirtschaftete, sich selbst überlassene Apfelbäume zum Beispiel werden zwar von Krankheiten befallen, überleben aber trotzdem. Vielmehr wird eine natürliche Ausbreitung wohl durch die Standortanforderungen der Apfelpflanzen limitiert. Es ist deshalb nicht anzunehmen, dass eine unkontrollierte Kreuzung von Wildäpfeln mit Apfelpflanzen, die mit spezifischen Schorf-Resistenzgenen transformiert wurden, dem Wildapfel eine grössere Verbreitung erlauben würde.

Nicht bekannt ist, wie weit Pollen von *Malus x domestica* durch Bienen verbreitet wird. Wertheim (1991) untersuchte die Pollenverbreitung in Apfel-Intensivanlagen und fand, dass der Test-Pollen bis mindestens 40 m Entfernung (maximale Distanz der Tests) transportiert wird. Wertheim erwähnte nicht, dass auch in Hochstamm-Anlagen,

in denen Bäume oftmals weiter auseinanderstehen, die Blüten trotzdem befruchtet werden.

Schliesslich soll auch auf die Möglichkeit anthropogener Verbreitung von Apfelsamen hingewiesen werden. Dies könnte zu einer "Verschleppung" von transgenen Pflanzen in Gebiete führen, in denen *M. x domestica* auch wild verbreitet ist.

Die bisher durchgeführten Transformationen an Apfelbäumen befassten sich mit Resistenzen gegen Insekten oder Bakterien. Die dazu notwendigen Gene sind bereits kloniert und "erhältlich", was für pilzliche Pathogene weniger der Fall ist. Wie unter Punkt 4 erwähnt, werden die beiden wirtschaftlich und pathologisch bedeutsamsten Krankheiten von Pilzen verursacht. Wohl sind Gene (beispielsweise für Chitinasen) kloniert, welche eine gewisse Rolle in der Abwehr gegen Pilze spielen könnten.

Pflanzenspezifische, in Züchtungsprogrammen verwendete Resistenzgene gegen diese Krankheiten konnten aber bisher nicht kloniert werden. Sobald solche Gene aber zur Verfügung stehen, werden sie sicherlich in Transformations-Programmen verwendet werden, da sich mit diesen Resistenzen die grössten wirtschaftlichen Interessen verbinden. Unseres Erachtens birgt die Transformation von Apfelbäumen mit Genen anderer Äpfel keine grösseren ökologischen Risiken als jene, die von der traditionellen Züchtung ausgehen. Nachteilige ökologische Auswirkungen durch bisherige, konventionell gezüchtete Apfelsorten sind bisher nicht bekannt. Durch die gegenwärtig verfügbaren Techniken kann allerdings der Ort des Einbaus in das pflanzliche Genom nicht vorbestimmt werden. Dazu kommt, dass bisher die Regulation der eingeführten Gene durch Standard-Promoter-Sequenzen ausgeführt wird. Dies hat vermutlich Konsequenzen für den Phänotyp. Solange man aber die Genprodukte der Resistenz-vererbenden Gene nicht kennt, sind solche Auswirkungen auch nicht nachweisbar.

Im Fall von Apfel-Apfel-transgenen Bäumen wären also einzig die Selektions-Gene sowie die Promoter-Sequenzen transgenes Genmaterial. Das Gefahrenpotential der Verwendung dieser Erbinformationen ist aber nicht auf Arbeiten mit Apfelbäumen limitiert und wird deshalb hier nicht weiter diskutiert. Es wurden Methoden beschrieben, durch die die Selektions- und/oder Markergene wieder aus dem Zielorganismus entfernt werden können (Dale and Ow 1990, 1991). Die Methoden bedingen aber einen Selbst-Kreuzungs-Schritt, was beim Apfel generell nicht möglich ist.

Ein allgemeines Problem ist der Verbleib und die Auswirkungen von Resten transgener Pflanzen in der Umwelt. Transgene Produkte wie das Attacin E (siehe Punkt 2) könnten, da sie antimikrobiell wirken, verändernde Einflüsse auf die Boden-Mikroflora haben. Solche Einflüsse sind im Falle transgener Wurzelstöcke naheliegend, werden doch Wurzeln von einer Vielzahl von Organismen im Boden angegriffen und zersetzt, wodurch auch ansonsten zellgebundene Stoffe freigesetzt und verbreitet werden können. Spezielle Beachtung bei der Transformation von Unterlagen sollte den Mykorrhizza-Organismen geschenkt werden, wobei Bedenken bei der Verwendung von unspezifisch wirkenden, funktionellen Struktur-Resistenzgenen angebracht sind.

Der Einfluss von *Bacillus-thuringiensis*-Toxin auf Mikroorganismen im Boden wurde bereits von Donegan *et al.* (1993) untersucht. Dabei wurden signifikante Veränderungen in Pilz- und Bakterienpopulationen gefunden, wenn Pflanzengewebe einer Linie von BT-transgenen Baumwollpflanzen in Erde gemischt wurden. Gereinigtes Toxin, welches dem Boden zugegeben wurde, verursachte aber keine Veränderungen.

## 8. Beurteilung der ökonomischen Auswirkungen von Apfeltransformationen

Unter diesem Punkt sollen mögliche wirtschaftliche Auswirkungen genetisch veränderter Äpfel untersucht werden, wobei wir uns nur auf Auswirkungen auf den Produzenten beschränken können. Einflüsse auf die Volkswirtschaft werden an dieser Stelle nicht beurteilt.

Ob und wie stark künftige transgene Apfelsorten auf dem Markt eine Chance haben werden, steht und fällt mit der Akzeptanz beim Konsumenten. Gegenwärtig scheint in der Schweiz die Einstellung gegenüber solchen Produkten sehr negativ zu sein. Dies mag im Besonderen für Tafelobst gelten, das ja direkt konsumiert wird und nicht primär Ausgangsprodukt für industriell erzeugte Lebensmittel ist. Dabei spielt es eine entscheidende Rolle, ob transgene Produkte als solche deklariert werden müssen. Eine Deklaration beruht nach schweizerischer Gesetzgebung zur Zeit noch auf Freiwilligkeit, entsprechende Änderungen sind in Vorbereitung.

Die Akzeptanz für gentechnisch veränderte Lebensmittel wäre im Fall des Apfels vermutlich am grössten für Apfel-zu-Apfel-transgene Früchte gemäss Punkt 5a, evtl. 5b. Hoban und Kendall (1993) befragten Konsumenten in der USA bezüglich ihrer Meinung und ihrem etwaigen Kaufverhalten gegenüber gentechnisch veränderten Organismen. Zwei Drittel der Befragten hielten einen Planze-zu-Pflanze-Gentransfer für akzeptabel, während nur 25 % einen Tier-zu-Pflanze-Gentransfer akzeptieren würden, und nur 20 % der Befragten hielten einen Virus-zu-Pflanze-Gentransfer für annehmbar. Neben der Akzeptanz spielt natürlich das eigentliche Kaufverhalten eine wichtige Rolle. Fast 60 % der Befragten würden ein durch Biotechnologie erzeugtes Lebensmittel eher kaufen, wenn es 10 % billiger wäre als das konventionell erzeugte, dies unter Annahme von gleicher Qualität. Aber nur 40 % der Befragten würden ein biotechnologisch erzeugtes Produkt mit besseren Qualitätseigenschaften kaufen, wenn es 10 % teurer wäre als das konventionelle Erzeugnis.

Die Sicherheit gentechnologisch erzeugter Lebensmittel wurde von den von Hoban und Kendall befragten Konsumentinnen und Konsumenten als sehr wichtig beurteilt. Diese waren insbesondere besorgt über negative Langzeitauswirkungen und neue Allergene im Zusammenhang mit der Konsumation von transgenen Produkten.

Ein weiterer Faktor ist auch die Akzeptanz bei Produzenten und Obstverwertern. Jede Einführung einer neuen Apfelsorte bedingt eine gewisse Zeit, um Erfahrungen mit dieser Sorte zu sammeln. Bei der schorfresistenten Sorte "Florina" beispielsweise erkannte man, dass sie gut lagerfähig ist, wenn sie nach der Ernte sofort in kühler, kontrollierter Atmosphäre gelagert wird. Dagegen hat die Sorte nur ein sehr kurzes "shelf life" (Zeitraum zwischen Entnahme aus dem Lager und dem Verzehr) bevor der Apfel nicht weich beziehungsweise "mehlig" und somit vom Konsumenten schlecht bewertet wird. Diese Zeitspanne kann aber zwei Wochen übersteigen, was für die Sorte "Florina" bereits zu viel ist. Die Akzeptanz einer bewährten (z.B. "Golden Delicious" oder "Jonagold") aber transgen resistenten Sorte wäre aus diesen Gründen möglicherweise grösser.

Um mögliche ökonomische Auswirkungen transgener Pflanzen auf den Obstproduzenten abschätzen zu können, braucht es einige Informationen über die gegenwärtigen ökonomischen Verhältnisse der Obstbauern. Es ist äusserst schwierig, einfache und/oder allgemeingültige Angaben zu machen. Einerseits herrscht eine starke obstbauliche Vielfalt sowohl betreffend Obstarten und -Verwertungen als auch bezüglich des Anteils, welchen die Obstkulturen in den verschiedenen Betrieben einnehmen. Darüberhi-

naus schwanken Obstanlagen oft in ihrer Wirtschaftlichkeit. So gibt es Junganlagen mit niedrigerem Ertrag, Anlagen im Vollertrag sowie Anlagen mit sinkendem Ertrag. Die Eidgenössische Forschungsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau in Wädenswil führt seit 1947 betriebs- und arbeitswirtschaftliche Erhebungen im Obstbau durch. Die letzte Erhebung datiert vom Juli 1991 (Meli, 1991). Um für den Obstbau einigermaßen repräsentative Informationen zu erhalten, wurden 28 Betriebsergebnisse aus Vollertragsbeständen berücksichtigt. Die im folgenden gemachten zahlenmässigen Überlegungen basieren auf dieser Erhebung.

Der Einsatz von (transgenen) krankheitsresistenten Sorten bringt eine Reduktion der Produktionskosten im Bereich Pflanzenschutz mit sich. Die Pflanzenschutz-Kosten sind in der Studie von Meli nicht weiter aufgeschlüsselt. Sie betragen im Mittel zwischen 1985 - 1989 2248 Fr. pro Hektare und Jahr, was 11 Prozent der Produktionskosten und damit etwa gleichviel ausmacht wie Schnitt und Baumpflege. Am meisten Kosten verursachten Ernte/Transport/Kotierung mit rund 5000 Fr./ha x Jahr oder 25 % der Produktionskosten. In der Untersuchungszeit betragen die durchschnittlichen Produktionskosten 20423 Fr./ha x Jahr (inklusive Zinsen für Obstanlage und Boden) und der mittlere Rohertrag belief sich auf 20384 Fr./ha x Jahr. Dies mittlere Differenz von -39 Fr. pro Jahr und Hektare zeigt, dass der Erlös die Produktionskosten zu decken vermag. So berechnet hätte eine wesentliche Verringerung des Pflanzenschutzaufwandes durch den Einsatz von krankheitsresistenten Sorten einen spürbaren Einfluss auf diese Kostenbilanz.

Gemessen am mittleren Rohertrag von ca. 20000 - 30000 Fr. ist der Pflanzenschutz mit rund 2000.- Fr. ein relativ kleiner Kostenpunkt. Andererseits ist auch bei geringem Schorfbefall der Ertragsausfall schnell grösser als die Kosten für Pflanzenschutz. Das bedeutet für den Produzenten ein grosses finanzielles Risiko, wenn er Einsparungen beim Pflanzenschutz machen soll. Der Einsatz von krankheitsresistenten Sorten - ob konventionell gezüchtet oder transformiert - würde also dieses Risiko vermindern beziehungsweise aufheben.

Insgesamt muss bemerkt werden, dass Pflanzenkrankheiten den Apfelanbau in dem Sinne nicht limitieren, dass eine wesentliche Reduktion des Pflanzenschutzaufwandes eine Erweiterung der Obstbau-Betriebe oder -Betriebszweige erlauben würde. Krankheitsresistente Bäume würden aber die bisherigen Einkommensverluste durch Deklassierung befallener Früchte (Qualitätsminderung) einschränken. In der Integrierten Produktion rechnet man bei der Ernte durchschnittlich mit 5-8 Prozent schorfbefallenen Früchten, welche nur etwa 50 Prozent des Erlöses von Klasse-I-Äpfeln erzielen. Somit lässt sich der Einkommensverlust auf etwa 2-4 Prozent des Roherlöses beziffern.

Für die obstverarbeitende Industrie sind krankheitsresistente Sorten ebenfalls sehr interessant. Hersteller von Baby-Nahrung beispielsweise erlauben zum Teil keine Rückstände aus Pflanzenschutzmitteln in den Ausgangsprodukten. Dies ist mit konventionell behandelten Äpfeln aber nur schwer zu erreichen.

Schliesslich können durch krankheitsresistente Apfelsorten auch Lagerkrankheiten unterdrückt werden. Dies gilt wiederum insbesondere für Apfelschorf. Latente Schorfinfektionen können sich nämlich während der Lagerzeit auf den Früchten manifestieren und so eine wesentliche Minderung der Fruchtqualität bewirken, da, wie unter Punkt 3 erwähnt, jeglicher Schorfbefall zu einer Deklassifizierung und somit zu vermindertem Erlös führt. Eine gewisse Krankheitstoleranz und damit eine gemässigte Lockerung der Qualitätsansprüche könnte dem entgegenwirken.

Um Krankheitsbefall im Lager zu verringern, werden vor der Ernte sogenannte Abschluss-spritzungen appliziert. Diese sollen aber nicht nur Apfelschorf sondern auch Fäulniserreger unterdrücken wie *Pezicula alba*, *Gloeosporium perennans*, *Botrytis ci-*

*nera*, *Monilia fructigena* und *Nectria galligena*. Es ist unwahrscheinlich, dass Resistenzen gegen alle diese Krankheitserreger in einer Apfelsorte kombiniert werden können. Deshalb werden auch weiterhin Abschlussbehandlungen gemacht werden müssen. Hier ergäbe sich also durch krankheitsresistente Sorten vorerst keine Spritzmittelreduktion.

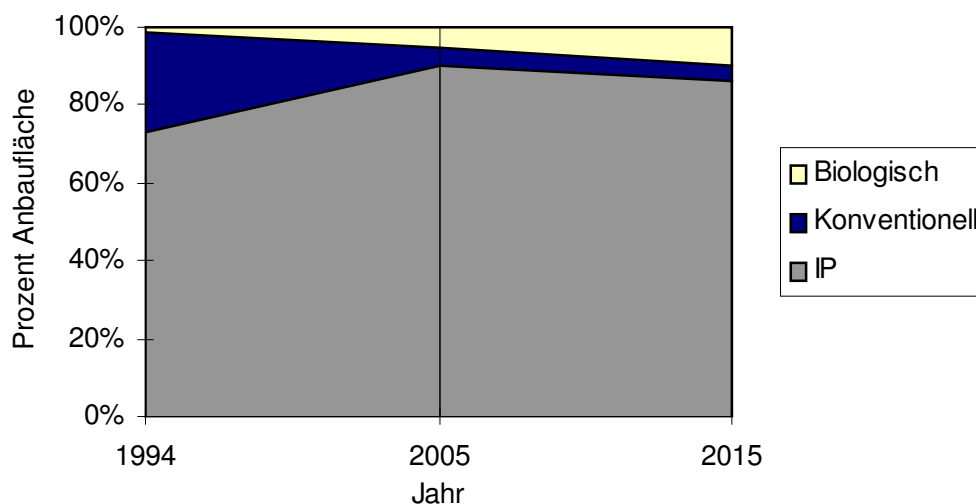
Unter Punkt 2 wurde erwähnt, dass bereits an der Unterdrückung der Ethylen-Synthese in Äpfeln gearbeitet wird. Die Lagerfähigkeit und das "shelf life" sind bei einigen Apfelsorten ein Problem. Die Unterdrückung der Reifung in Früchten von transgenen Bäumen könnte diese Situation ändern und einige "Problemsorten" dadurch lagerfähiger machen. Es sei hier auf das Beispiel "Florina" verwiesen.

Weitere Diskussionspunkte im Zusammenhang mit transgenen Apfelbäumen könnten auch der Sortenschutz, Lizenzgebühren und daraus entstehende zusätzliche Kosten sein. Für den Sortenschutz ergeben sich keine Unterschiede zu den bisherigen kommerziellen Sorten. Damit verbunden ist aber die Frage, wer allenfalls Apfelbäume transformieren könnte. Im Gegensatz zur traditionellen Züchtung, wo zur Selektion grosse Testflächen benötigt werden, können transgene Pflanzen im Labor erzeugt werden. Die dafür ausgerüsteten Labors und das notwendige Wissen sind an traditionellen Züchtungsanstalten nur zum Teil vorhanden. Es ist anzunehmen, dass private Erzeuger transgener Bäume auch Lizenzgebühren erheben würden, wodurch der Anschaffungspreis für den Produzenten unter Umständen wesentlich ansteigen könnte.

Das Problem des Schutzes geistigen Eigentums ("Intellectual Property Rights", IPR) betrifft nicht nur den Apfel und wird an dieser Stelle nicht behandelt.

## 9. Fallszenarien

Für alle Szenarien wurden folgende Grundannahmen getroffen: Ab dem Jahre 2005 stehen Hochqualitäts-Apfelsorten zur Verfügung, welche durch gentechnische Methoden krankheitsresistent gemacht wurden. Es existieren keine gesetzlichen Beschränkungen bezüglich Vertrieb und Verwendung dieser Sorten. Etwa 90 % der Äpfel in der Schweiz werden durch Integrierte Produktion hergestellt, die restlichen 10 % durch biologische Betriebe. Ein konventioneller Anbau existiert bis zu diesem Zeitpunkt kaum mehr (Fig. 2). Die Konsumenten halten an herkömmlichen Sorten fest, und traditionell gezüchtete resistente Sorten werden nicht in grösserem Umfang angebaut und/oder gekauft. **In den Fallszenarien werden deshalb transgen resistente Sorten mit anfälligen Sorten verglichen und nicht mit traditionell gezüchteten resistenten Sorten. Falls die traditionell gezüchteten resistenten Sorten (R-Sorten) zum gesagten Zeitpunkt einen bedeutenden Marktanteil beanspruchen können, werden die Marktchancen für transgene Sorten proportional reduziert.**



Figur 2. Entwicklung der Anbauflächen von Tafeläpfeln nach Produktions-System.

Für alle definierten Umfelder wurde des weiteren folgendes angenommen:

- Der biologische Landbau erlaubt keine transgenen Apfelsorten.
- Für den Import von transgenen Äpfeln werden keine Schutzzölle erhoben, für sie gelten aber die gleichen Auflagen wie für Schweizer Produkte.
- Der Anbau von transgen resistenten Äpfeln ist ökonomisch vorteilhaft. Einsparungen von ca. 5% der Produktionskosten sind möglich sowie in einzelnen Obstanlagen die Vermeidung von schorfbedingten Verlusten in der Höhe von 2-4 % des Roherlöses.

Für jeden geschilderten Fall wurde zusätzlich noch ein spezifisches Umfeld definiert, welches vor allem regulative Bedingungen beinhaltet wie zum Beispiel die Akzeptanz von transgenen Apfelsorten in der Integrierten Produktion sowie der eventuell damit verknüpften Leistung von Direktzahlungen durch den Bund. Basierend auf diesem Umfeld wurde die Reaktion von Produzenten, Handel und Konsumenten vermutet, und die Folgen dieser Reaktionen geschildert, insbesondere im Hinblick auf eine Marktchance

transgener Apfelsorten. Schliesslich wurde die Wahrscheinlichkeit des jeweiligen Umfeldes und/oder Szenarios beurteilt.

Es wurden fünf Fälle entwickelt, deren Umfeld die Entwicklung und/oder den Anbau von transgenen Apfelbäumen erlauben. In einem weiteren Fall könnte man davon ausgehen, dass dies gesetzlich verboten wird. In diesem Fall erübrigte sich aber Überlegungen über den Einstieg der Schweiz in die Transformations-Technologie, weshalb ein solches Szenario nicht detailliert aufgeführt wird.

## Erläuterung zur Darstellung der Fallszenarien

### Umfeld

Regulative Bedingungen unter besonderer Berücksichtigung der Akzeptanz von transgenen Apfelpflanzen in der Integrierten Produktion (IP) sowie der eventuell damit verknüpften Leistung von Direktzahlungen durch den Bund.

### Szenario

Vermutete Reaktion von Produzenten, Handel und Konsumenten aufgrund der im jeweiligen Umfeld definierten Bedingungen.

Schlussfolgerungen aus den oben geschilderten Reaktionen. Abschätzung der Marktchancen von transgenen Apfelsorten in dem jeweiligen Umfeld.

Beurteilung der Wahrscheinlichkeit des Eintretens des geschilderten Falles.



# Fall 1

## Umfeld

IP **erlaubt** transgene Äpfel.  
 IP von Äpfeln wird mit **Direktzahlungen** des Bundes gefördert.  
 Es existiert ein Label "IP-transgen".  
 Die **Deklaration** "Transgen" bei Lebensmitteln aus und von transgenen Organismen ist **obligatorisch**.

## Szenario a

Der Handel reagiert positiv. Die Vorteile des reduzierten chemischen Pflanzenschutzes werden herausgehoben.  
 Die wichtigsten Handelssorten können sowohl als "transgen resistant" als auch "normal" angebaut werden.  
 Anfangs genügt das Angebot der Nachfrage nicht.  
 Kritische Einstellung gegenüber transgenen Organismen dieses Typus (Gattungseigene Erkennungs-Resistenzgene) sind nicht oder nur gering vorhanden. Transgene Äpfel werden als "Öko-Apfel" beworben.  
 Es werden auch ausländische transgene Äpfel verkauft (Angebot gering). Preislich sind transgene Äpfel gleich wie herkömmliche Sorten.  
 IP ist grundsätzlich gut bekannt bei Konsumenten. Ein Grossteil der Konsumenten kennt die Problematik des Pestizideinsatzes in der Landwirtschaft im Allgemeinen sowie bei der Apfelproduktion im Speziellen.  
 Äpfel mit dem IP-Label werden gekauft.  
 Die "IP-transgen"-Äpfel werden zuerst aus Neugierde gekauft, später aus Überzeugung.

Innerhalb von etwa 10 Jahren nimmt das Marktsegment "IP-transgene Äpfel" schnell zu. Durch normale Rotation werden diese Sorten dann etwa 30 % der Anbaufläche ausmachen.

Das Szenario ist eher unwahrscheinlich, da die Integrierte Produktion transgene Äpfel solange nicht erlauben wird, wie für den Produzenten ökonomisch tragbare Alternativen bestehen.

## Szenario b

Der Handel reagiert negativ. Die Vorteile des reduzierten Pflanzenschutzes werden als unbedeutend eingestuft. Es herrscht eine globale kritische Einstellung gegenüber transgenen Organismen, und zwischen verschiedenen Typen der Transgenität wird nicht unterschieden.  
 Produzenten wollen nicht experimentieren, da sie befürchten, dass massive Kritik auf sie zukommt, und dass die Investition unrentabel ist, weil sie die transgenen Äpfel nicht verkaufen können.  
 Keine Nachfrage. Promotions-Veranstaltungen zeigen keine positive Wirkung (ablehnende Haltung der Konsumenten).

Die Anbaufläche stagniert bei einigen kleineren Versuchsflächen.  
 Forschung wird nicht gefördert, keine Priorität in Transgenik.

Das Szenario ist sehr wahrscheinlich, falls das Umfeld (Gesetz und IP-Richtlinien) wie beschrieben sein wird, wobei darauf hingewiesen werden muss, dass in diesen Szenarien traditionell gezüchtete R-Sorten nicht einbezogen sind.

## Fall 2

### Umfeld

Es gibt **keine Deklarationspflicht** von transgenen Produkten.

IP **erlaubt** transgene Äpfel.

Es existiert ein Label "IP-transgen".

IP von Äpfeln wird mit **Direktzahlungen** des Bundes gefördert.

### Szenario

Seitens Kritiker der Gentechnik werden grosse Anstrengungen unternommen, um Öko-Werbung zu unterbinden, welche die Pestizid-Einsparungen durch transgene Pflanzen hervorhebt.

Produzenten haben weniger Bedenken als in 1b, da der Verkauf von transgenen Äpfeln als IP-Produkt immer möglich ist. Nach einer Anlaufphase möchten die Produzenten auf transgene traditionelle Sorten umsteigen, weil die Vorteile für sie gross sind.

Schleichend werden transgene Produkte den Weg in den Alltag finden.

Grosse Bedeutung hat hier die Gewichtung des Vorteils des reduzierten Pflanzenschutzes. Bei positiver Bewertung resultiert ein Verlauf wie in 1a. Bei negativer Bewertung werden grosse Anstrengungen unternommen, um die Deklarationspflicht einzuführen und den Zustand von 1b zu erreichen. Langsamere Etablierung von transgenen Produkten auf dem Markt wegen Verunsicherung der Produzenten. Konsumentinnen und Konsumenten werden sich nicht äussern können, da sie die Produkte nicht unterscheiden können.

Das Szenario hat Gültigkeit bis zur Einführung einer Deklarationspflicht. Zur Beachtung: In diesen Szenarien werden traditionell gezüchtete R-Sorten nicht einbezogen.

## Fall 3

### Umfeld

IP **erlaubt keine** transgene Äpfel.

IP von Äpfeln wird mit **Direktzahlungen** des Bundes gefördert.

Die **Deklaration** "Transgen" bei Lebensmitteln aus und von transgenen Organismen ist **obligatorisch**.

### Szenario

Die Produktion von transgenen Äpfeln ist nur gegenüber dem konventionellen Anbau ökonomisch vorteilhaft. Obwohl gegenüber der IP (mit anfälligen Sorten) Ersparnisse von 5 % der Gesamtkosten resultieren, besteht wegen des Ausfalls der Direktzahlungen ein Nachteil.

Der konventionelle Anbau von Äpfeln ist unbedeutend geworden. IP-Produzenten steigen nicht auf den Anbau von transgenen Äpfeln um, da kein entsprechender ökonomischer Reiz vorhanden ist. Es kann sich kein Markt für transgene Äpfel etablieren. Dementsprechend entsteht keine öffentliche Diskussion über positive/negative Aspekte transgener Pflanzen, und die Bedeutung der Deklarationspflicht wird minim.

Das hier angenommene Umfeld entspricht am ehesten den zu erwartenden Bedingungen. Das sich daraus ergebende Szenario ist deshalb realistisch.

## Fall 4

### Umfeld

IP **erlaubt keine** transgene Äpfel.

Es werden an **keine Produktionsform** von Äpfeln **Direktzahlungen** des Bundes geleistet.

Die **Deklaration** "Transgen" bei Lebensmitteln aus und von transgenen Organismen ist **obligatorisch**.

### Szenario

Das Umfeld hat die gleichen Folgen wie das Umfeld 1. Es entsteht aber ein Konflikt zwischen IP und "transgenen"-Produzenten.

Kurzfristig wird die IP den Markt weiter bestimmen.

Die aus diesem Szenario resultierende Polarisierung zwischen IP und "transgenem Anbau" ist unerwünscht. Allerdings ist die Annahme, dass der Bund keinerlei Direktzahlungen an den Apfelanbau leistet, aus heutiger Sicht nicht zutreffend. Das Eintreffen dieses Szenarios könnte stark zur Förderung der traditionell gezüchteten R-Sorten führen.

## Fall 5

### Umfeld

IP **erlaubt** transgene Äpfel.

Es werden an **keine Produktionsform** von Äpfeln **Direktzahlungen** des Bundes geleistet.

Die **Deklarationspflicht** ist noch nicht gesetzlich geregelt.

### Szenario

Sollte eine Deklarationspflicht obligatorisch werden, entsprechen die Folgen dieses Szenarios den Szenarien 1a und b. Ohne eine Deklarationspflicht resultieren Folgen wie unter Szenario 2. Allerdings ist die Annahme, dass der Bund keinerlei Direktzahlungen an den Apfelbau leistet, aus heutiger Sicht nicht zutreffend.

## Zusammenfassung der Szenarien

Als entscheidender Faktor resultiert aus den Szenarien die Frage, ob die Integrierte Produktion die Anwendung transgener Pflanzen erlauben wird oder nicht. Die Entscheidung darüber wird stark davon abhängen, ob bis zum besagten Zeitpunkt (Jahr 2005) traditionell gezüchtete resistente Sorten von hoher Qualität zur Verfügung stehen beziehungsweise sich bereits auf dem Markt etabliert haben. Ist dies der Fall, sind die Chancen, dass transgene Äpfel einen bedeutenden Marktanteil einnehmen werden, gesamthaft niedrig. Andernfalls kann folgendes zusammengefasst werden:

- Werden transgene Apfelbäume in der Integrierten Produktion erlaubt, spielen Direktzahlungen des Bundes keine Rolle, hingegen kann die Deklarationspflicht einen Einfluss haben. Es ist schwierig abzuschätzen, wie sich die öffentliche Meinung bezüglich transgener Pflanzen entwickeln wird. Bei dieser Diskussion haben Äpfel und daraus hergestellte Lebensmittel aber keine Vorreiterrolle.
- Falls die IP transgene Pflanzen nicht erlaubt, ist es von Bedeutung, ob die IP durch Direktzahlungen des Bundes gefördert wird:
  - Werden keine Direktzahlungen geleistet, ist nicht anzunehmen, dass sich ein Markt für transgene Äpfel entwickeln wird.
  - Werden Direktzahlungen geleistet, resultiert eine Polarisierung zwischen den IP-Produzenten und den Befürwortern und Anwendern der transgenen Pflanzen, wobei letztere das Argument der "ökologischeren Produktion durch transgene Pflanzen" ausnützen. Eine Polarisierung ist aber als unerwünscht zu betrachten, da sie zu einer unsachlichen Diskussion und zur Verunsicherung der Konsumentinnen und Konsumenten führt.

*Bezüglich der öffentlichen Diskussion ist zu bemerken, dass auch optimistische Schätzungen mit mindestens 10 Jahren rechnen, bis marktreife transgene Apfelsorten zur Verfügung stehen. Es ist anzunehmen, dass die Diskussion über transgene Produkte bis dahin bereits fortgeschritten ist.*

## Schlussfolgerungen

Der Wunsch von Konsumentinnen und Konsumenten nach einem reduzierten Einsatz von Pflanzenschutzmitteln in der Lebensmittelproduktion wuchs in den letzten Jahren stark an. Im Erwerbs-Apfelanbau werden nach dem Getreide- und Rebbau am meisten Pflanzenschutzmittel eingesetzt. Der Einsatz von krankheitsresistenten Apfelsorten birgt demzufolge ein grosses Potential für die Reduktion von Fungiziden und Pestiziden.

Die Transformation von Apfelpflanzen mittels biotechnologischer Verfahren ist gemäss der zum Thema veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten möglich. Es kann davon ausgegangen werden, dass jede Apfelsorte nach Ermittlung der spezifischen Methoden transformiert werden kann. Die Arbeiten, welche ausser den Selektions- und Marker-Genen noch andere Gene transferierten, befassen sich mit Gattungsheterologen Genen. Gene für *Malus*-spezifische Resistenzen sind entweder noch nicht kloniert oder sind noch nicht identifiziert.

Es besteht eine Diskrepanz zwischen der verfügbaren Technik und dem derzeitigen Wissen um die genetischen Grundlagen von Krankheitsresistenzen. Auf dem Gebiet der Genomkartierung und Genlokalisierung wurden in letzter Zeit grosse Fortschritte gemacht. Für viele Eigenschaften des Apfels liegen heute molekulare Marker vor, wenn auch nur vereinzelt für Resistenz-relevante Gene..

Bei einer künftigen Verfügbarkeit von Resistenzgenen wird beachtet werden müssen, dass eine auf einem einzelnen Gen beruhende Resistenz von Krankheitserregern relativ schnell durchbrochen beziehungsweise unwirksam gemacht werden kann. Dieser Effekt ist von anderen Kulturpflanzen bekannt. Deshalb wird in der Zukunft auch in traditionellen Züchtungsprogrammen auf kombinierte Resistenzen vermehrt Gewicht gelegt werden.

Die Züchtung von Apfelsorten ist langwierig. Besonders die lange Generationszeit erschwert einen schnellen Züchtungsfortschritt. Die Züchtung der bislang kommerziell erfolgreichsten schorfresistenten Apfelsorte dauerte rund 60 Jahre. Eine Beschleunigung der Züchtung durch die Transformationstechnik ist denkbar. Sinnvoller ist es wohl, kommerziell bewährte aber krankheitsanfällige Sorten mit entsprechenden Erkennungs-Genen aus anderen *Malus*-Arten zu transformieren. Weil Äpfel vegetativ vermehrt werden, hat dieser Ansatz den Vorteil, dass das eingeführte Genmaterial im Genom des Apfels nicht durch Kreuzungen stabilisiert werden müsste. Bei Verwendung von Resistenz-Genen und Regulations-Sequenzen aus anderen *Malus*-Arten kann darüberhinaus auch von einem minimalen ökologischen und toxikologischen Risiko ausgegangen werden.

Eine Kulturpflanze mit einer Standzeit von mehreren Jahren bis Jahrzehnten macht stabile Eigenschaften der angebauten Pflanze - beispielsweise eine dauerhafte Resistenz - wünschenswert beziehungsweise zur Bedingung. Der Pflanzenschutz hat sich im Falle des Apfels in den kommenden Jahren vermehrt auf resistente Sorten abzustützen, seien sie nun traditionell gezüchtet oder gentechnisch verändert. Um die Dauerhaftigkeit der Resistenzen zu gewährleisten, werden allerdings auch kulturtechnische Massnahmen notwendig sein. Dabei könnten vor allem Sortenmischungen von grossem Nutzen sein. Untersuchungen dazu sind im Gange.

Die Einführung von molekularen DNA-Markern eröffnete in den letzten Jahren neue Perspektiven für die traditionelle Züchtung. Die Selektion von Kreuzungsnachkommen war bis anhin ein zeit- und arbeitsaufwendiger Schritt. Die Züchtung von Nachkommen mit kombinierten Resistenzen wird unter anderem dadurch verunmöglicht, dass die gewünschten Nachkommen nicht identifiziert werden können. Die sogenannte Marker-

unterstützte Züchtung erlaubt es dem Züchter, in Nachkommen die Präsenz der gewünschten Eigenschaften im gleichen Individuum festzustellen und so sein Züchtungsprogramm wesentlich zu beschleunigen.

Diese Punkte zeigen, dass zur Erzeugung von krankheitsresistenten Äpfeln die Transformations-Technik keine wesentlichen Vorteile bringt. Die traditionelle Züchtung ist imstande, praxisgerechte Sorten zu erzeugen. Erste Erfolge der noch relativ jungen Schweizer Resistenzzüchtung sind bereits vorhanden. Das Argument der Beschleunigung der Züchtung durch die Transformations-Technologie verliert im Falle des Apfels an Gewicht, da für jede neue Sorte eine Sortenprüfung vorgenommen werden muss, welche einige Jahre in Anspruch nimmt.

Der gezielte Einbau von Resistenzgenen in Marktsorten ist wünschenswert. Dabei erscheinen nur Transformationen mit *Malus*-eigenen Resistenzgenen (Erkennungsgenen) sinnvoll. Transformationen mit strukturellen Abwehrfaktoren hingegen scheinen ungeeignet. Um eine Beschleunigung der Züchtung beziehungsweise ihren Ersatz durch Transformation zu bewirken, müssen aber einige Vorbedingungen erfüllt werden. Der Apfel ist kein Modellorganismus für die Entwicklung der Transformations-Technologie. Die Erzeugung von transgenen Äpfeln geschieht nicht primär aus wissenschaftlichem Interesse, vielmehr sollen transgene Früchte in grösserem Massstab in der Landwirtschaft praktisch angebaut werden. Ein Einstieg der Schweiz in die Transformation von Apfelpflanzen scheint solange nicht sinnvoll, wie wirksame Resistenzgene nicht kloniert sind, ein gezielter DNA-Transfer nicht möglich ist und der Erfolg des Transfers von Resistenzgenen nicht erwiesen ist.

## Zusammenfassung

Im Auftrag des BATS (Biosicherheitsforschung und Abschätzung von Technikfolgen des Schwerpunktprogrammes Biotechnologie) sollten Technikfolgen von transgenen Äpfeln untersucht werden. Der Themenkatalog beinhaltete als Erstes die Erfassung der bisher publizierten Literatur auf diesem Gebiet sowie die Analyse ausgewählter Arbeiten. Danach wurde die Situation des Pflanzenschutzes im Schweizer Apfelanbau zusammengefasst, wobei dieser in "Integrierte Produktion" und "Biologischer Anbau" unterteilt wurde. Als nächstes wurden die in der traditionellen Züchtung verwendeten Krankheitsresistenzen beschrieben und diskutiert. Es folgten Analysen des toxischen Risikos, der ökologischen sowie der ökonomischen Auswirkungen. Schliesslich wurden die Informationen aus den vorherigen Punkten zu Fallszenarien verarbeitet.

Die bisher publizierte Literatur auf dem Gebiet transformierter Apfelpflanzen befasste sich in der Regel mit dem Gentransfer von Marker- und Selektions-Genen sowie der Regeneration der transformierten Gewebe zu ganzen Pflanzen. Zwei Arbeiten, in welchen noch weitere Gene transferiert wurden, werden weiterführend diskutiert. In der ersten Arbeit wurden Äpfel mit dem Gen für ein Protein (Attacin E) transformiert, welches die Zellwand vieler pflanzenpathogener Bakterien lysiert. Attacin-transgene Bäume hatten in Resistenztests eine erhöhte Resistenz gegen den Erreger des Feuerbrands, *Erwinia amylovora*, der sich in den letzten Jahren in der Schweiz zunehmend ausbreitete und lokal bedeutende Schäden in Obstkulturen verursachte. Bisher wurden nur eine als Unterlage verwendete Sorte transformiert. In der zweiten eingehender diskutierten Arbeit wurden Apfelpflanzen mit dem Gen für ein Toxin aus *Bacillus thuringiensis* transformiert, das für gewisse apfelschädigende Insekten giftig ist. Der praktische Nutzen eines BT-Toxin-transgenen Apfels wurde hier in Frage gestellt. Vor allem die bekannte, rasche Resistenzbildung von Insekten gegen das Toxin ist für eine mehrjährige Kultur mit langen Standzeiten ein grosses Problem.

Die Schilderung der gegenwärtigen Situation im Pflanzenschutz des Apfelanbaus wies auf das Potential hin, welches bezüglich Einsparungen ausgebrachter Pflanzenschutzmittel besteht. Das Beachten beispielsweise von Infektionsbedingungen im Feld führte in der Integrierten Produktion bereits zu einer Reduktion von Fungiziden. Der Einsatz von schorfresistenten Apfelsorten kann in der Zukunft diesen Effekt noch wesentlich verstärken. Insbesondere im biologischen Anbausystem haben resistente Sorten ein grosses Anbaupotential. Krankheitsresistente Apfelsorten sind als Resultat von (traditionellen) Züchtungsprogrammen bereits auf dem Markt erhältlich.

Bei der Beurteilung des toxischen Risikos von transgenen Äpfeln wurden die bereits unter Punkt 2 eingehender diskutierten Arbeiten behandelt. Für BT-Toxin-transgene Pflanzen wurde dabei kein Risiko gefunden, und über das lytische Protein Attacin E sind keine Daten verfügbar. Abgesehen von einem gewissen allergenen Potential von Apfelsorten konnten keine Berichte über toxische Wirkung von Äpfeln gefunden werden, also auch nicht im Zusammenhang mit Krankheitsresistenzen. Dennoch müsste das Risiko von transgenen Äpfeln jeweils erst ermittelt werden, mindestens solange die entsprechenden Kontrollgene nicht mittransformiert werden können.

Die ökologischen Auswirkungen von transgenen Apfelpflanzen waren schwierig zu beurteilen, da noch keine entsprechenden Erfahrungen vorliegen. Verschiedene Arten der Gattung *Malus* können untereinander hybridisieren. Hinweise auf wild vorkommende Hybriden von *M. x domestica* mit *M. silvestris* waren aber nicht zu finden. Keine der *Malus*-Arten zeigt eine Tendenz als Unkraut, was selbst bei einer ungewünschten Verwilderung keine unkontrollierte massenhafte Verbreitung befürchten lässt. Schliesslich kommt *M. x domestica* in der Schweiz nur selten verwildert vor. Das öko-



logische Risiko von Apfelpflanzen, die mit Resistenzfaktoren aus anderen *Malus*-Arten transformiert wurden, wird deshalb für die Schweiz als gering eingeschätzt. Insbesondere für Wildäpfel ist keine Beeinflussung der Konkurrenzfähigkeit anzunehmen, falls etwa spezifische, *Malus*-eigene Gene für Schorfresistenz unkontrolliert ausgekreuzt würden. Auf Einflüsse von solchen Pflanzen auf Gebiete, in denen der kultivierte Apfel heimisch ist, wurde hingewiesen.

Als nächstes wurden ökonomische Auswirkungen transgener Äpfel beschrieben. Für den Produzenten ergäben sich ähnliche Einsparungen, wie sie durch krankheitsresistente, traditionell gezüchtete Äpfel möglich sind. Ein wesentlicher Faktor in beiden Fällen ist die Dauerhaftigkeit der eingeführten Resistenz. Auf diesem Gebiet hat die traditionelle Züchtung bislang Vorteile. Erstens sind für den Apfel noch keine Resistenzgene kloniert worden und damit für eine Transformation verfügbar. Zweitens können durch traditionelle Kreuzung ausser den Hauptresistenzen ("major resistance genes") auch unterstützende, noch nicht genau bekannte Resistenzen mitvererbt werden.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die Technik der Transformation von Äpfeln dem Wissen um die genetischen Grundlagen von Krankheitsresistenzen wesentlich voraus ist. Eine Transformation mit diesen Resistenzen ist demnach vorderhand nicht möglich. Die Verwendung von einzelnen heterologen, nicht *Malus*-spezifischen Resistenzfaktoren ist bislang problematisch. Die Selektion für Krankheitserreger, welche diese Faktoren überwinden beziehungsweise durchbrechen können, ist besonders in Erwerbs-Obstanlagen sehr stark.

Um die Dauerhaftigkeit von Krankheitsresistenzen - ob traditionell oder gentechnisch eingeführt - zu erhalten, wird ausser dem Einsatz von entsprechenden Resistenzgenen auch ein Resistenz-Management nötig sein. Dieses umfasst zum Beispiel Strategien im Anbau wie Sortenmischungen. Daneben wird in der Literatur auch das Pyramidisieren von Resistenzen in einzelnen Sorten erwähnt.

Transgene krankheitsresistente Apfelpflanzen bieten nur dann einen Vorteil, wenn Produzenten und Konsumenten an den heutigen Hauptsorten festhalten. Die Gründe für ein solches Verhalten liegen in der heute noch mangelnden qualitativen und produktionstechnischen Wettbewerbsfähigkeit der traditionell gezüchteten resistenten Sorten. Können diese Nachteile aufgehoben werden, was bei geeigneter Förderung der traditionellen Züchtung zu erwarten ist, vermuten wir aufgrund der vorgebrachten Argumente, dass Produzenten, Handel und Konsumenten eher auf traditionelle R-Sorten umsteigen als auf transgene Sorten.

## Literatur

- Ai-Ping D., Hong-Fan W. and Yu-Fen Ch. 1995. Plant regeneration from cotyledon and cell suspension protoplasts of apple (*Malus x domestica* cv. Starkrimson). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40:145-149.
- Aldwinckle H.S. and van der Zwet T. 1979. Recent progress in breeding for fire blight resistance in apple and pear in North America. *Eppo. Bull.* 9:27-34.
- Alston F.H. 1977. Practical aspects of breeding for mildew (*Podosphaera leucotricha*) resistance in apple. *Proceedings of the Eucarpia Symposium on Tree Fruit Breeding, 1976, Wageningen*: p. 4-13.
- Alston F.H. and Watkins R. 1975. Apple breeding at East Malling. In: Brown A.G., Watkins R. and Alston F.H. (eds.): *Proceedings of the Eucarpia Fruit Section Symposium V, Canterbury 1973*: 14-29.
- Anderson J.R. 1978. Pesticide effects on non-target soil microorganisms. In: *Pesticide Microbiology*, ed. Hill I.R. and Wright S.J.L., Academic Press. p. 313-533.
- Anonymous. 1994. *Pflanzenbehandlungsmittel. Eidgenössische Forschungsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau Wädenswil (FAW) und FAP, RAC, WSL, BAG.*
- Beresford R.M. and Manktelow D.W.L. 1994. Economics of reducing fungicide use by weather-based disease forecast for control of *Venturia inaequalis* in apples. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 22:113-120.
- Bilang R. and Schrott M. 1995. Genetic Manipulation of Plant Cells. In: *Molecular Biology and Biotechnology*. R.A. Myers (ed.). VCH Publishers, New York.
- Binggeli C. 1994. *Bio-Obstmarkt Schweiz: Angebotsanalyse Tafelkernobst. Diplomarbeit ETHZ.*
- Björkstén F., Halmepuro L., Hannuksela M. and Lahti A. 1980. Extraction and properties of apple allergens. *Allergy* 35:671-677.
- Blaise Ph. and Gessler C. 1994. Cultivar mixtures in apple orchards as a mean to control apple scab? *Norwegian Journal of Agricultural Sciences* 17(Supplement):105-112.
- Boman H.B. and Hultmark D. 1987. Cell-free immunity in insects. *Ann. Rev. Microbiol.* 41:103-126.
- Brändle U.E. 1994. Studies on the genetic structure of local populations of *Erysiphe graminis f. sp. hordei marchal.* Diss. ETH Zürich Nr. 10859. pp. 65.
- Brown A.G. 1960. The inheritance of shape, size and season of ripening in progenies of cultivated apple. *Euphytica* 9:327-337.
- Bühler M. 1995. Reduktion der Fungizidbelastung in Obstanlagen: Einsatz einer standortbezogenen Bekämpfungsstrategie gegen den Apfelschorf (*Venturia inaequalis*). Diss. ETH Zürich, pp. 158.
- Cheng J.S., Dandekar A.M., Uratsu S.L. 1992. A preliminary study on *Agrobacterium*-mediated gene transformation in apple. *Acta Horticulturae Sinica* 19(2):101-104.
- Cheung P.Y.K., Roe R.M., Hammock B.D., Judson C.L. and Montague M.A. 1985. The apparent *in vivo* neuromuscular effects of the  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in mice and insects of four orders. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 23:85-94.
- Crandall C.S. 1926. Apple breeding at the University of Illinois. *Illinois Agric. Exp. Stn. Bull.* 275:341-600.
- Crowe A.D. 1975. "Nova Easygro" apple. *Fruit Varieties Journal* 29:76.
- Dale E.C. and Ow D.W. 1991. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:10558-10562.
- Dandekar A.M., McGranahan G.H., Uratsu S.L., Leslie C., Vail P.V., Tebbets S.T., Hoffmann D., Driver J., Viss P., James D.J. 1992. Engineering for apple and walnut resistance to codling moth. Brighton crop protection conference. *Pests and Diseases*. 2, 741-747.
- Dayton D.F. 1977. Genetic immunity to apple mildew incited by *Podosphaera leucotricha*. *HortScience* 12:225-226.

- De Bondt A., Eggermont K., Druart P., Vil M. de, Goderis I., Vanderleyden J., Broekaert WF. 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Bork.): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. *Plant Cell Reports* 13:587-593.
- Donegan K.K., Fieland V.J. and Seidler R.J. 1993. Quantitative and qualitative effects of decomposing transgenic plants on soil microorganisms. 93rd general meeting of the american society for microbiology: 386(abstract Q-219).
- Engström Å., Xanthopoulos K.G., Boman H.G. and Bennich H. 1984. The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 3: 3347-3351.
- Fischer C., Fischer M., Schaefer H.J. and Ficke W. 1983. Erste Ergebnisse der Resistenzzüchtung gegen Feuerbrand, *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al., bei Kernobst. Tagungsbericht Akad. Landwirtsch.-Wiss. DDR, Berlin. 216:499-507.
- Fried P.M., Barben H., Keller S., Müller M.D., Winzeler H., Winzeler M. and Weisskopf P. 1993. Expertise betreffend Möglichkeiten des Einsatzes biotechnologischer Methoden zur Erhöhung der Resistenz gegen Krankheiten und Schädlinge wichtiger Kulturpflanzen der Schweiz. Schweizerischer Nationalfonds. Bern. pp. 86.
- Gallott J.C., Lamb R.C. and Aldwinckle H.S. 1985. Resistance to powdery mildew from some small-fruited *Malus* cultivars. *HortScience* 20:1085-1087.
- Gessler C. 1989. Genetics of the interaction *Venturia inaequalis* - *Malus*: the conflict between theory and reality. In Gessler, Butt and Koller (eds): Integrated control of pome fruit diseases II, OILB-WPRS Bulletin XII/6:168-190.
- Gardner G.G., Cummins J.N. and Aldwinckle H.S. 1980. Inheritance of fire blight resistance in *Malus* in relation to rootstock breeding. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105:912-916.
- Gatehouse A.M.R., Shi Y., Powell K.S., Brough C., Hilder V.A., Hamilton W.D.O., Newell C.A., Merryweather A., Boulter D. and Gatehouse J.A. 1993. Approaches to insect resistance using transgenic plants. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 342:279-286.
- Götz G. and Silbereisen R. 1989. Obstsorten-Atlas. Ulmer Verlag Stuttgart.
- Gould F., Martinez-Ramirez A., Anderson A., Ferre J., Silva F.J. and Moar W.J. 1992. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7986-7990.
- Häseli A., Niggli U., Bosshard E. und Schüepp H. 1995. Pflanzenschutz im biologischen Obstbau - Eine Zustandsanalyse. *Schweiz. Z. Obst-Weinbau* 2:36-39.
- Häseli A. und Bosshard E. 1994. Schlussbericht zum Projekt "Förderung von Methoden des biologischen Apfelanbaues 1985-1993". FAW Wädenswil und Forschungsinstitut für biologischen Landbau Oberwil. pp. 162.
- Hegi G. *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. 1908. J.F. Lehmann Verlag, München. IV/2:743.
- Hoban T.J. and Kendall P.A. 1993. Consumer attitudes about food biotechnology. North Carolina Cooperative Extension Services. Raleigh, N.C.
- Hough L.F., Shay J.R. and Dayton D.F. 1953. Apple scab resistance from *Malus floribunda* Sieb. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 62:805-820.
- James D.J., Passey A.J., Barbara D.J., Bevan M. 1989. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Reports* 7:658-661.
- James D.J., Passey A.J., Easterbrook M.A., Solomon M.G., Barbara D.J. 1992. Progress in the introduction of transgenes for pest resistance in apples and strawberries. *Phytoparasitica* 20(suppl.):83-87.
- James D.J., Passey A.J., Webster A.D., Barbara D.J., Dandekar A.M., Uratsu S.L., Viss P. 1993. Transgenic apples and strawberries: advances in transformation, introduction of genes for insect resistance and field studies of tissue cultured plants. *Acta Horticulturae* 336:179-184.
- James D.J., A.J. Passey, S.A. Baker. 1994. Stable gene expression in transgenic apple tree tissues and segregation of transgenes in the progeny - Preliminary evidence. *Euphytica* 77(1-2):119-121.

- Jaynes J.M., Nagpala P., Destéfano-Beltrán L., Huang J.H., Kim J., Denny T. and Cetiner S. 1993. Expression of a Cecropin B lytic peptide analog in transgenic tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Science* 89:43-53.
- Kellerhals M. 1989. Breeding disease resistant apple cultivars in Switzerland. In Gessler, Butt and Koller (eds): Integrated control of pome fruit diseases II, OILB-WPRS Bulletin XII/6:130-136.
- Kellerhals M. and Gessler C. 1995. Apfelzüchtung vor neuen Herausforderungen. *Agrarforschung* 2(2):61-64.
- Kellerhals M. and Goerre M. 1995. Projekt Resistenzzüchtung Kernobst - Zwischenbericht IX. FAW Wädenswil. pp. 14.
- King G. J., Alston F.H., Battle I., Gessler C., Janse J., Lindhout P., Manganaris A.G., Sansavini S., Schmidt H. and Tobutt K.. 1991. The "European Apple Genome Mapping Project" - developing a strategy for mapping genes coding for agronomic characters in tree species. *Euphytica* 56:89-94.
- Koller B., Gianfranceschi L., Seglias N., McDermott J., Gessler C. 1994. DNA-markers linked to the *Malus floribunda* 821 scab resistance. *Plant Molecular Biology* 26:597-602.
- Korban S.S. and Dayton D.F. 1983. Evaluation of *Malus* germplasm for sources of resistance to powdery mildew. *HortScience* 18:219-220.
- Korban S.S. und R.M. Skirvin. 1984. Nomenclature of the cultivated apple. *Hort. Science* 19(2):177-180.
- Korban S.S., Ries S.M., Klopmeier M.J., Morrisey J.F. and Hattermann D.R. 1988. Genotypic responses of scab-resistant apple cultivars/selections to two strains of *Erwinia amylovora* and the inheritance of resistance to fireblight. *Ann. appl. Biol.* 113:101-105.
- Lamb R.C., Aldwinckle H.S., Way R.D. and Terry D.E. 1979. "Liberty" apple. *Hort. Science* 14(6):757-758.
- Lambert C., Tepfer D. 1992. Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create transgenic apple trees having an altered organogenic response to hormones. *Theoretical and Applied Genetics* 85:105-109.
- Lespinasse Y. 1989. Breeding pome fruits with stable resistance to diseases. In Gessler, Butt and Koller (eds): Integrated control of pome fruit diseases II, OILB-WPRS Bulletin XII/6:100-115.
- Maheswaran G., Welander M., Hutchinson J.F., Graham M.W., Richards D. 1992. Transformation of apple rootstock M26 with *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Plant Physiology* 139(5):560-568.
- Meli T. 1991. Kosten und Erträge in Tafelapfelanlagen. Eidgenössische Forschungsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau, Wädenswil. pp. 28.
- Mooney P.A., Goodwin P.B. 1989. Presumptive transformation of apples by co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Horticulturae* 240:59-61.
- Momol M.T., Norelli J.L., Cummins J.N., Momol E.A. and Aldwinckle H.S. 1994. Increased resistance to *Erwinia amylovora* of Attacin E-transgenic M.26 apple rootstock in a field trial. *Phytopathology* 84(11): 1373.
- Morgan J. and Richards A. 1993. The book of apples. Ebury Press. London. pp. 304.
- Norelli J.L., H.S. Aldwinckle, L. Destéfano-Béltran, J.M. Jaynes. 1994. Transgenic "Malling 26" apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. *Euphytica* 77(1-2): 123-128.
- Parisi L., Lespinasse Y., Guillaumes J. and Krüger J. 1993. A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the Vf gene. *Phytopathology* 83(5):533-537.
- Patat-Ochatt E.M., Ochatt S.J., Power J.B. 1988. Plant regeneration from protoplasts of apple rootstocks and scion varieties (*Malus x domestica* Borkh.). *Journal of Plant Physiology* 133:4, 460-465.
- Penrose L.J. 1995. Fungicide use reduction in apple production - potentials or pipe dreams? *Agriculture, Ecosystems and Environment* 53(3):231-242.
- Saik J.E., Lacey L.A. and Lacey C.M. 1990. Safety of microbial insecticides to vertebrates - Domestic animals and wildlife. In: Safety of microbial insecticides. Laird, Lacey and Davidson (eds.). CRC Press Inc. Florida. p. 115-132.

- Schuermann P.L. und Dandekar A.M.. 1991. Potentials of woody plant transformation. Subcellular Biochemistry, Volume 17: Plant Genetic Engineering. Biswas and Harris (editors). Plenum Press, New York. p. 81-105.
- Schweizerischer Obstverband. 1995. Jahresbericht 1993/94. pp. 100.
- Schweizerische Gesellschaft für Chemische Industrie. 1995. Switzerland and the Principality of Liechtenstein: Plant Protection Products - Market Statistics 1988-1994. SGCI Zürich. pp. 11.
- Shay J.R. and Hough L.F. 1952. Evaluation of apple scab resistance in selections of *Malus*. Amer. J. Bot. 39:288-297.
- Sriskandarajah S., Goodwin P.B., Speirs J. 1994. Genetic transformation of the apple scion cultivar "Delicious" via *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36:317-329.
- Terras F.R.G., Eggermont K., Kovaleva V., Raikhel N.V., Osborn R.W., Kester A., Rees S.B., Torrekens S., Vanleuven F., Vanderleyden J., Cammue B.P.A. and Broekaert W.F. 1995. Small Cysteine-rich antifungal proteins from Radish - their role in host defense. Plant Cell. 7(5):573-588.
- Thomas W.E. and Ellar D.J. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal  $\delta$ -endotoxin: Effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. J. Cell Sci. 60:181-197.
- Trifonova A., Savova D., Ivanova K. 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of the apple cultivar Granny Smith. Progress in Temperate Fruit Breeding (Schmidt and Kellerhals, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. p. 343-347.
- USDA/APHIS. 1991. Permit 91-218-03. Environmental assessment and finding of no significant impact. pp. 34.
- USDA/APHIS. 1993. Permit 92-365-07 for Field Testing Genetically Engineered Apple Trees. Environmental Assessment. United States Department of Agriculture. pp. 9.
- USDA/APHIS. 1994. Permit 94-039-03 for Field Testing Genetically Engineered Apple Trees. Environmental Assessment. United States Department of Agriculture.
- Vereinigung schweizerischer biologischer Landbau-Organisationen. 1992. Richtlinien für die Erzeugung, Verarbeitung und den Handel von Produkten aus biologischem (ökologischem) Anbau. pp. 45.
- Wearing C.H. and Hokkanen H.M.T. 1994. Pest resistance to *Bacillus thuringiensis*: Case studies of ecological crop assessment for *Bt* gene incorporation and strategies of management. Biocontrol Science and Technology 4:573-590.
- Wearing C.H. and Hokkanen H.M.T. 1995. Pest resistance to *Bacillus thuringiensis*: ecological crop assessment for *Bt* gene incorporation and management strategies. In: Biological Control: Costs and benefits. Hokkanen and Lynch (eds.). Cambridge University Press, Cambridge. p. 236-252.
- Welten M. und Sutter R. 1982. Verbreitungsatlas der Farn- und Blütenpflanzen der Schweiz. Ed: Geobotanische Kommission - Schweizerische Naturforschende Gesellschaft Basel u.a. Birkhäuser. 2 Bände.
- Wertheim S.J. 1991. *Malus* cv. Baskatong as an indicator of pollen spread in intensive apple orchards. Journal of Horticultural Science 66(5):635-642.
- Williams E.B. and Kuç J. 1969. Resistance in *Malus* to *Venturia inaequalis*. Ann. Review of Phytopathology 7:223-246.
- Wolfe M.S., and C. Gessler. 1992. Resistance genes in breeding: epidemiological considerations. In: Boller, Meins (eds), Plant gene research, vol. 8. Genes involved in plant defense. Springer Verlag, Wien. p. 3-23.
- Yao J.L., Cohen D., Atkinson R., Richardson K., Morris B. 1995. Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala. Plant Cell Reports 14:407-412.
- Zander R. 1984. Handwörterbuch der Pflanzennamen. Encke, Buchheim und Seybold (Editors). Ulmer Verlag Stuttgart. pp. 769.

## Adressliste

Die Adressen von Personen, von welchen für diese Studie persönliche Mitteilungen stammten, sind im folgenden aufgelistet.

H. Aldwinckle, Agric. Exper. Station Geneva, NY, USA.

A.M. Dandekar, Dept. of Pomology, University of California at Davis, CA, USA.

J. A. Driver, Dry Creek Laboratories, Modesto, CA, USA. Tel: (209) 521 6217.

L. Gianfranceschi, Institut für Pflanzenwissenschaften, Universitätstr. 2, 8092 Zürich.

D. James, HRI East Malling, Kent ME19 6BJ, UK.

J.L. Norelli, 114 Barton Lab, Agric. Exper. Station Geneva, NY, USA.