

**Die Verwendung molekularbiologischer Technologien
zur Erzeugung von Wirtsresistenz gegen
Schadenserreger:**

**Mögliche Folgen bezüglich einer Anpassung der
Krankheiten und Schädlinge**

Robert Blatter und Martin S. Wolfe

Eidgenössische Technische Hochschule (ETH)
Institut für Pflanzenwissenschaften
Bereich Phytomedizin, Gruppe Pathologie
LFW, Universitätsstrasse 2
CH-8092 Zürich

November 1995

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. KRANKHEITSRESISTENZ	3
3. DER ANWENDUNGSBEREICH DER MODERNEN MOLEKULARBIOLOGIE	7
4. KRANKHEITS- UND SCHÄDLINGSRESISTENZ MITTELS GENTECHNOLOGIE	10
4.1. Transformationstechnologie	10
4.1.1. Transformation mittels <i>Agrobacterium</i>	10
4.1.2. Transformation mittels 'Biolistics'	10
4.1.3. Transformation von Plastiden	11
4.1.4. Menge der eingebauten DNA	11
4.2. Resistenzgene	12
4.2.1. Resistenz gegen Virusinfektionen	12
4.2.2. Resistenz gegen Bakterieninfektionen	14
4.2.3. Resistenz gegen Pilzinfektion	16
4.2.4. Resistenz gegen Insekten	19
4.3. Probleme der Anwendung in der Praxis	20
5. FALLBEISPIEL B.T.-TOXIN IN PFLANZEN	22
5.1. B.t.-Toxin	22
5.2. Strategien des Resistenz-Managements	23
5.2.1. Alternierender Einsatz von B.t.-Toxin mit anderen Massnahmen	23
5.2.2. Alternierender Einsatz von verschiedenen B.t. Toxinen	24
5.2.3. Gleichzeitiger Einsatz von verschiedenen B.t. Toxinen	24
5.2.4. Refugien	25
5.2.5. Zeitlich limitierte Toxinexpression	26
5.2.6. Erfolgchancen in der Praxis	26
5.2.7. Regionale Unterschiede	26
5.3. B.t. exprimierende Pflanzen zur Bekämpfung des Kartoffelkäfers	27
5.4. B.t. exprimierende Pflanzen zur Bekämpfung des Maiszünslers	28
6. EINFLUSS ODER RISIKOANALYSE DER TRANSGENEN PFLANZEN	31
6.1. Sicherheitsfragen bezüglich Virusresistenz	31
6.1.1. Heteroenkapsidierung	31
6.1.2. Rekombination	31
6.2. Ökologische Auswirkungen	32
7. KURZBEURTEILUNG DER KULTUREN	38

7.1. Kartoffel	38
7.1.1. Krankheiten	38
7.1.2. Schädlinge	41
7.2. Mais	41
7.2.1. Krankheiten	41
7.2.2. Schädlinge	41
7.3. Raps	42
7.3.1. Krankheiten	42
7.3.2. Schädlinge	43
7.4. Weizen	44
7.4.1. Krankheiten	44
7.4.2. Schädlinge	45
7.5. Zuckerrüben	46
7.5.1. Krankheiten	46
7.5.2. Schädlinge	46
8. ALLGEMEINE AGRONOMISCHE ÜBERLEGUNGEN	47
8.1. Merkmale von gentechnisch erzeugter Krankheits- und Schädlingsresistenz	47
8.2. Der strategische Ansatz der Krankheits- und Schädlingsbekämpfung	47
8.3. Strategien im Einsatz von genetisch modifizierten Varietäten	48
8.4. Biologischer Landbau	50
8.5. Generelle Bemerkungen	50
9. HAUPTSCHLUSSFOLGERUNGEN	52
10. LITERATUR	54

1. Einleitung

Resistenz gegen biologische Stressfaktoren, besonders gegen Krankheiten und Schädlinge, ist ein wichtiger Faktor, welcher in der Pflanzenzüchtung und in der Landwirtschaft berücksichtigt werden muss. In gewissen Fällen können Krankheiten oder Schädlinge wegen den an den Pflanzen entstehenden Schäden den wichtigsten limitierenden Faktor im Pflanzenbau bilden, wie z.B. der Kraut- und Knollenfäule der Kartoffel in feuchten Regionen. Wird das Produkt direkt konsumiert, wie z.B. der Apfel, kann dieses schon durch einen geringen Befall wertlos werden, da bereits kleine Schäden eine Vermarktung verunmöglichen können. In den letzten Jahren hat die Bedeutung der Krankheits- und Schädlingsresistenz weiter zugenommen, auf Grund von Forderungen der Öffentlichkeit, welche auf eine Reduktion oder auf einen völligen Verzicht des Pestizideinsatzes in der Landwirtschaft abzielen.

Moderne Kultursorten benötigen daher ein hohes Niveau an Resistenz gegen die wichtigsten Krankheiten und Schädlinge. Die Resistenz sollte einerseits stabil (d.h. wirksam unter verschiedenen Umweltbedingungen), und andererseits dauerhaft sein (d.h. wirksam gegen eine Selektion virulenter Krankheiten oder Schädlinge). Leider kann es äusserst schwierig sein, diese Ziele in einer Resistenz zu erreichen. Bei gewissen Krankheiten und Schädlinge sind keine ausreichenden Resistenzen in konventionellen Quellen bekannt. Gewisse Formen von Schädlingsresistenz können unter Umweltbedingungen, welche das Pathogen stark begünstigen, unwirksam werden. Die Dauerhaftigkeit einer Resistenz kann nur erkannt werden, wenn diese im praktischen Anbau unter Beweis gestellt wurde. Es gibt keine Möglichkeit die Dauerhaftigkeit einer Resistenz vorauszusagen, besonders, wenn es sich dabei um neue Mechanismen oder neue Quellen handelt. Erfolge, welche durch Resistenzzüchtung erreicht werden können, sind häufig das Resultat eines zeit- und arbeitsintensiven Screenings in Zuchtprogrammen, was die Menge der Varietäten, welche erzeugt werden können, einschränkt.

Die Gentechnologie bietet nun in einem schnell zunehmenden Masse neue Ansatzmöglichkeiten für Krankheits- und Schädlingsresistenz. Das Ziel dieser Expertise ist es, den gegenwärtigen Stand der Entwicklung zu erfassen und Fragen in Bezug auf mögliche Vor- und Nachteile der neuen Resistenzmechanismen aufzuzeigen. Dies besonders aus dem Blickwinkel möglicher Anpassungen der Krankheiten und Schädlinge. Viele dieser Fragen sind nicht neu. Oft müssen sie bei der Einführung von neuen Resistenzen allgemein, unabhängig von deren Herkunft gestellt werden.

Der Bericht berücksichtigt vor allem Pflanzenkrankheiten, es wird jedoch auch ausführlich auf den möglichen Anbau von Wirtspflanzen eingegangen, welche Toxin aus *Bacillus thuringiensis* als Mittel zur Schädlingsbekämpfung exprimieren. Dabei

handelt es sich um eines der am weitesten fortgeschrittenen Beispiele einer transgenen Pflanze, wobei eine Vielzahl von wichtigen Fragen bezüglich möglicher Anwendungsformen dieses neuen Parameters in der Landwirtschaft aufgeworfen werden.

2. Krankheitsresistenz

Bei der Interaktion zwischen einem Pathogen und einem Wirt entscheiden verschiedenste Faktoren darüber, ob es zu einem Befall kommt. Wichtig für das Pathogen ist es, erstens auf dem Wirt zu überleben und in ihn einzudringen, zweitens sich zu etablieren und zu wachsen und drittens sich zu vermehren. Neben klimatischen Bedingungen kann die Anfälligkeit der Wirtspflanze auch von anatomischen Faktoren abhängen, wie z.B. der Zellwanddicke oder der Behaarung der Blätter, welche mechanische Barrieren bilden können. Ein anderer Faktor kann der Chemismus in und um die Zellen sein, welcher das Pathogen hemmen oder ganz abtöten kann. Als weitere Möglichkeit der Resistenz existieren in Pflanzen im Rahmen der aktiven Resistenz eine ganze Reihe von chemischen Verbindungen zur Abwehr von Pathogenen, deren Produktion bei Befall verstärkt werden kann. Die dabei ablaufenden biochemischen Vorgänge und der dazugehörige genetische Hintergrund sind in ihrer Gesamtheit noch unbekannt. Bekannt hingegen sind viele einzelne Schlüsselgene und Genprodukte. Manche sind für die Erkennung des Pathogens verantwortlich, andere sind Bestandteil einer Reaktionskaskade, welche der Abwehr oder Eindämmung einer Infektion dient, wieder andere stehen am Ende dieser Kaskade und üben eine schädigende Wirkung direkt auf das Pathogen aus.

Das Pathogen versucht nun seinerseits sich an den Wirt anzupassen. Dies kann z.B. dadurch geschehen, dass ein Auslösen der Abwehrmechanismen verhindert wird, oder dass die Wirkung der chemischen Abwehrprodukte aufgehoben wird.

Die aktive, post-infektionelle Krankheitsresistenz kann grob in die zwei Kategorien spezifisch (oder vertikal) und unspezifisch (oder horizontal) unterteilt werden. Spezifische Resistenz deutet an, dass die Resistenz nur gegen Isolate des Pathogens wirksam ist, welchen das zur Resistenz passende Virulenzallel fehlt, jedoch unwirksam ist, gegenüber Pathogenisolaten, welche die passende Virulenz besitzen. Spezifische Interaktionen dieser Art werden häufig mit dem Begriff Gen-für-Gen Interaktionen bezeichnet (Phänotyp-für-Phänotyp wäre ein besserer Ausdruck; Wolfe *et al.*, 1976), da genetische Analysen von einzelnen solcher Systeme gezeigt haben, dass die Interaktionen von einem spezifischen Einzelgen im Wirt und dem entsprechenden einzelnen Virulenzgen im Pathogen kontrolliert werden. Allgemein wird angenommen, dass die Interaktionen zwischen den Einzelgenen auf einem Signalmechanismus beruhen: Produziert das Pathogen ein Signal, so wird beim resistenten Wirt die Produktion einer Reihe von Metaboliten zur Abwehr des Pathogens induziert.

Spezifische Interaktionen werden oft als das Resultat eines qualitativen oligogenetischen Resistenz-Virulenz Charakters angesehen. Jedoch gibt es viele Ausnahmen. Tatsächlich ist es nicht möglich die Spezifität der Resistenz anhand der Art der Wirt-Pathogen Reaktion oder anhand der genetischen Herkunft des Charakters zu bestimmen.

Unspezifische Interaktionen können wirklich unspezifisch sein, in dem Sinn, dass das Pathogen nicht in der Lage ist eine Antwort auf eine Resistenz zu finden (dies ist z.B. der Fall in sogenannten 'non-host' Resistenzen, wie der Resistenz von Eichen gegen den Gerstenmehltau). Es kann sich dabei aber auch spezifische Interaktionen handeln, bei welchen die Spezifität nur noch nicht nachgewiesen werden konnte, beispielsweise, wo keine Selektion für eine Virulenzantwort durch das Pathogen stattgefunden hat. Unspezifische Resistenz bedeutet nicht unbedingt, dass es sich dabei um ein hohes Resistenzniveau handelt. Eine Varietät mit einer unspezifischen Resistenz kann durch ein Pathogen mit einer hohen Aggressivität oder einer hohen unspezifischen Virulenz stark befallen werden.

Die Schwierigkeit in der Praxis zwischen einer wirklich unspezifischen Resistenz und einer spezifischen, bei welcher die Spezifität noch nicht nachgewiesen wurde, zu unterscheiden, führte zu dem Konzept der dauerhaften Resistenz (Johnson, 1984). Eine Wirtsresistenz kann als dauerhaft bezeichnet werden, wenn ihre Wirksamkeit erhalten bleibt, obschon sie während längerer Zeit, in grossem Massstab, bei starkem Infektionsdruck durch das Pathogen und unter Umweltbedingungen, welche eine Epidemie begünstigen würden, angebaut wurde. Andererseits kann die Resistenz einer dauerhaft resistenten Varietät nicht unspezifisch sein. Es ist nicht möglich, vorherzusagen, ob die Varietät bei einer weiteren Exposition gegenüber dem Pathogen resistent bleibt oder anfällig wird. In anderen Worten, die Qualität der Dauerhaftigkeit einer Resistenz ist nicht abschätzbar; sie kann nicht einfach von der Art der Resistenz oder von ihrer Herkunft abgeleitet werden.

Für eine Anzahl von Krankheiten konnte die Dauerhaftigkeit der Resistenz in Beziehung mit gewissen Resistenzgenen gestellt werden. Es scheint aber häufig der Fall zu sein, dass diese Korrelation die gleichzeitige Aktivität von verschiedenen Genen im Wirt beinhaltet. Sollte es sich als eine generelle Regel herausstellen, dass eine inherente Dauerhaftigkeit auf der gemeinsamen Aktivität von verschiedenen Wirtsgenen beruht, wird es wohl sehr schwierig werden, diese mit Hilfe von Transformationssystemen herzustellen.

Zusätzlich zu der inhärenten Dauerhaftigkeit einer Resistenz ist es ebenso möglich, eine Dauerhaftigkeit durch das Management der Resistenz zu erzeugen. Dies bedeutet, dass die Verwendung einer Resistenz in Züchtungs- oder Anbaustrategien in einer Art und Weise erfolgt, bei welcher die Wahrscheinlichkeit einer Selektion von Pathogenen mit einem Phänotyp, welcher in der Lage ist, die Resistenz zu überwinden, möglichst gering ist (Wolfe, 1993). Ein einfaches Beispiel ist der Einsatz der Resistenz nur im kleinen Massstab, anstatt in grossen Monokulturen.

Der Mechanismus von Resistenzen gegen Pflanzenkrankheiten ist trotz einer Vielzahl von Publikationen zu diesem Thema erst zu einem kleinen Teil verstanden. Es kann jedoch eine Unterteilung anhand der aktiven Resistenzmechanismen in folgende Hauptgruppen vorgenommen werden:

a) Bei biotrophen Pathogenen, wie dem Mehltau und Rostpilzen, wird, wenn der Wirt die Gegenwart des Pathogens erkennt, eine Kaskade von Prozessen induziert, welche zur Produktion vieler verschiedener Substanzen führt, welche eine mehr oder weniger negative Wirkung auf das Pathogen ausüben.

b) Nekrotrophe Pathogene produzieren in vielen Fällen ein Toxin, welches die Ursache der Krankheit ist. Wirtresistenz gegen diese Art von Pathogenen scheint auf einer Form der Detoxifizierung oder Inaktivierung des Toxins zu beruhen (beispielsweise wirkt die Hm1-Reduktase in Mais auf das von *Cochliobolus carbonum* produzierte Toxin).

c) Der Wirt modifiziert in einer Art und Weise seine eigenen Strukturelemente oder Metabolite, welche vom Pathogen als Angriffspunkt verwendet werden. Dies kann die Basis von gewissen Formen der Virusresistenzen sein.

d) Der Wirt produziert strukturelle oder konstitutiv biochemische Barrieren gegen Pathogene. Solche Mechanismen sind häufig in 'non-host' Resistenzen.

e) Der Wirt muss sich gegen die eigenen Abwehrmechanismen schützen, welche er gegen Pathogene einsetzt. Eine Krankheit erfolgt, wenn es dem Pathogen gelingt den Schutzmechanismus in genügendem Ausmasse zu stimulieren, sodass dadurch auch das Pathogen geschützt wird (Kuc, 1995).

Von den wenigen Resistenzgenen, welche bisher kloniert werden konnten, gehören die meisten in die erste Kategorie. Allerdings scheinen auch diese anscheinend einfachen Prozesse komplexer zu sein, als zuerst vermutet. In der Gerste zum Beispiel sind mindestens zwei Formen von Hauptgenen bekannt: das dominante *M1* Wirtsresistenzgen, welches einen mehr oder weniger schnellen hypersensitiven Zelltod bewirkt, und die rezessive *mlo* Resistenz, welche dadurch wirkt, dass sie dem Pathogen den Zugang zu den Epidermiszellen verwehrt. Beide Resistenzformen werden als einfache Einzelgenresistenzen betrachtet. Es gibt jedoch vermehrt Hinweise dafür, dass für die Expression bei beiden Arten der Resistenz Helfergene benötigt werden (Freialdenhoven *et al.*, 1994 and Freialdenhoven *et al.*, in press). Dazu kommt, dass, wenn das Signal vom Wirt empfangen wurde, es wahrscheinlich ist, dass eine Anzahl von Prozessen in die Resistenz involviert sind, welche auf der Wirkung von vielen Genen beruhen (z.B. können bis zu 20 Gene an der Produktion eines einzelnen Phytoalexins beteiligt sein; Kuc, 1995).

Das wichtigste, langfristige Ziel der Gentechnologie sollte in der verbesserten Aktivität der vermutlich eher begrenzten Zahl von Genen liegen, welche als Regulatoren für die Produktion von anti-mikrobiellen Stoffen in den Pflanzen wirken. Zur Zeit jedoch liegt das Interesse bei der Produktion von Resistenzen, welche auf

eher breit wirksamen Abwehrsubstanzen beruhen, bei welchen die Konsequenzen weniger absehbar sind.

3. Der Anwendungsbereich der modernen Molekularbiologie

Die Molekularbiologie besitzt ein breites Anwendungsspektrum in der Züchtung von Resistenzen gegen Pflanzenkrankheiten (kürzlich zusammengefasst von Michelmore, 1995):

a) Die Verwendung von **molekularen Markern**, welche mit einem bekannten Resistenzgen **gekoppelt** sind. Dies bringt keine Veränderungen, ausser des möglicherweise beschleunigten Einkreuzens von interessanten Genen in Züchtungsprogrammen.

b) Die Verwendung des **Resistenzgens selbst als molekularen Marker**. Auf diese Weise können Züchtungsprogramme beschleunigt und deren Genauigkeit erhöht werden.

c) Die **Modifikation der bekannten Resistenzgene**, zum Beispiel durch Duplikation um eine neue Rassenspezifität zu erzeugen. Dies könnte die Wirkung der Varietät beeinflussen, beispielsweise, wenn mehr Ressourcen des Wirtes stärker auf die Aktivität der Resistenz verteilt werden. Die Dauerhaftigkeit lässt sich nicht vorhersagen, aber die Resistenz könnte in den oben genannten Strategien verwendet werden. Der Selektionsdruck auf der Pathogenpopulation durch die neue Form des Resistenzniveaus (sofern sie tatsächlich neu ist) könnte zu unerwarteten Reaktionen bezüglich Aggressivität führen, welche auch die Wirkung des Pathogens gegenüber anderen Varietäten beeinflussen könnte. Andere Auswirkungen sind unwahrscheinlich.

d) **Transfer von bekannten Krankheitsresistenzen** über Art- und höhere taxonomische Grenzen hinweg. Sowohl die Wirksamkeit, als auch die Dauerhaftigkeit dieser Resistenzen in einem neuen Wirt sind nicht vorherzusehen. Die Dauerhaftigkeit der Rost- und Mehltairesistenzen, welche aus verschiedenen Weizensorten und anderen Grasarten in Brotweizen (*Triticum aestivum*) eingekreuzt wurden, ist nicht sehr ermutigend. Viele waren nicht dauerhafter, als solche von Brotweizen selbst. Dazu kommen vermehrte Anzeichen dafür, dass dieselben Virulenzgene in verschiedenen Pathogenen auftreten können (Whalen *et al.*, 1991).

e) **Transfer von Genen, welche bisher nicht als Resistenzgene in Pflanzenarten bekannt waren**. Dieser Ansatz ist zur Zeit wichtig im Zusammenhang mit neuen Virusresistenzen.

f) **Transfer von Avirulenzgenen aus dem Pathogen in den Wirt**.

g) **Transfer von anderen Genen des Pathogens** oder anderer Mikroorganismen in den Wirt.

Diese beiden Anwendungen unter a) und b) können dazu verwendet werden, Strategien zu verbessern, um Resistenzen im Feld besser auszunützen, indem eine grössere Diversität der Resistenzen innerhalb der passenden Varietäten leichter verfügbar wird, oder indem es dadurch möglich wird, neue "Pyramiden" von Resistenzgenen zu entwickeln. Trotz der theoretischen Vorteile dieser 'marker assisted selection', wurde sie in der praktischen Pflanzenzüchtung bisher wenig verwendet. Es scheint jedoch nur eine Frage der Zeit zu sein, bis dieses Hilfsmittel eine breite Anwendung findet.

Die Entwicklungen unter a) und b), welche keine Transformationen beinhalten, machen immer schnellere Fortschritte, haben aber bisher nur wenig Einfluss auf die praktische Pflanzenzüchtung gehabt. Die Entwicklung in d) bis g), welche Transformationen beinhalten, haben dem gegenüber mehr Aufsehen erregt und zur ersten Vermarktung der neuen Sorten geführt (B.t.-Toxin, Virus-Hüllprotein). Diese Entwicklungen wurden jedoch eher durch die Verfügbarkeit der Gene bestimmt, welche durch die molekularbiologische Forschung (z.B. die verhältnismässig einfache, genetische Analyse von Viren) bekannt waren und zugleich für einen Gentransfer geeignet waren, denn durch die Bedürfnisse der Landwirtschaft.

Der Pflanzentransformation werden vier wichtige Vorteile zugeteilt:

- Neuheit der Methode; Resistenzformen, mit welchen die Pathogene noch nie zuvor konfrontiert waren, können in Arten eingeführt werden.
- Durch die Verwendung eines definierten Gens bei der Transformation ist es im Gegensatz zur konventionellen Züchtung möglich, ein Gen ohne damit verbundenes, anderes genetisches Material in die Pflanze miteinzubauen.
- Der Transfer ist, z.T. nach Modifikationen über genetische Barrieren hinweg möglich.
- Das Aufbrechen von selektionierten Genotypen in heterozygoten, klonal vermehrten Kulturpflanzen wie z.B. der Kartoffel wird vermieden.

Einzelne dieser Punkte bedürfen jedoch einer Präzisierung. So bedeutet die Neuheit der Resistenzform nicht automatisch Dauerhaftigkeit und Stabilität. Auch wird es bei Chromosomenmanipulationen, welche in der Weizenzüchtung üblich sind, als Vorteil angesehen, dass dabei das ganze Resistenzsystem mit Promotoren, Regulationselementen und möglicherweise auch besondere Vorteile im Zusammenhang mit Positionseffekten der Resistenz auf dem Chromosom in den Wirt übertragen werden (Jones *et al.*, 1995).

Bezüglich Pflanzentransformation werden auch Nachteile genannt: Diese beziehen sich auf die unbekannt Anzahl Genkopien und deren Einbauort im Genom, auf die ungewisse Stabilität der Expression des eingebauten Gens und Veränderungen im

Genom der transformierten Pflanze (siehe Kapitel 4.3.). Je grösser die taxonomische Distanz zwischen dem Genursprung und dem Genempfänger ist, desto grösser ist die Wahrscheinlichkeit, dass weitere Gene benötigt werden, um unerwartete oder fehlende Aktivitäten im Wirt zu kompensieren. Die Transformationen erhöhen auch das Risiko von unerwarteten Problemen in ökologischen Bereichen (siehe Bericht K. Ammann)

Das Verständnis der Prozesse auf molekularer Ebene ist bisher stark auf qualitative Resistenzen beschränkt. Quantitative Resistenzen sind im Allgemeinen nur wenig verstanden, vor allem wegen den technischen Schwierigkeiten, welche sich in der Arbeit mit ihnen ergeben. In der Praxis sind sie jedoch mindestens so wichtig wie qualitative Resistenzen. Die praktischen Schwierigkeiten ergeben sich dadurch, dass es sich dabei um eine unvollständige Expression einer Resistenz handelt (was schwierig zu messen ist), weil sie sich oft unter verschiedenen Umweltbedingungen verändert, in den verschiedenen Entwicklungsstadien des Wirtes unterschiedlich exprimiert sein kann und weil teilweise eine Spezifität bei den Interaktionen mit Isolaten des Pathogens auftreten kann, was besonders schwierig zu testen ist.

Als eine Konsequenz dieser praktischen Schwierigkeiten erweist sich die genetische Analyse der quantitativen Resistenz als sehr schwierig und dadurch auch die der molekularen Mechanismen. Fortschritte werden mit einer genetischen Analyse quantitativer Eigenschaften auf molekularem Niveau, der QLT-Analyse (Quantitative Trait Loci; z.B. Saghai Maroof *et al.*, 1994) erreicht. Diese sind jedoch langsam und es werden wohl noch viele Jahre vergehen, bevor die Loci geklont werden können und deren Funktionsweise verstanden ist. Dies obwohl es sich dabei womöglich um Schlüsselemente in Resistenzmechanismen handelt

4. Krankheits- und Schädlingsresistenz mittels Gentechnologie

4.1. Transformationstechnologie

Um abschätzen zu können, inwiefern der künstliche Gentransfer als Hilfsmittel zur Herstellung von Resistenzen in Kulturpflanzen verwendet werden kann, soll zunächst ein Blick auf den gegenwärtigen Stand der Forschung und die mögliche Entwicklung in naher Zukunft gerichtet werden.

Als erstes sollen kurz die heutigen Möglichkeiten und Grenzen des Einbaus von Genen in Pflanzen besprochen werden. Bedingt vor allem durch Unterschiede in der Regenerationsfähigkeit, sowohl zwischen, als auch innerhalb der in diesem Bericht behandelten Kulturpflanzen, müssen verschiedene Techniken des Gentransfers angewendet werden. Diese unterscheiden sich in der Effizienz und in der Genauigkeit des Einbaus. Neben den im Folgenden erwähnten Transformationsmethoden sind auch mit anderen Methoden Transformationen gelungen. Die wichtigen Probleme lassen sich mit diesen jedoch auch nicht umgehen.

4.1.1. Transformation mittels *Agrobacterium*

Die meisten Dikotyledonen werden mit Hilfe von pflanzenpathogenen Bakterien vom Genus *Agrobacterium* transformiert. Bei der Kartoffel funktioniert diese Technik besonders gut, weshalb sie zu einer der Modellpflanzen der Gentechnik gehört. Ebenso mittels *Agrobacterium* transformiert werden die beiden anderen Dikotyledonen Zuckerrübe und Raps. Bei einer solchen Transformation werden aus dem Vektor unerwünschte Gene entfernt und durch DNA-Fragmente nach Wahl ersetzt. Diese DNA wird darauf durch das *Agrobacterium* anstelle der bakteriellen Gene ins Genom eingebaut. Der Vorteil einer Transformation mit *Agrobacterium* beruht darin, dass die Sequenz und die Grösse des Fragmentes genau bestimmt werden können, dass meist nur eine einzige Kopie eingebaut wird und dass die Methode auch bezüglich der Regeneration der Pflanzen recht effizient ist. Ein systembedingtes Problem besteht darin, dass die transformierte Zelle ein Gewebekulturstadium durchläuft, wobei es zu Veränderungen der Chromosomen und damit zu somaklonalen Variationen kommen kann. Dadurch können sich Unterschiede zwischen der Ausgangspflanze und der transformierten Pflanze ergeben, welche nicht auf dem eingebauten Gen beruhen (Dale & McPartlan, 1992).

4.1.2. Transformation mittels 'Biolistics'

Im Gegensatz zu den Dikotyledonen fehlt den meisten Monokotyledonen bei Verletzung die für eine Transformation mit *Agrobacterium* notwendige 'woundresponse'. Transformationen bei den Poaceen Weizen und Mais werden daher

vor allem mittels sogenannter 'Biolistics' durchgeführt. Dabei werden die Gene, mechanisch auf Gold- oder Wolframpartikel haftend, in proliferierendes Gewebe geschossen (Schrott und Bilang, 1993). Dabei können sich extreme Streuungen ergeben, sowohl was die Unversehrtheit, als auch was die Anzahl der DNA-Sequenzen betrifft. Die Folge ist ein Einbau von vielen z.T. Bruchstücken, z.T. ganzen Genen an diversen Stellen im Genom. Dies führt zu starken Unterschieden in der Expressionsrate.

Ein weiteres Problem bei Poaceen besteht in der Auswahl an Genotypen, welche in Kulturmedium embryogenes Gewebe ausbilden. Auf diesem Weg wurden bisher die meisten transgenen Getreide hergestellt. Sorten, welche diese Fähigkeit haben, sind aber oft von eher geringer agronomischer Qualität. Möglicherweise ist in Hochertragssorten des Weizens die Regenerationsfähigkeit der Zellen derart begrenzt, dass eine Transformation auf diesem Weg grundsätzlich nicht möglich ist. Von den Getreiden der Schweizer Sortenliste konnte, soweit den Autoren bekannt, bislang keine Varietät transformiert werden.

Beim Mais ergeben sich bei den verschiedenen Varietäten ebenso Unterschiede bezüglich der Transformierbarkeit, hingegen können hier auch qualitativ hochstehende Sorten inkl. Hybridsorten transformiert werden (Lowe *et al.*, 1995). Möglicherweise gelingt in Zukunft auch bei Hochleistungssorten des Weizens ein künstlicher Einbau von DNA, bis dahin müssen die Gene aber weiterhin erst in eine transformierbare, aber minderwertige Sorte eingebaut werden, um dann mittels klassischer Züchtung in ertragreiche Sorten eingekreuzt zu werden.

4.1.3. Transformation von Plastiden

Eine Methode, welche aufgrund verschiedener Vorteile in Zukunft an Bedeutung gewinnen könnte, besteht im Einbau der Gene ins Plastidengenom. Durch die Wahl der flankierenden Sequenzen kann der Integrationsort durch homologe Rekombination vorbestimmt werden und es werden wegen der hohen Kopienzahl hohe Expressionsraten erzielt (McBride *et al.*, 1995). Weiter kann auf diese Weise bei vielen Pflanzen eine Verbreitung der Gene durch Pollenflug verhindert werden, da eine Vererbung normalerweise maternell stattfindet. Bisher gelingt die Chloroplastentransformation jedoch erst bei Tabak (z.B. Carrer & Maliga, 1995).

4.1.4. Menge der eingebauten DNA

Heute können mittels *Agrobacterium* und mittels Biolistic DNA-Fragmente von einer Grösse bis etwa 15 kb, d.h. etwa 2-3 Gene in eine Pflanze eingebaut werden, wobei eines der Gene als Markergen verwendet wird. Durch die hohen Transformationsraten durch *Agrobacterium* können durch wiederholte Transformation mehrere Gene in Dikotyledonen eingebaut werden. Ein Einbau von mehreren Genen in Getreide, sei es durch gleichzeitige Insertion, sei es durch eine Steigerung der Effizienz der Transformationen, welche mehrere Manipulationen nacheinander möglich machen

würde, scheint vorerst nicht möglich. So muss zum Beispiel eine Pyramidisierung von Resistenzgenen in einer einzelnen Pflanze durch das mehrfache Einkreuzen aus verschiedenen transformierten Pflanzen geschehen.

4.2. Resistenzgene

Während viele der technischen Probleme zumindest teilweise umgangen werden können, stellt die Auswahl an geeigneten Genen eine viel grössere Einschränkung bei der Herstellung von Pflanzen mit Resistenz gegen Krankheiten und Schädlinge dar (Vasil, 1994). Eine mögliche Strategie zur Erzeugung von Resistenz gegen Pathogene beruht auf der Erhöhung der Expression von einem oder mehreren Genen, welche bereits Bestandteil der Pathogenabwehr sind. Neben arteigenen Resistenzgenen werden auch solche aus anderen Pflanzenarten eingebaut. Es können auch Gene verwendet werden, welche Bestandteil von Abwehrstrategien aus Tieren oder Bakterien sind. In anderen Fällen werden Resistenzen auch durch den Einbau von Genen des Pathogens selbst erreicht.

4.2.1. Resistenz gegen Virusinfektionen

In vielen Sorten von verschiedenen Kulturen befinden sich natürliche Virusresistenzen, welche aber bisher nicht geklont und damit auch nicht auf gentechnischem Weg transferiert werden konnten. Es besteht jedoch die Möglichkeit, Resistenz durch Gene aus anderen Quellen zu verwenden. Die wichtigste Gruppe bilden dabei Gene oder davon abgeleitete Sequenzen, welche aus den Viren selbst stammen, und eine sogenannte 'pathogen derived resistance' (PDR) erzeugen. Weitere antivirale Gene stammen aus Wildpflanzen oder aus Tieren.

PDR wird durch den Einbau eines chimären Genes erzeugt, welches für ein virales Protein codiert. Ein solches Gen besteht aus der kodierenden Sequenz des gewünschten Proteins und veränderten flankierenden Sequenzen des ORF, um eine bessere Stabilität und Translation der mRNA zu erhalten. Um eine gute Transkription im Eukariontenkern zu gewährleisten, wird besonders bei Genen aus RNA-Viren ein Promotor angesetzt, welcher von der RNA-polymerase II gelesen werden kann. Dazu wird oft der ribosomale 35S Promotor oder der verbesserte E35S des 'cauliflower mosaic virus' (CaMV) verwendet. Am 3'-Ende werden schliesslich Sequenzen zur Terminationskontrolle und Polyadenylierung angehängt (Hanley-Bowdoin & Hemenway, 1992).

'Coat proteine'

Die erfolgreichste PDR wurde durch den Einbau eines Gens erzeugt, welches für virale Hüllproteine codiert. Auf 'coat protein' (CP) basierende PDR konnte in

verschiedenen Kulturpflanzen, so auch in Mais und Kartoffeln, gegen alle grösseren Gruppen von Viren erzeugt werden. Resistenzen, welche durch den Einbau eines CP-Gens erreicht wurden, beschränken sich zum Teil auf das einzelne Isolat, aus welchem das Gen stammt, zum Teil bieten sie aber auch Schutz gegen verschiedene Isolate einer ganzen Virusgruppe. Die Wirkung des Schutzes konnte sowohl für eine mechanische Inokulation, als auch für eine Inokulation mit einer Vielzahl natürlicher Insektenvektoren gezeigt werden. Nicht nachgewiesen wurde der Schutz bisher bei einer Infektion durch Pilzvektoren. Der Mechanismus der Resistenz basiert möglicherweise auf einer Blockierung der Entmantelung der viralen RNA. Es bestehen weitere Hinweise, dass auch die Replikation und die systemische Ausbreitung des Virus gestört wird. Sollte die Resistenz durch Expression von CP tatsächlich auf mehreren unabhängigen Mechanismen beruhen, ist es sehr wahrscheinlich, dass sie sich auch im Feld als dauerhaft erweisen wird (Stiekema *et al.*, 1993).

Replikasegene

Eine weitere wirksame PDR wurde mit dem Einbau von viralen Replikasegenen oder mit Rumpfstücken davon erzeugt. Der eigentliche Mechanismus, der die Vervielfältigung des Virus verhindert, ist bisher unbekannt. Diese Strategie wurde gegen Viren aus verschiedenen Gruppen eingesetzt. In einem dreijährigen Feldversuch waren Kartoffeln unter natürlichen Infektionsbedingungen resistent gegen 'Potato leaf roll virus' (PLRV) (Kaniewski & Lawson, 1994).

Andere Virusproteine

Durch das Proteasegen *Nia* des 'Potato virus Y' (PVY) konnte PDR gegen Viren erzeugt werden (Vardi *et al.*, 1993). Ein breites Resistenzspektrum ergab sich durch den Einbau von modifizierten Gensequenzen, welche für Proteine codieren, die für die Bewegung der Viren in der Pflanze verantwortlich sind (Kaniewski & Lawson, 1994).

Satelliten RNA und DI

Durch Inokulation von Pflanzen mit Satelliten-RNA aus schwach virulenten Isolaten konnten Pflanzen im grossen Massstab gegen 'Cauliflower mosaic virus' (CMV) tolerant gemacht werden. Versuche, durch Einbau von Satelliten-RNA exprimierenden Genen denselben Schutz zu erreichen, waren ebenfalls erfolgreich. Der Einsatz von Satelliten-RNA scheint aber sehr virus- und kulturspezifisch zu sein und birgt möglicherweise Risiken für andere Kulturen (Matthews, 1991). Eine andere Strategie, welche bisher höchstens eine geringe Resistenz ergab, basiert auf der Expression von 'defective interfering' DNA (DI) (Kaniewski & Lawson, 1994).

Antisense RNA

Die Expression von Antisense-RNA bewirkt möglicherweise, dass durch Bildung eines Heteroduplex mit der komplementären RNA des Virus eine Translation verhindert wird. Die Strategie zeigte bei RNA-Viren nur bei geringer Inokulumdichte

eine Wirkung. Zudem scheint die Methode isolatspezifisch und nicht sehr dauerhaft zu sein (Kaniewski & Lawson, 1994).

Antivirale Proteine

Neben den PDR-Genen wurden auch Gene für Ribozyme, Ribosomen inhibierende Proteine, Interferon induzierte Proteine und Antikörper in Pflanzen eingebaut.

Während mit Ribozymen bisher kein genügender Schutz erreicht wurde, waren Tabak- und Kartoffelpflanzen, welche Ribosomen inhibierende Proteine aus der Kermesbeere (*Phytolacca americana*) exprimierten, resistent gegen verschiedene Viren. Diese antiviralen Proteine scheinen ein breites Resistenzspektrum aufzuweisen (Lodge, *et al.*, 1993).

Durch den Einbau einer 2'-5' Oligoadenylat Synthetase aus der durch Interferon induzierten Virusabwehr einer Ratte, wurden Kartoffelpflanzen gegen 'Potato virus X' (PVX) resistent. Möglicherweise ist das Resistenzspektrum auch dieser Strategie sehr breit (Truve *et al.* 1993). Aufgrund der grossen Vielfalt könnte sich auch durch die Expression von Antikörpern oder einzelnen Fragmenten davon ein breiter Anwendungsbereich in Pflanzen ergeben. So führte ein 'single-chain' Fv Antikörper in Tabak exprimiert zu reduzierten Symptomen durch das 'Artichoke mottled crinkle virus' (AMCV), wobei die Funktionsweise noch ungeklärt ist (Tavladoraki *et al.*, 1993).

Von den verschiedenen Möglichkeiten der Resistenz gegen Viren hat bisher die PDR durch CP eine gute Schutzwirkung gezeigt. In den USA ist seit 1995 eine durch CP virusresistente Kürbissorte zum kommerziellen Anbau zugelassen (anonymous, 1995). PDR, welche von Replikasegenen abgeleitet wurde, ergab in Freilandversuchen ebenfalls gute Ergebnisse. Ein kommerzieller Einsatz erscheint möglich (Kaniewski & Lawson, 1994). Andere Strategien werden nur aus wissenschaftlicher Sicht von Interesse sein oder auch ganz aufgegeben werden.

4.2.2. Resistenz gegen Bakterieninfektionen

Eine der Hauptschwierigkeiten bei der Züchtung von Resistenzen gegen Bakterien auf konventionellem, wie auch auf gentechnischem Weg, liegt in einem praxisnahen Selektionsverfahren. Bei vielen Bakterienkrankheiten handelt es sich um bodenbürtige Pathogene, welche heterogen im Boden verteilt vorkommen. Dies ist unter Laborbedingungen nur schwer zu simulieren. Da aber das Zustandekommen eines Befalls oft von der Menge des Anfangsinokulums abhängig ist, erklärt sich die häufige Diskrepanz zwischen Labor- und Feldversuchen.

Bakterielle Enzyme

Bei den Interaktionen zwischen einem Pathogen und einem Wirt erfolgt die Schädigung des Wirts häufig aufgrund eines Toxins, welches im Pathogen produziert wird. Hat dieses Toxin ein breites Wirkungsspektrum, muss sich das Pathogen selbst vor möglichen Schädigungen wappnen. Eine Strategie einer möglichen Resistenz

besteht nun darin, die Schutzmechanismen der Pathogene in die Pflanze einzubauen. Bisher wurden zwei verschiedene Arten dieses Selbstschutzes ausführlicher untersucht: Beim ersten ist das Zielenzym so verändert, dass es durch das Toxin nicht geschädigt wird. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* produziert das wirtunspezifische Phaseolotoxin, welches das Enzym Ornithin Carbamoyl-Transferase (OCTase) des Arginin Biosyntheseweges inhibiert. Das Pathogen selbst besitzt eine veränderte OCTase, welche durch das Phaseolotoxin nicht gehemmt wird. Tabakpflanzen, in welche die bakterielle OCTase eingebaut wurde, zeigten weder Läsionen, noch eine systemische Infektion, sondern sie reagierten mit einer hypersensitiven Reaktion (Herrera-Estrella and Simpson, 1995).

Der zweite Mechanismus beruht auf einer Inaktivierung des Pathogentoxins in der Pflanze. *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* produziert Tabtoxin, welches die Glutamin-Synthetase inaktiviert. Daneben besitzt es ein 'Tabtoxin resistance gene' (*ttr*), welches Tabtoxin inaktiviert. Auch in diesem Fall zeigt transgener Tabak mit (*ttr*) nicht nur keine Symptome, ebenso wird auch der Befall durch das Bakterium verhindert (Herrera-Estrella and Simpson, 1995). Um wieder virulent zu werden, müsste im Pathogen das Toxin so verändert werden, dass das Zielenzym in der Pflanze wieder angegriffen werden kann. Gleichzeitig müssten im Pathogen Mutationen stattfinden, damit das eigene Enzym durch das neue Toxin nicht gestört wird. Dieser Strategie wird langfristig die grösste Chance eingeräumt, bei Bakterien mittels Gentechnologie zu einer dauerhaften Resistenz zu führen, da sich klassische Resistenzen, welche auf einer Inaktivierung von Pathogentoxinen oder auf dem Fehlen eines Rezeptors für das Toxin beruhen, bisher als dauerhaft erwiesen haben (pers. Mitt. G. Défago). Voraussetzung dafür ist jedoch ein vertieftes Verständnis der Interaktionen zwischen den Bakterien und der Wirtspflanze.

Antibakterielle Substanzen

Eine weitere Resistenzstrategie beruht auf dem Einbau von lytischen Peptiden mit einer antibakteriellen Aktivität, wie sie in verschiedenen Lebewesen wie Insekten, Mollusken, Amphibien und z.T. auch Säugern vorkommen. Cecropine z.B. stammen aus Insekten. In Tabak eingebaut ergab ein Homologon von Cecropin B aus einer Seidenmotte einen reduzierten Befall durch *Pseudomonas solanacearum* bei einer Stengelinfektion, nicht jedoch bei Wurzelinfektion (Jaynes *et al.*, 1993).

Phytoalexin

Thionine, die zu den Getreidephytoalexinen gehören, weisen *in vitro* eine antibakterielle Aktivität auf. In Tabakpflanzen exprimiert, führte ein Gerstenthionin zu einem reduzierten Befall durch *P. syringae* Rassen (Strittmatter and Wegener, 1993).

Lysozym

Lysozyme sind Enzyme, welche das Murein der bakteriellen Zellwand abbauen können. Der Einbau eines Lysozyms des Bakteriophagen T4 ergab schon bei einer

geringen Expressionsrate einen reduzierten Befall von Kartoffelknollen durch das bodenbürtige Pathogen *Erwinia carotovora* (Düring *et al.*, 1993).

4.2.3. Resistenz gegen Pilzinfektion

Wie bei den bakteriellen Pathogenen finden sich in Pilzen ebenso Substanzen, welche bei der Kolonialisierung des Wirts eine wichtige Rolle spielen. Zu diesen gehören z.B. Enzyme, wie die Polygalakturonasen. Eine Resistenz könnte daher möglicherweise durch Polygalakturonase-inhibierende Proteine (PGIP) erzeugt werden (Cornelissen & Melchers, 1993).

Eine andere Substanz ist das HC-Toxin von *C. carbonum*, dem Erreger der Blattfleckenkrankheit des Mais. Dieses Toxin ermöglicht eine rasche Kolonisierung des Wirts. Resistente Maissorten besitzen das *Hm*-Gen, welches für eine HC-Toxin Reduktase kodiert, die das Toxin inaktiviert und so einen Befall verhindert (Panaccione, 1993). Ebenfalls im Mais wurde eine Resistenz gegen das Pilzpathogen *Cochliobolus heterostrophus* durch das Wegfallen eines Proteins in der Mitochondrienmembran erlangt. Das Protein war die Ansatzstelle des vom Pathogen produzierten T-Toxins (Panaccione, 1993).

Über Resistenz in Pflanzen durch den transgenen Einbau eines PGIP-Genes, eines anderen Inhibitors oder eines detoxifizierenden Enzyms ist jedoch nichts bekannt.

Chitinasen und β -1,3-Glucanasen

Bei vielen Pilzen sind Chitin und β -1,3-Glucan wichtige Strukturelemente der Zellwände. Chitinasen und β -1,3-Glucanasen gehören daher in Pflanzen zu den 'pathogenesis-related' (PR) Proteinen, welche bei Pilzbefall induziert werden um das Wachstum des Pilzes zu stören. Dieser pflanzeigene Abwehrmechanismus wird häufig jedoch nur in ungenügenden Mengen oder zu spät exprimiert. Wird die Konzentration durch Einbau der entsprechenden Gene erhöht, kann ein Schutz der Pflanzen gegen gewisse Pilze erreicht werden. So konnte durch Einbau einer Endochitinase in Tabak und Raps das Resistenzniveau im Labor gegenüber *Rhizoctonia solani* signifikant erhöht werden, während sich die Anfälligkeit gegenüber *Pythium aphanidermatum*, welcher kein Chitin in den Zellwänden enthält, nicht änderte (Broglie *et al.*, 1991). Bei anderen Versuchen hingegen war der Effekt auf chitinhaltige Pilze gering oder zeigte nur eine additive Wirkung bei Pflanzen, welche schon eine Resistenz aufwiesen. Dies liegt vermutlich daran, dass *R. solani* zu den Pilzen gehört, bei welchen die Chitinschicht eher in den äusseren Zellschichten der Hyphen angeordnet ist, während sie bei anderen Pilzen von β -1,3-Glucan und/oder Cellulose verdeckt sein kann (Benhamou *et al.*, 1993). Bei einem weiteren Versuch, bei welchem eine β -1,3-Glucanase und eine Chitinase gleichzeitig in einer Tabakpflanze exprimiert wurde, resultierte eine erhöhte Resistenz gegen *Cercospora nicotianae* (Zhu *et al.*, 1994).

Ribosomen inhibierende Proteine

Resistenz gegen *Rhizoctonia solani* in Tabak konnte auch durch Einbau eines Ribosomen inhibierenden Proteins (RIP) aus Gerste erreicht werden (Logemann *et al.* 1992). RIPs üben keine schädigende Wirkung auf die Ribosomen der Pflanze aus, können aber die 35S rRNA von Ribosomen entfernter Arten wie zum Beispiel von Pilzen schneiden. Hier stellt sich jedoch die Frage, ob die Wirkung der Resistenz nicht zu breit sein und auch andere Organismen in Mitleidenschaft ziehen könnte.

‘disease resistance response’- Gene

Der Einbau einer Resistenz aus einer Kulturpflanze in eine andere, fand auch bei der Transformation von Kartoffeln mit dem Resistenzgen ‘disease resistance response’ (DRR) Gen 49 aus der Erbse statt. Dieses Gen ist bei der Erbse Bestandteil der Resistenz gegen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, welches nicht zu den Pathogenen auf Erbse gehört (‘non-host resistance’). Der Resistenznachweis in der Kartoffel wurde mit pathogenverseuchtem (‘potato early dying’ -PED) Boden durchgeführt, in welchem vor allem der bodenbürtige Pilz *Verticillium dahliae* als Schädling auftritt (Chang *et al.*, 1993). Eine Resistenz gegen *V. dahliae* konnte aber auch schon durch somaklonale Variation allein erzeugt werden (Sebastiani *et al.*, 1994).

Phytoalexine

Einen weiteren Bestandteil der pflanzlichen Abwehr von Pathogenen können die sogenannten Phytoalexine bilden. Das Phytoalexin Stilbene beispielsweise ist Bestandteil der Pilzabwehr in der Weinrebe. In Tabak produziert, vermittelt es einen gewissen Schutz vor *Botrytis cinerea*, welches ein sehr breites Wirtsspektrum hat (Hain *et al.*, 1993). Am Beispiel der Phytoalexine wurden auch mögliche Probleme sichtbar, welche durch den Einbau von Resistenzen aus anderen Organismen entstehen können. Pathogene, welche Erbsen befallen können, sind im Gegensatz zu anderen Pathogenen in der Lage, Pisatin, das Phytoalexin der Erbse zu metabolisieren. Wurde in das Maispathogen *C. heterostrophus* ein Pisatin-Demethylase-Gen eingebaut, erlangte dieses dadurch die Fähigkeit Läsionen auf Erbsen zu produzieren. Wird ein Resistenzgen aus einer Pflanze in eine andere eingebaut, könnte eine Virulenz gegen das eingebaute Gen selektioniert werden. Dadurch könnte das Pathogen die Fähigkeit erlangen, die Pflanze, aus welcher das Resistenzgen ursprünglich stammt, zu befallen.

Aktivatoren der systemischen Resistenz

Einen völlig anderen Ansatz bietet der Einsatz eines Aktivatormoleküls, welches innerhalb einer Pflanze eine Funktion von Salicylsäure (SA) übernehmen kann. SA besitzt bei Befall durch ein Pathogen eine Schlüsselrolle in der systemischen Aktivierung einer ganzen Reihe von Genen, wie sie auch in der aktiven Resistenz vorkommen, wie Chitinase, β -1,3-Glucanase und cysteinreiche Proteine. Das Phänomen ist als systemisch aktivierte Resistenz (SAR) bekannt, welche über die ganze Pflanze verteilt, relativ unspezifisch wirkt (Uknes *et al.*, 1995). Das bisher einzige Präparat dieser Art auf dem Markt CGA 245704 wirkt u.a. bei Getreide und Tabak (Ruess *et al.*, 1995). Bei Weizen erfolgt früh in der Saison eine einmalige Spritzung. Der Aktivator wird in die Pflanze aufgenommen und metabolisiert. Das Produkt aktiviert darauf an Stelle von SA ein breites Spektrum von pflanzeigenen Abwehrreaktionen, wobei diese sortenunabhängig zu sein scheint. Die Wirkung, welche nicht durch grössere Präparatmengen gesteigert werden kann, erfolgt mit einer Verzögerung von etwa einer Woche und hält ungefähr vier bis sechs Wochen an. Bei der Pflanze werden Stressreaktionen sichtbar, es kommt jedoch zu keinen Ertragseinbussen. Erfolgt die Applikation jedoch zu einem späteren Zeitpunkt (etwa nach dem 2 Nodien Stadium, GS 32), wird die Pflanze geschädigt. Der Schutz erfolgt bei Weizen vor allem gegen *Erysiphe graminis*, den Erreger des Mehltaus. Daneben wird auch der Befall durch *Puccinia*- und *Septoria*-Arten um etwa 30% gemindert. Noch ist unklar, ob der Grad der Resistenzerhöhung u.a. dadurch bestimmt wird, ob eine Infektion durch das Pathogen zu einem Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung geschehen kann, wenn die Wirkung des Aktivators nachgelassen hat. Der Befall durch Rost und Septoria käme zustande, weil die Wirkung der SAR nachlässt, eine Applikation aber wegen einer eventuellen Schädigung der Pflanze nicht mehr möglich ist (pers. Mitt. C. Müller). Die permanente Expression der Aktivatorsubstanz in der Pflanze durch den Einbau der zur Synthese notwendigen Gene ergäbe möglicherweise ein erweitertes Schutzspektrum (sofern es zu keiner Schädigung in einem fortgeschrittenen Wachstumsstadium kommt, wie bei einer direkten Applikation). Durch die Synthese des Aktivators im Weizen liessen sich beispielsweise mögliche Probleme mit Unkräutern umgehen, da deren Widerstandskraft durch den Aktivator ebenso gesteigert werden könnte. Dies wiederum könnte u.a. Auswirkungen auf den Herbizideinsatz oder auf biologische Bekämpfungsstrategien von Unkräutern durch pilzliche Antagonisten haben.

Die Wahrscheinlichkeit, dass sich Virulenzen gegen die durch den Aktivator induzierte SAR ausbildet, scheint gering zu sein, da diese Resistenz auf vielen verschiedenen Abwehrreaktionen der Pflanze beruht.

Artifizielle hypersensitive Reaktionen

Eine andere Strategie, um dauerhafte Resistenz auf gentechnischem Weg erzeugen, wurde von De Wit und Van Kan (1993) vorgeschlagen. Gewisse Tomatensorten enthalten das Resistenzgen *cf9*. Dieses löst bei Befall durch Isolate des Pathogens *Cladosporium fulvum* eine hypersensitive Reaktion aus, sofern diese das Avirulenzgen

avr9 enthalten. Ziel ist es nun, in Tomaten mit *cf9* Genen das *avr9* Gen einzubauen, welches an einen Promotor gekoppelt ist, der durch bestimmte Pathogene aktiviert werden kann. Wird darauf das *avr9* Gen exprimiert, kommt es zur hypersensitiven Reaktion, ein Fortschreiten der Infektion findet nicht statt. Die Schwierigkeit des Systems liegt darin, einen geeigneten Promotor zu finden. Wird er zu leicht aktiviert, zeigen zu viele Zellen eine Reaktion, was im Extremfall zum Tod der gesamten Pflanze führen kann. Erfolgt die Aktivierung zu wenig schnell oder werden gewisse Rassen nicht erkannt, wird die Pflanze dennoch befallen. Sollte es jedoch möglich sein, zuverlässige Promotoren zu finden, möglicherweise sogar selbst zu kreieren, welche unspezifisch auf verschiedene Rassen oder Arten reagieren, scheint es durchaus möglich auf diesem Weg in Zukunft eine dauerhafte Resistenz gegen beliebige Pilze herzustellen. Durch die gleichzeitige Übertragung des Hypersensitivität auslösenden Gens *cf9* mit dem Gen *avr9* oder durch ein äquivalentes Resistenz-Avirulenz Genpaar, liesse sich dieses System auch in anderen Kulturen anwenden. Ebenso liesse sich der Effekt auch durch ein anderes Gen hervorrufen, welches bei Induktion durch ein Pathogen das Absterben der betreffenden Zelle bewirkt. So konnte mit einem Genkonstrukt, bestehend aus einem Barnasegen, welches für eine cytotoxische RNase codiert, und aus einem Promotorfragment des *prp1-1* Genes, welches bei Pilzbefall aktiviert wird, im Labor eine Resistenz gegen Befall durch *P. infestans* erzeugt werden (Strittmatter *et al.*, 1995). Offene Fragen in Bezug auf das System, welche auch von den Autoren angedeutet werden, bestehen hinsichtlich der Zuverlässigkeit im Feld, der möglichen Resistenzbildung durch Umgehung der Erkennungsmechanismen, der Wirkungsweise bei Befall durch fakultativ oder ganz nekrotrophe Pilze.

4.2.4. Resistenz gegen Insekten

Das Schwergewicht der Erzeugung von Resistenz gegen Insekten beruht zur Zeit auf dem Einbau von δ -Endotoxinproteinen von *Bacillus thuringiensis* (B.t.). Durch diese Methode wurden bereits transgene Pflanzen mit Insektenresistenz hergestellt, welche in den USA demnächst auf den Markt kommen. Das Schwergewicht der Zielinsekten liegt bei den Lepidopteren und bei den Coleopteren, keine Wirkung zeigen die B.t.- (ebenso wie Protease-Inhibitoren) exprimierenden Pflanzen aber bei saugenden Insekten (Marrone, 1994). Eine ausführliche Diskussion erfolgt in Kapitel 5.

Protease-Inhibitoren

Neben den B.t.-Genen gibt es noch weitere Gene, welche in Pflanzen eingebaut zu Insektenresistenz führen können. Hier bilden die Protease-Inhibitoren (PI) die wichtigste Gruppe. Protease-Inhibitoren sind pflanzeneigene Gene, welche die Proteasen von verschiedenen Insekten hemmen, nicht jedoch die pflanzeneigenen. Es wird daher vermutet, dass sie auch in der Pflanze der Abwehr von Insekten dienen, indem sie diesen die Verdauung des Pflanzenmaterials verunmöglichen. Bisher sind etwa acht unterschiedliche PI-Familien bekannt. Man unterscheidet dabei vier

mechanistische Klassen, wobei die meisten der bekannten PI gegen Serin Proteinasen wirken. Ein Beispiel dafür ist der Cowpea Trypsin Inhibitor (CpTI), welcher in Tabak in hohen Konzentrationen exprimiert einen gewissen Schutz vor verschiedenen Tabak-fressenden Insekten gewährt. Zur selben Klasse der Serin PI, aber zu verschiedenen Familien gehören die miteinander nicht verwandten PI-I und PI-II aus Kartoffeln und Tomaten. In Tabak exprimiert ergab PI-II je nach Konzentration einen Schutz vor dem 'tobacco hornworm', nicht jedoch PI-I (in Kahl & Winter, 1995). Der Vorteil der PI besteht darin, dass möglicherweise Resistenz gegen mehrere Insekten auf einmal erzeugt werden kann. Darin liegt jedoch ebenso ein möglicher Nachteil, indem auch nützliche Insekten in Mitleidenschaft gezogen werden können, zumal hohe Konzentrationen notwendig sind, damit eine Pflanze ausreichend geschützt wird. Ein Beispiel hierfür wären Pollen fressende Insekten, wobei sich bei Raps z.B. das Problem durch einen Einbau ins Chloroplastengenom lösen liesse (Hilder *et al.*, 1993). Ein Einsatz von Pflanzen mit geringeren Konzentrationen von PI wäre bei Insekten sinnvoll, welche erst spät in der Saison, in der zweiten oder einer späteren Generation die Schadensschwelle überschreiten und bei welchen durch PI die Entwicklungszeit so verlängert würde, dass der Aufbau einer kritischen Populationsgröße nicht möglich wäre (Wolfson & Murdock, 1995).

Andere Strategien

Auf demselben Prinzip, wie die Protease-Inhibitoren basiert auch der Einbau von anderen verdauungshemmenden Substanzen, wie z.B. α -Amylase-Inhibitoren. Eine leichte Resistenz konnte auch durch Gene wie eine Tryptophan Decarboxylase oder Proctolin erzeugt werden, indem u.a. die Entwicklung von Insekten behindert wurde (In Kahl & Winter, 1995). Der Einbau einer bakteriellen Isopentenyl-Transferase in *Nicotiana plumbaginifolia* führte zu einer verstärkten Cytokinin Biosynthese, was einen erhöhten Schutz vor Insektenfrass und eine verzögerte Insektenentwicklung ergab (Smigocki *et al.*, 1993). Durch die Expression von Lectinproteinen wurde bisher nur eine ungenügende Resistenz erzeugt (Hilder *et al.*, 1995).

4.3. Probleme der Anwendung in der Praxis

Ein Teil der erörterten Strategien zur Erzeugung von Resistenz gegen Krankheiten und Schädlinge in Pflanzen, beruht auf theoretischen Überlegungen. Bei einigen konnte eine Wirkung in definierten Laborversuchen gezeigt werden. Erfolgreiche Freilandversuche gelangen jedoch mit einer eher geringen Anzahl von transgenen Pflanzen. Diese sind jedoch eine Grundvoraussetzung für einen kommerziellen, grossflächigen Anbau der betreffenden Pflanzen.

Bei der Beurteilung von Erfolgen, welche mit verschiedenen Resistenzstrategien erzielt werden konnten, ist eine gewisse Vorsicht in der Interpretation der Laborversuche angebracht. Erwähnt wurden bereits somaklonale Variationen, welche bei Pflanzen vorkommen können, welche aus einem Protoplasten regeneriert wurden. Solche Variationen können durch weiteres Kreuzen beseitigt werden. Dies ist möglich

bei Kulturpflanzen wie Weizen, welche durch Inzucht erzeugt werden, kaum jedoch bei klonal vermehrten Kulturpflanzen wie Kartoffeln (Conner & Christey, 1994). In einem Versuch führten somaklonale Variationen bei 18% der transformierten Kartoffeln der Sorte Escort und bei 82% der Sorte Bintje zu wesentlichen morphologischen Änderungen (Jongedijk *et al.*, 1992). Das Aussortieren solcher Abweichler ist ein wichtiger Bestandteil von kleinen Feldversuchen, da die Veränderungen oft erst unter Feldbedingungen sichtbar werden (Conner & Christey, 1994). Zum Teil können somaklonale Variationen auch dazu führen, dass eine Pflanze auch ohne den Einbau eines Gens gegen ein Pathogen eine höhere Resistenz erlangt (Sebastiani *et al.*, 1994). Eine Veränderung der ursprünglichen Eigenschaften der Pflanze kann auch bei einer Transformation mittels Biolistics erfolgen. Obschon es im Genom von Pflanzen einen grossen Anteil von nicht-codierenden Regionen gibt, besteht bei einem Einbau von vielen Kopien eines Gens oder von Bruchstücken davon die Möglichkeit, dass eine codierende Sequenz getroffen wird und dass sich dadurch Veränderungen ergeben, welche möglicherweise erst im Feldversuch beobachtet werden können.

Ein weiteres Problem kann sich bezüglich der Stabilität der eingebauten Gene ergeben. Eine Inaktivierung von eingebauten Genen konnte bei verschiedenen Transformationsmethoden und verschiedenen Genkonstrukten beobachtet werden (Finnegan & McElroy, 1994). In einem Fall beispielsweise wurde in homozygoten Tabakpflanzen durch das Auspflanzen eine sogenannte Cosuppression induziert, als in einem Feldversuch bei 59% der homozygoten Pflanzen das eingebaute Gen nicht mehr exprimiert wurde (Brandle *et al.*, 1995). In diesem Fall war die Inaktivierung des Gens leicht beobachtbar. Geschieht dies jedoch bei einem Gen, welches neben mehreren anderen Genen für denselben Phänotyp kodiert ('Genpyramide'), könnte ein Nachweis einer Inaktivierung sehr schwierig sein, da sich der Ausfall unmittelbar nur durch molekularbiologische Methoden nachweisen liesse. Vermutlich würde in der Praxis eine Inaktivierung von einem Teil der Gene, wenn überhaupt, erst bei einem Zusammenbruch der Resistenz entdeckt.

5. Fallbeispiel B.t.-Toxin in Pflanzen

Unter den transgenen Pflanzen, welche in den USA für den Anbau zugelassen sind oder kurz davor stehen, befinden sich nur zwei Arten von Resistenzgenen. Es handelt sich dabei um eine Mais- und eine Kartoffelsorte, welche durch Einbau eines Genes aus *Bacillus thuringiensis* vor Insektenfrass geschützt sind, und um einen Kürbis, welcher durch Einbau eines viralen Hüllproteins resistent gegen Viren ist (anonymous, 1995). Während für die beiden erst genannten Pflanzen auch in der Schweiz grundsätzlich eine Einsatzmöglichkeit vorhanden wäre, hat der Anbau von Kürbis im Inland keine kommerzielle Relevanz. Im folgenden Kapitel soll auf die Diskussion bezüglich eines möglichst dauerhaften Einsatzes von Toxinen aus B.t. eingegangen werden.

5.1. B.t.-Toxin

Bacillus thuringiensis ist ein Gram-positives, weit verbreitetes Bakterium, welches neben anderen Insektentoxinen ein δ -Endotoxin produziert. Die genetische Information für das, je nach B.t.-Stamm unterschiedliche Toxin liegt auf einem einzelnen Plasmid und ist in vielen Fällen bereits isoliert und sequenziert worden. Es kann somit in andere Bakterien oder auch in eine Vielzahl von Pflanzen eingebaut werden. Das δ -Endotoxin wird in Form von Sprays oder Pulver schon seit über 30 Jahren verwendet. Im Vergleich mit klassischen Insektiziden besitzt es besondere Eigenschaften, welche es für den Einsatz in der Landwirtschaft wertvoll machen:

- Das Wirkungsspektrum der einzelnen B.t.-Toxine ist sehr eng, was zu einer Schonung der Nutzinsekten führt. Gegenüber dem Menschen, anderen Säugern und Vögeln besteht keine toxische Wirkung.
- Die B.t.-Toxine werden in der Umwelt schnell abgebaut.
- Gewisse B.t.-Toxine wirken gegen Schädlinge, welche gegen die meisten der herkömmlichen Insektizide Resistenzen ausgebildet haben.
- Da das Toxin aus Bakterien gewonnen wird, ist der Einsatz in Form von Applikationen im biologischen Landbau toleriert.

Der ökologische Vorteil, dass das Toxin in der Umwelt schnell abgebaut wird, ist aber zugleich auch ein Nachteil, da das Toxin nur von begrenzter Wirkungsdauer ist. Aus diesem Grund sind für eine wirksame Schädlingsbekämpfung meist mehrere Spritzungen notwendig. Ein weiterer Nachteil ist der hohe Preis der Spritzpräparate verglichen mit chemischen Insektiziden.

Diese Nachteile werden als Gründe dafür angegeben, weshalb die B.t.-Toxine bisher nur eine Nischenstellung eingenommen haben. Durch die Expression der B.t.-Toxingene in der Pflanze wird die Persistenz erhöht, die hohen Produktionskosten entfallen und es eröffnen sich neue Möglichkeiten bezüglich des Anwendungsbereichs. Durch die dadurch erhöhte Leistungsfähigkeit scheint es

möglich, dass B.t. exprimierende Pflanzen die chemischen Präparate möglicherweise ersetzen können (Roush, 1994).

Aufgrund der daher zu erwartenden quantitativen Zunahme der Einsatzfläche und der erhöhten Persistenz besteht die grosse Gefahr, dass die Zielorganismen und vielleicht auch Organismen, welche bei der behandelten Kultur im Moment keine Schäden verursachen, Resistenzen gegen die Toxine ausbilden. Diese Resistenzbildung ist auch schon in Fällen aufgetreten, wo es zu einem vermehrten Einsatz der B.t.-Spritzpräparate oder zum Einsatz von Spritzpräparaten mit hoher Persistenz kommt. Alarmiert durch diese Szenarien hat man daher begonnen, sich Überlegungen zu machen, wie eine Resistenzbildung möglichst lange herausgezögert werden kann. Man stützt sich dabei einerseits auf Erfahrungen und Versuche, welche man mit herkömmlichen B.t.-Spritzpräparaten gemacht hat, andererseits auf theoretische Überlegungen und auf mathematische Modelle.

Bis zum Auftreten der ersten Resistenz gegen B.t. (McGaughey, 1985) war man teilweise davon ausgegangen, dass eine Resistenzbildung gegen B.t.-Toxine wegen ihres Wirkungsortes im Darmepithel nicht möglich sei. In der Folge wurde jedoch bei vielen verschiedenen Insekten Resistenz gefunden. Diese war in gewissen Fällen auf eine verringerte Bindungsaffinität der Toxine an die Darmmembrane zurückzuführen (Tabashnik, 1994). Bei anderen Fällen von resistenten Insekten konnte diese Korelation jedoch nicht nachgewiesen werden (z.B. Gould *et al.*, 1992). Generell kann man davon ausgehen, dass das Potential zur Resistenzbildung bei allen Insekten vorhanden ist. Ob sich eine rezessive B.t.-Resistenz nun durch Selektion durchsetzen kann, welche in natürlichen Schädlingspopulationen heterozygot in einer geringen Frequenz bereits vorhanden ist, hängt davon ab, ob mit der Resistenz ein Fitnessverlust einher geht und wie stark und wie lange der ausgeübte Selektionsdruck wirkt, d.h. wie hoch die Mortalität der anfälligen Schädlinge bei einem B.t.-Einsatz ist und wie oft dieser Einsatz erfolgt. Das Ziel des Resistenzmanagements beruht darin, den Schaden durch Insektenfrass unter der Toleranzschwelle zu halten und zugleich die Bildung einer resistenten Schädlingspopulation so lang wie möglich herauszuzögern.

5.2. Strategien des Resistenz-Managements

Im Folgenden sollen verschiedene, in der Literatur beschriebene Strategien des Resistenz-Managements mit den dafür notwendigen Grundvoraussetzungen und auch mit den spezifischen Problemen erörtert werden.

5.2.1. Alternierender Einsatz von B.t.-Toxin mit anderen Massnahmen

Die Wirksamkeit des alternierenden Gebrauchs von B.t.-Toxin mit konventionellen Insektiziden, mit einer biologischen Kontrolle oder mit Kulturmassnahmen hängt davon ab, wie schnell die Schädlingspopulation bei einer Resistenzbildung gegenüber dem B.t.-Wirkstoff wieder anfällig wird. Dies setzt voraus, dass mit der Resistenzbildung bei den Insekten ein gewisser Verlust an Fitness verbunden ist,

welcher zu einer Wiederherstellung des Ausgangszustandes führt, sobald der Selektionsdruck wegfällt. Versuche mit verschiedenen Schädlingen haben gezeigt, dass die Situation je nach Spezies und je nach der Art und Ausprägung der Resistenz verschieden ist (z.B. Groeters *et al.*, 1993; Tabashnik *et al.*, 1994). Bei der Motte *Plodia interpunctella* beispielsweise war eine gering ausgeprägte Resistenz eher instabil, wo hingegen eine hohe Resistenz während langer Zeit auch ohne Selektionsdruck stabil blieb (McGaughey, 1994a).

Eine Möglichkeit einer kombinierten Anwendung ergibt sich beispielsweise durch die Verwendung von Pflanzen, welche nur eine geringe Konzentration von B.t.-Toxin exprimieren. Diese können die Entwicklung eines Schädling so verlangsamen, dass sich in einem Jahr nur noch eine Generation von Schädlingen an Stelle von mehreren entwickelt. Die anfälligen Schädlinge überleben, ihr Schaden hingegen wird begrenzt, eine direkte Selektion für Resistenz findet nicht statt. Hingegen besteht die Gefahr, dass sich resistente Individuen durch den früheren Fortpflanzungszeitpunkt von den anfälligen Individuen zeitlich isolieren und sich auf diesem Weg eine resistente Population ausbildet. Aus diesem Grund und aufgrund einer oft ungenügenden Effizienz müssen Pflanzen mit geringer Toxinexpression mit anderen Bekämpfungsmethoden wie z.B. natürlichen Antagonisten verknüpft werden. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Bekämpfung des Schädling auf völlig unterschiedlichen Mechanismen beruht, die Ausbildung einer Kreuzresistenz demzufolge kaum möglich ist.

5.2.2. Alternierender Einsatz von verschiedenen B.t. Toxinen

Wenn B.t.-Toxin mit anderen B.t.-Toxinen alternierend gebraucht wird, spielt auch hier die Stabilität von einmal entstandenen Resistenzen eine wichtige Rolle. Dabei gilt es zusätzlich die Bildung von Kreuzresistenzen zu beachten. Diese hängt hauptsächlich vom Mechanismus ab, auf welchem eine Resistenz beruht, was wiederum von Art zu Art variiert. So wies ein Laborstamm der Lepidoptere *Heliothis virescens* mit einer Resistenz gegen das Toxin CryIA(c) eine breite Kreuzresistenz gegen andere B.t.-Toxine auf (Gould *et al.*, 1992), während bei der Lepidoptere *Plutella xylostea*, resistent gegen CryIA(b), keine Kreuzresistenzen auftraten (Ballester *et al.*, 1994). Ein möglicher Faktor scheint zu sein, ob die B.t.-Toxine dieselbe oder verschiedene Bindungsstellen im Verdauungstrakt der Insekten haben.

5.2.3. Gleichzeitiger Einsatz von verschiedenen B.t. Toxinen

Mögliche Kreuzresistenzen können auch die Verwendung von mehreren B.t.-Toxinen in einem einzigen Feld in Frage stellen, sei es durch die Expression von verschiedenen B.t.-Toxingenen in einer Pflanze, der sogenannten Pyramidisierung, sei es durch das Mischen von Pflanzen, welche unterschiedliche Toxine exprimieren (McGaughey, 1994b). Bei letzterer Strategie ist eine Voraussetzung, dass das Insekt auf

verschiedenen Pflanzen frisst, sodass die Bekämpfung auch wirklich von mehreren Toxinen ausgeht. Der Einsatz von Genpyramiden kann nur dann erfolgreich sein, wenn noch keines der verwendeten Gene durchbrochen ist und wenn die pyramidierten Gene nicht auch als Einzelgene in benachbarten Regionen verwendet werden. Dies, da sich dort Resistenzen entwickeln können, welche die Wahrscheinlichkeit eines Durchbruchs der pyramidierten Gene erhöhen oder welche durch Kreuzung sogar direkt zu einem resistenten Stamm kombiniert werden können.

5.2.4. Refugien

Einen anderen Ansatz des Resistenz-Managements beinhaltet das zur Verfügung Stellen von Refugien, in welchen die Insekten nicht von dem Toxin fressen und somit keinem Selektionsdruck ausgesetzt sind. Da bei der Applikation der B.t.-Präparate immer gewisse Stellen der Pflanze nicht erreicht werden, ergeben sich dadurch eine Art Nischen. Ein gezieltes zur Verfügung Stellen von dem Schädling angepassten Refugien ist jedoch nur mit B.t.-exprimierenden Pflanzen möglich. Das Prinzip beruht darauf, dass Insekten ohne Resistenzgene in den Refugien überleben können. Wird in den übrigen Pflanzen das Toxin in solchen Mengen exprimiert, dass es gegen Schädlinge wirkt, welche heterozygot resistent sind, nicht aber gegen die homozygot resistenten, ergäbe sich bald eine rein homozygot resistente Schädlingspopulation. Dies wird jedoch durch die Einkreuzung mit homozygot anfälligen, welche in den Refugien überleben, verhindert. Der Schaden begrenzt sich also auf die Pflanzen oder Pflanzenteile, welche als Refugien dienen und auf das, was die verbleibenden homozygot resistenten Schädlinge fressen. Voraussetzung dieser Strategie ist jedoch, dass sich die homozygot anfälligen mit den homozygot resistenten Insekten kreuzen, und dass die homozygot anfälligen nicht mit Pflanzen oder Pflanzenteilen in Kontakt kommen, welche B.t. exprimieren und ebenfalls Resistenzen entwickeln. Ersteres ist abhängig von der Mobilität der Adulttiere, letzteres von der Mobilität der Schädlinge in dem Entwicklungsstadium, in welchem sie von B.t.-exprimierenden Pflanzen fressen können. In vielen Fällen ist aus diesem Grund die Verwendung von kleinen Refugien, wie z.B. Pflanzen, welche das Toxin nur in einem bestimmten Pflanzenteil exprimieren oder Mischungen aus Pflanzen mit und ohne Toxin nicht zu empfehlen. Diese können im Gegenteil sogar die Ausbildung von Resistenzen beschleunigen, verglichen mit Kulturen aus 100% geschützten Pflanzen (Mallet & Porter 1992). Für mobilere Schädlinge eignen sich daher als unbehandelte Refugien eher ganze Reihen oder sogar Felder. Bei allen Strategien, wo Refugien ausgespart werden, stellt sich auch die Frage nach deren Grösse in Bezug zur gesamten Anbaufläche. Sind sie zu klein und werden vollständig gefressen, weichen die anfälligen Schädlinge auf die geschützten Pflanzen aus und sind dort der Selektion durch B.t. unterworfen. Dies kann eine Beschleunigung der Resistenzbildung zur Folge haben. Sind die Refugien zu gross, werden die Massnahmen unwirtschaftlich. Zudem könnte sich das Erstellen von Refugien in der Praxis als zu umständlich und arbeitsaufwendig erweisen.

5.2.5. Zeitlich limitierte Toxinexpression

Eine andere Möglichkeit den Selektionsdruck zu verringern, besteht darin, die Toxinexpression auf die Zeitperiode zu beschränken, während der tatsächlich Schaden durch Insektenfrass entstehen kann. Durch die entsprechende Wahl des Promotors würde die Expression des B.t.-Gens gesteuert.

Auslöser wäre:

- der phänologische Zustand; dabei stellt sich die Frage, ob der Selektionsdruck tatsächlich relevant verringert wird,
- Insektenfrass; hier wäre neben der Reduktion des Selektionsdruck, auch die Zuverlässigkeit des Systems im Feld erst noch zu überprüfen,
- extern applizierbare Elizitoren, (Williams *et al.*, 1992); eine Toxinproduktion würde nur induziert, wenn die Toleranzschwelle an Schädlingen überschritten wird. Eine unnötiger Selektionsdruck würde dadurch vermieden werden.

5.2.6. Erfolgchancen in der Praxis

Der Vorteil der B.t.-Applikationen bezüglich Resistenzentwicklung besteht, neben dem niemals hundertprozentigen Wirkungsgrad im Feld darin, dass sie nur bei tatsächlichen Problemen mit Schädlingsbefall ausgebracht werden. Es kommt demzufolge nicht zu einem präventiven Einsatz, was eine Selektion zur Folge hätte, wenn diese gar nicht notwendig wäre. Von all den verschiedenen Strategien des Resistenzmanagements mit transgenen Pflanzen wird zur Zeit von vielen Autoren das Bereitstellen von Refugien als am erfolgsversprechendsten bewertet (z.B. McGaughey & Whalon, 1992). Daneben werden auch einer alternierenden Verwendung von Pflanzen mit unterschiedlichen Genpyramiden gute Erfolgchancen eingeräumt (pers. Mitteilung P. Lüthy). In verschiedenen Fällen sind bereits genügend wirksame B.t.-Gene vorhanden, die Rotationen müsste in einem regelmässigen, je nach Insekt verschieden langen Zyklus erfolgen.

Die meisten Strategien des Resistenzmanagements benötigen eine Absprache zwischen den Saatgutproduzenten zur Koordination des Einsatzes der verschiedenen B.t.-Gene innerhalb einer Saison. Vor allem die Strategien, welche Refugien beinhalten, setzen voraus, dass sich die Bauern an zum Teil relativ komplizierte Anbauschemen halten (Alstad & Andow, 1995). Erfahrungen mit konventionellen Insektiziden haben gezeigt, dass Empfehlungen bezüglich der Anwendung nicht immer beachtet werden.

5.2.7. Regionale Unterschiede

Es gilt zu berücksichtigen, dass die meisten der Überlegungen des B.t.-Resistenzmanagements für die USA gemacht wurden, wo die Anbauflächen und

dadurch auch der Selektionsdruck auf die Schädlinge sehr viel grösser sind, als in der Schweiz. Bedingt durch klimatische Unterschiede können sich in vielen Gegenden auch mehrere Insektengenerationen in einem Jahr entwickeln, was eine genetische Anpassung der Insekten innert kürzeren Zeiträumen ermöglicht.

Ein anderer Unterschied besteht in der Struktur der Landwirtschaft. Die Grösse der einzelnen Bauernhöfe ist in der Schweiz bedeutend geringer, die Kulturen eher auf verschiedene Gebiete verteilt. Dies könnte bei Resistenzmanagementstrategien, welche sich nicht nur auf einzelne Felder beschränken, Probleme in der Koordination ergeben. Ein wichtiger Unterschied besteht auch in der Bedeutung des Biolandbaus, welcher in der Schweiz schon heute nicht mehr nur eine Nischenfunktion hat und gemäss Prognosen in Zukunft weiter an Bedeutung gewinnen wird. Je nach dem ob und wenn ja, was für Insektizide in der Schweiz mit Abgaben belegt werden, könnte sich die Konkurrenzfähigkeit von B.t.-Präparaten gegenüber klassischen Insektiziden stark verbessern und somit diese auch gegenüber der Bekämpfungsstrategie mit transgenen Pflanzen aufwerten.

Im folgenden Kapitel sollen diese theoretischen Überlegungen unter anderem auf die beiden Schädlinge Kartoffelkäfer und Maiszünsler angewendet werden, da gegen diese in den USA bereits transgene Pflanzen mit B.t.-Toxin zur Verfügung stehen und da beide Insekten auch in der Schweiz als Schädlinge auftreten können.

5.3. B.t. exprimierende Pflanzen zur Bekämpfung des Kartoffelkäfers

Der Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*) hat bisher gegen alle grösseren Gruppen von Insektiziden z.T. innert kurzer Zeit Resistenz entwickelt. Diese Anpassungsfähigkeit scheint sich unter anderem darauf zu gründen, dass in grossen Kartoffelanbaugenden kaum unbehandelte Wirtspflanzen vorhanden sind und sowohl die Larven, als auch die Adulttiere am Wirt fressen. Der Selektionsdruck ist dadurch sehr gross. Ein weiterer Grund könnte auch eine gewisse Veranlagung zur Resistenzbildung sein, welche auf der Koevolution des Käfers mit einer Wirtspflanze basieren könnte, die hohe Toxinkonzentrationen, besonders Glycoalkaloide aufweist (Ferro, 1993). Bei einer dauernden einförmigen Anwendung eines B.t.-Toxins, welches über 90 % der Insekten tötet, prognostizieren, auf Laborversuchen basierende, mathematische Modelle eine erhöhte Resistenz nach weniger als 15 Generationen (Tabashnik, 1992). Diese Prognose gilt für den Einsatz von Sprays und von transgenen Pflanzen.

In den USA besteht Erfahrung mit einem Präparat aus *B. thuringiensis tenebrionis* (M-One, Mycogen, San Diego, CA). Eine Resistenzbildung gilt als eher unwahrscheinlich, da das Präparat nicht sehr persistent und eine maximale Bedeckung des Blattbelags mit Spritzmittel selten erreicht wird. Dadurch überleben genügend

anfällige Schädlinge zur Weitervermehrung, sodass sich eine Resistenz nicht etablieren kann. Wird der Schutz durch Einbau des Toxingens absolut, steigt die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzbildung stark an. Ein ähnlicher Effekt könnte auch durch einen intensiveren Einsatz des B.t.-Sprays hervorgerufen werden (Ferro, 1993). Es konnte jedoch die Beobachtung gemacht werden, dass Kartoffelkäfer, welche im Labor eine Resistenz gegen B.t.-Sprays entwickelt hatten, durch transgene Kartoffeln weiterhin bekämpft werden konnten. Dies könnte darauf hinweisen, dass sich bei einem gleich intensiven Einsatz von B.t. in Sprays oder in transgenen Pflanzen Resistenzen in letzteren langsamer entwickeln (Roush, 1994). Da es sich bei den in den Pflanzen exprimierten B.t.-Toxinen, meist um modifizierte Formen der B.t.-Toxine in Sprays handelt, wäre es naheliegend auch zu testen, ob Käfer, welche resistent gegen B.t. exprimierende Pflanzen werden, gegenüber den Sprays noch anfällig sind.

Kommt es zu einem Einsatz von transgenen Kartoffeln, scheint das Bereitstellen von Refugien wenig aussichtsreich zu sein. Bei einer Mischung aus geschützten und ungeschützten Pflanzen, würde ein zu hoher Prozentsatz an ungeschützten Pflanzen benötigt, sodass die Massnahme unrentabel würde. Da sich Kartoffelkäferpopulationen gemäss vorliegenden Daten wegen ihrer geringen Mobilität nur wenig mischen, erscheint auch die Verwendung von Streifen am Feldrand als Refugien wenig sinnvoll (Ferro, 1993).

Obschon der wichtigste Schädling der Kartoffel weltweit und in der Schweiz der Kartoffelkäfer ist, hat er bei uns nur eine geringe Bedeutung. Die Behandlungen beschränken sich auf einzelne Felder (Rang 9 bzgl. Indexwert für Insektizid-Behandlungen, gemäss Fried *et al.*, 1993). Dabei kommt vor allem der spezifische Wachstumshemmer Nomolt zum Einsatz. Als Alternative bietet sich auch das B.t.-Spritzpräparat Novodor an, welches mit einem Wirkungsgrad von 83-99 % in der Grössenordnung von Nomolt liegt (Dubois & Jossi, 1993).

Ein Einsatz von B.t.-Toxin exprimierenden Kartoffeln erscheint in der Schweiz nicht notwendig. Wohl liessen sie sich in gewissen Fällen anstelle von anderen Bekämpfungsmethoden verwenden, der Einsatz von B.t. in Form von Spritzmitteln ergibt aber ebenso befriedigende Resultate. Da B.t.-Präparate nur in einem geringen Ausmass zum Einsatz kommen, ist die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzbildung sehr viel kleiner als bei transgenen Kartoffeln, welche das B.t.-Toxin konstitutiv exprimieren und so einen permanenten Selektionsdruck ausüben. Möglicherweise ergäbe sich auch ein Interessenskonflikt mit den biologischen Bauern. Sollten wegen den B.t.-Kartoffeln Kartoffelkäfer mit Resistenz gegen Toxin aus *B.t. tenebrionis* selektioniert werden, würden möglicherweise auch die entsprechenden Spritzpräparate ihre Wirkung verlieren.

5.4. B.t. exprimierende Pflanzen zur Bekämpfung des Maiszünslers

Der Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*), welcher in Mais einen Schaden von 10-30% verursachen kann, ist im frühen Larvenstadium auf B.t.-Toxin empfindlich. Da sich die Larven aber nach der zweiten Häutung in den Stengel oder Kolben einboren, können sie mittels Spritzungen nur schlecht bekämpft werden. Dieses Problem lässt sich umgehen, wenn sich das B.t.-Toxin im Inneren der Pflanze befindet. Eine Möglichkeit dazu bietet heute der Anbau von transgenem Mais. Eine andere Möglichkeit wäre z.B. die Verwendung des InCide® Systems, bei welchem das B.t.-Gen in das Bakterium *Clavibacter xyli* eingepflanzt wird, welches nachher im Innern der Pflanze lebt und dort das Toxin produziert (In Gelernter & Schwab, 1993). Ob letzteres System auch verwendet wird, hängt wohl von Faktoren, wie Zuverlässigkeit, Kosten, Produktesicherheit u.a. ab. Der ausgeübte Selektionsdruck hingegen wird weniger vom System, als von der B.t.-Toxinkonzentration in der Pflanze selbst bestimmt. In Bezug auf die verschiedenen Strategien des Resistenzmanagements ergibt sich hier eine andere Situation als beispielsweise beim Kartoffelkäfer. Einerseits stehen beim Maiszünsler verschiedene alternative Bekämpfungsmethoden zur Verfügung. So wird heute direkt mit der Schlupfwespe *Trichogramma brassicae* biologisch bekämpft. Indirekt kann durch sauberes Unterpflügen des Strohs ein Teil der Raupen vernichtet werden (Haeni *et al.*, 1992). Eine Untersaat oder das Belassen einer Restverunkrautung fördert natürliche Antagonisten (siehe unten). Andererseits besitzt der Maiszünsler ein breiteres Wirtsspektrum als der Kartoffelkäfer. Er befällt neben Mais auch andere Wild- und Kulturpflanzen. Diese sind zwar verglichen mit den Maispflanzen für die Vermehrung unbedeutend. Da die Imagines des Maiszünslers aber relativ mobil sind, könnten diese Populationen im Falle eines Einsatzes von B.t.-exprimierenden Pflanzen einen möglichen Beitrag zur Ausdünnung von homozygot resistenten Individuen leisten. Den Wildpflanzen käme also die Funktion eines Refugiums zu (Ferro, 1993). Der Selektionsdruck auf den Maiszünsler scheint dadurch nicht so gross wie beim Kartoffelkäfer zu sein. Zudem ist die Erzeugung von Stämmen mit einer stabilen Resistenz im Labor im Gegensatz zum Kartoffelkäfer noch nicht gelungen. Angesichts dieser Ausgangslage scheint die Gefahr einer Resistenzbildung allgemein weniger gross zu sein.

Die direkte Bekämpfung des Maiszünslers erfolgt in der Schweiz fast ausschliesslich biologisch durch *Trichogramma*. Da es sich bei dieser Schlupfwespe um einen Eiparasiten handelt, ist es wenig wahrscheinlich, dass es wie bei gewissen parasitierten Larven zu einer direkten Resistenzreaktion gegen das Schlupfwespenei kommt. Denkbar, wenn auch noch nicht beobachtet, wäre jedoch eine Verhaltensresistenz des Maiszünslers z.B. bei der Auswahl des Eiablageortes, welche zu einer geringeren Effizienz der Bekämpfung führen würde. In diesem Fall wäre ein B.t.-Einsatz eine mögliche Ergänzung. Eine Möglichkeit des parallelen Einsatzes des B.t.-Toxins mit *Trichogramma* ist die Verwendung von Konzentrationen in der Pflanze, welche neben anfälligen auch heterozygot resistente Individuen töten. Homozygot resistente würden durch die Bekämpfungsmassnahme mit *Trichogramma* erfasst, dazu kommt die genetische Ausdünnung mit den Populationen auf den Wildpflanzen. Sollten diese nicht ausreichen, könnten zusätzlich Refugien bereitgestellt werden. Hierbei stellt sich jedoch wiederum die Frage nach deren Form,

da eine Larve oft nicht nur eine einzige Pflanze befällt. Der parallele Einsatz von B.t. und Schlupfwespen zur Bekämpfung wäre auch bei massivem Befallsdruck geeignet, insofern eine Bekämpfung mit Schlupfwespen nicht mehr effizient genug wäre. Da sich die Larven von *Trichogramma* in den Eigelegen von *O. nubilalis* entwickeln, welche mit dem B.t.-Toxin im Inneren der Pflanze nicht in Kontakt kommen, sollten sich daher keine Probleme ergeben. Abzuklären wäre hingegen, ob die Schlupfwespe nicht bevorzugt die Refugien besucht, sollten sich dort höhere Gelegedichten ergeben. In einem solchen Fall würde der Nutzen der Refugien geschmälert (Gould, 1994).

Wegen der Lebensweise der Maiszünslerlarven ist der Einsatz von B.t.-Spritzmitteln kaum möglich. Aus diesem Grund hätte eine Resistenzbildung durch den Maiszünsler von B.t. insofern wenig Konsequenzen, als dadurch einfach der Status quo in der Auswahl an Bekämpfungsmöglichkeiten wieder hergestellt würde, sofern die Zucht von *T. brassicae* noch weitergeführt würde. Ein Anbau könnte für den Bauern insofern interessant sein, als er Arbeit einsparen könnte. Dieser Vorteil würde jedoch zunichte gemacht, wenn das Anlegen von Refugien das Aussäen verkompliziert. Zudem stellt sich die Frage, ob ein Bauer zu einem bewussten Opfer eines Teils der Kultur bereit wäre, um eine Resistenzbildung um ein paar Jahre hinauszuzögern. Würden 10% der Pflanzen als Refugium zur Verfügung gestellt, wäre der Unterschied zur durchschnittlichen Schadensmenge durch den Maiszünsler gering.

Auf die grosse Gefahr des Durchbruchs von monogenetischen Resistenzen hingewiesen, lautet eine gängige Antwort der Produzenten von transgenen Pflanzen, dass es sich dabei um Pflanzen einer ersten Generation handelt und dass folgende Generationen von transgenen Pflanzen Genpyramiden enthalten werden. Solche Argumente machen es aber wenig verständlich, dass derzeit diese erste Generation als eine Art 'Prototypen' grossflächig auf den Markt kommen. Einmal durchbrochen wären diese in späteren Genpyramiden praktisch nutzlos. In jedem Fall ist davon auszugehen, dass ein Einsatz von *Trichogramma* einen geringeren Einfluss auf die Umwelt ausübt, als ein Einsatz von B.t., egal in welcher Anwendungsform. Die Gefahr einer Resistenzbildung ist in der Schweiz generell als eher gering einzuschätzen, da die Anbaufläche des Mais vergleichsweise klein ist und da sich pro Jahr nur eine einzige Maiszünslergeneration entwickelt, der Selektionsdruck also relativ gering ist. Gerade der geringen ökologischen und ökonomischen Problematik wegen erscheint ein Einsatz von B.t.-Mais höchstens zu Forschungszwecken sinnvoll. Da zu erwarten ist, dass in den nächsten Jahren in den USA grosse Flächen mit B.t.-Mais angebaut werden, ergibt sich aber dort die Möglichkeit, mögliche Resistenzstrategien unter hohem Selektionsdruck vor einem allfälligen Einsatz in der Schweiz zu studieren. Da der Maiszünsler in der Schweiz von viel geringerer Bedeutung ist, als in den USA und eine ausreichende Bekämpfung mittels *Trichogramma* erfolgt, ist ein Zuwarten mit dem grossflächigen Einsatz von B.t.-Mais also problemlos möglich.

6. Einfluss oder Risikoanalyse der transgenen Pflanzen

6.1. Sicherheitsfragen bezüglich Virusresistenz

Im Zusammenhang mit der 1995 erstmals erfolgten Zulassung einer gentechnisch veränderten Pflanze in den USA, welche durch den Einbau eines viralen Hüllproteins vor Virusbefall geschützt ist, ergaben sich verschiedene Fragen bezüglich der Sicherheit dieser Pflanzen bei einem grossflächigen Anbau. Die Untersuchungen, welche dabei zur Zeit im Vordergrund stehen, zielen darauf ab, herauszufinden, ob durch den Einbau von Virusgenen in Pflanzen neue Viren mit einem veränderten Wirtsspektrum und einer erhöhten Virulenz entstehen können.

Ein Phänomen, welches nur in CP exprimierenden Pflanzen verstärkt auftreten kann, ist die sogenannte "Heteroenkapsidierung". Die Möglichkeit einer homologen oder nicht-homologen Rekombination ist jedoch bei den meisten der PDRs gegeben.

6.1.1. Heteroenkapsidierung

Bei Pflanzen, welche Hüllproteine einer bestimmten Virusart synthetisieren, kann bei einer Infektion durch eine andere Virusart durch eine Heteroenkapsidierung ein Virus entstehen, dessen Hülle ganz oder zumindest teilweise aus artfremden Proteinen besteht. Dadurch kann sich für das Virus hybrid ein neues Wirtsspektrum oder neue Verbreitungsmöglichkeiten ergeben. So kann z.B. ein von Blattläusen nicht übertragener Stamm durch Heteroenkapsidierung plötzlich von Blattläusen übertragen werden (Lecoq *et al.*, 1993). Probleme durch Heteroenkapsidierung sollten jedoch nicht auftreten, da die Nukleinsäure der Viren nicht verändert wird. In dem neuen Wirt würden wieder die ursprünglichen Hüllproteine synthetisiert, eine Vervielfältigung des Virus hybrid käme somit nicht zustande (Beringer, 1994). Zudem kann eine Übertragung durch Blattläuse durch einfache Veränderungen eines Aminosäuretripletts verhindert werden (Malnoë, 1995).

6.1.2. Rekombination

Unter hohem Selektionsdruck kann es nachweislich zur Entstehung neuer Viren durch Rekombination zwischen dem Transkriptionsprodukt einer transgenen Pflanze und viraler RNA kommen (Greene and Allison, 1994). Was für Folgen diese Rekombinationen jedoch bei einem grossflächigen Anbau von transgenen Pflanzen mit viralen Genen haben können, ist Gegenstand kontroverser Ansichten. Es wird darauf hingewiesen, dass durch die Freisetzung von Pflanzen mit PDR ein grosses Potential zur Rekombination von viraler Nukleinsäure geboten wird. Die Möglichkeit zur Rekombination ist aber auch so durch Mischinfektion verschiedener Viren gegeben. Der Nachweis, dass eine virale RNA auch durch die verschieden geformte

Proteinhülle eines anderen Virus übertragen werden konnte, weist darauf hin, dass eine Evolution der Viren auch durch die Aufnahme fremder Virusgene stattfinden kann (De Jong & Ahlquist, 1992). Neue Viruskrankheiten entstehen aber meist durch kleine Änderungen in schon bekannten Virusstämmen (Falk and Bruening, 1994). Rekombinanten mit Genen aus verschiedenen Virusgruppen waren, weniger lebensfähig als die Viren, aus welchen sie zusammengesetzt waren (De Jong & Ahlquist, 1992). Insgesamt wird argumentiert, dass es sehr unwahrscheinlich ist, dass mehr lebensfähige Rekombinanten entstehen können als bei den bisherigen Anbaumethoden. Zudem wird auf die zahlreichen Feldversuche hingewiesen, welche bisher keine negativen Auswirkungen gezeigt haben. Mögliche Risiken stehen demzufolge in einem kleinen Verhältnis zum Nutzen virusresistenter Arten. Dem wird entgegengehalten, dass bei einem überwiegenden Teil der Freilandversuche mit virusresistenten Pflanzen die mögliche Entstehung neuer Viren nicht untersucht wurde und demzufolge auch nicht entdeckt werden konnte (Mellon & Rissler, 1995). Ein weiterer Einwand gilt der Grösse von Freilandversuchen. Einzig Freisetzen, welche in China gemacht wurden, waren grossflächig genug (Plafker, 1994), dass eine genügend grosse Wahrscheinlichkeit zur Entstehung neuer Viren durch Rekombination in transgenen Pflanzen gegeben war. Bisher liegen keine Berichte über negative Auswirkungen vor, was als Hinweis darauf gewertet werden kann, dass die Risiken eher gering sind. Nach Parlevliet (1993) gehören die meisten Viren bezüglich Wirt-Pathogen Verhältnis in eine Gruppe, in welcher eine Anpassung an klassische Resistenzen, wenn überhaupt, nur langsam erfolgt. Dies obschon Viren zu den am schnellsten mutierenden Organismen gehören. Bezüglich der Rekombination in Pflanzen, welche ein CP-Gen enthalten, bestehen aber noch verschiedene offene Fragen, welche aufgrund des heutigen Wissens nicht beantwortbar sind (Malnoë, 1995).

In verschiedenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass es für eine PDR nicht notwendig ist, vollständige Hüllproteine oder Replikasen einzubauen. Die gleiche Wirkung konnte z.T. auch mit fehlerhaften Genen oder auch nur mit Genfragmenten erzielt werden. Soweit dies möglich ist, sollten eingebaute Virussequenzen so abgeändert werden, dass das Gen seiner Funktion beraubt wird, der Schutz der Pflanze aber immer noch gewährleistet ist (Beringer, 1994). Dies würde etwaige Rekombinationsrisiken minimieren, möglicherweise sogar ganz beseitigen.

6.2. Ökologische Auswirkungen

Sollen der Einfluss und die möglichen ökologischen Risiken eines Einsatzes gentechnisch veränderter Pflanzen abgeschätzt werden, müssen folgende Punkte abgeklärt werden:

a) *Die Funktion des Genes im Spenderorganismus muss bekannt sein.*

Besitzt das Gen nur die gewünschte Funktion? Die Antwort darauf ist vermutlich positiv, wenn es sich dabei um eine Modifikation eines bekannten Resistenzgens handelt, welches in bekannten Clustern von Resistenzgenen vorkommt. Bei anderen Genen können wir die Frage vermutlich nicht beantworten.

b) *Was für einen Effekt hat das Transgen auf den Phänotyp der transgenen Empfängerpflanze?*

Hat das Transgen nur die gewünschte Resistenzwirkung? Wiederum ist die Antwort bei Modifikationen von bekannten Resistenzgenen vermutlich positiv. Bei anderen Resistenzen können auch andere Effekte auftreten. Wo diese offensichtlich werden, können sie vor einer Anwendung ausselektiert werden. Es können jedoch auch Effekte auftreten, welche nicht einfach beobachtet oder gemessen werden können, solange die Pflanze nicht auf einer grossen Fläche angebaut wird:

Integrationeffekte. Bisher gibt es kaum eine Möglichkeit Ort und Anzahl der eingebauten Gene zu bestimmen (siehe Kapitel 4.1.). Dadurch können sich Auswirkungen auf die Genexpression und auf die Wechselwirkungen zwischen dem Resistenzgen und anderen Genen, welche die Resistenzantwort des Wirts auf einen Krankheits- oder Schädlingsbefall modifizieren, ergeben.

Pleiotropische Effekte. Ein Resistenzgen von einer anderen Art kann pleiotropische Effekte auf die Abwehr von Krankheiten und Schädlingen oder auf andere, davon unabhängige Merkmale des Wirt haben.

Instabilität des Transgens. Das Transgen wird möglicherweise während einiger Generationen im Wirt exprimiert und verschwindet dann aber, beispielweise als Folge einer "DNA-Reparatur", wie sie z.B. während der Meiose vorkommt, wenn der Wirt sich von Fremd-DNA befreit. Im Feld würden sich solche Effekte als Verlust der Resistenz äussern. Solche Effekte können bei der Selektion von resistenten Organismen gegenüber einem Resistenzgen eine wichtige Rolle spielen, da es unwahrscheinlich ist, dass alle Individuen der Wirtspopulation die Resistenz gleichzeitig verlieren würden. Es könnte also zu einem graduellen Verlust der Wirksamkeit der Resistenz kommen, was die Dynamik in der Selektion von Adaptationen der Krankheits- oder Schädlingspopulationen an die Resistenz beeinflussen könnte. Ein bereits erwähntes Beispiel sind Genpyramiden. Sollten in einer Genpyramide jeweils verschiedene Resistenzgene ausfallen, sodass das Pathogen im Extremfall nur ein einziges Resistenzgen überwinden muss, könnten sich, besonders wenn dies im selben Feld geschieht, innert kurzer Zeit durch sexuelle Rekombination Pathotypen mit multipler Resistenz ausbilden (siehe auch Kapitel 4.2.).

Auswirkungen des Transformationsprozesses. Der Transformationsprozess selbst kann während der Regeneration des Wirts zu somaklonalen Variationen oder zu anderen Mutationen führen (siehe Kapitel 4.2.). Einige mögen keine Konsequenzen haben, andere dagegen könnten die Reaktion des Wirts gegen die Krankheit oder den Schädling beeinflussen.

c) *Gibt es toxische oder allergene Effekte?*

d) *Was sind die Auswirkungen auf Nicht-Zielorganismen?*

Dies ist eine äusserst wichtige Frage, da ein breites Spektrum von Resistenzstrategien auf Enzymen mit einer generellen Wirkung auf Pilze beruht. Durch die transgenen Pflanzen gelangen diese in einer aktiven Form direkt in die Rhizosphäre. Dadurch können sich Schäden an Nutzorganismen ergeben, wie z.B. Mykorrhizapilzen, hyperparasitären Pilzen, Pilzen, welche Schadpilze verdrängen oder auch Pilzen, welche für die Bodentextur wichtig sind. Bisher ist diesbezüglich nur wenig Information vorhanden, jedoch gibt es bekannte Beispiele mit ähnlichen Problemstellungen, z.B. der Einsatz von breit wirksamen Insektiziden.

Ein aussergewöhnlicher Erfolg in der Bekämpfung eines Pflanzenpathogens kann zu einer Veränderung in der Kompetitivität zwischen den verbleibenden Pathogenen führen, was zu einer unerwarteten Verschärfung eines bisher unwichtigen Problems führen kann (Stakman, 1947). Ein Beispiel dafür wäre das Aufkommen von Infektionen durch *Rhizoctonia* im Weizenanbau, nachdem *Pseudocercospora herpotrichoides* erfolgreich mit einem Fungizid bekämpft werden konnte.

e) *Was ist die Persistenz von transgenen Pflanzen in landwirtschaftlichen und natürlichen Habitaten?*

d.h. kann es zu einer Verunkrautung wegen eines selektiven Vorteils kommen (siehe Expertise von K. Ammann)?

f) *Was ist die Wahrscheinlichkeit und die Konsequenz eines vertikalen Gentransfers?*

Hier muss zwischen einem Transfer -in andere Varietäten derselben Kultursorte, -in eine verwandte Kultursorte, -in eine verwandte Wildsorte unterschieden werden.

Auskreuzung durch Pollen auf nicht transformierte Kultur- und Wildpflanzen
Aufgrund von kürzlich gemachten Beobachtungen hat sich die Tendenz ergeben, die Distanz, durch welche transgene Pflanzen in Versuchen isoliert werden, zu verkleinern. Dies, da die Frequenz des Pollens mit zunehmender Distanz von der

Ursprungsquelle in einem steilen Gradient sinkt. Dabei werden zwei wichtige Faktoren übersehen:

i) Bei einer Vergrößerung von kleinen Feldversuchen ausgehend nimmt die Masse an vorhandenem Pollen enorm zu (besonders bei einem grossflächigen Anbau), was, ausgehend von unseren Erfahrungen mit Sporen von *Erysiphe graminis*, welche in etwa dieselbe Grösse von Pollenkörnern haben, vermutlich zur Folge hätte, dass ein grosser Teil der Pollenkörner in Konvektions- oder Windströmen erfasst und über lange Distanzen verfrachtet werden, was eine Kreuzung mit nicht transformierten Sorten und Varietäten ermöglicht. Kürzlich konnte dies bei Raps bestätigt werden, wo grosse Pollendepositionen in 2,5 km Entfernung von der Ursprungskultur gefunden wurden (Coghlan, 1995). Dieser Faktor kann bei Pflanzen, welche schon lange in Europa heimisch sind wie Brassica, Rüben und gewisse Getreidesorten von Bedeutung sein, jedoch kaum bei "neu" in Europa eingeführten Kulturpflanzen, wie Kartoffel und Mais.

ii) Durch den Menschen kommt es, absichtlich oder unabsichtlich, zu einem beachtlichen Transport von Samen und Pflanzen über ein ganzes Spektrum von Entfernungen vom Ursprungsort. Dies könnte vor allem von Bedeutung sein, wenn es zum erwarteten grossflächigen Anbau von transformierten Varietäten kommt.

Der unabsichtliche Transfer eines Resistenzgens in eine andere Varietät derselben Kulturpflanze kann zu einer erhöhten Selektion bezüglich einer Anpassung durch den Zielorganismus führen. Gewisse Resistenzmanagementstrategien könnten dadurch verunmöglicht werden. Weitere Probleme könnten sich durch Unklarheiten bezüglich Royalties für mögliche Patente auf ausgekreuzten Genkonstrukten ergeben. Der Transfer von Resistenzgenen auf andere Kultur- oder Wildpflanzen kann zu Unkrautproblemen in der Landwirtschaft oder zu Veränderungen von natürlichen Pflanzengesellschaften führen.

Verbunden mit der Frage, ob es zum Transfer des Transgens in eine andere Sorte oder Art kommt, ist die Frage, ob dies überhaupt von biologischer Relevanz ist. Dies kann nicht vorausgesagt werden, sollte aber aus folgenden Gründen mit Vorsicht behandelt werden:

i) Kultursorten können zu Unkräutern werden und auch verwildern. Beispielsweise ist die Zuckerrübe als Unkraut wohl bekannt und in Grossbritannien wird neu das Auftreten von wildem Raps beobachtet. Die verwilderten Populationen scheinen das Resultat einer Beweidung zu sein, welche die Mehrjährigkeit von Rapspopulationen erhöht.

ii) Es gibt viele bekannte Beispiele, in welchen die Verbreitung oder die Ausbreitungskapazität einer Pflanzenart von einem einzigen Pathogen oder Schädling begrenzt wird. Dies ist die Basis der bekannten und besonders eindrücklichen Beispiele aus der biologischen Kontrolle. Die Freisetzung von transgenen Pflanzen könnte zum umgekehrten Effekt der biologischen Kontrolle führen, sollte das Transgen in eine Art eingekreuzt werden, welche einzig durch die Anfälligkeit gegenüber dem entsprechenden Pathogen oder Schädling begrenzt wird (siehe aber unter iv)).

iii) Es ist möglich, dass eine bestimmte Krankheit oder ein bestimmter Schädling in natürlichen Populationen nur selten auftritt und daher unwichtig erscheint. Dieses geringe Vorkommen kann aber daran liegen, dass die Krankheit oder der Schädling die Häufigkeit des Wirtes verringert hatte. Die Einführung eines resistenten Wirtes könnte zu einer raschen Vermehrung des Wirtes führen, da er nicht mehr durch das Pathogen oder den Schädling begrenzt würde.

iv) Es besteht die Tendenz, die Häufigkeit einer bestimmten Art in der Pflanzengemeinschaft als Folge eines einzelnen limitierenden Faktors, z.B. Kältetoleranz, zu betrachten. In Wirklichkeit ist die Situation in den meisten Fällen jedoch komplizierter, da die einzelne Art durch komplexe Interaktionen mit zwei und mehr anderen Arten und Faktoren kontrolliert wird. Neue Krankheits- und Schädlingsresistenzen in einer Art können daher auch die Dynamik von anderen beeinflussen.

Eine möglicherweise wichtige Interaktion im agronomischen Zusammenhang kann der weitverbreitete Einbau von Herbizidresistenz in Kulturpflanzen und deren möglicher Anbau in Kombination mit breit wirksamen Herbiziden sein. Dies würde zu einer starken Reduktion der Nicht-Kulturpflanzen führen, was mit einem Verlust von Nischen für Nutzinsekten (und andere Organismen) verbunden wäre. Dadurch könnte der Bedarf an Insektiziden oder schädlingsresistenten Pflanzen steigen, was wiederum zu einer erhöhten Selektion auf Resistenz im Schädling führt. Eine erfolgreiche Anpassung der Schädlinge oder der Krankheit durch erhöhte Selektion wäre dann besonders schwierig zu kontrollieren.

g) Was ist der Einfluss eines neu selektionierten Pathogens oder Schädlings, wenn eine neuartige Resistenz durchbrochen wird?

Es besteht die Möglichkeit, dass das Pathogen sein Wirtsspektrum ändern kann. In Kapitel 4.2.3. wurde bereits erwähnt, dass der Transfer eines Erbsenphytoalexins in Mais zur Selektion eines Maispathogens mit der Fähigkeit die Resistenz zu durchbrechen führen könnte, welches dann auch eine pathogene Wirkung auf der Erbse erlangen würde.

Sollte es einem neuartig selektionierten Pathogen oder Schädling gelingen, mit einem anderen zu hybridisieren, könnten weitere Probleme wegen der veränderten Fitness des Pathogens oder Schädlings, welcher die neue Eigenschaft erhalten hat, entstehen. Dieses wäre analog dem oben erwähnten Problem beim Transfer von Resistenzgenen in andere Wirtspflanzen. Ein möglicherweise wichtiges Problem diesbezüglich ist die Frage der Virusrekombination (siehe Kapitel 6.1.).

Diese Fragen der ökologischen Interaktionen wurden von Parker und Kareiva (1994) bezüglich des Bedarfs von ökologischen Tests auf Eigenschaften, welche die Expression von Resistenz gegenüber biologischem Stress beeinflussen können, in der folgenden Frage zusammengefasst:

“Verändert die modifizierte Eigenschaft die ökologischen Charakteristika des betreffenden Organismus (Interaktionen mit anderen Arten miteingeschlossen) in einer Art und Weise, dass es zu einem unerwarteten Populationswachstum oder einer Vergrößerung des Verbreitungsgebiets führen könnte?“

Lautet die Antwort “möglicherweise ja“ werden ökologische Versuche benötigt, bevor die Eigenschaft eingebaut wird.

Ein wichtiges Gebiet, welches in der Diskussion über ökologische Auswirkungen häufig nicht beachtet wird, ist die Lagerung von Landwirtschaftsprodukten. Das erste Insekt, bei dem eine Resistenz gegen das δ -Endotoxin von B.t. nachgewiesen werden konnte, war *Plodia interpunctella*, ein wichtiger Lepidopteren-Schädling auf gelagerten Körnern und Getreiden. Das stabile einzelne Resistenzgen ergab eine Kreuzresistenz zu anderen B.t.-Isolaten. Sollte sich dieses Spektrum von dem anderer Schädlinge auf ganzen Pflanzen unterscheiden, könnte sich ein Problem in der Strategie der Anwendung von B.t. ergeben.

7. Kurzbeurteilung der Kulturen_

In dem folgenden Teil des Berichtes wird auf Krankheiten in den Kulturen Kartoffel, Mais, Raps, Weizen und Zuckerrübe in der Schweiz eingegangen. Dabei stützt sich der Bericht in der Auswahl der für die Schweiz relevanten Schädlinge und Krankheiten auf die Expertise von P. Fried *et al.* (1993). Bedingt durch einzelne Erfolge in der gentechnologischen Entwicklung von Resistenzen, wurden z.T. von der genannten Expertise verschiedene Schwerpunkte gesetzt. Mögliche Bekämpfungsmethoden wurden neben dem Bericht u.a. auch dem Buch "Integrierter Pflanzenschutz im Ackerbau" von Haeni *et al.*, 1992 entnommen.

Das Ziel dieses Kapitels ist es zu erörtern, was für Krankheiten heute in der Schweiz von Bedeutung sind, wie diese bekämpft werden und was für alternative Bekämpfungsmöglichkeiten sonst noch zur Verfügung stehen, wo ein Einsatz von transgenen Pflanzen möglich wäre und was für Auswirkungen dies hätte. Dabei muss auf Schwierigkeiten in der Beurteilung hingewiesen werden. Das Wissen über die Interaktionen zwischen Pathogenen und ihren Wirten ist heute noch sehr lückenhaft. Besonders bei Pilzkrankheiten ist noch völlig unklar, was für Strategien in transgenen Pflanzen im Feld zu einer Resistenz führen könnten. Aus diesem Grund kann über mögliche Reaktionen und Anpassungen des Pilzes an die Veränderung im Wirt nur aufgrund früherer Erfahrungen mit Resistenzgenen gemutmasst werden. Dies gilt noch in verstärktem Masse für mögliche Reaktionen und Anpassungen, welche bei Organismen hervorgerufen werden könnte, auf welche das eingebaute Gen nicht direkt gerichtet ist.

7.1. Kartoffel

7.1.1. Krankheiten

Die meisten der in der Schweiz zugelassenen Kartoffelsorten sind gegen mindestens eine der drei wichtigsten Virose (PLRV, PVY, PVX) stark bis mittel anfällig (Winiger, 1995). Daneben gibt es Kartoffelsorten, welche eine gute natürliche Resistenz aufweisen. Das Einkreuzen von Resistenzen in die Kartoffel ist jedoch äussert aufwendig, da bei der Kartoffelzucht eine Vielzahl von wichtigen Qualitätsmerkmalen zugleich beachtet werden müssen und es bei Selbstung zu Inzuchtdepressionen kommt. Heute ist es möglich, mittels Transformation direkt einzelne Resistenzgene gegen die drei Virose in Kartoffeln einzubauen. Die wirksamsten dieser Resistenzgene gegen Viruskrankheiten wurden aus den Viren selbst isoliert. Am weitesten fortgeschritten ist die Entwicklung bei Kartoffelpflanzen, welche durch Expression von 'Coatprotein' gegen PVX und PVY resistent sind. In den USA wurden bereits etliche Freilandversuche durchgeführt und auch in der Schweiz wurden in kleinen Parzellen in Changins zwei Freilandversuche

vorgenommen, bei welchen der Schutz der Pflanzen im Feld nachgewiesen wurde (Collet *et al.*, 1993).

Die möglichen Schäden durch die Virose können beträchtlich sein. Daher werden heute verschiedene Massnahmen dagegen ergriffen. Eine indirekte Bekämpfungsmethode, welche eine Ausbreitung der Viren v.a. durch Blattläuse verringert, besteht im Totspritzen der Kartoffelstauden bei Beginn des Blattlausflugs. Diese Massnahme wird auch zur Ernteerleichterung und zur Verminderung der Gefahr von Krautfäuleinfektionen durchgeführt (Putz, 1986). Daher ist ein Verzicht darauf nicht möglich, jedoch könnte sie aber zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden. Weiter wird die Ausbreitung der Viren in der Schweiz durch stichprobenartige ELISA-Tests im Labor und durch einen Nachbau eines Teils der Saatkartoffeln im Feld begrenzt. Wären diese Massnahmen nicht mehr nötig, würde dies zu einer Vereinfachung der Saatgutproduktion führen. Eine wirkliche Einsparung von Arbeitsschritten kommt aber erst dann zustande, wenn durch Resistenzen ein sicherer Schutz vor allen wichtigen Virose gewährleistet werden kann. Auf die ELISA-Tests und auf den Nachbau zwecks Virusnachweis könnte bei virusresistenten Kartoffeln verzichtet werden, nicht jedoch auf die visuellen Kontrollen des Saatguts, welche vor allem den Pilzkrankheiten gelten. Sollte in der Folge das Virusproblem als gelöst angesehen werden, könnte die Tendenz bestehen das Totspritzen des Krautes nicht mehr vom Blattlausflug, sondern vom Erntezeitpunkt abhängig zu machen. Dies würde zu einer vermehrten Mobilität der Blattläuse führt. Damit besteht die Gefahr, dass sich durch diese Vektoren Viren ausbreiten können, welche bisher weniger wichtig waren und gegen welche aus diesem Grund auch keine Resistenz eingebaut wurde (Pers. Mitt. U. Merz). Dieses Unterdrücken von Nebenkrankheiten durch eine Massnahme gegen eine Hauptkrankheit ist ein Phänomen, welches schon in verschiedenen Fällen beobachtet werden konnte. Dadurch können Erfolge im Einbau oder auch Einkreuzen von Resistenzen zumindest zu einem Teil wieder relativiert werden. Sollten die Kontrollen bei transgenen Kartoffeln völlig oder teilweise wegfallen, müsste sichergestellt werden, dass dennoch zertifiziertes Saatgut zu den ursprünglichen Preisen für (Bio-) Bauern, welche keine transgenen Kartoffeln anbauen wollen, zur Verfügung steht.

Als wichtigste Krankheit der Kartoffel in der Schweiz gilt der Oomycet *Phytophthora infestans*, der Erreger der Kraut- und Knollenfäule. Die in der Schweiz zugelassenen Sorten weisen starke Unterschiede bezüglich ihrer Resistenz auf. Ausgerechnet die Sorte Bintje, welche in der Schweiz mit 23,8 % Flächenanteil am weitaus häufigsten angebaut wird, ist gegen die meisten Krankheiten, so auch gegen *P. infestans* sehr anfällig (Winiger, 1995). Die wichtigste Bekämpfungsmethode ist der Einsatz von Fungiziden. Aus Mexiko und den Anden kommen zahlreiche Wildarten, welche eine hohe unspezifische, polygene Resistenz aufweisen (Van Soest *et al.*, 1984). Worauf diese Resistenz beruht, ist nicht bekannt. Auch sind verschiedene Kultivare bekannt, welche keine spezifischen Resistenzen (R-Gene) besitzen, aber dennoch eine gute bis sehr gute Feldresistenz (unspezifisch) gegen die Kraut- und Knollenfäule aufweisen. Da die Gene dieser Feldresistenz (r-Gene) weder identifiziert, noch charakterisiert

sind, ist ein gentechnischer Transfer nicht möglich. Es wurden bisher 11 verschiedene R-Gene identifiziert, wobei wahrscheinlich noch weitere existieren. Diese Gene wurden in verschiedene Sorten eingekreuzt, das Pathogen konnte jedoch innert kurzer Zeit Virulenzen entwickeln. Da es sich bei diesen Genen um Einzelgene handelt, wäre es von der vorhandenen Technik und vom Zeitaufwand her gesehen denkbar, diese zu isolieren und in verschiedene Kartoffelsorten einzubauen. Da aber in Mexiko Rassen des Pathogen mit allen 11 Virulenzfaktoren und auch in Europa Rassen mit 9 Virulenzen gefunden werden, scheint eine Pyramidisierung keine Aussicht auf eine dauerhafte Resistenz zu bringen, selbst wenn alle bisher bekannten Gene in eine Sorte eingebaut würden (Turkensteen, 1993). Der Einbau von neuen R-Genen aus anderen Arten wie z.B. *Solanum muricatum* mittels Genmanipulation in neue Sorten könnte zu grösserer Dauerhaftigkeit führen, wenn das R-Gen durch ein hohes Niveau einer quantitativen Resistenz abgesichert wird. Eine mögliche Virulenz könnte sich erstens nur langsam und zweitens nur mit wenig verursachtem Schaden etablieren.

In Kapitel 4.2.3. wurden verschiedene Strategien vorgestellt, um mittels Gentechnologie Resistenz gegen Pilzkrankheiten zu erzeugen. Da die meisten Oomyceten kein Chitin, sondern Cellulose in der Zellwand enthalten, kommt ein Einsatz von Chitinasen bereits nicht in Frage. Eine Reduktion des Befalls durch *P. infestans* wurde im Labor durch ein zytotoxisches Barnasegen erreicht, welches durch den Pilz-induzierten Promotor *prp 1-1* reguliert wurde (Strittmatter *et al.*, 1995). Über Erfolge in Feldversuchen ist hingegen nichts bekannt. Dazuhin hat seit dem Auftreten des Paarungs-Typs A2 in Europa die Variabilität von *P. infestans* stark zugenommen (Drenth *et al.*, 1994). Es darf daher zumindest angezweifelt werden, ob ein einziger Resistenzmechanismus lange Bestand hätte. Die aus phytopathologischer Sicht zur Zeit wohl sinnvollste, weil einfachste Lösung, wäre der Anbau von verschiedenen der heute schon resistenten Sorten, an Stelle der hoch anfälligen Bintje-Kartoffel.

Rhizoctonia solani, der Erreger der Kartoffelpocken bildet zur Überwinterung Sklerotien, welche bis zu vier Jahre im Boden keimungsfähig bleiben. Schäden können durch Fruchtfolgemassnahmen, aber auch durch einen standortgerechten Anbau vermieden werden. Intensivere Fruchtfolgen machen weitere Massnahmen notwendig. Da keine resistenten Sorten vorliegen, werden in der Schweiz ca. 20% der Saatgutkartoffeln gezielt gebeizt (Fried *et al.*, 1993). Im Labor konnte ein Schutz vor *R. solani* bei Tabak und Raps durch den Einbau eines Chitinasegens und bei Tabak durch den Einbau eines RIP-Gens erreicht werden (siehe Kapitel 4.2.3.). Erfolgreiche Feldversuche sind keine bekannt. Angenommen die erwähnten Gene führten unter Feldbedingungen auch in Kartoffeln zu einem Schutz, schiene auf diesem Weg eine Einsparung der Beizmittel möglich zu sein. Bei den RIP stellt sich aber die Frage nach möglichen toxischen Auswirkungen auf eine Vielzahl von Lebewesen. Bei einem Eintrag von Chitinasen und β -1-3-Glucanasen in den Boden gilt es daneben sowohl die kurz- als auch die langfristigen Auswirkungen auf andere Bodenpilze zu untersuchen. So konnte in einem Fall eine verlangsamte Besiedlung der Wurzeln durch Mykorrhiza nachgewiesen werden (Vierheilig *et al.*, 1995). Veränderungen in

der Zusammensetzung der Bodenlebewesen könnten zu einer Schädigung des Bodens und auch zu einem Auftreten von neuen bodenbürtigen Pathogenen führen.

Die Bekämpfung der Dürrfleckenkrankheit (durch *Alternaria solani* verursacht) erfolgt einerseits durch die Verwendung gesunden Saatgutes, andererseits auch durch die Spritzungen gegen *P. infestans*. Sollte es gelingen, Kartoffeln mit einer Resistenz gegen die Kraut- und Knollenfäule zu züchten, sei es mittels konventioneller oder biotechnologischer Methoden, könnte zumindest ein Teil der Spritzungen wegen des Befalls durch *Alternaria* trotzdem weiterhin notwendig sein.

7.1.2. Schädlinge

Die Möglichkeiten der Bekämpfung des Kartoffelkäfers (*L. decemlineata*) mittels Einbau eines B.t.-Toxins wurde in Kapitel 5. bereits erläutert. Auch auf die Gefahr einer Resistenzbildung und mögliche Folgen wurde aufmerksam gemacht. Neben dem Einsatz von B.t. gibt es Versuche, eine Insektenresistenz durch den Einbau von Proteinase-Inhibitoren zu erreichen (Marchetti *et al.*, 1994). Weiter sind auch verschiedene natürliche Resistenzen gegen den Kartoffelkäfer und andere Insekten bekannt (z.B. Plaisted *et al.*, 1992).

Nematoden (*Globodera rostochiensis* / *G. pallida*) können in Ländern mit einer sehr intensiven Kartoffelproduktion zu grossen Schäden führen. In der Schweiz spielen sie jedoch nur eine geringe Rolle. Das Saatgut ist strengen Kontrollen unterworfen, im Schadensfall wird ein mehrjähriges Anbauverbot verfügt. Bei den einzelnen Kartoffelsorten bestehen Unterschiede in der Anfälligkeit. Für den Einsatz von Pflanzen, welche durch den Einbau von z.B. B.t.-Genen mit einer nematiziden Wirkung (Feitelson *et al.*, 1992) resistent sind, besteht in der Schweiz demzufolge kaum Bedarf.

7.2. Mais

7.2.1. Krankheiten

In Maiskulturen in der Schweiz werden keine Spritzungen gegen Krankheiten vorgenommen, da selten hohe Ertragsausfälle auftreten. Resistenzen gegen *Fusarium spp.* (den Erreger der Stengelfäule) und *Ustilago maydis* (Beulenbrand) werden in der Züchtung berücksichtigt.

7.2.2. Schädlinge

Der Maiszünsler stellt bei ca. 65'000 ha Maisanbau in der Schweiz auf ca. 15'000 ha ein Problem dar. Davon lohnt sich auf etwa der Hälfte der Fläche eine Bekämpfung. Diese erfolgt auf biologische Weise mittels *T. brassicae*. Für einen Einsatz von transgenem Mais ergibt sich kaum eine Notwendigkeit (siehe Kapitel 5.).

Der grösste Teil des Insektizideinsatzes im Mais ist auf die Bekämpfung der Drahtwürmer (Larven von *Agriotes spp.*) zurückzuführen. Auf knapp einem Drittel der Felder werden Granulate eingesetzt. Zur Zeit wird die Möglichkeit einer biologischen Bekämpfung durch das Ausbringen insektenpathogener Pilze geprüft. Pilze sind für die natürliche Regulation von Insektenpopulationen mitverantwortlich. Verschiedene Fungizide, aber auch Herbizide, wirken jedoch negativ auf den Pilz, was eine natürliche Regulation z.B. des Kartoffelkäfers durch Pilzpathogene verhindert (Haeni *et al.*, 1992). Möglicherweise liessen sich die Drahtwürmer in Zukunft auch durch transgene Pflanzen bekämpfen, welche insektizide Substanzen bei Befall in den Wurzeln exprimieren. Die Larven von *Agriotes lineatus* zeigten gegen *B.t. tenebrionis*- Toxin im Labor jedoch keine Anfälligkeit (Keller and Langenbruch, 1993).

In diesem Zusammenhang sollen auch Alternativmethoden erwähnt werden, welche den Forderungen nach einem umweltschonenderen und möglichst nachhaltigen Anbau nachkommen. Während mehreren Jahren wurden verschiedene Methoden des Maisanbaus an der Forschungsanstalt Reckenholz erprobt. Die besten Resultate bezüglich Schädlingen und Krankheiten wurden dabei mit der Maiswiese erzielt. So ergab sich im Vergleich zum konventionellen Anbau vermutlich durch natürliche Antagonisten ein um 50-60 % niedrigerer Befall durch den Maiszünsler, obschon dabei auf das Unterpflügen des Strohs, einer indirekten Bekämpfungsmethode des Maiszünslers, verzichtet wurde. Auch bei anderen Schädlingen war der Befall im Durchschnitt verringert. Bei den Krankheiten konnte nur der Beulenbrand betrachtet werden, wobei sich hier ein um ca. 50% verringerter Befall ergab. (Bigler *et al.*, 1995).

7.3. Raps

7.3.1. Krankheiten

In der Schweiz ist im IP Anbau der Einsatz von Spritzmitteln im Raps verboten. Für eine Bekämpfung von *Sclerotinia sclerotiorum* (den Verursacher des Rapskrebses) stünden Fungizide zur Verfügung. Da jedoch bei Vollblüte gespritzt wird, ist deren Einsatz wegen der Schädigung der Bienen nicht unproblematisch. Gegen *Phoma lingam*, den Erreger der Stengelfäule kann das Saatgut gebeizt werden. Die generelle Bekämpfung auch der anderen Krankheiten auf Raps, wie *Plasmodiophora brassicae* (Kohlhernie), *Alternaria spp.* (Rapsschwärze) und *Pyrenopeziza brassicae*

(Blattfleckenkrankheit) erfolgt jedoch durch eine geregelte Fruchtfolge, durch Kulturmassnahmen, wie ein Bekämpfen von Unkräutern, welche als Zwischenwirt dienen können und durch die Wahl resistenter Sorten.

7.3.2. Schädlinge

Der Rapsglanzkäfer (*Meligethes aeneus*) und der Rapsstengelrüssler (*Ceuthorrhynchus napi*) werden mit breit wirksamen Insektiziden bekämpft. Mit 1,3 Spritzungen jährlich weist der Raps die meisten Insektizidbehandlungen unter den einjährigen Kulturen in der Schweiz auf. Eine gewisse Alternative bietet bei geringem Befallsdruck auch das Beimischen von Rübsen am Feldrand, welche von den Schädlingen gegenüber den Rapspflanzen bevorzugt werden. Gegen den Rapserrdfloh (*Psylliodes chrysocephala*) wird das Saatgut gebeizt.

Da eine Zunahme des Rapsanbaus in der Schweiz prognostiziert wird, ist damit zu rechnen, dass sich dadurch auch erhöhte Krankheits- und Schädlingsprobleme ergeben werden. Aufgrund der zur Zeit unbefriedigenden Situation in der Schädlingsbekämpfung beim Raps ist durch den Einsatz von resistenten Sorten ein eindeutiges Potential zur Einsparung von Hilfsstoffen gegeben. Mit der provisorischen Zulassung der Sorte Synergy wird zum ersten Mal in der Schweiz auch Hybridraps angebaut. Dieser führt zu Mehrerträgen, die Krankheitsresistenz, vor allem gegenüber *S. sclerotiorum* ist bisher jedoch schlecht (FAP + RAC, 1995). Da durch den Einsatz von Hybridraps die Saatgutproduktion kommerziell interessanter wird, kann durch eine verstärkte Forschungstätigkeit der Saatgutproduzenten längerfristig auch mit verbesserten und neuen Resistenzen gerechnet werden. Die Adulttiere von *M. aeneus* zeigten im Labor gegen *B.t. tenebrionis* keine Anfälligkeit (Keller and Langenbruch, 1993). Möglicherweise werden aber in Zukunft wirksame B.t.-Toxine, auch gegen *C. napi*, gefunden werden, welche die heute eingesetzten Pyrethroide ersetzen können. Da die Frassschäden im Innern der Pflanze geschehen, bliebe abzuwarten, ob ein Einsatz von Spritzmitteln möglich wäre, oder ob das B.t.-Toxin nur in der Pflanze exprimiert einen ausreichenden Schutz gewährt. Damit die Spritzungen eingespart werden können, müssen zumindest *M. aeneus* und *C. napi* von dem Toxin erfasst werden. Da der Raps von Bienen stark besucht und auch von Rehen gefressen wird, ist die konstitutive Expression von breiter wirksamen Insektentoxinen (z.B. Protease-Inhibitoren), nur möglich, wenn dadurch keine toxischen Nebeneffekte auftreten.

7.4. Weizen

7.4.1. Krankheiten

Im Weizenanbau werden die Krankheiten Halmbruch (*Pseudocercospora herpotrichoides*), Braunrost (*Puccinia recondita*), Gelbrost (*Puccinia striiformis*), Spelzenbräune (*Septoria nodorum*), und Mehltau (*Erysiphe graminis*) mittels Fungiziden bekämpft, da übliche Kulturmassnahmen nur eine ungenügende Wirkung zeigen. Die wichtigste Bekämpfungsmöglichkeit besteht jedoch im Einsatz resistenter Sorten.

Arteigene Gene können heute mittels klassischer Züchtung einfacher und schneller in eine Sorte eingebracht werden, als mittels eines gentechnischen Einbaus. Die Resistenzzüchtung konzentriert sich zur Zeit darauf, Resistenzgene, welche aus verschiedenen Weizensorten bekannt sind, zusammen in eine Sorte einzukreuzen. Dabei liegen die Schwierigkeiten weniger beim Einkreuzen selbst. (Einzig bei multiallelischen Genen, wie zum Beispiel gewissen R-Genen gegen Mehltau, kann eine Pyramidisierung in einer Pflanze unmöglich sein. Einen Ausweg böte ein Misanbau von Sorten mit verschiedenen Resistenzen, sogenannten isogenen Linien). Die Hauptschwierigkeit der Resistenzzüchtung liegt in der Identifizierung von Genen durch phänotypische Merkmale oder durch einen genetischen Marker. Zum ersten gilt es, geeignete Resistenzen durch ein effizientes Screening-Verfahren zu entdecken. Handelt es sich um ein Gen oder eine einzelne Gengruppe mit einem eindeutigen phänotypischen Charakteristikum, so kann dies in eine Sorte eingekreuzt werden. Sollen jedoch mehrere Gene mit demselben Phänotyp in einer Pflanze vereint werden, ist es notwendig, dass genetische Marker vorliegen, anhand welcher die betreffenden Gene in einer Pflanze voneinander unterschieden werden können. Das Auffinden von genetischen Markern kann besonders beim hexaploiden Weizen ein äusserst schwieriges Unterfangen darstellen. Die Effizienz der Resistenzzüchtung wird dadurch aber enorm gesteigert. Ein wesentlicher Bestandteil der Züchtungsforschung im molekularbiologischen Bereich liegt daher im Aufspüren von Resistenzmarkern, welche die Screening-Verfahren vereinfachen, wie RFLP- und RAPD-PCR- Marker oder auch ELISA-Tests. Diese und andere Techniken werden auch zur Analyse der Verbreitungsgeschwindigkeit, der genetischen Variabilität, der Virulenzstrukturen und anderen populationsdynamischen Aspekten beim Pathogen angewendet. Sie bilden eine wichtige Grundlage für die Ausarbeitung von geeigneten Strategien des Resistenzmanagements. Gegen die oben genannten Krankheiten stehen heute zum Teil Resistenzgene zur Verfügung, welche in Zukunft in neue Sorten eingezüchtet werden sollen. Ebenso sind auch in der Identifizierung von neuen Resistenzen weitere Fortschritte zu erwarten. (siehe Fried *et al.*, 1993).

Als weitere Bekämpfungsmöglichkeit von *E. graminis* steht in Zukunft auch der Aktivator CGA 245704 zur Verfügung (siehe Kapitel 4.2.3.). Es bleibt abzuwarten, wie sehr er in die bestehenden Strategien integriert werden kann und ob der Schutz gegen Rost und Septoria noch weiter gesteigert werden kann, sodass weitere Spritzungen in Zukunft nicht mehr nötig wären.

Über Versuche, in welchen Weizen zumindest im Labor durch den Einbau von artfremden Resistenzgenen vor Pilzbefall geschützt werden konnte, ist dem Autor nichts bekannt. Dies mag einerseits an den technischen Problemen bei der Transformation von Weizen liegen, andererseits an der geringen Verfügbarkeit von artfremden Genen mit Aussicht auf Erfolg.

Eine geregelte Fruchtfolge wirkt vor allem gegen *Gäumannomyces graminis*, den Erreger der Schwarzbeinigkeit, teilweise auch gegen *Rhizoctonia cerealis*, den Erreger des scharfen Augenflecks, welche durch Spritzungen gegen *P. herpotrichoides*, den Erreger der Halmbrechkrankheit indirekt gefördert wird (Haeni *et al.*, 1992). Ein gewisser Schutz vor *G. graminis* var. *tritici* konnte in Feldversuchen durch eine Kolonisation der Wurzeln mit Pseudomonas-Bakterien erreicht werden (Keel & Defago, 1996) In der Resistenzzüchtung werden *G. graminis*, gegen den keine Resistenzgene bekannt sind, und *R. cerealis* nicht berücksichtigt. Ebenso wenig berücksichtigt in der schweizer Resistenzzüchtung werden die Krankheiten *Tilletia caries* (Stinkbrand), *Ustilago sp.* (Flugbrand), *Fusarium nivale* (Schneesimmel) und *Fusarium sp.* (Ährenfusariosen), da diese durch eine Beizung bekämpft werden können. Bei *F. nivale* kommen auch Kulturmassnahmen zum Einsatz. Ebenso können auch Schäden durch Ährenfusariosen mittels Kulturmassnahmen zusätzlich begrenzt werden. Wollte man die Beizung einsparen, müssten Resistenzen gegen alle betroffenen Krankheiten gefunden und eingezüchtet werden. Sowohl *T. caries*, als auch *Ustilago sp.* könnten aber durch den biologischen Landbau an Bedeutung gewinnen, wenn in zunehmenden Masse Saatgut verwendet werden wird, welches nicht gebeizt wurde. Gegen diese Krankheiten müssen wohl durch klassische Resistenzzüchtung Lösungen gefunden werden, da kaum vorstellbar ist, dass Biobauern auf gebeiztes Saatgut verzichten, um dafür transgenes zu verwenden.

7.4.2. Schädlinge

Die Schäden, welche durch Insekten auf Weizen verursacht werden, sind relativ gering. Insektizide werden bei Bedarf gegen Getreidehähnchen (*Oulema melanopa* / *O. lichenis*) und gegen Blattläuse (*Sitobion avenae* / *Rhopalosiphum padi* / *Metopolophium dirhodum*) eingesetzt. Dabei kommt es nach EPIPPE-Erhebungen bei etwa 10% der Weizenfelder zu einer Behandlung mit Insektiziden. Die konstitutive Expression einer insektiziden Substanz in Weizen scheint vor diesem Hintergrund wenig sinnvoll. In Versuchen mit *B.t. tenebrionis*-Präparaten, welche normalerweise gegen Coleopteren eingesetzt werden, zeigten weder die Larven noch die Adulten von *O. melanopa* im Labor eine Anfälligkeit (Keller and Langenbruch, 1993). Sollten in Zukunft grössere Probleme durch Insekten auftreten, so sind verschiedene Faktoren, wie Behaarung, Siliziumgehalt Wachsgehalt, u.a. bekannt, welche Resistenz gegen verschiedene Insekten bewirken und in den Weizenzüchtungsprogrammen der Schweiz berücksichtigt werden könnten.

7.5. Zuckerrüben

7.5.1. Krankheiten

Gegen verschiedene Erreger des Wurzelbrandes (*Pythium spp.*, *Aphanomyces spp.*, *Phoma betae*, *Fusarium spp.* etc.) wird das Saatgut gebeizt. Die Schwierigkeiten in der Züchtung von Resistenzen gegen bodenbürtige Pathogene wurden bereits erwähnt (siehe Kapitel 4.2.2.). Auch hier müssten Resistenzen eingekreuzt oder eingebaut werden, welche gegen alle Pathogene wirken, damit auf eine Beizung verzichtet werden könnte.

Gegen *Ramularia*-Blattflecken (*Ramularia beticola*) und *Cercospora*-Blattflecken (*Cercospora betae*) werden je nach Befall Fungizide eingesetzt. Aufgrund der geringen Anwendung (0,5 Spritzungen pro Jahr) sind auch die möglichen Einsparungen klein.

BNYVV (beet necrotic yellow vein virus), der Erreger der Wurzelbärtigkeit, wird durch den Pilz *Polymyxa betae* übertragen und durch den Transport von Erde verbreitet. Eine direkte Bekämpfung ist nicht möglich. In Befallsgebieten werden tolerante Sorten angebaut. Heute existiert auch eine Zuckerrübe, welche durch den Einbau eines CP-Gens von BNYVV tolerant gegen einen Befall ist. Veränderungen am eingebauten Gen, um eine mögliche Heteroencapsidierung oder homologe Rekombination zu verunmöglichen, wurden keine vorgenommen.

7.5.2. Schädlinge

Gegen die Schädlinge Rübenerdfloh (*Chaetocnema concinna* / *C. tibialis*) und Rübenkopffälchen (*Ditylenchus dipsaci*) werden Insektizide und Nematizide eingesetzt. Eine Verringerung des Befalls kann ebenso durch einen reduzierten Herbizideinsatz bzw. durch eine geregelte Fruchtfolge erreicht werden. Durch Hacken und Brandspritzung kann auch der Befall durch Blattläuse und damit die Übertragung des Vergilbungsvirus um durchschnittlich 30% gesenkt werden, was der mittleren Wirkung von zwei Insektizidbehandlungen entspricht (Dubois *et al.*, 1993).

8. Allgemeine agronomische Überlegungen

8.1. Merkmale von gentechnisch erzeugter Krankheits- und Schädlingsresistenz

Jegliche Form von Krankheits- und Schädlingsresistenz, welche in der Landwirtschaft verwendet wird, muss vier Merkmale erfüllen: 1) ein ausreichend hohes Niveau der Aktivität, 2) eine Stabilität bezüglich der Wirksamkeit unter verschiedenen Umweltbedingungen, 3) Dauerhaftigkeit und 4) Sicherheit für die Umwelt. Unsere Erfahrung zeigt, dass es grosser Anstrengung bedarf, um Informationen bezüglich aller dieser Punkte zu erlangen, egal aus welcher Quelle die Resistenz stammt. Bei der transformierten Resistenz besitzen wir, ausser über das erste Merkmal, bei allen vier Punkten nur sehr wenig Informationen. Diese müssen jedoch gefunden werden. Wegen der Neuheit der Mechanismen bei vielen der vorgeschlagenen Transformationen müssen auch weitere Fragen bezüglich deren Auswirkung gestellt werden. Es ist jedoch nicht möglich, eine allgemeine Liste für alle Beispiele zu machen. Aufgrund der Diversität der neuen Ansätze, ist es angebrachter, eine Beurteilung nach einem Fall-für-Fall Szenario vorzunehmen.

Da in Zukunft mit der vermehrten Verwendung von neuen Genen auch Probleme entstehen können (z.B. Williamson, 1994), scheint es wichtig zu sein, dass ein System besteht, welches es uns erlaubt, mögliche Auswirkungen von Problemen zu minimieren. Auf dem Niveau der Einführung des Transgens könnte das Konstrukt eine Sequenz enthalten, welche nur vom Wirt erkannt werden kann und daher nur in diesem exprimiert wird. Ausserdem sollte das Konstrukt, wenn möglich, im Chloroplastengenom eingebaut werden, um eine mögliche Verbreitung im Pollen zu verhindern. Die Frage der Verbreitung von Viren durch Blattläuse wurde bereits früher behandelt. Das betreffende Motiv im Resistenzgen sollte daher entfernt werden. Da diese biologischen Massnahmen nicht immer möglich oder praktikabel sind, sollten gesetzliche Möglichkeiten bestehen bestimmte Genkonstrukte, analog den Möglichkeiten bei Pflanzenvarietäten via Sortenzulassung, vom Markt zu nehmen, sollte dies beispielsweise aus ökologischen Gründen oder aus Gründen des Resistenzmanagements notwendig sein.

8.2. Der strategische Ansatz der Krankheits- und Schädlingsbekämpfung

Der Ansatz der landwirtschaftlichen Systeme in der Schweiz basiert in zunehmendem Masse auf einer ökologischen Basis. Für die Krankheits- und Schädlingsbekämpfung bedeutet dies die gleichzeitige und integrierte Anwendung einer breiten Reihe von Massnahmen, wie resistente Pflanzen und Kulturmassnahmen. Dies benötigt Forschung und Entwicklung auf diversen Gebieten, darunter auch die Einführung von

neuen Methoden. Beispielsweise besteht zur Zeit ein grosses Interesse an der Entwicklung von Anbaumethoden, bei welchen Mais direkt in eine Kunstwiese eingesät wird (siehe auch Kapitel 7.2.), was verschiedene Vorteile mit sich bringt, wie z.B. eine Reduktion von Krankheits- und Schädlingsproblemen verglichen mit einer konventionellen Aussaat auf einen nackten Boden. Ähnliche Anbaumethoden sind auch möglich mit einer Einsaat von Winterweizen in Klee, wiederum mit bemerkenswerten Vorteilen bezüglich Krankheits- und Schädlingskontrolle. Schweizer Landwirte verwenden auch in vermehrtem Masse Mischungen von Wintergersten-Varietäten, was den Vorteil einer Diversität innerhalb des Feldes bei der gleichzeitigen Kontrolle von einigen der Hauptkrankheiten ergibt.

Solche Methoden erhöhen die Diversität sowohl auf der Ebene der Art, als auch auf der Ebene der Varietät, was zu einer Verbesserung des Managements der Dauerhaftigkeit von Krankheits- und Schädlingsresistenz führt. Die Minimierung der Exposition und die Maximierung der Diversität der Resistenz ist wichtig, um die Anpassung von Pathogenen zu verzögern und um sich gegen den Ausfall eines oder je nach dem auch mehrerer der Komponenten abzusichern. Ausserdem ist die Diversität innerhalb der Kulturen und ihren Varietäten nicht nur aus Gründen der Krankheits- und Schädlingsproblematik wichtig, sondern auch bezüglich einer Pufferung gegenüber Schwankungen bei allen wichtigen Umweltparametern, welche die Ertragsentwicklung beeinflussen können. Dies kann in einer Periode der klimatischen Instabilität besonders wichtig sein.

Aus diesen Gründen ist es wichtig sicherzustellen, dass der Einsatz von genetisch manipulierten Varietäten nicht zu einer verstärkten Intensivierung der Agrarwirtschaft, basierend auf dem erhöhten Anbau von Monokulturen führt. Der Einsatz jeglicher Art von transformierten Varietäten sollte daher eher als ein weiteres Element in der Bereitstellung von Variabilität angesehen werden. Dies hätte den weiteren Vorteil, dass es dazu beiträgt, die Wirksamkeit der neu eingeführten Resistenz selbst zu bewahren.

8.3. Strategien im Einsatz von genetisch modifizierten Varietäten

Momentan sieht es so aus, als gäbe es in nächster Zeit eher wenig Bestrebungen bezüglich einer Zulassung von genetisch transformierten Sorten, welche Auswirkungen auf die Schweizer Landwirtschaft hätten. Einzige Ausnahme bildet ein Mais mit einem B.t.-Resistenzgen, welcher in Frankreich vermutlich 1996 auf den Markt kommen wird. Es besteht also noch eine gewisse Zeit, die relative Bedeutung der ersten Einführungen und das Bedürfnis nach den passenden ökologischen Experimenten abzuklären.

Auf mittlere Sicht gesehen, dürften diese Bestrebungen zunehmen. In Moment scheint es völlig unklar zu sein, wie die Konkurrenz zwischen den Firmen die Art der Strategien des Einsatzes beeinflusst. Wichtiger noch könnte es sein, dass es sehr schwierig sein wird, mögliche Interaktionen abzuschätzen, welche durch die gleichzeitige Einführung von verschiedenen Resistenzen gegen verschiedene Stressfaktoren entstehen.

Im Zusammenhang mit transformierten Pflanzen ist zur Zeit eine intensive Diskussion im Gange um Anbaustrategien zu definieren, welche in der Lage sind, die Selektion von resistenten Krankheits- oder Schädlingerregern zu verhindern, welche in der Lage wären, die transformierten Sorten zu befallen. Die theoretische Basis dieser Strategien ist nur ungenügend verstanden. Jedoch selbst wenn diese für praktische Anwendungen bekannt wären, sind die Chancen, dass diese wirksam in die Praxis umgesetzt werden, eher gering. Dies liegt einerseits daran, dass die Flächen, auf welchen die ersten transformierten Varietäten zum Einsatz kommen würden, sehr gross wären, andererseits in einer Nachlässigkeit von Seiten der Bauern in den betreffenden Einsatzgebieten, sich an die Regeln des Resistenzmanagements zu halten. Ein naheliegendes Problem besteht darin, dass sich möglicherweise nicht alle Bauern einer Region (besonders Biobauern) an der vorgesehenen Resistenzmanagement-strategie beteiligen wollen. Ein weiteres Problem liegt in den grossen lokalen Unterschieden bezüglich der Grösse der Felder und in Bezug auf die Umwelteinflüsse. Die einzigen Gebiete, in welchen Resistenzmanagementstrategien gute Erfolgschancen besitzen, sind Anbaugebiete, in welchen teure Produkte im Vertragsanbau angepflanzt werden, wo der Vertrag die Anbauform vorschreibt.

Ein kritischer Aspekt für die Schweiz ist natürlich auch die Grösse der Anbaufläche in Bezug zu jener der Nachbarn, besonders Frankreich und Deutschland. Aus diesem Grund ist möglicherweise eine Anbaustrategie, welche für eine bestimmte transformierte Sorte oder eventuell auch für eine konventionelle Sorte notwendig wäre, in der Schweiz nicht praktikabel, wegen den Anbautätigkeiten der grösseren Nachbarn und der möglichen Einwanderung von wichtigen Krankheiten und Schädlingen in die Schweiz (siehe auch Wolfe *et al.*, 1992).

Ein weiteres Problem diesbezüglich beruht auch darauf, dass das Resistenzmanagement auf dem Einbau von einem einzelnen Resistenzgen wie z.B. B.t. beruht. Werden jedoch mehrere verschiedene Resistenzen in einer einzelnen Sorte oder Varietät vereint, können die benötigten Anbaustrategien je nachdem miteinander nicht kompatibel sein.

8.4. Biologischer Landbau

Auf den biologischen Landbau muss besonders eingegangen werden, da die heutigen Reglemente einen Einsatz von transgenen Pflanzen im biologischen Anbau nicht erlauben. Diese Frage dürfte in Zukunft an Bedeutung zunehmen. Einerseits besteht in Europa eine steigende Nachfrage nach biologisch angebauten Produkten. Sollten Andererseits transgene Pflanzen bewusst oder unbewusst Eingang in die wichtigsten Züchtungsprogramme finden, kann dies die Möglichkeit, neue, ertragreichere und resistenter Varietäten im biologischen Anbau einzuführen, stark verringern. Es könnte argumentiert werden, dass die biologischen Bauern ihre Regeln ändern sollen, um solche Probleme zu umgehen. Weshalb jedoch sollten sie? Möglicherweise besteht ein dauerhaftes öffentliches Interesse an landwirtschaftlichen Produkten, welche keine Transgene enthalten. In diesem Fall liegt es an den Organisationen, welche die Pflanzenzucht betreiben, dieses Problem zu beachten.

Ein weiteres Problem wurde bereits erwähnt. Sind die transgenen Kartoffelsorten mit Virusresistenz erfolgreich, könnte dies zu einer Reduktion oder zu einem völligen Verzicht auf eine Kontrolle von Saatkartoffeln bezüglich Virusbefall führen, was zu Verlusten im biologischen Anbau führen könnte.

Bei der Anwendung von B.t. exprimierenden Kartoffeln im nicht biologischen Anbau, neben klassischen Applikationen von B.t., stellen sich auch ethische Fragen. Einerseits dürfte die Entwicklung und Anwendung von Einsatzstrategien für B.t.-Toxine äusserst schwierig werden. Andererseits besteht das bereits erwähnte Problem, dass ein Durchbruch des B.t.-Toxins durch eine intensive Anwendung in transgenen Pflanzen oder auch in Form von applizierten Präparaten vor allem negative Konsequenzen für (Bio-)Bauern hätte, welche von den B.t.-Präparaten nicht einfach auf andere Präparate wechseln können (siehe auch Kapitel 5.3.).

8.5. Generelle Bemerkungen

Unser allgemeiner Eindruck bezüglich transformierten Varietäten mit Krankheits- und Schädlingsresistenz ist, dass es zumindest in naher Zukunft in der Schweiz kaum einen Einsatz von Pflanzen mit einer wirklich agronomischen Relevanz geben wird. Dennoch denken wir, dass die Ausbildung und Forschung auf diesem Gebiet weitergehen und auch weiterentwickelt werden sollte. Es gibt bereits ein hohes Forschungsniveau auf diesem Gebiet mit einer aktiven Infrastruktur für Feldarbeit. Die Schweiz ist daher geeignet, um die notwendige Wissenschaft sowohl in der grundlegenden Erforschung der Resistenzmechanismen, als auch in der Entwicklung der notwendigen Feldversuche bezüglich Sicherheit und möglicher Anbauformen in der Landwirtschaft.

Dem gegenüber bestehen gewisse Bedenken bezüglich des Gewichts, welches die Erforschung von Pflanzentransformationen zur Zeit einnimmt. Nach unserer Ansicht scheint es, besonders aufgrund dieser Studie, äusserst wichtig, dass ein Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Methoden zur Kontrolle der Krankheits- und Schädlingserreger besteht, und dass es zu einem umfassenden Einbezug von mehreren momentan vorhandenen Methoden kommt. Zweifellos könnte sich dadurch die Möglichkeit zu neuen, besser diversifizierten Lösungsansätzen ergeben, welche weniger kostenintensiv, ökologisch weniger belastend und auch dauerhafter wären, als eine Konzentration auf nur eine einzige Bekämpfungsstrategie. Neben den etablierten Züchtungsmethoden und den genetischen Transformationen bestehen verschiedene alternative Methoden der Krankheits- und Schädlingsbekämpfung, wie zum Beispiel die Anwendung von Kulturmassnahmen, modifizierte Anbausysteme, Fruchtfolgen, biologische Schädlingskontrolle oder auch der Einsatz von Pestiziden, welche in gewissen Fällen einen geringeren Einfluss auf die Umwelt haben, als andere Massnahmen. Neuartige Methoden bestehen beispielsweise in der Anwendung von Aktivatoren der systemischen Resistenz, im Ablenken der Herbivoren, in Methoden der Untersaat von Kulturen, dem Einsatz von Fledermäusen zur Schädlingskontrolle, verschiedensten Fangmethoden für Insekten, selbst dem Einsatz von energieabsorbierenden Farben, welche bei Schadinsekten, welche diese aufnehmen, zu einer Überhitzung führen. Es bestehen noch viele weitere Möglichkeiten, doch wäre die Liste noch bedeutend länger, gäbe es mehr Investitionen in dieser Richtung.

9. Hauptschlussfolgerungen

- a) Es besteht ein dauernder Bedarf an Krankheits- und Schädlingsresistenzen mit einem hohen Resistenzniveau, welche stabil, dauerhaft und sicher für die Umwelt sind.
- b) Trotz des umfangreichen Einsatzes von Krankheits- und Schädlingsresistenz, sind deren Mechanismen und Genetik bisher nur unzureichend bekannt.
- c) Besonders die dauerhafte Resistenz ist nur wenig verstanden. Die inhärente dauerhafte Resistenz kann auf dem Zusammenspiel einer Anzahl verschiedener Gene beruhen. Dauerhaftigkeit einer Resistenz kann bis zu einem gewissen Grad auch durch ein Resistenzmanagement erreicht werden, wie z.B. durch eine Minimierung der Exposition von Resistenzen gegenüber den Krankheit und Schädlingen und durch das Bereitstellen von Refugien.
- d) In zunehmendem Masse stehen verschiedenste molekularbiologische Methoden zur Verfügung, mit einem Nutzen in vielen Bereichen der Züchtung für Krankheits- und Schädlingsresistenz. Beispiele sind das Mapping von Genen, das Verständnis deren Funktionsweise, die Züchtung mit Hilfe von Genmarkern, die Modifikation von Genen und die Transformation von Pflanzen.
- e) Ein weiter Bereich von Möglichkeiten des Gentransfers über viele taxonomische Grenzen hinweg wird ins Auge gefasst. Es besteht jedoch kein Hinweis bezüglich einer erhöhten Dauerhaftigkeit oder Stabilität der Wirtsresistenz in Relation zur Neuartigkeit oder der genetischen Distanz der Transformationselemente. Aus diesem Grund ist eine Kontrolle durch Testverfahren, wie sie auch zur Zeit gebraucht werden, notwendig.
- f) Genetische Transformationen, welche im Einbau von neuartigen Genen bestehen, erfordern eine besondere Aufmerksamkeit bezüglich der Punkte unter a) und bedürfen möglicherweise einer allgemeinen Abklärung bezüglich ökologischen Auswirkungen. Solch neuartige Freisetzungen müssen von Fall zu Fall neu abgeklärt werden.
- g) Mögliche Sicherheitsmassnahmen können zum Teil auf dem Niveau des Transformationskonstrukts eingebaut werden. Es sollte jedoch auch ein System in Betracht gezogen werden, mit welchem bestimmte Transformanten wieder vom Markt genommen werden können.
- h) Es werden Managementstrategien für neue Resistenzen untersucht, vermutlich werden sie aber noch nicht entwickelt sein, wenn die ersten Resistenzen kommerziell erhältlich sein werden. Die Umsetzung der Managementstrategien in die Praxis könnte sich als schwierig erweisen.

i) Der erste Einsatz von transformierten Resistenzen in der Schweiz werden vermutlich virusresistente Kartoffeln und mit B.t.-Toxingenen transformierte Mais- und eventuell auch Kartoffelpflanzen sein. Virusresistente Kartoffeln könnten sich in der Schweizer Landwirtschaft als nützlich erweisen, der Nutzen der beiden anderen Beispiele ist vermutlich jedoch nur gering.

j) Teils wegen der gegenwärtigen Landwirtschaftspolitik der Schweiz, welche in Richtung einer integrierten oder auch biologischen Produktion abzielt, teils wegen den unbekanntem Faktoren unter f) und g) sollten transformierte Varietäten nur behutsam freigesetzt werden. Das Ziel dabei sollte sein, diese als ein weiteres Mittel zur Erhöhung der Diversität der Sorten und Varietäten in einer hoch diversifizierten Landwirtschaft einzusetzen.

k) Es ist von grosser Wichtigkeit, dass ein Gleichgewicht in der Entwicklung von Methoden zur Kontrolle von Krankheiten und Schädlingen besteht, sowohl innerhalb, als auch ausserhalb der Molekularbiologie und dass auch geeignete Wege gefunden werden, diese miteinander zu verbinden.

10. Literatur

- Alstad, D.N. and Andow, D.A. 1995. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science* 268:1894-1896.
- anonymous. 1995. What's coming to market? *The Gene Exchange* 8-10.
- Ballester, V., Escriche, B., Mensua, J.L., Riethmacher, G.W., and Ferre, J. 1994. Lack of cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal proteins in a population of *Plutella xylostella* highly resistant to *CryIA(b)*. *Biocontrol Science and Technology* 4:437-443.
- Beringer, J.E. 1994. Are there unresolved issues regarding the possible generation of new viral pathogens from transgenic plants? in: 3rd international symposium, Nov.'94, biosafety of field tests with genetically modified plants and Microorganismn. J.E. Beringer, School of Biological Science, University of Bristol, Woodland Road, Bristol, BS8 1UG, UK.
- Bigler, F., Waldburger, M., and Frei, G. 1995. Vier Maisanbauverfahren 1990 bis 1993. Krankheiten und Schaedlinge. *Agrarforschung* 2:380-382.
- Brandle, J.E., McHugh, S.G., James, L., Labb, F.H., and Miki, B.L. 1995. Instability of transgene expression in field grown tobacco carrying the *csrl-1* gene for sulfonylurea herbicide resistance. *Bio/technology* 13:994-998.
- Brogliè, K., Chet, I., Holliday, M. et al. 1991. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254:1194-1197.
- Benhamou, N., Brogliè, K., Chet, I. and Brogliè, R. 1993. Cytology of infection of 35S-bean chitinase transgenic canola plants by *Rhizoctonia solani*: cytochemical aspects of chitin breakdown in vivo. *The Plant Journal* 4(2):295-305.
- Carrer, H. and Maliga, P. 1995. Targeted insertion of foreign genes into the tobacco plastid genome without physical linkage to the selectable marker gene. *Bio/technology* 13:791-794.
- Chang, M-M., Chiang, C.C., Martin, M.W., and Hadwiger, L.A. 1993. Expression of a pea disease resistance response gene in the potato cultivar Shepody. *American Potato Journal* 70:635-647.
- Coghlan, A., 1995. Far-flung pollen raises spectre of superweed. *New Scientist* 2003:10.
- Collet, G.F., Malnoe, P., Farinelli, L., and Reust, W. 1993. Pomme de terre transgenique au champ. *Revue Suisse d'Agriculture* 25 (6):373-381.
- Conner, A.J. and Christey, M.C. 1994. Plant breeding and seed marketing options for the introduction of transgenic insect-resistant crops. *Biocontrol Science and Technology* 4:463-473.
- Cornelissen, J.C.B. and Melchers, L.S. 1993. Strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. *Plant Physiology* 101:709-712.
- Dale, P.J. and McPartlan, H.C. 1992. Field performance of transgenic potato plants compared with controls regenerated from tuber discs and shoot cuttings. *Theoretical and Applied Genetics* 84:585-591.
- De Jong, W. and Ahlquist, P. 1992. A hybrid plant RNA virus made by transferring the noncapsid movement protein from a rod shaped to an icosahedral virus is competent for systemic infection. *Proceedings of the National Academy of Science* 89:6808-6812.
- De Wit, P.J.G.M. and Van Kan, J.A.L. 1993. Is durable resistance against fungi attainable through biotechnological procedures? pp.57-71 in: *Durability of*

- Disease Resistance. eds. T. Jacobs and J.E. Parlevliet, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Drenth, A., Tas, I.C.Q., and Grovers, F. 1994. DNA fingerprinting uncovers a new sexually reproducing population of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* 100:97-107.
- Dubois, D., Haeni, A., Ammon, H.U., and Keller, S. 1993. Einfluss der Unkrautbekaempfung auf Ertrag und Virusbefall von Zuckerrueben. *Landwirtschaft Schweiz* 6 (3):133-138.
- Dubois, D. and Jossi, W. 1993. Biologische Bekaempfung des Kartoffelkaefers mit *Bacillus thuringiensis*. *Landwirtschaft Schweiz* 6 (5):261-264.
- Düring, K., Porsch, P., Fladung, M., and Lorz, H. 1993. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *Plant Journal* 3:587-598.
- Falk, B.W. and Bruening, G. 1994. Will transgenic crops generate new viruses and new diseases. *Science* 263:1395-1396.
- FAP + RAC. 1995. Offizielle Winterraps-Sortenliste fuer die Aussaat 1995. Eidgenoessische Forschungsanstalten Reckenholz und Changins. 8046 Zuerich, Switzerland.
- Feitelson, J.S., Payne, J., and Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/technology* 10:271-275.
- Ferro, D.N. 1993. Potential for resistance to *Bacillus thuringiensis*: Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*): A model system. *American Entomologist* 39:38-44.
- Finnegan, J. and McElroy, D. 1994. Transgene inactivation: plants fight back. *Bio/technology* 12:883-888.
- Freialdenhoven, A., Scherag, B., Hollricher, K., Collinge, D.B., Thordal-Christensen, H., and Schulze-Lefert, P. 1994. *Nar-1* and *Nar-2*, two loci required for *Mla12*-specified resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell* 6:983-984.
- Freialdenhoven, A., Peterhaensel, C., Kurth, J., Kreuzaler, F. and Schulze-Lefert, P. 1996. Identification of genes required for the function of non race-specific *mlo* resistance in barley to powdery mildew. (in press).
- Fried, P.M., Barben, H., Keller, S., Mueller, M.D., Winzeler, H., Winzeler, M. and Weisskopf, P. 1993. Expertise betreffend Moeglichkeiten des Einsatzes biotechnologischer Methoden zur Erhoehung der Resistenz gegen Krankheiten und Schaedlinge wichtiger Kulturpflanzen der Schweiz; BATS. Clarastr. 13, CH-4058 Basel, Switzerland.
- Gelernter, W. and Schwab, G.E. 1993. Transgenic Bacteria, Viruses, Algae and other Mikroorganismen as B.t. Toxin Delivery Systems. pp.89-104 in: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and Practice. eds. P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, and S. Higgs; John Wiley & Sons Ltd.
- Gould, F. 1994. Potential and problems with high-dose strategies for pesticidal engineered crops. *Biocontrol Science and Technology* 4:451-461.
- Gould, F., Martinez-Ramirez, A., Anderson, A., Ferre, J., Silva, F.J., and Moar, W.J. 1992. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Heliothis virescens*. *Proceedings of the National Academy of Science* 89:7986-7990.
- Greene, A.E. and Allison, R.F. 1994. Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. *Science* 263:1423-1425.
- Groeters, F.R., Tabashnik, B.E., Finson, N., and Johnson, M.W. 1993. Resistance to *Bacillus thuringiensis* affects mating success of the diamondback moth (*Lepidoptera: Plutellidae*). *Journal of Economic Entomology* 86:1035-1039.

- Haeni, F., Popow, G., Reinhard, H., Schwarz, A., Tanner, K., and Vorlet, M. 1992. Pflanzenschutz im integrierten Ackerbau, 3rd ed. pp.31-269 in: Krankheiten und Schaedlinge, Landwirtschaftliche Lehrmittelzentrale. 3052 Zollikofen, Switzerland.
- Hain, R., Reif, H.J., Krause, E. et al. 1995. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant genetically engineered resistance to bacterial and fungal pathogens. *Nature World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11:383-392.
- Hanley-Bowdoin, L. and Hemenway, C. 1992. Expression of plant viral genes in transgenic plants. pp.251-295 in: *Genetic Engineering With Plant Viruses*. eds. T.M.A. Wilson and J.W. Davies, CRC Press. Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo.
- Herrera-Estrella, L. and Simpson, J. 1995. Genetically engineered resistance to bacterial and fungal pathogens. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11:383-392.
- Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R., and Boulder, D. 1993. Transgenic plants conferring insect tolerance: protease inhibitor approach. pp.317-338 in: *Transgenic Plants*. eds. S. Kung and R. Wu, Academic Press, Inc.
- Hilder, V.A., Powell, K.S., Gatehouse, A.M.R. et al. 1995. Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgenic Research* 4:18-25.
- Jaynes, J.M., Nagpala, P., Destefano-Beltran, L. et al. 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.
- Johnson, R. 1984. A critical analysis of durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 22:309-330.
- Jones, S.S., Murray, T.D., and Allan, R.E. 1995. Use of alien genes for the development of disease resistance in wheat. *Annual Review of Phytopathology* 33:429-443.
- Jongedijk, E., de Schutter, A.A.J.M., Stolte, T., van der Elzen, P.J.M., and Cornelissen, B.J.C. 1992. Increased resistance to potato virus X and preservation of cultivar properties in transgenic potato under field conditions. *Bio/technology* 10:422-429.
- Kahl, G. and Winter, P. 1995. Plant genetic engineering for crop improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11:449-460.
- Kaniewski, W.K. and Lawson, E.C. 1994. Biotechnology strategies for virus resistance in plants. in: EFPP, Potnau, 5-9. Sept. 94., Monsanto Co., 700 Chesterfield Pkwy, St.Louis, MO, 63198, USA.
- Keel, C. and Defago, G. 1996. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. pp.1-21 in: *Multitrophic Interactions In Terrestrial Ecosystems*. ed. A. Gange, Blackwell Scientific Publishers, London. (in press).
- Keller, B. and Langenbruch, G.A. 1993. Control of coleopteran pests by B.t. pp.171-191 in: *Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory And Practice*. eds. P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey, and S. Higgs; John Wiley & Sons Ltd.
- Kuc, J. 1995. Phytoalexins, stress metabolism and disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* 33:275-297.
- Lecoq, H., Ravelonandro, M., Wipf-Scheibel, C., Monsion, M., Raccach, B., and Dunez, J. 1993. Aphid transmission of a non-aphid-transmissible strain of Zucchini

- Yellow Mosaic Potyvirus from transgenic plants expressing the capsid protein of Plum Pox Potyvirus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6(3):403-406.
- Lodge, J., Kaniewski, W., and Turner, N. 1993. Broad-spectrum resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90:7089-7093.
- Logemann, J., Jach, G., Tommerup, H., Mundy, J., and Schell, J. 1992. Expression of a barley ribosome-inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants. *Bio/technology* 10:305-308.
- Lowe, K., Bowen, B., Hoerster, G., Ross, M., Bond, D., and Pierce, D.A. 1995. Germline transformation of maize following manipulation of chimeric shoot meristems. *Bio/technology* 13:677-682.
- Mallet, J. and Porter, P. 1992. Preventing insect adaptation to insect-resistant crops: are seed mixtures or refugia the best strategy. *Proceedings of the Royal Society of London* 250:165-169.
- Malnoe, P. 1995. Virus resistant crops - new viral pathogens from transgenic plants / Safety of transgenic crops. Environmental and agricultural considerations. in: *Proceedings, Basel Forum on Biosafety*. Agency BATS, Clarastr. 13, 4058 Basel, Switzerland.
- Marchetti, S., Giordana, A., Olivieri, A.M., Fogher, C., and Delledonne, M. 1994. Genetic engineering for insect resistance in potato. Introduction of foreign proteinase-inhibitor genes. *Potato Research* 37:450-451.
- Marrone, P.G. 1994. Present and future use of *Bacillus thuringiensis* in integrated pest management systems: an industrial perspective. *Biocontrol Science and Technology* 4:517-526.
- Matthews, R.E.F. 1991. Protecting the plant from systemic disease. pp.618-631 in: *Plant Virology* 3rd ed., Academic Press, Inc.
- McBride, K.E., Svab, Z., Schaaf, D.J., Hogan, P.S., Stalker, D.M., and Maliga, P. 1995. Amplification of a chimeric bacillus gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Bio/technology* 13:362-365.
- McGaughey, W.H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 229:193-195.
- McGaughey, W.H. 1994a. Problems of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture Ecosystems & Environment* 49(1):95-102.
- McGaughey, W.H. 1994b. Implications of cross-resistance among *Bacillus thuringiensis* toxins in resistance management. *Biocontrol Science and Technology* 4:427-435.
- McGaughey, W.H. and Whalon, M.E. 1992. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science* 258:1451-1455.
- Mellon, M. and Rissler, J. 1995. Transgenic crops: USDA data on small-scale tests contribute little to commercial risk assessment. *Bio/technology* 13:96
- Michelmore, R.A. 1995. Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology* 33:393-427.
- Panaccione, D.G. 1993. The fungal genus *Cochliobolus* and toxin-mediated plant disease. *Trends in Microbiology* 1:14-20.
- Parker, I.M. and Kareiva, P. 1994. Assessing the risk of invasion in genetically modified crops: an ecological perspective. in: *Proceedings of the 3rd International Symposium on The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms*. ed. D. D. Jones. Oakland: University of California.

- Parlevliet, J.E. 1993. What is durable resistance, a general outline. pp.23-40 in: Durability of Disease Resistance. eds. T. Jacobs and J.E. Parlevliet, Kluwer Academic Pub. Dordrecht.
- Plafker, T. 1994. First biotech safety rules don't deter chinese efforts. *Science* 266:966-967.
- Plaisted, R.L., Tingey, W.M., and Steffens, J.C. 1992. The germplasm release of NYL 235-4, a clone with resistance to the colorado potato beetle. *American Potato Journal* 69:843-846.
- Putz, B. 1986. Kartoffel. pp.431-463 in: Pflanzenproduktion Band 2: Produktionstechnik, ed. Oehmichen, J. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
- Roush, R.T. 1994. Managing pest and their resistance to *Bacillus thuringiensis*: Can transgenic crops be better than sprays?. *Biocontrol Science and Technology* 4:501-516.
- Ruess, W., Kunz, W., Staub, T., Müller, K., Poppinger, N., Speich, J. and Ahl Goy, P. 1995. Plant activator CGA 245704, A new technology for disease management. in: Oral presentation for XIII. Intern. Plant Protection Congress, The Hague, July 2-7, 1995. W. Ruess, Ciba-Geigy AG, Crop Protection Division, CH-4002 Basle, Switzerland.
- Saghai-Marooif, M.A., Zhang, Q., and Biyashev, R.M. 1994. Molecular marker analysis of powdery mildew resistance in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 88:733-740.
- Schrott, M. and Bilanz, R. 1993. Gentechnik in der Pflanzenzuechtung. *Landwirtschaft Schweiz* 6:565-569.
- Sebastiani, L., Lenzi, A., Pugliesi, C., and Fambrini, M. 1994. Somaclonal variation for resistance to *Verticillium dahliae* in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants regenerated from callus. *Euphytica* 80:5-11.
- Smigocki, A., Neal, J.W., Jr., McCanna, I., and Douglass, L. 1993. Cytokinin-mediated insect resistance in *Nicotiana* plants transformed with the *ipt* gene. *Plant Molecular Biology* 23:325-335.
- Stakman, E.C. 1947. Plant diseases are shifting enemies. *Am. Scientist* 35:321-350.
- Stiekema, W.J., Visser, B., and Florack, D.E.A. 1993. Is durable resistance against viruses and bacteria attainable via biotechnology?. pp.71-82 in: Durability of Disease Resistance. eds. T. Jacobs and J.E. Parlevliet, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Strittmatter, G., Janssens, J., Opsomer, C., and Botterman, J. 1995. Inhibition of fungal disease development in plants by engineering controlled cell death. *Bio/technology* 13:1085-1089.
- Strittmatter, G. and Wegener, D. 1993. Genetic engineering of disease and pest resistance in plants: Present state of the art. *Zeitschrift fuer Naturforschung Section C Biosciences* 48(9-10):673-688.
- Tabashnik, B.E. 1992. Resistance risk assessment: Realized heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (*Lepidoptera: Plutellidae*), tobacco budworm (*Lepidoptera: Noctuidae*), and Colorado potato beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*). *Journal of Economic Entomology* 85(5):1551-1559.
- Tabashnik, B.E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology* 39:47-79.
- Tabashnik, B.E., Groeters, F.R., Finson, N., and Johnson, M.W. 1994. Instability of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Biocontrol Science and Technology* 4:419-426.

- Tavladoraki, P., Benvenuto, E., Trinca, S., DeMartinis, D., Cattaneo, A., and Galeffi, P. 1993. Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* 366:469-472.
- Truve, E., Aaspollu, A., Honkanen, J., Puska, R., Mehto, M., Hassi, A., Teeri, T., Kelve, M., Seppänen, P. and Saarma, M. 1993. Transgenic potato plants expressing mammalian 2-5 oligoadenylate synthetase are protected from potato virus X infection under field conditions. *Bio/technology* 11:1048-1052.
- Turkensteen, L.J. 1993. Durable resistance of potatoes against *Phytophthora infestans*. pp.115-124 in: *Durability of Disease Resistance*. eds. T. Jacobs and J.E. Parlevliet, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Uknes, S., Vernooij, B., Williams, S., Chandler, D., Lawton, K., Delaney, T., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Alexander, D., Ward, E. and Ryals, J. 1995. Systemic acquired resistance. *HortScience* 30:962-963.
- Van Soest, L.J.M., Schroeber, B., and Tazelaar, M.F. 1984. Resistance to *Phytophthora infestans* in tuber-bearing species of *Solanum* and its geographical distribution. *Potato Research* 27:393-411.
- Vardi, E., Sela, I., Edelbaum, O., Livneh, O., Kusnetsova, L., and Stram, Y. 1993. Plants transformed with a cistron of a potato virus Y protease (*N1a*) are resistant to viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90:7513-7517.
- Vasil, I.K. 1994. Molecular improvement of cereals. *Plant Molecular Biology* 25:925-937.
- Vierheilig, H., Alt, M., Lange, J., M.Rella, G., Wiemken, A., and Boller, T. 1995. Colonization of Transgenic Tobacco Constitutively Expressing Pathogenesis-Related Proteins by the Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae*. *Applied and Environmental Microbiology* 61:3031-3034.
- Whalen, M.C., Innes, R.W., Bent, A.F., and Staskawicz, B.J. 1991. Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of Arabidopsis and a bacterial locus determining avirulence on both Arabidopsis and soybean. *Plant Cell* 3:49-59.
- Williams, S., Friedrich, L., Dincher, S. et al. 1992. Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis* (δ -Endotoxin expression in transgenic plants). *Bio/technology* 10:540-543.
- Williamson, M. 1994. Community response to transgenic plant release: predictions from British experience of invasive plants and feral crop plants. *Molecular Ecology* 3(1):75-79.
- Winiger, F.A. 1995. Offizielle schweizerische Liste der Kartoffelsorten 1995. Eidgenoessische Forschungsanstalt fuer landwirtschaftlichen Pflanzenbau, Reckenholz (FAP). 8046 Zuerich, Switzerland.
- Wolfe, M.S., Limpert, E., McDermott, J., Müller, K., Koller, B., Schaffner, D. and Brändle, U. 1992. Barley mildew in Europe: population biology and host resistance. In: *Breeding for Disease Resistance*. eds. R. Johnson & G. J. Jellis. *Euphytica* 63:125-139.
- Wolfe, M.S. 1993. Can the strategic use of disease resistant hosts protect their inherent durability. pp.83-96 in: *Durability of Disease Resistance*. eds. T. Jacobs and J.E. Parlevliet, Kluwer Academic Pub. Dordrecht.
- Wolfe, M.S., Barrett, J.A., Shattock, R.C., and Shaw, D.S.A. 1976. Phenotype-phenotype analysis: field application of the gene-for-gene hypothesis in host-pathogen relations. *Annals of Applied Biology* 82:369-374.

Wolfson, J.L. and Murdock, L.L. 1995. Potential use of protease inhibitors for host plant resistance: A test case. *Environmental Entomology* 24:52-57.

Zhu, Q., Maher, E.A., Masoud, S., Dixon, R.A., and Lamb, C.J. 1994. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Bio/technology* 12:807-812.

Danksagung :

Wir danken Maria Finckh für das Durchlesen des Manuskriptes und allen Personen, welche durch persönliche Mitteilungen Informationen zu diesem Bericht beigesteuert haben.