

Nicola Hofmann und Gabriele Neuber

Untersuchungen zur Verbreitung und Anreicherung von Transgensequenzen in der Umwelt über Auskreuzung und Bodeneintrag am Beispiel von HR-Raps



**Untersuchungen zur Verbreitung und
Anreicherung von Transgensequenzen in
der Umwelt über Auskreuzung und
Bodeneintrag am Beispiel von HR-Raps:
Pilotprojekt zur Entwicklung und Erprobung von
Monitoringmethoden an definierten
Freilandstandorten**

Förderkennzeichen (UFOPLAN) 200 89 412/03

Nicola Hofmann

Gabriele Neuber

unter Mitarbeit von

**Thomas Thienel, Sigrun Feldmann,
Heinrich Höper und Bernd Kleefisch**



Titelfotos:

Rapsfeld (Foto: F. Lehmann, www.aboutpixel.de); DGGE-Bandenmuster der DNA von Pilzgemeinschaften aus einer Bodenproben (Foto: Hofmann/Neuber, NLÖ); Bodenprofil (Podsol, Foto: K. Weddeling, Bonn); Karte: Lage der Bodendauerbeobachtungsflächen mit Rapsanbau im Fruchtwechsel (grüne Punkte) und Anteil des Rapsanbaus (Gelbstufungen) (nach Züghart & Breckling 2003 & Niedersächsisches Landesamt für Bodenforschung, Bremen)

Adressen der AutorInnen:

Dr. Nicola Hofmann	Niedersächsisches Landesamt für Ökologie (NLÖ)
Dr. Gabriele Neuber	An der Scharlake 39, 31135 Hildesheim
Dr. Sigrun Feldmann	(heute: Staatliches Gewerbeaufsichtsamt Hildesheim, Dezernat
Thomas Thienel	Gentechnik, An der Scharlake 39, 31139 Hildesheim)
Dr. Heinrich Höper	Niedersächsisches Landesamt für Bodenforschung
Dr. Bernd Kleefisch	(heute: Landesamt für Bergbau, Energie und Geologie, Stilleweg 2, 30655 Hannover)

Fachbetreuung im BfN:

Dr. Wiebke Züghart Fachgebiet I 1.3 „Monitoring“

Bund-Länder Modellprojekt im Auftrag des Niedersächsischen Landesamtes für Ökologie, des Umweltbundesamtes und des Bundesamtes für Naturschutz gefördert mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit.

Als Download erhalten Sie den Skriptenband und den Anhang unter: <http://www.bfn.de/>

Die Beiträge der Skripten werden aufgenommen in die Literaturlatenbank „**DNL-online**“ (www.dnl-online.de).

Die BfN-Skripten sind nicht im Buchhandel erhältlich.

Herausgeber: Bundesamt für Naturschutz (BfN)
Konstantinstr. 110
53179 Bonn
Tel.: 0228/8491-0
Fax: 0228/8491-9999

Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie für die Beachtung privater Rechte Dritter. Die in den Beiträgen geäußerten Ansichten und Meinungen müssen nicht mit denen des Herausgebers übereinstimmen.

Nachdruck, auch in Auszügen, nur mit Genehmigung des BfN.

Druck: BMU-Druckerei

Gedruckt auf 100% Altpapier

Bonn-Bad Godesberg 2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Ziele des Pilotprojektes.....	9
1.2 Anbindung an bestehende Umweltbeobachtungssysteme	12
1.2.1 BDF-Programm in Niedersachsen	14
1.2.1.1 Ziele des niedersächsischen BDF-Programms.....	14
1.2.1.2 Auswahl und Lage der Boden-Dauerbeobachtungsflächen in Niedersachsen	14
1.2.1.3 Einrichtung von BDF-L-Flächen	16
1.2.1.4 Untersuchungsprogramm auf BDF-L.....	17
1.2.1.5 Verzahnung des BDF-Programms mit anderen Umweltmessnetzen	25
1.2.1.6 Zeitreihendaten der Boden-Dauerbeobachtung.....	27
1.3 Schnittstellen für ein Monitoring und Erweiterungen	27
1.4 Untersuchungsprogramm im Pilotprojekt	28
2. Material und Methoden.....	32
2.1 Untersuchungsgebiete	32
2.1.1 Freisetzungsstandorte.....	32
2.1.2 Referenzflächen des Bodendauerbeobachtungsprogramms	36
2.2 Transgene Pflanzen und Konstrukte	38
2.3 Untersuchung der Flora und Vegetation	39
2.3.1 Floristische Kartierungen.....	39
2.3.2 Vorkommen von Raps und seinen potenziellen Kreuzungspartnern.....	42
2.3.3 Untersuchung des Vorkommens von Transgensequenzen im Kreuzblütlerbestand	44
2.4 Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit transgener Sequenzen (Ringversuch).....	47
2.5 Untersuchung von Bodenproben	48
2.5.1 Probenahmen	48
2.5.2 DNA-Extraktion	52
2.5.3 Entwicklung von Methoden zum Nachweis von Transgensequenzen aus Bodenproben	53
2.5.4 Analyse mikrobieller Gemeinschaften im Boden mittels DGGE	55
2.6 Verwendete Primer und Temperaturprogramme	57
2.7 Einbeziehung der im BDF-Programm erhobenen Daten	60
3. Ergebnisse	62
3.1 Untersuchungen der Flora und Vegetation	62
3.1.1 Floristische Kartierungen.....	62
3.1.2 Vorkommen von Raps und seinen potenziellen Kreuzungspartnern.....	67
3.1.3 Vorkommen des Transgens in den Kreuzblütlerbeständen	70
3.2 Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit transgener Sequenzen (Ringversuch).....	73
3.3 Untersuchungen des Bodens	74

3.3.1 DNA-Extraktion aus Boden	74
3.3.2 Nachweis verschiedener Transgensequenzen aus Boden.....	76
3.3.2.1 Bestimmung der PCR-Nachweisempfindlichkeit	77
3.3.2.2 Nachweis transgener Sequenzen in Bodenproben aus den Freisetzungsstandorten bzw. Referenzflächen.....	80
3.3.3. Mikrobielle Gemeinschaften im Boden	83
3.3.3.1 Untersuchung bodenbiologischer Parameter	83
3.3.3.2 Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften im Boden mittels DGGE	85
4. Diskussion	97
4.1 Flora und Vegetation	97
4.2 Parameter Boden	113
4.2.1 Nachweis transgener Sequenzen im Boden.....	113
4.2.2 Mikrobiologische Untersuchungen	117
4.3 Ausblick: Nutzung der BD-Flächen für ein Langzeitmonitoring von GVP	124
5. Zusammenfassung / Summary.....	128
6. Literatur	136
Danksagung	145
Anhang	146

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Studie bearbeiteten Fragestellungen und Parameter für ein Langzeitmonitoring von HR-Raps.	10
Tabelle 2: Verteilung der nds. BDF-L nach geowissenschaftlicher Kriterien, Bodennutzung und Be- und Entlastungssituation	15
Tabelle 3: Untersuchungsumfang auf landwirtschaftlich genutzten Standard-BDF	18
Tabelle 4: Mikrobiologische Untersuchungen im BDF-Programm.....	22
Tabelle 5: Zeitreihen-Datenbestände des BDF-Programms	27
Tabelle 6: Untersuchungsflächen des BDF-Programms	38
Tabelle 7: Verwendete transgene Pflanzen bzw. DNA-Extrakte und Konstrukte.....	39
Tabelle 8: Skala zur Aufnahme der Artmächtigkeiten (Deckungswerte) der einzelnen Pflanzenarten im Bodendauerbeobachtungsprogramm	41
Tabelle 9: Übersicht über die floristischen und vegetationskundlichen Erhebungen der drei Untersuchungsjahre	42
Tabelle 10: Potenzielle Kreuzungspartner von Raps und ihr Einbürgerungsstatus in der niedersächsischen Flora.....	43
Tabelle 11: Probenahmezeitpunkte auf den verschiedenen Untersuchungsflächen mit Angabe der durchgeführten Untersuchungen	50
Tabelle 12: Verwendete Primer.	58
Tabelle 13: Verwendete Temperaturprogramme zur PCR Amplifikation.....	59
Tabelle 14: Auflistung relevanter Datensätze bzw. Korrelationen für ein GVO-Monitoring, die im Rahmen der Auswertungen vegetationskundlichen Erhebungen der Aufbauphase (1992-2000) vom BDF-Programm ausgewertet wurden.....	61
Tabelle 15: Vegetationsaufnahmen in der Freisetzungsfläche bei Sickte und innerhalb der Bodendauerbeobachtungsflächen	63
Tabelle 16: Gefäßpflanzenarten der FF Sickte und der 1 ha-BDF aller drei Untersuchungsjahre sowie die pflanzensoziologische Zugehörigkeit.	65
Tabelle 17: Die Artenzahlen auf den gesamten Flächen der untersuchten Äcker und der Anteil der in den einzelnen Untersuchungsjahren neu registrierten Arten.....	66
Tabelle 18: Übersicht über alle Individuenzahlen und Anzahl der Fundorte der erfassten Kreuzblütler-Arten in den verschiedenen Lebensraumtypen	68
Tabelle 19: Übersicht über die Häufigkeit von Vorkommen des Rapses (<i>Brassica napus</i>) und des Acker-Senfs (<i>Sinapis arvensis</i>) in verschiedenen Lebensraumtypen.	69
Tabelle 20: Anzahl untersuchter Blatt- und Schotenproben in den verschiedenen Untersuchungsgebieten	71
Tabelle 21: Untersuchung reifer Samen mittels Keimungstest bzw. alternativ mittels molekularbiologischer Analysen von Tausendkornaliquots.....	73
Tabelle 22: Bodentypen, an denen die DNA-Extraktionsmethode (Methode A) anhand von qualitativen PCR-Analysen erfolgreich getestet wurde.	75
Tabelle 23: Reextraktionseffizienz von DNA aus verschiedenen Böden.....	76
Tabelle 24: Nachweisempfindlichkeit reextahierter DNA aus Boden.....	79

Tabelle 25: Transgennachweis aus Bodenproben der Versuchsflächen zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten nach Ernte der transgenen Pflanzen.	82
Tabelle 26: Untersuchung von Bodenproben der BDF-Referenzflächen zum Zeitpunkt des Rapsanbaus.	83
Tabelle 27: Messergebnisse für Basalatmung und mikrobielle Biomasse getrennt nach Kernflächen des Versuchsfeldes in Sickte (2001 - 2003).	84
Tabelle 28: Messergebnisse für Basalatmung und mikrobielle Biomasse des Versuchsfeldes in Sickte sowie der untersuchten Referenzflächen des BDF-Programms der Jahre 2001-2003.	84
Tabelle 29: Physikalische Parameter der 4 Kernflächen in Sickte (2002).	85
Tabelle 30: DGGE-Gele mit den in die Analysen eingesetzten Proben von verschiedenen Probenahmezeitpunkten im Jahreszeitlauf (2001-2003).	87
Tabelle 31: Artenzahlen in den Kernflächen der BDF-L.	98
Tabelle 32: Mittlere Artenzahl in den Kernflächen von BD-Feldern, auf denen zum Zeitpunkt der Aufnahme Raps kultiviert wurde.	98
Tabelle 33: Artenzahlen in der 1 ha-Fläche von ausgewählten BDF-L, die Raps im Fruchtfolgewechsel haben.	102
Tabelle 34: Metabolischer Quotient von BD-Flächen, in denen Raps in der Fruchtfolge angebaut wird im Vergleich zu Sickte.	118
Tabelle 35: Bodenbiologische Parameter von BD-Feldern im Vergleich zur Freisetzungsfäche Sickte.	119

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Lage der BD-Flächen in Niedersachsen	15
Abbildung 2: Schematische Darstellung des mehrstufigen Verdichtungsverfahrens bei der Bodenkartierung der BDF-L.....	16
Abbildung 3: Übersichtsskizze zu den Eckpunkten und Kernflächen einer BDF-L	17
Abbildung 4: Entnahmemuster für Bodenproben in Kernflächen	19
Abbildung 5: Lebensräume unterschiedlicher Lebensraumgemeinschaften.....	23
Abbildung 6: Stand der integrierten Umweltbeobachtung auf den nds. BDF.....	26
Abbildung 7: Einrichtung der Kernflächen, Raps-Versuchsfeld Sickte/Braunschweig	33
Abbildung 8: Anbauschema des Freisetzungversuches in Dahnsdorf.....	35
Abbildung 9: Keimungstest.....	46
Abbildung 10: Anbauschema der Kartoffel-Fruchtfolge 2003.....	51
Abbildung 11: Artenzahlen der Freisetzungsfläche und der BDF012-L.....	64
Abbildung 12: Elektropherogramm der Gesamt-DNA aus Bodenproben	75
Abbildung 13: Amplifikation reextrahierter DNA.....	78
Abbildung 14: Vergleich von Amplifikaten eines Bereiches innerhalb der 16S-rDNA	86
Abbildung 15: DGGE-Bandenmuster von Einzelbodenproben aus Sickte 2001.....	88
Abbildung 16: Dendrogramm der Einzelproben der 4 Entnahmestellen einer Kernfläche	88
Abbildung 17: DGGE-Bandenmuster von Bodenproben aus Sickte 2001 (Ausschnitt)	89
Abbildung 18: DGGE-Bandenmuster von Bodenproben aus Sickte 2001	90
Abbildung 19: Ausschnittvergrößerung aus Gel 5 (Abb. 18).	90
Abbildung 20: Dendrogramm der Proben vor und nach Anwendung des Komplementärherbizides.....	91
Abbildung 21: DGGE-Bandenmuster von Bodenproben der Referenzfläche BDF013-L	92
Abbildung 22: Dendrogramm BDF012-L, 2001	93
Abbildung 23: Dendrogramm BDF058-L, 2001	93
Abbildung 24: DGGE-Bandenmuster von high-GC-Organismen aus Bodenproben	95
Abbildung 25: DGGE-Bandenmuster der Pilzgemeinschaft BDF008-L	96
Abbildung 26: DGGE-Bandenmuster der Pilzgemeinschaft aus Bodenproben vom Standort Dahnsdorf.	96

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
aBDF	Gesamtacker, in dem die BD-Fläche liegt
aFF	Gesamtacker, in dem die Freisetzungsfläche liegt
AZ	Aktenzeichen
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
BDF	Bodendauerbeobachtungsflächen
BDF-L	landwirtschaftlich genutzte BD-Fläche
BD-Fläche	Bodendauerbeobachtungsfläche
BfN	Bundesamt für Naturschutz
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Fa	Firma
FF	Freisetzungsfläche
g	Gramm
GVO	gentechnisch veränderte Organismen
GVP	gentechnisch veränderte Pflanzen
ha	Hektar
HR	Herbizidresistenz
K	Kopien
Kap.	Kapitel
LAG	Länderausschuss Gentechnik
LÜN	Lufthygienisches Überwachungssystem Niedersachsen
MgCl	Magnesiumchlorid
Min	Minute
ng	Nanogramm
NLFB	Niedersächsisches Landesamt für Bodenforschung
NLÖ	Niedersächsisches Landesamt für Ökologie
NN	Normal-Null
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pg	Pikogramm
qm	Quadratmeter
RKI	Robert-Koch-Institut

RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
Sec	Sekunde
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphismus
Tab.	Tabelle
T-RFLP	Terminaler Restriktionsfragment Längen-Polymorphismus
U	Unit
UG	Untersuchungsgebiet
Upm	Umdrehungen pro Minute
vBDF	Kernflächen innerhalb der BD-Flächen
vFF	Kernflächen innerhalb der Freisetzungsfläche

1. Einleitung

Die im Februar 2001 verabschiedete und seit Oktober 2002 in Kraft getretene Novellierung der europäischen Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG regelt in den Ländern der EU die Freisetzung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) in die Umwelt im Rahmen des versuchsweisen und des kommerziellen Anbaus. Aufgrund der Novellierung besteht die Notwendigkeit für die Entwicklung eines Überwachungsplanes, anhand dessen schädliche Auswirkungen oder unerwartete Effekte gentechnisch veränderter Organismen auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt nach Inverkehrbringung ermittelt werden sollen. Mit einer verstärkten Markteinführung von gentechnisch veränderten Kulturpflanzen ist in den nächsten Jahren zu rechnen. Voraussichtlich werden gentechnisch veränderter (transgener) Raps und Mais, sowie transgene Zuckerrüben und Kartoffeln als erstes zum Anbau in der Landwirtschaft zugelassen (www.rki.de). Welche ökologischen Folgewirkungen mit einem großflächigen Anbau gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP) verbunden sind, ist heute weitgehend unbekannt. In diesem Zusammenhang wird die Etablierung einer ökologischen Dauerbeobachtung zur Abschätzung von Langzeiteffekten relevant (Sachverständigenrat für Umweltfragen, 1998).

Die Risikoabschätzung von Langzeitwirkungen bei einem Anbau von GVP birgt viele Unsicherheiten. Dem wird in der novellierten Richtlinie Rechnung getragen, in dem die Durchführung eines Monitorings nach Inverkehrbringen verbindlich vorgeschrieben wird (EUROPÄISCHES PARLAMENT & RAT DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN, 2001). Das Monitoring ist Bestandteil des Genehmigungsverfahrens zum Inverkehrbringen und soll direkte und indirekte, sofortige und spätere sowie unerwartete und erst im großflächigen GVP-Anbau feststellbare Auswirkungen auf die Umwelt feststellen. Es dient dazu, Erfahrungen im Umgang mit gentechnisch veränderten Pflanzen zu sammeln und es soll möglichst frühzeitig unerwartete Effekte erkennen lassen. Außerdem gilt es, die im Rahmen der Genehmigung getroffenen Sicherheitsbewertungen zu möglichen nachteiligen Auswirkungen zu überprüfen. Dabei wird in der Richtlinie zwischen der nur erforderlichenfalls durchzuführenden „fallspezifischen“ Überwachung (Case Specific Monitoring) und der grundsätzlich auszuführenden „allgemeinen überwachenden Beobachtung“ (General Surveillance) unterschieden (EUROPÄISCHES PARLAMENT & RAT DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN, 2001). Das fallspezifische Monitoring ist auf die jeweilige Kulturpflanze und die eingeführte gentechnische Veränderung abgestimmt. Sie dient dazu, Vermutungen aus der Risikoabschätzung zu überprüfen und ist nur über einen begrenzten Zeitraum durchzuführen. Dagegen dient die allgemeine überwachende Beobachtung zur Erfassung von Langzeiteffekten von GVO sowie von Effekten, die in der Risikoabschätzung nicht vorhergesehen wurden. In den Leitlinien zur Richtlinie wird hierzu nach Möglichkeit die Nutzung bereits bestehende Beobachtungsinstrumente vorgeschlagen (LEITLINIEN ZUR ERGÄNZUNG DES ANHANGS VII DER RICHTLINIE 2001/18/EG, EUROPÄISCHES PARLAMENT & RAT DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN 2002).

In Deutschland erarbeitet das Umweltbundesamt zusammen mit Vertretern des Bundes und der Länder in der AG "Monitoring der Umweltauswirkungen von gentechnisch veränderten

Pflanzen" ein Konzept für das GVP-Monitoring in Ziel- und Nicht-Zielökosystemen. Dabei wurde zunächst eine Prioritätenliste nach den Kriterien „Stand der Marktzulassung“ sowie „Potential für ökologische Wirkungen“ erstellt. Diese Liste zeigt auf, für welche Pflanzen und gentechnischen Veränderungen mit einem Monitoring begonnen werden sollte. Auf Grundlage dieser Prioritätensetzung nimmt Raps eine herausragende Stellung ein. Es wird empfohlen, die Herbizidresistenz (HR)-Technik bei Raps aufgrund folgender Eigenschaften als Fallbeispiel für eine transgene Pflanze mit hohem ökologischem Potential zu bearbeiten:

- Überwinterung und Überdauerung möglich
- Auskreuzung möglich, heimische Kreuzungspartner vorhanden
- Gentransfer in benachbarte Bestände möglich
- geringe Konkurrenzfähigkeit; temporäre Verwilderung auf gestörten Flächen möglich
- Raps mit HR und/oder männlicher Sterilität ist mehrfach zugelassen
(<http://www.umweltbundesamt.de/uba-info-daten/daten/bsg/bsg11.htm>)

Zudem wurden ein Eckpunktepapier und eine Parametertabelle entwickelt, die Anregungen für Erhebungsparameter sowie Untersuchungsflächen, -zeiträume und -methoden in Abhängigkeit von der jeweiligen Pflanze und der transgenen Eigenschaft geben (<http://www.umweltbundesamt.de/uba-info-daten/daten/bsg/bsg12.htm>). Auf dieser Grundlage wurde Ende 2002 ein Konzeptvorschlag für das Monitoring von gentechnisch veränderten Organismen erstellt (<http://www.umweltbundesamt.de/uba-info-daten/daten/bsg/bsg5.htm>).

Eine weitere AG unter Federführung der Biologischen Bundesanstalt erarbeitet ein Überwachungskonzept für das Agrarökosystem. Zielsetzung dieser Arbeitsgruppe „Anbaubegleitendes Monitoring“ ist sowohl die Definition von Parametern, Erfassungsmethoden und Bewertungskriterien als auch die Entwicklung von Vorschlägen zu möglichen Zuständigkeiten für das Monitoring. Der Schwerpunkt liegt dabei auf Schutzziele im Bereich der Landwirtschaft. In beiden AGs wird zudem die Möglichkeit der Einbindung verschiedener, schon bestehender Beobachtungssysteme und Netzwerke geprüft.

Darüber hinaus hat auf europäischer Ebene die „European Enforcement Group on Deliberate Release of Genetically Modified Organisms“ Konzepte zum Monitoring verschiedener Kulturpflanzen (z.Z. für Raps und Mais vorliegend) entwickelt (<http://eep-mon.iitb.fhg.de>).

1.1 Ziele des Pilotprojektes

Zur Ermittlung der Umsetzbarkeit der Monitoringvorschläge fördert das Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit im Rahmen des UFOPLAN 2000 in Zusammenarbeit mit den Bundesländern Modellprojekte, in denen Monitoringkonzepte entwickelt und deren konkrete Anwendung geprüft werden soll. Das niedersächsische Pilotprojekt befaßt sich mit der Entwicklung und Erprobung von Monitoringmethoden am Beispiel von herbizidresistentem Raps und einer möglichen Anbindung an konventionelle Umweltbeobachtungssysteme. Das Ziel der 3-jährigen Studie ist die Entwicklung von Routineuntersuchungsmethoden und deren Erprobung im Freiland im Hinblick auf ihre Eignung für ein

Langzeitmonitoring. In Tab. 1 sind die Fragestellungen und Parameter zusammengestellt, die in dieser Studie bearbeitet wurden und im Folgenden genauer erläutert werden.

Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Studie bearbeiteten Fragestellungen und Parameter für ein Langzeitmonitoring von HR-Raps.

Kommt es in der Umgebung von transgenen Rapsfeldern durch Auskreuzung/ Samenaustrag zur Anreicherung von Transgensequenzen?

- Kartierung von potenziellen Zielarten/Kreuzungspartnern
- Erfassung der Auskreuzung in verwandte Wildarten

Kommt es zu einer Beeinflussung der Ackerbegleitflora durch die Anwendung von nicht-selektiven Herbiziden?

- Vegetationskundliche Untersuchungen der Ackerbegleitflora

Kommt es durch den Anbau von GVP zum Eintrag und zur Anreicherung transgener DNA im Boden?

- Nachweis transgener DNA im Boden

Gibt es Auswirkungen auf die mikrobielle Diversität?

- Analyse von Bakterienpopulationen im Boden, Erfassung von jahreszeitlichen und nutzungsspezifischen Schwankungen

Aufbauend auf den in den genannten Gremien diskutierten Konzepten wurden relevante Parameter für ein Langzeitmonitoring von HR-Raps ausgewählt, die zum einen Basisinformationen und zum anderen Hinweise auf mögliche Auswirkungen des Anbaus auf die Bereiche Vegetation und Boden liefern. Auswirkungen auf die Fauna wurden im Rahmen dieses Projektes nicht berücksichtigt.

Die Ermittlung von Hintergrundparametern, die Informationen zur Struktur des Testgebietes, zu den landwirtschaftlichen Bewirtschaftungsmassnahmen sowie zum Klima und Witterungsverlauf geben, ist unabdingbar, um die im Rahmen eines Monitorings erhobenen Daten auswerten, interpretieren und in einen ökologischen Zusammenhang stellen zu können. Die Untersuchungen möglicher Auswirkungen auf die Vegetation und den Boden sollten aufgrund der Biologie der Kulturpflanze Raps sowie der eingeführten gentechnischen Veränderung elementare Bestandteile eines Langzeitmonitorings bei HR-Raps darstellen.

Das Potential für Umweltwirkungen von transgenem Raps ist aufgrund seiner Fähigkeit der Ausbreitung, Auskreuzung und zumindest temporären Verwilderung hoch. Zudem ist eine Verbreitung über Verschleppung von transgenem Samenmaterial möglich. Aus verschiedenen Studien zur Ausbreitung/ Auskreuzung von transgenem Rapspollen ist bekannt, dass sich die Pollenverbreitung bei einem großflächigen Anbau von transgenem Raps kaum wirkungsvoll eingrenzen lässt und zur Ausbreitung transgener Eigenschaften führen wird (MANNASSE & KAREIVA, 1991; MCCARTNEY & LACEY, 1991; SCHEFFLER *et al.*, 1993; TIMMONS *et al.*, 1995; ERNST *et al.*, 1998; FELDMANN *et al.*, 1998; FÖRSTER *et al.*, 1998; HANKELN *et al.*, 1998; PELLMANN *et al.*, 1998; MENZEL & MATHES, 1999; TREU & EMBERLIN 2000; RIEGER *et al.*, 2002; WILKINSON *et al.*, 2003, WARWICK *et al.*, in press). Da Auskreuzungsereignisse zu-

nächst einmal wertneutral anzusehen sind und nicht zwangsläufig mit schädlichen ökologischen Auswirkungen verbunden sein müssen, ist jede gentechnische Veränderung im Einzelfall zu beurteilen, inwieweit die transgene Eigenschaft den Pflanzen einen Selektionsvorteil bietet und zur Ausbildung dauerhafter Populationen oder anderer Auswirkungen auf das Ökosystem führen könnte. Dies ist nach den bisherigen Erkenntnissen nicht abschätzbar und sollte durch die Erfassung der Verbreitung transgener Pflanzen und den damit ggf. einhergehenden Bestandsveränderungen abgeklärt werden. Somit stellen Kartierungen von potenziellen Zielarten / Kreuzungspartnern (qualitativ und quantitativ) und die Erfassung der Auskreuzung in verwandte Wildarten prioritäre Punkte in dieser Studie und auch beim Aufbau eines Monitoringprogramms von transgenem Raps dar.

Die gentechnische Veränderung zur Vermittlung von Herbizidresistenz, die in dieser Studie als Modellbeispiel gewählt wurde, ist eine in der Sortenzüchtung häufig verwendete transgene Eigenschaft, wobei Rapsorten mit Toleranzen gegen die Wirkstoffe Glufosinat und Glyphosat am weitesten verbreitet sind. HR-Rapsorten wurden EU-weit bereits mehrfach zugelassen und werden im Rahmen von Freisetzungsversuchen auch in Deutschland angebaut. Der in der vorliegenden Studie verwendete HR-Raps trägt eine Resistenz gegen das Komplementärherbizid Glufosinat (L-Phosphinothricin, Handelsname BASTA bzw. LIBERTY-LINK™). Die für die Pflanzen toxische Wirkung von Glufosinat beruht auf der Hemmung des Enzyms Glutaminsynthetase im Stickstoffstoffwechsel der Pflanzen, die zu einer toxischen Akkumulation von Ammonium führt. Eine Resistenz wird durch die Insertion des pat-Gens aus dem Mikroorganismus *Streptomyces viridochromogenes* unter Kontrolle des 35S-Promotors und Terminators aus dem Cauliflower Mosaikvirus vermittelt. Das pat-Gen codiert eine Phosphinothricin-acetyl-Transferase (PAT), die die Acetylierung von Glufosinat katalysiert und somit die Substanz inaktiviert. Der Anbau der herbizidresistenten Sorten und die Verwendung des jeweiligen Komplementärherbizides ermöglichen die Aufbringung der Breitbandherbizide über die gesamte Vegetationsperiode. Sie können auch im Nachauflauf, also zu einem Zeitpunkt fortgeschrittenen Wachstums, appliziert werden, ohne dass die Kulturpflanze Schaden nimmt. Eine in England großflächig angelegte Studie über 3 Jahre ergab, dass der Anbau von transgenen HR-Rapspflanzen die Ackerbegleitflora und in Folge dessen auch die Fauna dezimiert (ZEKI 2003). Daher sollte auf den Feldern eine durch Einsatz der nicht-selektiven Herbizide bedingte mögliche Beeinflussung der Ackerflora (Verdrängung von Arten, Entstehung mehrfachresistenter Arten) und der Ackerrandvegetation mit Hilfe von floristischen und vegetationskundlichen Untersuchungen erfasst werden.

Eine weitere zentrale Fragestellung ist aufgrund der Vielzahl und der Komplexität unterschiedlicher transgener Genkassetten, der Eintrag transgener DNA in den Boden in Zusammenhang mit horizontalem Gentransfer und damit möglicherweise einhergehenden evolutiven Prozessen. Es ist bekannt, dass DNA im Boden über Monate persistieren kann (PAGET & SIMONET, 1994; WACKERNAGEL & LORENZ, 1994; SMALLA, 1995; ECKELKAMP *et al.*, 1997; SANDERMANN *et al.*, 1997; ERNST *et al.*, 1998) und es gibt Hinweise, dass pflanzliche DNA, insbesondere wenn bakterienhomologe Bereiche vorhanden sind, von Bakterien aufgenommen werden kann (GEBHARD & SMALLA, 1998, NIELSEN *et al.*, 1998). Mögliche Folgewirkun-

gen auf die Bodenstruktur, Bodenfruchtbarkeit, Schädlings-/ Nützlingsverschiebungen sind wesentlich und bislang kaum abschätzbar. Diese Belange des Bodenschutzes sind im Sinne des Vorsorgegrundsatzes, der in der Freisetzungsrichtlinie und auch im Sinne des in §7 BBodSchG verankert ist, zu berücksichtigen.

Die Wahrscheinlichkeit eines horizontalen Gentransfers ist jedoch sehr gering (GEBHARD & SMALLA, 1998, NIELSEN *et al.*, 1998; SMALLA *et al.*, 2000) und methodisch nur mit einem hohen Aufwand nachzuweisen. Daher werden im Rahmen dieses Projektes Methoden zur Darstellung mikrobieller Gemeinschaften bzw. von Veränderungen in mikrobiellen Gemeinschaften auf ihre Eignung für ein GVP-Monitoring als ersten Schritt für die Detektion möglicher Beeinflussungen durch den GVP-Anbau und den damit einhergehenden Veränderungen in der landwirtschaftlichen Praxis geprüft. Bisherige Studien über Auswirkungen des Anbaus von gentechnisch verändertem Raps im Rahmen von zeitlich begrenzten Freisetzungsversuchen ergaben Hinweise auf geringfügige oder vorübergehende Beeinflussungen der mikrobiellen Gemeinschaften (SICILIANO *et al.*, 1999; GYAMFI *et al.*, 2002; DUNFIELD & GERMIDA, 2001 und 2003). Um mögliche langfristige Auswirkungen des Anbaus von transgenem HR-Raps auf die mikrobiellen Gemeinschaften im Boden untersuchen zu können, werden ergänzend zu den Aufnahmen mikrobieller Kennwerte wie Biomasse und Basalatmung, PCR-Fingerprintverfahren etabliert und an unterschiedlichen Bodentypen erprobt.

Eine weitere Fragestellung des Projektes befasst sich mit der Stabilität von Transgensequenzen in Bodenproben. Als Basisparameter, die im weiteren Verlauf eines Monitoring elementare Hintergrundinformationen für eine Zuordnung von eventuell auftretenden Veränderungen zum Anbau von GVP liefern können, werden Untersuchungen zum Eintrag und zur Anreicherung von transgener DNA im Boden durchgeführt.

Neben der Auswahl von Untersuchungsparametern wurden im Rahmen der Studie Vorschläge zur Methodik der Probenahme, Einrichtung der Untersuchungsflächen, zu Anzahl und Zeitpunkt der Beprobungen, Untersuchungsmethoden, Referenzflächen und zur Datenauswertung entwickelt sowie deren Anbindungsmöglichkeiten an bestehende Umweltbeobachtungssysteme geprüft.

1.2 Anbindung an bestehende Umweltbeobachtungssysteme

Die Durchführung des Monitorings von Umweltwirkungen transgener Kulturpflanzen sollte aus Kosten- und Effizienzgründen unter Einbeziehung schon bereits bestehender und etablierter Systeme erfolgen. Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen des Pilotprojektes eine Anbindung an schon bestehende Umweltbeobachtungssysteme in Niedersachsen geprüft. Dabei kommen als niedersächsische Umweltbeobachtungssysteme das Boden-Dauerflächenbeobachtungsprogramm (BDF), das Pflanzen- und Tierartenerfassungsprogramm des Landes Niedersachsen, Natura 2000 und das Ackerrandstreifenprogramm in eine engere Wahl.

Die Auswahl der Mess- und Beobachtungsprogramme hinsichtlich ihrer Anbindungsmöglichkeiten für ein GVP-Monitoring erfolgte nach folgenden Kriterien:

- Die Datenerhebung des Beobachtungsprogramms sollte in für das Monitoring relevanten Medienbereichen (Biota, Boden, ggf. Luft und Gewässer) durchgeführt werden.
- Schwerpunkt sollte das Agrarökosystem sein, da hier die Wahrscheinlichkeit einer Beeinflussung am größten ist.
- Die Untersuchungsflächen sollten in geographischen Räumen durchgeführt werden, die für ein Monitoring von Bedeutung sind (repräsentative Flächen für naturräumliche und nutzungsspezifische Begebenheiten in Niedersachsen).
- Die Untersuchungsflächen sollten in Anbauflächen von GVP oder in Referenzflächen liegen oder als solche genutzt werden können.
- Eine langfristige Nutzung des Umweltbeobachtungsprogramms und der Untersuchungsgebiete muss gewährleistet sein.
- Es sollten Fragestellungen bearbeitet bzw. Parameter erhoben werden, die für das Monitoring relevant sind. Zudem sollten die Erhebungen in Intervallen durchgeführt werden, die für ein GVP-Monitoring geeignet sind.
- Eine Erweiterung der Untersuchungsmethoden für gentechnisch spezifische Fragestellungen sollte prinzipiell möglich sein.
- Die erhobenen Daten sollten hinsichtlich der Fragestellungen im GVP-Monitoring auswertbar sein (Datenzugang, Zusammenführung, Auswertbarkeit).
- Eine bundesweit weitgehend einheitliche Durchführbarkeit des Programms wäre wünschenswert.

Eine umfangreiche generelle Bewertung von schon bestehenden Umweltbeobachtungssystemen in Deutschland und deren Eignung für ein Monitoring findet sich bei ZÜGHART & BRECKLING, 2003. Daher wird an dieser Stelle auf eine detaillierte Bewertung der in Niedersachsen durchgeführten Programme verzichtet. Zusammenfassend ist festzustellen, dass es in Niedersachsen gegenwärtig kein Programm gibt, das sich zur vollständigen oder weitgehenden Aufnahme des Monitoring transgener Kulturpflanzen eignet. Dies hängt damit zusammen, dass Umweltwirkungen von GVP in unterschiedlichen Umweltbereichen zu überprüfen sind und zudem gentechnisch spezifische Fragestellungen, wie der Nachweis transgener Sequenzen, bisher in keinem Programm integriert sind.

Von den oben aufgeführten Kriterien bietet das nds. BDF-Programm die meisten Schnittstellen für ein GVP-Monitoring. Daher wurde im Rahmen des Pilotprojektes eine Anbindung an das BDF-Programm sowie eine Erweiterung des Programms um gentechnisch spezifische Fragestellungen am Beispiel von HR-Raps geprüft. Im Folgenden wird zunächst das nds. BDF-Programm vorgestellt (Kap. 1.2.1), anschließend werden die Schnittstellen zum GVP-Monitoring aufgezeigt. Aufbauend auf diesen Schnittstellen wurde im Forschungsprojekt ein Konzept für eine konkrete Anbindung entwickelt und die Eignung der Erweiterungen in der Praxis überprüft.

1.2.1 BDF-Programm in Niedersachsen

1.2.1.1 Ziele des niedersächsischen BDF-Programms

Im niedersächsischen Bodendauerbeobachtungsprogramm wurde vom Niedersächsischen Landesamt für Bodenforschung (NLFb) seit 1991 ein Netz von insgesamt 90 so genannten Boden-Dauerbeobachtungsflächen (BDF) aufgebaut. 20 BDF entfallen auf forstlich genutzte (BDF-F) und 70 BDF auf ortsüblich landwirtschaftlich genutzte Standorte (BDF-L, Abb. 1). Ziel ist es, auf Basis dieser repräsentativ ausgewählten Messflächen und damit auf allen wesentlichen Standorten des Landes den Ist-Zustand zu dokumentieren und mögliche Bodenveränderungen als Folge von Bodennutzung und Bodenbelastungen aufzudecken, Ursache und Auswirkungen zu bewerten und zu prognostizieren. Der Aufbau eines digitalen Bodeninformationssystems dient dabei zur einheitlichen Zusammenführung und Anwendung aller verwertbaren Daten und Auswertungsmethoden (www.nlfb.de). Zudem sollen die BDF neben ihrer Hauptfunktion der Umweltbeobachtung als Plattformen der Umweltforschung in Niedersachsen dienen. Durch Abstimmungen mit den Dauerbeobachtungsprojekten anderer Bundesländer wird eine länderübergreifende Auswertung angestrebt (www.nlfb.de)

1.2.1.2 Auswahl und Lage der Boden-Dauerbeobachtungsflächen in Niedersachsen

Die Auswahl der BDF-Flächen erfolgte nach den Repräsentanzkriterien Boden, Nutzung und regionalen Unterschieden in der Bodenbelastung.

Dabei wurden als geowissenschaftliche Kriterien Boden- und Gesteinsverhältnisse, Klima und Morphologie berücksichtigt. Darüber hinaus wurden typische Bodennutzungen (Land- und Forstwirtschaft, Naturschutzflächen) und Belastungsfaktoren (Immissionen, nutzungsbedingte Belastungen etc.) berücksichtigt. So wurden knapp die Hälfte der BDF stellvertretend für bestimmte Bodenbelastungssituationen ausgewählt, beispielsweise Siedlungsgebiete, Immissionsgebiete, Auengebiete mit belasteten Flusssedimenten sowie erosionsgefährdete Gebiete. Die übrigen BDF (39 BDF-L) geben die Vielfalt der niedersächsischen Böden unter ortsüblicher Bewirtschaftung wieder (Tab. 2). 10 der Flächen wurden als sog. Intensiv-BDF und 3 als Sondermessflächen zur Beobachtung der Erosion eingerichtet (BODENSCHUTZ IN NIEDERSACHSEN, 2003). Die Anzahl der Acker- und Grünlandflächen orientiert sich an dem Acker-/Grünlandverhältnis der Landschaft in Niedersachsen (ca. 1/3 Acker und 1/3 Grünland).

Tabelle 2: Verteilung der nds. BDF-L nach geowissenschaftlicher Kriterien, Bodennutzung und Be- und Entlastungssituation (aus KLEEFISCH & KUES, 1997).

Landwirtschaftliche Nutzflächen (BDF-L)	
Referenzflächen	39
Siedlungsgebiete	5
Immisionsgebiete	6
Flächen mit erhöhter Düngung	4
Erosionsgefährdete Gebiete	6
Flächen zur Grundwassergewinnung	4
Naturschutzgebiete auf extensivem Grünland	3
Naturschutzflächen ohne aktuelle Nutzung	3

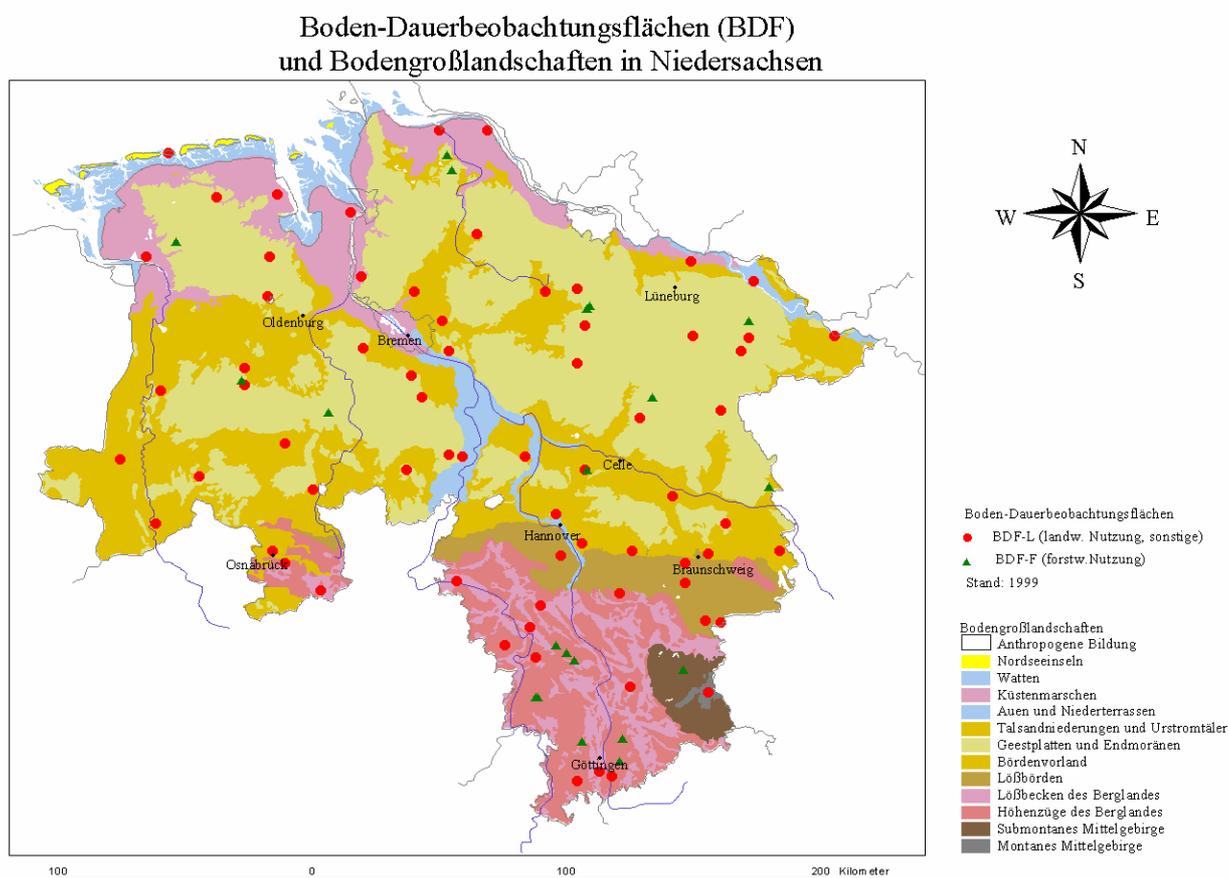


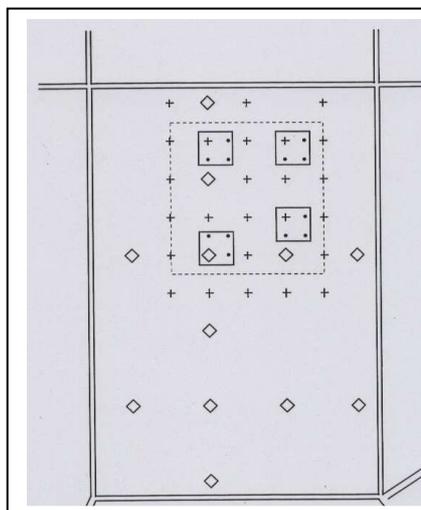
Abbildung 1: Lage der BD-Flächen in Niedersachsen

1.2.1.3 Einrichtung von BDF-L-Flächen

Bodenkartierung (Vorerkennung und Feinkartierung)

In den Flächen werden Bereiche von 1 ha Größe (1 ha BDF) und vier sogenannte Kernflächen eingerichtet. Um eine größtmögliche Homogenität der Untersuchungsflächen zu gewährleisten, werden Bodenkartierungen bei der Einrichtung der Flächen durchgeführt, die sich in zwei Phasen gliedern. Im ersten Schritt wird in dem Areal, in dem die BDF (1 ha Fläche) eingerichtet werden soll, eine Übersichtskartierung zur Ermittlung der Bodenformen und deren Verbreitung durchgeführt. Anhand der Ergebnisse wird nach Kriterien der Homogenität der Böden und ihrer Substrate eine Fläche festgelegt, die durch eine Feinkartierung näher untersucht wird. Die Feinkartierung selbst wird rasterförmig durchgeführt, und überschreitet die Größe der BDF deutlich (Rautensymbole Abb. 2, Rasterpunktabstand 50 m). Auf der Basis dieser Kartierung wird eine geeignete Teilfläche des Schläges ausgewählt und mit kleineren Rasterpunkt-Abständen (25m Abstände, Plus Symbol in Abb. 2) erneut kartiert. Die Ergebnisse sind dann die Grundlage für die Auswahl der 1-ha BDF sowie der 4 Kernflächen unter der Maßgabe möglichst großer bodenkundlicher Homogenität. Hierzu werden die Bohrungen innerhalb der Kernflächen auf ein 12,5 m Raster (Punkt-Symbol in Abb. 2) verdichtet. Als Kernflächen werden i.d.R. Entnahmequadrate mit einer Seitenlänge von 16 m eingerichtet (Fläche: 256 qm).

Abbildung 2: Schematische Darstellung des mehrstufigen Verdichtungsverfahrens bei der Bodenkartierung der BDF-L (aus Kleefisch und Kues, 1997). Symbolerklärung s. Kap. 1.2.1.3



Flächensicherung

Da das Bodendauerbeobachtungsprogramm auf lange Zeiträume ausgelegt ist, kommt der langfristigen Sicherung der BD-Flächen entscheidende Bedeutung zu. Dies gilt sowohl für die rechtliche Sicherung der Flächen als auch für deren vermessungstechnische innere und äußere Vermarkung.

- **Rechtliche Sicherung:**

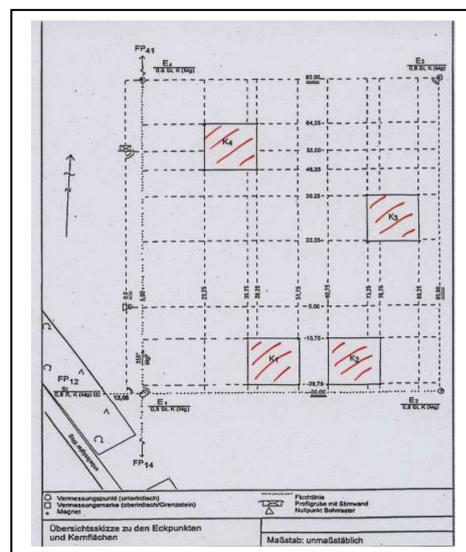
Zur langfristigen rechtlichen Sicherung der Flächen wird zwischen den Grundstückseigentümern und dem Land Niedersachsen ein „Gestattungsvertrag“ für zunächst 12 Jahre abgeschlossen. Nach Ablauf dieses Zeitraumes sind Anschlußverträge von mindestens 5 Jahren Laufzeit vorgesehen.

Zur Sicherstellung der Ziele der Bodendauerbeobachtung verpflichtet sich der Flächenbesitzer unter anderem dazu, die Parzellen betriebsüblich und einheitlich zu bewirtschaften, keine Nutzungsänderung vorzunehmen (Wechselfruchtbau gilt in diesem Sinne nicht als Nutzungsänderung) und eine Schlagkartei zu führen, in der die wesentlichen Bewirtschaftungsmaßnahmen aufzuzeichnen sind und diese dem NLFB zur Verfügung zu stellen. Im Gegenzug erhält der Flächenbesitzer eine jährliche Entschädigung.

- **Vermessungstechnische Sicherung:**

Die vermessungstechnische Flächensicherung erfolgt über die genaue Einmessung der 1 ha Fläche unter Anschluß an das amtliche Meßnetz der Katasterverwaltung. Die Vermarkung erfolgt durch unterirdisch eingebrachte Vermarkungsplatten (BDF-Eckpunkte) und mit Hilfe von Dauermagneten (Eckpunkte und Kernflächen), die mit entsprechenden Detektoren geortet werden können. Zur schnellen Orientierung werden an den Schlaggrenzen oberirdische Vermarkungssteine eingebracht. Dies ermöglicht ein einfaches Wiederfinden der Untersuchungsflächen.

Abbildung 3: Übersichtsskizze zu den Eckpunkten und Kernflächen (K1 – K4) einer Bodendauerbeobachtungsfläche (aus Kleefisch & Kues, 1997)



1.2.1.4 Untersuchungsprogramm auf BDF-L

Hinsichtlich der versuchstechnischen Konzeption und der instrumentellen Ausstattung der Flächen wird zwischen „Standardflächen“ und „Intensivmessflächen“ unterschieden. Während auf den Standardflächen (75% der Flächen) über zeitlich wiederholte Untersuchungen Aussagen zu möglichen Veränderungen von physikalischen, chemischen und biologischen Bodeneigenschaften sowie der Vegetation angestrebt werden, werden auf den „Intensivmessflächen“ durch eine Ausstattung mit physikalischen und chemischen Sensoren (Untersuchungen zu Stoffeinträgen aus der Atmosphäre und Stoffausträgen in das Grundwasser)

mögliche Belastungen frühzeitig über detaillierte Messungen des Wasser- und Stoffhaushaltes der Böden identifiziert. Weiterhin werden die wichtigsten Wetterdaten (Niederschlag, Lufttemperatur, Luftfeuchte, Globalstrahlung, Windgeschwindigkeit, Windrichtung) durch Wetterstationen an diesen „Intensiv-BDF“ ermittelt.

Eine Übersicht über den Untersuchungsumfang auf Standard BDF-L gibt Tab. 3. Nach Abschluß der Feinkartierung und der vertraglichen Sicherung der Flächen wird eine bodenphysikalische, -chemische, mikrobiologische und vegetationskundliche Grundinventur der BDF-L durchgeführt. Im zehnjährigen Rhythmus erfolgt eine wiederholte Untersuchung der Bodenfestphase (Wiederholungsinventur), die bodenmikrobiologischen und vegetationskundlichen Erhebungen werden in kürzeren Zeitintervallen wiederholt. Das Standardprogramm wird auf belastungsspezifisch eingerichteten BDF-L um weitere Untersuchungen ergänzt. Alle Untersuchungsergebnisse fließen in die Datenbanken des niedersächsischen Bodeninformationssystems (NIBIS) ein.

Tabelle 3: Untersuchungsumfang auf landwirtschaftlich genutzten Standard-BDF (aus KLEEFISCH & KUES, 1997).

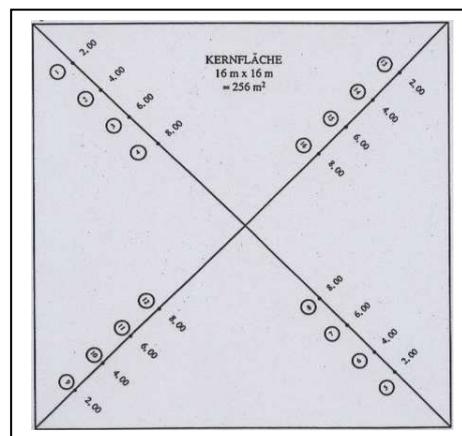
A) Einmalig bei Einrichtung der Fläche	<ul style="list-style-type: none"> • Bodenkundliche Feinkartierung, Schürfgrube, Standortbeschreibung • Aufnahme der nutzungs- und belastungsspezifischen Faktoren • Vermessung, Höhennivellement, Fotodokumentation • Langfristige Sicherung
B) Wiederkehrende Untersuchungen	1. Wiederholungszeitraum 10 Jahre (Flächenproben) <ul style="list-style-type: none"> • Bodenphysikalische und bodenchemische Parameter • Nähr- und Schadstoffe (organisch und anorganisch) • Untersuchung des Aufwuchses (u.a. Radioaktivität, organische Schadstoffe) • Vegetationsaufnahme (Gesamtartenbestand)
	2. Wiederholungszeitraum drei Jahre <ul style="list-style-type: none"> • Vegetationsaufnahme (Kernflächen, Deckungsgrade)
	3. Jährliche Untersuchungen <ul style="list-style-type: none"> • Bodenmikrobiologische Parameter- Ernteterminnung und Aufwuchsanalysen (Output an Nähr- und Schadstoffen)
	4. Fortlaufende Untersuchungen <ul style="list-style-type: none"> • Erfassung der Bewirtschaftungsmaßnahmen (Schlagkartei)

Bodenprobennahme

Für die Grundinventur werden sowohl flächenbezogene Bodenproben aus den Kernflächen als auch Bodenproben aus einer Profilgrube gezogen. Die Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen erfolgt als flächenbezogene Bodenproben aus den Kernflächen jährlich im Frühjahr vor dem Vegetationsbeginn und vor der Durchführung landwirtschaftlicher Bewirtschaftungsmaßnahmen. Auf Acker- und Grünland werden Bodenproben aus 0-10 cm und

10-20 cm gezogen. Dabei wird angesichts der kleinräumigen Variation der Bodeneigenschaften die Beprobung in vierfacher räumlicher Wiederholung durchgeführt, um eine gewisse statistische Absicherung der Befunde zu gewährleisten. Hierzu werden pro Kernfläche mit einem Nmin Bohrer Proben von 16 Entnahmestellen genommen (s. Abb. 4). Das Probengut wird nach Tiefenbereich und Bestimmung getrennt gesammelt, anschließend jeweils gut gemischt und sorgfältig homogenisiert (Mischproben aus 16 Einzelproben für jede der 4 Kernflächen). Eine Rückstellprobe für die Bodenprobendatenbank wird nach der Homogenisierung für die Laboruntersuchungen abgedont und getrennt verpackt. Bei der Wiederholungsuntersuchung wird das Diagonalkreuz um 1/8 Vollkreis gedreht, so dass keine Doppelbeprobung eines gestörten Punktes erfolgen kann.

Abbildung 4: Entnahmestellen für Bodenproben in Kernflächen (16 Entnahmestellen) (aus Kleefisch & Kues, 1997).



Bodenchemische und -physikalische Analytik

Zur Beschreibung der Bodeneigenschaften ist die Kenntnis der anorganischen und organischen Bodeninhaltsstoffe, ergänzt durch physiko-chemische Parameter notwendig. Im BDF werden neben den Gesamtgehalten durch unterschiedliche Extraktionsverfahren mobile, leicht bewegliche und mobilisierbare, durch Nutzung und Düngung aber auch im Laufe der Zeit frei werdende Stoffe bestimmt. Die einzelnen Parameter und Nachweismethoden sind bei KLEEFISCH & KUES, 1997 aufgelistet. Daneben werden im Rahmen der Grundinventur auf allen Flächen auch radiologische Bestandsaufnahmen durchgeführt.

- **Anorganische Bodenchemie**

Die bodenchemischen Untersuchungen umfassen u.a. die Bestimmung der Gesamtgehalte von Pflanzennährstoffen in Böden, die Bestimmung der pflanzenverfügbaren bzw. pflanzenaufnehmbaren Nährstoffe im Boden, die Schwermetallgehalte im Boden, die potenzielle Kationenaustauschkapazität und die austauschbaren Kationen. Insgesamt werden 42 Parameter analysiert.

- **Organische Schadstoffe**

Im Rahmen der Grundinventur werden die Böden auf ihren Gehalt an organischen Schadstoffen untersucht. Aus der Vielzahl möglicher Schadstoffe wurden chlorierte Kohlenwasserstoffe (CKW) und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) als beispielhafte Verbindungen ausgewählt. Insgesamt werden 32 Parameter/Verbindungen analysiert. Im

Rahmen von Sonderprogrammen werden an einzelnen Standorten zusätzlich jährliche Untersuchungen auf den Schadstoffgehalt im Aufwuchs sowie Pflanzenschutzmitteluntersuchungen durchgeführt, so z.B. 2001/02 Pflanzenschutzmitteluntersuchungen auf insgesamt 99 Wirkstoffe an 53 Standorten.

- **Bodenphysikalische Untersuchungen**

Es werden 8 bodenphysikalische Parameter aufgenommen. Neben Körnungsanalysen können aus diesen Parametern Kennwerte zum Bodenwasserhaushalt, Bodengefüge und Eingangparameter für Wasserhaushalts- und Stofftransportmodelle abgeleitet werden. Weiterhin liefern diese Parameter Kriterien zur Gefährdungsabschätzung (z.B. Verschlammung, Erosion, Auswaschung), aber auch zur Erkennung von aktuellen Belastungen (z.B. Bodenverdichtung).

Untersuchungen des Wasser- und Stoffhaushaltes

Neben den „Intensiv-BDF“ werden auf ausgewählten Standard-BDF an boden- und belastungsrepräsentativen Stellen in unterschiedlichen Umfang Daten aus der Boden-, Luft- und Gewässerüberwachung erfasst. Dazu werden neben einer „Stoffinventur“ der Bodenfestphase zeitabhängige Untersuchungen der ein- und ausgehenden Wasser- und Stoffströme durchgeführt:

- **Atmosphärische Deposition**

Atmosphärische Depositionsmessungen werden auf derzeit 28 BDF-L durch Ausstattungen mit Niederschlagssammlern im halbmonatlichen Rhythmus durchgeführt.

- **Landwirtschaft**

Die durch landwirtschaftliche Maßnahmen bedingten Stoffflüsse werden durch folgende Parameter erfasst

- Jährliche Aufnahme von Schlagkarteien durch die Landwirte auf allen BDF-L
- Ernteermittlung: Zur Abschätzung des Stoffentzuges der Böden durch die Kulturpflanzen werden auf allen BDF-L Ernteuntersuchungen auf den Kernflächen durchgeführt (Ermittlung der Menge der von der Fläche abgefahrenen Biomasse). Zudem wird der Gehalt an Hauptnährelementen in den zu analysierenden Pflanzenproben ermittelt.
- Wirtschaftsdünger: Auf ausgewählten BDF-L werden Gülle- oder Festmistproben genommen und untersucht.
- Klärschlammproben: Auf ausgewählten BDF-L werden Klärschlammchargen, die auf die BD-Flächen ausgebracht werden sollen auf ihren Gehalt an anorganischen und organischen Substanzen sowie Schadstoffen analysiert. Insgesamt werden 86 Parameter analysiert.

- Bodenwasserhaushalt und Stofftransport/Grundwasseranalytik

Zur Abschätzung von Stofftransporten in das Grundwasser wird die Gewinnung und Analyse von Sickerwasser aus dem Unterboden durchgeführt. In Niedersachsen wurden zudem die Meßstellen des staatlichen Grundwassergütemeßnetzes GÜN (Gewässer-Überwachungssystem Niedersachsen) mit den Standorten der BDF räumlich zusammengelegt und aufeinander abgestimmt. Daher erfolgt auf derzeit 58 von allen 90 BD-Flächen die Beprobung und Analytik des Grundwassers, wobei 53 Parameter (u.a. physiko-chemische Parameter, Salze, organische Verbindungen, Schwermetalle) zur Bestimmung der Grundwasserbeschaffenheit z.T. im halbjährlichen Untersuchungsturnus analysiert werden.

Mikrobiologische Untersuchungen

Die bodenmikrobiologischen Untersuchungen werden jährlich durchgeführt, da hier kulturspezifische Einflüsse und stärkere Schwankungen zwischen einzelnen Jahren zu beobachten sind (KLEEFISCH & KUES, 1997).

Die mikrobielle Biomasse als Gesamtheit aller Bakterien und Pilze im Boden ist an vielen Prozessen des Stoffumsatzes wesentlich beteiligt. Im Vergleich mit der abiotischen organischen Substanz zeigt sie eine viel höhere Umsatzrate und wird deshalb auch stärker durch sich verändernde Umweltbedingungen beeinflusst. Dabei ist weniger der absolute Wert der Biomasse als ihre zeitliche Entwicklung von Bedeutung. Eine Veränderung deutet möglicherweise auf eine Schädigung hin. Ziel des BDF-Programms ist es, die Entwicklung der mikrobiellen Kennwerte zu verfolgen und ggf. solche trendhaften Veränderungen als Schadentwicklung zu erkennen (KLEEFISCH & KUES, 1997).

Daneben werden die Basalatmung (CO_2 -Abgabe aller Bodenorganismen unter standardisierten Bedingungen) als Aktivitätsparameter gemessen und ökophysiologische Quotienten (z. B. Anteil des mikrobiell gebundenen am organischen Kohlenstoff, metabolischer Quotient) zur Standortbewertung abgeleitet. Die verschiedenen bodenmikrobiologischen Verfahren werden zur Indikation und Bewertung von Bodenbelastungen eingesetzt. So steigt der metabolische Quotient als Quotient aus Basalatmung und mikrobieller Biomasse unter Belastung an. Es ist ein Maß für den Erhaltungsbedarf der Mikroflora, d.h. den Energieverbrauch der Mikroorganismengemeinschaft ohne Zellwachstum. Ein hoher metabolischer Quotient deutet auf ungünstige Lebensbedingungen hin. Parallel dazu sinkt der Quotient aus mikrobiell gebundenem zu organisch gebundenem Kohlenstoff ($C_{\text{mik}}/C_{\text{org}}$). Letzteres zeigt eine nachhaltige Störung im Kohlenstoffhaushalt an.

Für einen Großteil der Flächen liegen Zeitreihen dieser Untersuchungen seit 1996 vor.

Tabelle 4: Mikrobiologische Untersuchungen im BDF-Programm.

Parameter	Methode	Referenz
Mikrobielle Biomasse	Substrat-induzierte Respiration (SIR)	HEINEMEYER <i>et al.</i> 1989
Basalatmung	Durchflußsystem, 22°C	HEINEMEYER <i>et al.</i> 1989
Metabolischer Quotient	Berechnung Basal- atmung:Biomasse	ANDERSON & DOMSCH 1990

Nach den bisherigen Erfahrungen im BDF-Programm ergibt sich durch die Auswertung von Ergebnissen der Boden-Dauerbeobachtung ein umfassender Ansatz, der sowohl die räumliche als auch die zeitliche Schwankung der biologischen Parameter einbezieht (www.nlfb.de). So konnten bodenartspezifische Kenngrößen für Acker- und Grünlandböden abgeleitet werden. Darüber hinaus lassen sich aus der Kenntnis bestimmter physikalisch-chemischer Bodeneigenschaften Sollwerte für mikrobiologische Parameter abschätzen, die den tatsächlich gemessenen Istwerten gegenüber gestellt werden. Weicht der Istwert deutlich vom Sollwert ab, wird eine weitergehende Untersuchung angestrebt.

Über das BDF-Programm hinaus wurden vom NLF für Niedersachsen flächenhaft mögliche Standorte von faunistischen Bodenorganismen-Gemeinschaften ausgewiesen und einer Bewertung zugänglich gemacht. Auf Grundlage von Informationen zur Bodennutzung und -ausstattung wird die Verbreitung der Bodenorganismen-Gemeinschaften (analog zu den Pflanzengesellschaften in der Pflanzensoziologie) flächendeckend für das Land ermittelt und kartiert. Vorkommen bzw. Abwesenheit von Regenwürmern, Kleinringelwürmern (Enchytraeen), Raub- und Hornmilben sowie die mikrobielle Aktivität stellen dabei Indikatoren dar. Dieses Verfahren der flächendeckenden Darstellung der Lebensräume unterschiedlicher Lebensraumgemeinschaften in einem mittleren Maßstabsbereich (1:25.000 bis 1:50.000) wurde im NLF entwickelt. Die erstellte Karte ermöglicht eine Bewertung der Flächeneinheiten im Hinblick auf Größe, räumlicher Anordnung sowie Seltenheit und Repräsentanz auf regionaler aber auch auf überregionaler Ebene. Allein aus der geographischen Darstellung - betrachtet man räumliche Anordnung und Flächendeckung - ergibt sich bereits eine erste Möglichkeit der Bewertung. Weitere Bewertungskriterien werden z.Z. sukzessive entwickelt.

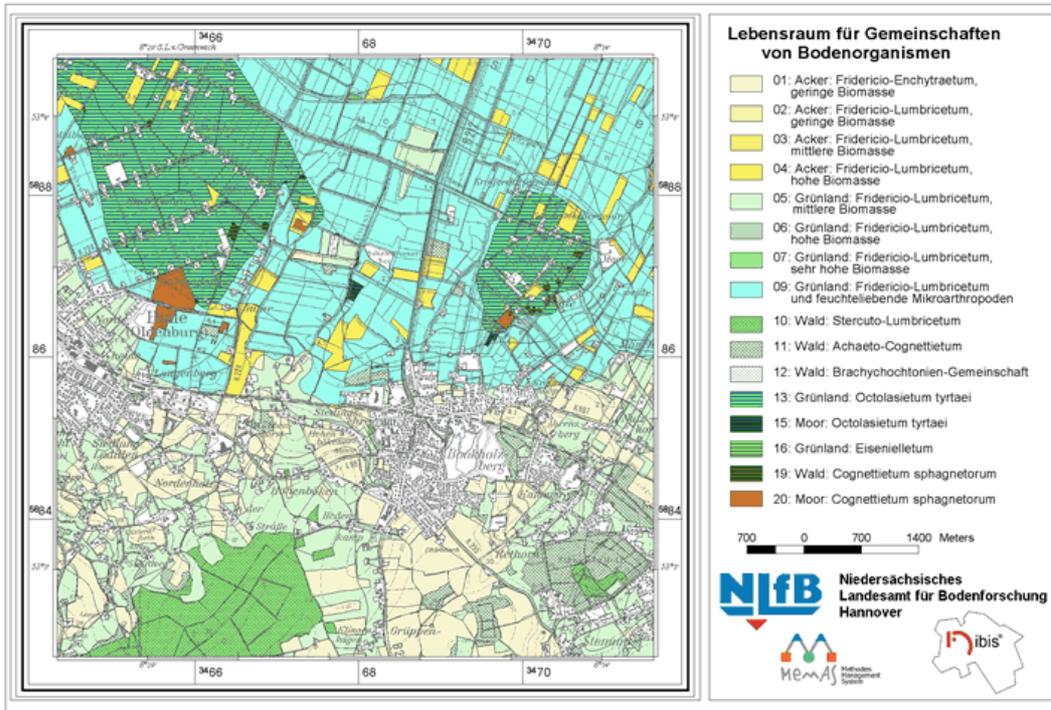


Abbildung 5: Lebensräume unterschiedlicher Lebensraumgemeinschaften, flächendeckend in einem mittleren Maßstabbereich (1:25.000 bis 1:50.000) dargestellt (Quelle: www.nlfb.de)

Untersuchung von Flora und Vegetation

Auf allen BD- Flächen werden sowohl der Gesamtartenbestand an Gefäßpflanzen als auch die Vegetation auf definierten Teilflächen nach standardisierten Methoden erfaßt. Durch Wiederholungsaufnahmen wird die Veränderung des Pflanzenbestandes über die Zeitachse dokumentiert. In ausgewählten Grünlandflächen erfolgt darüber hinaus die Erfassung der Moosflora und –vegetation, die in ein bundesweites Monitoring von Schwermetallen eingebunden ist.

Die Aufnahme von Flora und Vegetation erfolgt i.d.R. bei einer einmaligen Begehung zur Hauptentwicklungszeit der Bestände (Mai-Juli). Bei Rapskulturen erfolgt die Begehung vor dem Schotenschluß.

Die ermittelten Arten (Nomenklatur nach GARVE & LETSCHERT, 1991) werden in Bezug auf den ökologischen Zeigerwert (nach ELLENBERG *et al.*, 1991) ausgewertet, wodurch eine Abschätzung der vegetationsrelevanten Bodenkennwerte, insbesondere in Bezug auf Feuchte, Stickstoffgehalt und Reaktivität (pH-Wert) ermöglicht wird. Zusätzlich erfolgt zur Charakterisierung der Vegetation eine Einstufung der Bestände in beschriebene Pflanzengesellschaften bzw. höhere syntaxonomische Einheiten, deren ökologische Ansprüche in der Literatur belegt sind. Da die BDF-L größtenteils in bewirtschafteten Acker- und Grünlandflächen liegen, ermöglicht der Vergleich mit dem Artenspektrum der Umgebung und den entsprechenden Zeigerwerten eine Abschätzung der nutzungsbedingten Veränderungen der Standortverhältnisse auf den Nutzflächen.

- Gesamtartenbestand (1 ha-Fläche)

Der Gesamtartenbestand an Gefäßpflanzen wird auf der 1 ha großen BDF im Rahmen der Grundinventur qualitativ ermittelt und im sieben- bis zehnjährigen Rhythmus wiederholt. Angaben zur Populationsgröße beschränken sich auf die Arten der Roten Liste Niedersachsens. Die Erhebungen erfolgen nach den standardisierten Methoden des nds. Pflanzenarten-Erfassungsprogramms des Niedersächsischen Landesamtes für Ökologie (HAEUPLER & GARVE, 1983) und werden in dessen Datenbank als ein Instrument der Umweltüberwachung übernommen.

- Umgebung

In der Umgebung jeder BDF wird seit 1995 ebenfalls eine floristische Inventarisierung entsprechend der genannten Vorgehensweise durchgeführt. Dazu wird ein Gebiet in 500 m Umkreis um die 1 ha Fläche untersucht und die Pflanzensippen in den entsprechenden Gesamtartenlisten für das niedersächsische Pflanzenarten-Erfassungssystem des NLÖ notiert (KLEEFISCH & KUES, 1997).

Der Pflanzenbestand auf der 1 ha-Fläche und seine Einbindung in die Umgebung wird anhand von Fotos dokumentiert.

- Vegetationsaufnahmen in den Kernflächen

In jeder BD-Kernfläche von je 256 qm Größe wird eine vegetationskundliche Daueruntersuchungsfläche (vBDF) von ca. 50 qm (i.d.R. 16x3,1m) Größe eingemessen und auf diesen Flächen jeweils eine Artenliste der Gefäßpflanzen angefertigt, sowie die Artmächtigkeit (Deckungswert) jeder Art anhand einer modifizierten dezimalen LONDO-Skala (Tab. 8) geschätzt. Diese qualitativen und quantitativen Erfassungen werden bei der Grundinventur und zwei bis vier Jahre nach der Ersteinrichtung im Rahmen von Zwischeninventuren durchgeführt. Seit 1997 wird der Aufnahmerhythmus auf Ackerflächen an die Fruchtfolge angepasst, der somit mit dem Anbau einer bestimmten Feldfrucht einhergeht.

Die für vegetationskundliche Dauerflächen relativ große Flächengröße von 50 qm wurde gewählt, um repräsentative Ausschnitte mit einem nicht zu kleinen Potential an Arten und speziell an Zeigerarten bestimmter Umweltparameter zu erfassen. Trotz dieser Größe finden sich auf den konventionell bewirtschafteten Ackerflächen mitunter nur wenige Arten mit geringer Deckung. Da der Artenbestand sehr empfindlich bereits auf geringe Standortunterschiede reagiert, wurde mit Hilfe der Aufnahme von Flora und Vegetation kontrolliert, ob die Auswahl und Festlegung der BDF und ihrer Kernflächen dem Anspruch einer weitgehenden Flächenhomogenität gerecht wurden. Die bisher veröffentlichten Ergebnisse lassen nach KLEEFISCH & KUES (1997) den Schluss zu, dass die Kernflächen jeweils für den überwiegenden Anteil der 1 ha-BDF repräsentativ sind. Während die 1 ha-BD- Flächen in den allermeisten Fällen gewisse standörtliche und strukturelle Inhomogenitäten aufweisen, die sich auch im Gesamtartenbestand widerspiegeln (z.B. Mulden mit Feuchteanzeigern), sind die Kernflächen und insbesondere die in diesen liegenden vBDF sehr homogen.

Die Intervalle der vegetationskundlichen Aufnahmen wurden darauf ausgerichtet, Veränderungen über längere Zeiträume aufzuzeigen. Schwankungen im Artenbestand und in den Deckungswerten von Jahr zu Jahr, die häufig witterungsbedingt sind oder die von der aktuellen Bewirtschaftung abhängen, sollten nicht überbewertet werden. Nach den bisherigen Erfahrungen im BDF-Programm hat sich das gewählte Verfahren zur Aufnahme von Flora und Vegetation und deren Veränderungen seit 1992 bewährt. Die erhobenen Datensätze werden als geeignet bewertet, um eine langfristige Umweltüberwachung auf repräsentativen Flächen zu ermöglichen (KLEEFISCH & KUES, 1997).

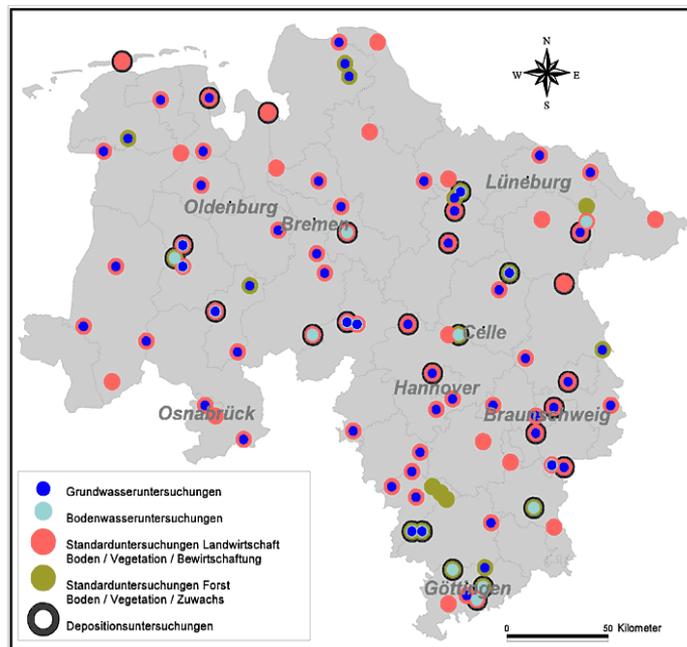
1.2.1.5 Verzahnung des BDF-Programms mit anderen Umweltmessnetzen

Da der Boden aufgrund seiner zentralen ökosystemaren Stellung zahlreichen Einflüssen unterworfen ist, ist es wichtig, auch andere Umweltkompartimente - wie Atmosphäre, Grund- und Oberflächenwasser - zu beobachten, von denen die Beeinflussung ausgeht, bzw. auf die mögliche Bodenveränderungen wirken könnten. Die Umweltüberwachung dieser Kompartimente obliegt in Niedersachsen jedoch verschiedenen Landesdienststellen und die jeweiligen Messnetze wurden zunächst unter ausschließlich sektoralen Gesichtspunkten entworfen. Mittlerweile konnte die überwiegende Zahl der Standorte der Boden-Dauerbeobachtung

mit Depositions- und Grundwassermessstellen des Gewässergütemessnetzes Niedersachsen (GÜN) gekoppelt werden (s. oben). Ebenso ist es gelungen, Boden-Dauerbeobachtungsflächen als Überwachungsstandorte zur Umweltradioaktivität und verschiedener anderer Umweltmessnetze zu installieren.

Insgesamt wurden an etwa 50 BDF-L vom NLFb in Absprache mit anderen Landesdienststellen mehrere Umweltmessnetze bzw. Monitoringprogramme im Sinne einer integrierten Umweltbeobachtung miteinander verzahnt. Zudem werden auf Sonderflächen vom NLFb in Kooperation mit niedersächsischen Universitäten und Forschungseinrichtungen verschiedene weitere Fragestellungen untersucht. Informationen hierzu sind den Jahresberichten des NLFb zu entnehmen.

Abbildung 6: Derzeitig realisierter Stand der integrierten Umweltbeobachtung auf den nds. Boden-Dauerbeobachtungsflächen
(Quelle: www.nlfb.de)



1.2.1.6 Zeitreihendaten der Boden-Dauerbeobachtung

Die Einrichtung und kontinuierliche Untersuchung der BD-Flächen begann 1991. Die letzten Flächen wurden 2000 eingerichtet. In Rahmen dieser Untersuchungen kann auf die in Tab. 5 aufgeführten Zeitreihendaten zurückgegriffen werden:

Tabelle 5: Zeitreihen-Datenbestände des BDF-Programms (Parameterumfang der Einzeluntersuchungen s. KLEEFISCH & KUES, 1997)

A) Daten zum Zustand niedersächsischer Böden für 70 repräsentativ ausgewählte Standorte (BDF-L)
<ol style="list-style-type: none">1. Daten zur Situation bei Einrichtung der Flächen 1991-2000<ul style="list-style-type: none">• Bodenkundliche Daten der Standortbeschreibung sowie Daten zur Nutzungs- und Belastungssituation bei Einrichtung der BDF-L• Bodenchemische, bodenphysikalische und bodenbiologische Rohdaten des Bodenzustandes bei Einrichtung der BDF-L (Grundinventur)• Abgeleitete bodenkundliche Kennwerte zur Beschreibung des Bodenzustandes2. Fortlaufende Untersuchungen auf allen BDF-L<ul style="list-style-type: none">• Zeitreihen der landwirtschaftlichen Bewirtschaftungsmaßnahmen• Zeitreihen des mikrobiologischen Bodenzustandes zum Ausgang der Winterruhe der Vegetation• Vegetationsuntersuchungen im dreijährigen Zyklus
B) Zusätzliche Daten zum Stoffein- und -austrag auf ausgewählten Standorten (Intensiv-BDF)
<ul style="list-style-type: none">• Zeitreihen zur Sickerwasserqualität und Bodenwasserhaushalt für 10 Intensiv-BDF-L• Zeitreihen abgeleiteter und modellierter Kennwerte des Bodenwasserhaushaltes• Zeitreihen zur Grundwasserqualität an 48 BDF-L• Zeitreihen zur Niederschlagsgüte an 26 BDF-L

1.3 Schnittstellen für ein Monitoring und Erweiterungen

Aus den vorgestellten Parametern und der Organisation des BDF-Programms ergeben sich einige Anknüpfungspunkte für ein Monitoring für HR-Raps, die im Folgenden aufgelistet werden.

- Langfristige Laufzeit des Untersuchungsprogramms
- Langfristige und vertragliche Sicherung der Flächen
- Ausreichende Anzahl von landwirtschaftlich genutzten Flächen mit ortsüblicher Bewirtschaftungsweise. Zurzeit wird auf ca. 10 Feldern Winterraps in der Fruchtfolge angebaut, so dass pro Jahr ca. 3 Felder als mögliche Referenzflächen zur Verfügung ständen. Die Lage in Bezug zu Rapsanbaugebieten in Niedersachsen ist Anhang A, Karte 33 zu ent-

nehmen. Zudem gibt es einige Felder mit extensiver Bewirtschaftung, mit Lage in Schutzgebieten oder auch mit ökologischer Bewirtschaftung („Biohöfe“).

- Auswahl der Felder nach den Repräsentanzkriterien Boden, Nutzung und regionale Unterschiede in der Bodenbelastung.
- Einrichtung von Dauertransekten (Kernflächen, 1 ha Flächen)
- Erhebung von für das Monitoring relevanten Parametern in ausreichender zeitlicher Wiederholung
 - Hintergrundparameter (genaue bodenkundliche Charakterisierung, umfangreiche Erhebung bodenphysikalischer und –chemischer Parameter in 10-jähriger Wiederholung, jährliche Führung von Schlagkarteien, an ausgewählten BDF umfangreiche klimatische und hydrologische Erhebungen sowie Untersuchungen des Wasser und Stoffhaushaltes zur Boden-, Luft- und Gewässerüberwachung)
 - GVP-relevante Parameter (jährliche bodenmikrobiologische Analysen, Vegetationsuntersuchungen in den Kernflächen in 3-jähriger Wiederholung, in 7-10 jähriger Wiederholung Aufnahme des Gesamtartenbestandes in 1 ha BDF und Umgebung, an ausgewählten Standorten Rückstandsanalysen von ausgewählten Pflanzenschutzmitteln, Grundwasseranalysen sowie Erfassung von Bodenerosion)
- Anwendung von etablierten/standardisierten Untersuchungsmethoden inklusive Probenahme
- Auswertung der Daten und Hinterlegung in Datenbanken
- Archivierung der genommenen Bodenproben
- Bundesweite Durchführung von BDF-Programmen in allen Bundesländern. In der Durchführung der einzelnen Programme gibt es zwar Unterschiede, jedoch wird eine Vereinheitlichung angestrebt.
- Nutzung der BDF als Forschungsplattform für unterschiedliche Fragestellungen und Möglichkeiten der Integration in das vorhandene Messnetz
- Prinzipielle Erweiterungsmöglichkeiten in Hinblick auf die zu untersuchenden Parameter und Untersuchungsmethoden

Im nds. BDF-Programm werden keine faunistischen Untersuchungen durchgeführt. Ebenso werden keine Analysen zum Eintrag und möglichen Anreicherung von Transgensequenzen im Boden und die Verbreitung über Auskreuzung durchgeführt. Vor allem um die beiden letztgenannten Punkte ist das Programm für ein GVP-Monitoring von HR-Raps zu ergänzen. Um die Einbindung eines GVP-Monitorings zu prüfen, wurden in der vorliegenden Studie die vegetationskundlichen sowie bodenmikrobiologischen Untersuchungen methodisch eng an dieses etablierte Umweltbeobachtungsprogramm angelehnt und bedarfsgerecht um transgenspezifische Aspekte erweitert.

1.4 Untersuchungsprogramm im Pilotprojekt

Um die genannten Fragenkomplexe (Kap. 1.1 Ziele des Pilotprojektes) methodisch umzusetzen, wurde folgende Vorgehensweise gewählt:

- Auswahl einer Anbaufläche mit transgenem HR- Raps auf einem langfristig gesicherten Freisetzungstandort sowie von Raps-Referenzflächen aus dem nds. BDF-Programm
Als Freisetzungsfeld von HR-Raps wurde freundlicherweise eine Fläche von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Braunschweig zur Verfügung gestellt und bestellt. Allerdings stand nur für eine Vegetationsperiode (2000/2001) transgenes Saatgut zur Verfügung. Als Referenzflächen wurden für jedes Untersuchungsjahr BDF-L Äcker ausgewählt, auf denen in den jeweiligen Untersuchungsjahren Winterraps angebaut wurde und die in größtmöglicher Nähe zum Freisetzungstandort lagen. Dadurch sollten witterungsbedingte/klimatische Unterschiede zwischen den Feldern innerhalb eines Untersuchungszeitraumes möglichst minimiert werden. Ein weiteres Kriterium bei der Auswahl der Referenzflächen war der Bodentyp. Da dieser maßgeblichen Einfluß auf die Extraktionsfähigkeit der DNA und die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft hat (MUYZER & SMALLA, 1998; GRIFFITHS *et al.*, 1996; WIELAND, 2001), wurden Referenzflächen mit verschiedenen Bodentypen ausgewählt. Im ersten Untersuchungsjahr wurden zwei BDF-Felder (BDF012-L und 058-L) ausgewählt. In den beiden folgenden Jahren wurde jeweils eine weitere BDF dazugenommen sowie BDF012-L weiter beprobt, da diese Fläche im folgenden Jahr die selbe Fruchtfolge wie der Freisetzungstandort aufwies.
- Einrichtung von Daueruntersuchungsflächen (Kernflächen) im Freisetzungsfeld für Vegetationsaufnahmen und Bodenprobenahmen analog zu den BD-Flächen.
- Vegetationsaufnahmen analog zum BDF-Programm in dem Freisetzungsfeld und den Referenzflächen (Gesamtartenliste auf dem Freisetzungsfeld bzw. 1 ha BDF und Vegetationsaufnahmen in den Kernflächen). Zusätzlich Aufnahme der Artenliste des Gesamtackers.
- Qualitative und quantitative Erfassung von kreuzungsfähigen Brassicaarten in der Umgebung der Felder (Freisetzungsfeld- und Referenzflächen); Analyse auf Auskreuzungsereignisse.

Die ursprüngliche Planung der Einrichtung von Dauertransekten in verschiedenen Abständen um die Anbaufläche erwies sich als ungeeignet, da die Umgebung der verschiedenen Felder teilweise sehr heterogene Strukturen aufwies. Zudem sind Auskreuzungsereignisse bei Raps neben Insektenbestäubung auch durch Windbestäubung bedingt und werden somit von der Windrichtung und -stärke beeinflusst (GERDEMANN-KNÖRCK, 1997; TREU & EMBERLIN, 2000; NEEMANN & SCHERWAß, 1999). Daher war eine repräsentative und bei verschiedenen landschaftlichen Begebenheiten vergleichbare Einrichtung von Dauertransekten bzgl. der Größe und Lage nur bedingt möglich. Aus diesem Grund erfolgte eine flächendeckende Kartierung von potenziellen Kreuzungspartnern von Raps im Umkreis von 1 km um den jeweiligen Feldmittelpunkt (Kreisradius 1 km). Der molekularbiologische Nachweis auf Transgenität der erfassten Kreuzungspartner erfolgte anhand von Blatt- und Samenmaterial.

- Untersuchungen zum Eintrag und zur Anreicherung von transgener DNA im Boden
Ziel war die Etablierung und Validierung einer effizienten und kostengünstigen DNA-Extraktionsmethode aus Bodenproben für nachfolgende PCR-Analysen. Die Eignung für Routineanalysen zum Nachweis von häufig verwendeten Transgenen wurde überprüft und die Methoden im Freiland an Bodenproben von verschiedenen Freisetzungstandorten getestet.

- Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften in Bodenproben

Es erfolgte eine Methodenetablierung mit dem Ziel, mögliche gentechnikspezifische Auswirkungen auf die mikrobielle Biodiversität erfassen zu können.

In den letzten Jahren sind im Bereich der mikrobiellen/ molekularen Ökologie große Fortschritte gemacht worden. Heute ist es möglich, mikrobielle Populationen auf der Basis von DNA-Sequenzen (16S-rDNA) - die in allen Organismen vorkommen und spezifische Varianten aufweisen - auf taxonomischer Ebene in komplexen Ökosystemen, wie z.B. im Boden zu analysieren (AMANN *et al.*, 1995; LIESACK *et al.*, 1997).

Um Auswirkungen der Freisetzungen von GVO auf die mikrobiellen Bodengemeinschaften zu untersuchen, wurden in neuerer Zeit sogenannte Fingerprinttechniken wie D-/TGGE (MIETHLING *et al.*, 2000; HEUER *et al.*, 2002), T-RFLP (LUKOW *et al.*, 2000) oder SSCP (SCHMALENBERGER & TEBBE, 2002) angewendet. So konnten Veränderungen mikrobieller Gemeinschaften in der Rhizosphäre von HR-Rapspflanzen im Vergleich zu konventionellen Linien nicht nur anhand von arbeits- und zeitaufwendigen, kultivierungsabhängigen Studien wie FAME und Biolog-Analysen (DUNFIELD & GERMIDA, 2001, 2003; SICILIANO & GERMIDA, 1999), sondern auch anhand von DGGE-Analysen (GYAMFI *et al.*, 2002) aufgezeigt werden. Für den Einsatz in einem GVP-Monitoring müssen diese Methoden weiterentwickelt, optimiert und validiert sowie für den Einsatz in einer Routineanwendung kritisch bewertet werden. Daneben muss eine standardisierte Probenahme und Aufarbeitung auch aus verschiedenen Bodenproben angestrebt werden (LABES *et al.*, 1999). Weiterhin sind die molekularen Daten auch in Bezug zu geeigneten Funktions- und Bodenanalysen zu setzen und Studien zur natürlichen Variabilität von Böden einzubeziehen, um gentechnikspezifische Effekte untersuchen zu können.

Als ersten Schritt einer Methodenetablierung wurde in dieser Studie die Analyse bakterieller Gemeinschaften zur Erfassung von jahreszeitlichen und nutzungsspezifischen Schwankungen mittels einer denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) durchgeführt. Hierbei erfolgt nach Extraktion der DNA aus Bodenproben und Amplifikation bakterien- oder pilzspezifischer Bereiche mittels PCR eine sequenzspezifische Trennung der Amplifikate durch eine Polyacrylamidelektrophorese innerhalb eines chemischen Gradienten. Die erhaltenen Bandenprofile (Fingerprints) dienen zur Charakterisierung der ihr zugrunde liegenden mikrobiellen Gemeinschaft. Durch den Vergleich von Mustern können Veränderungen in den Gemeinschaften detektiert werden. In der vorliegenden Studie wurden Bodenproben aus den Kernflächen der Freisetzungsfläche und der Referenzflächen von verschiedenen Zeitpunkten innerhalb eines Jahres, verschiedener Jahre und bei Anbau verschiedener Kulturpflanzen anhand von Clusteranalysen verglichen. Zudem wurden mögliche Auswirkungen des Einsatz-

zes des nicht-selektiven Herbizides auf die mikrobielle Gemeinschaft untersucht. Auf einem Teil des HR-Rapsfeldes wurde das nicht-selektive Herbizid LIBERTY-LINK™ appliziert und Bodenproben von behandelten und unbehandelten Kernflächen analysiert.

Vergleichend zu diesen Analysen mittels Fingerprinttechniken wurden die im BDF-Programm durchgeführten mikrobiologischen Analysen (mikrobielle Biomasse, Basalatmung, metabolischer Quotient) mit einbezogen, um die Eignung dieser Methoden für ein GVP-Monitoring zu prüfen. Die Untersuchungen wurden routinemäßig einmal jährlich vom NLFB auf den Referenzflächen und zusätzlich freundlicher Weise auch über den gesamten Untersuchungszeitraum auf dem Freisetzungsort durchgeführt.

- Auswertung der im BDF-Programm erhobenen Daten.

Es erfolgte eine Recherche über die im BDF-Programm erhobenen Daten und deren Auswertung nach Kriterien, die für ein GVP-Monitoring relevant sind.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsgebiete

2.1.1 Freisetzungsstandorte

Sicke

Als Freisetzungsstandort wurde ein 0,4 ha großes Feld auf dem Gelände der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) in Sickte/Braunschweig (Flur 3, Flurstücke 160/1, 160/4, 161/4) ausgewählt. Die Aussaat des transgenen herbizidresistenten Winterraps der Firma AgrEvo (RKI-Az.: 6786-01-0101, Tab. 7) wurde Ende August 2000 durchgeführt. Es wurde keine Mantelsaat angebaut. Der Anbau erfolgte in üblicher landwirtschaftlicher Praxis unter Verwendung des Komplementärherbizides LIBERTY-LINK™ (2,5 l / ha) am 2. April 2001 auf Teilbereichen des Feldes (Flächen II und III, s. Abb. 7). Im Oktober 2000 war auf der gesamten Freisetzungsfäche eine Behandlung mit dem herkömmlichen Herbizid Butisan Top (1,25 l / ha) vorausgegangen.

Die Pflanzen wurden Ende Mai 2001 nach der Blüte, aber vor der Samenreife (Pflanzenstadium 69) gehäckselt und das Pflanzenmaterial eine Woche später untergegraben (Fräsen), da eine Weiterführung des Versuchs über die Vollblüte hinaus nicht notwendig war.

Als Folgefrucht wurde auf der Versuchsfläche der BBA im Spätherbst 2001 Winterweizen und 2002 Wintergerste ausgesät.

Die zur Absicherung der ersten Ergebnisse für Herbst 2001 bzw. Herbst 2002 geplante erneute Aussaat des transgenen Winterraps auf einer direkt angrenzenden Fläche konnte entgegen der Versuchsplanung nicht stattfinden, da in diesen Jahren von den Saatgutzüchtern kein transgenes Saatgut zur Verfügung gestellt wurde.

Abweichend von üblichen Ackerflächen mit Größen zwischen 5 und 15 ha, erstreckte sich das Versuchsfeld über lediglich 0,4 ha. Eine weitere Besonderheit ist der, die eigentliche Freisetzungsfäche umgebende, 30 Meter breite, unbewirtschafteten Randstreifen.

Die Freisetzungsfäche (Anhang A, Karten 1-7) liegt in einem Acker auf einer Höhe von etwa 98 m ü. NN bei Sickte südöstlich von Braunschweig am Rande der Schöppenstedter Lössbörde, in der tiefgründige Schwarzerden und basenreiche Braunerden auf Löss oder Lösslehm vorherrschen. Der Jahresniederschlag liegt etwa zwischen 600 und 650 mm. Die als Untersuchungsgebiet definierte Kreisfläche mit einem Radius von einem Kilometer um die Mitte der Freisetzungsfäche (s. Kap. 2.3.2) umfaßt ein von Straßen und Wegen durchzogenes, vorwiegend ackerbaulich genutztes Gebiet, das sich auf die Mitte, den Nordwesten, den Nordosten sowie auf den Südwesten erstreckt. Es handelt sich um ein sanft welliges Gelände im Höhenbereich zwischen 85 und 110 m ü. NN. Im Norden befindet sich neben einem gerade noch angeschnittenen Laubwaldgebiet militärisch genutztes Gelände, welches von den Untersuchungen ausgenommen werden musste. Im Westen und besonders im Süd-

ten des Untersuchungsgebietes entfallen umfangreiche Flächenanteile auf die Ortschaften Hötzum und Obersicke, die sich durch alte dörfliche Strukturen ebenso auszeichnen, wie durch neuere gewerblich genutzte Bereiche und umfassende Einzel- oder Reihenhaussiedlungen.

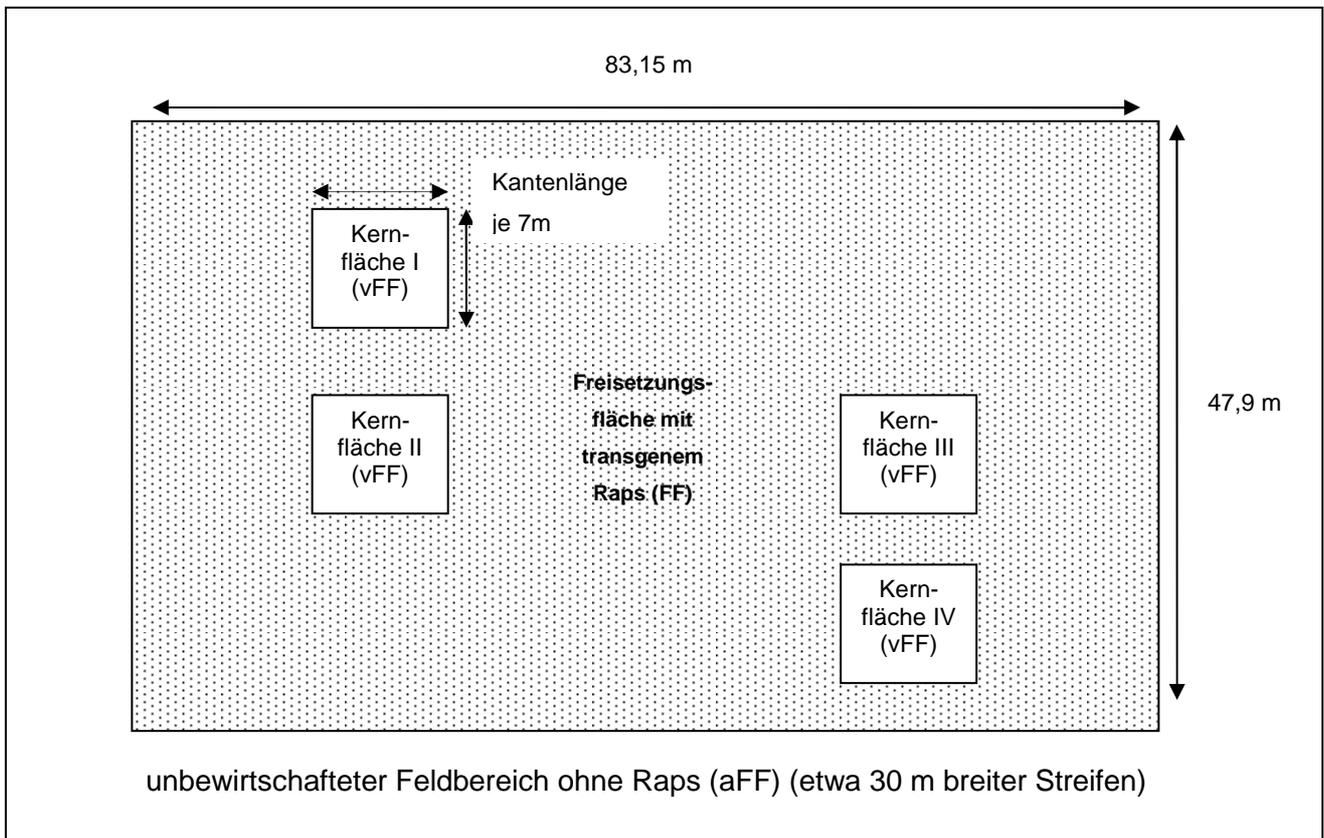


Abbildung 7: Freisetzungsfeld des Raps-Versuchsfeld Sicke/Braunschweig mit Kernflächen

In Anlehnung an das BDF-Projekt wurden Anfang Februar 2001 Kernflächen (4 Bereiche à 50 qm, im Folgenden vFF genannt) für Bodenprobenahmen und detaillierte vegetationskundliche Untersuchungen (quantitative und qualitative Erfassung) auf dem Versuchsfeld in Sicke eingemessen und mittels Magneten markiert, so dass ein Wiederauffinden auch nach längerem Zeitraum möglich ist (Abb. 7). Allerdings erfolgte die Einrichtung der Kernflächen im Gegensatz zum BDF-Programm ohne vorherige Bodenkartierung und somit ohne vorherige Prüfung auf Bodenhomogenität.

Auf einem benachbarten Feld, das ebenfalls von der BBA bewirtschaftet wird, wurden im ersten Untersuchungsjahr (2001) transgene Maispflanzen der Linie T 25 angebaut. Der Acker lag in nördlicher Richtung zur Rapsversuchsfläche und wurde von ihm durch einen Graben getrennt (entspricht Fundortfläche 44, Anhang A, Karte 1).

Dahnsdorf

Im Rahmen des Projektes konnten darüber hinaus freundlicherweise Bodenproben von Freisetzungsfeldern der Biologischen Bundesanstalt in Dahnsdorf, Land Brandenburg entnommen werden, um Untersuchungen zum Verbleib transgener DNA im Boden durchzuführen¹. Die mehrjährigen Freisetzungsversuche (PALLUTT & HOMMEL, 1998; HOMMEL & PALLUTT, 2000) befinden sich auf einem 36 ha großen Feld mit Sand-Löß-Boden (etwa 58% Sand, 38% Schluff, 5% Ton und 1,5% Humus). Die mittlere Bodenzahl beträgt 48. Die langjährigen Mittel für Temperatur und Niederschlag erreichen 8,4°C bzw. 536 mm.

Der Freisetzungsversuch in Dahnsdorf ist als randomisierte Blockanlage mit vier Wiederholungen angelegt (Abb. 8). Bei dem seit 1996 durchgeführten Versuch zur Herbizidresistenz (RKI Az.: 6786-01-0051, bzw. -0062) wird auf 16 Feldparzellen mit je 360 qm Größe in der Fruchtfolge Winterraps-Winterroggen-Mais-Winterweizen angebaut, wobei Glufosinat-resistenter Mais (Linie T25) und Raps (Linie GS40/90) eingesetzt wird. Auf jeder Parzelle sind auf diese Weise seit 1996 alle 2 Jahre transgene Pflanzen (abwechselnd Mais und Raps) kultiviert worden. Auf den jeweils dreigeteilten Feldparzellen kommt parallel konventionelles und Komplementär-Herbizid zur Anwendung.

Weiterhin finden an diesem Standort seit 2000 Freisetzungsversuche mit transgenen Kartoffeln (Sorte Désirée) mit Veränderung des Kohlenhydratstoffwechsels statt (RKI Az.: 6786-01-0136 und -0122). Parzellen mit jeweils drei Linien mit den Konstrukten 35S-SST sowie 35S-SST/FFT wurden im Rahmen dieser Studie untersucht (s.a. Abb. 10., Kap. 2.5.).

¹ unser Dank gilt Herrn Dr. B. Hommel, BBA Kleinmachnow, für die Kooperationsbereitschaft und die Erlaubnis zur Probenahme

Fruchtfolge im Herbizidresistenzversuch von 1996 bis 2003					
Block	Aussaatjahr	Feld 1	Feld 2	Feld 3	Feld 4
		<i>Nord-Westen</i>			<i>Nord-Osten</i>
D	1996	Weizen	Senf/Mais	Roggen	Raps
	1997	Raps	Weizen	Senf/Mais	Roggen
	1998	Roggen	Raps	Weizen	Senf/Mais
	1999	Senf/Mais	Roggen	Raps	Weizen
	2000	Weizen	Senf/Mais	Roggen	Raps
	2001	Raps	Weizen	Senf/Mais	Roggen
	2002	Roggen	Raps	Weizen	Senf/Mais
	2003	Senf/Mais	Roggen	Raps	Weizen
C	1996	Roggen	Raps	Weizen	Senf/Mais
	1997	Senf/Mais	Roggen	Raps	Weizen
	1998	Weizen	Senf/Mais	Roggen	Raps
	1999	Raps	Weizen	Senf/Mais	Roggen
	2000	Roggen	Raps	Weizen	Senf/Mais
	2001	Senf/Mais	Roggen	Raps	Weizen
	2002	Weizen	Senf/Mais	Roggen	Raps
	2003	Raps	Weizen	Senf/Mais	Roggen
B	1996	Senf/Mais	Weizen	Raps	Roggen
	1997	Weizen	Raps	Roggen	Senf/Mais
	1998	Raps	Roggen	Senf/Mais	Weizen
	1999	Roggen	Senf/Mais	Weizen	Raps
	2000	Senf/Mais	Weizen	Raps	Roggen
	2001	Weizen	Raps	Roggen	Senf/Mais
	2002	Raps	Roggen	Senf/Mais	Weizen
	2003	Roggen	Senf/Mais	Weizen	Raps
A	1996	Raps	Roggen	Senf/Mais	Weizen
	1997	Roggen	Senf/Mais	Weizen	Raps
	1998	Senf/Mais	Weizen	Raps	Roggen
	1999	Weizen	Raps	Roggen	Senf/Mais
	2000	Raps	Roggen	Senf/Mais	Weizen
	2001	Roggen	Senf/Mais	Weizen	Raps
	2002	Senf/Mais	Weizen	Raps	Roggen
	2003	Weizen	Raps	Roggen	Senf/Mais
		<i>Süd-Westen</i>			<i>Süd-Osten</i>
Block	Aussaatjahr	Feld 1	Feld 2	Feld 3	Feld 4

Abbildung 8: Anbauschema des Freisetzungversuches in Dahnsdorf, 1996-2003
(Quelle: B. Hommel, persönliche Mitteilung, 2002)

2.1.2 Referenzflächen des Bodendauerbeobachtungsprogramms²

Für die vergleichenden Untersuchungen wurden jeweils 2 Felder aus dem BDF-Programm als Referenzflächen in den drei Untersuchungsjahren (2001, 2002 und 2003) ausgewählt, auf denen Raps angebaut wurde. Eine Übersicht über die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen gibt Tab. 6.

Referenzflächen 2001: BDF012-L und 058-L

BDF012-L liegt in einer Flussaue westlich Nienburgs auf einer Höhe von etwa 25 m über NN (Anhang A, Karten 8-13). Auf den nährstoffreichen Auensedimenten sind lehmige Auenböden entwickelt. Der Jahresniederschlag bewegt sich im Bereich um 700 mm. Der Umkreis von einem Kilometer Radius um die Bodenbeobachtungsfläche erstreckt sich zum überwiegenden Teil auf die ebene Flussaue, die meist ackerbaulich, seltener auch als Grünland genutzt wird. Es handelt sich um hochwertige Böden, auf denen der Anbau von Rüben, Weizen, Gerste und Raps im Vordergrund steht. Im Osten und Süden befindet sich der von einem niedrigen Damm eingedeichte Fluss, mit seinen gehölzbestandenen Uferböschungen, flussnahen Grünländern, dem Mündungsbereich der Großen Aue und einem blind endenden Altarm. Jenseits des Flusses, am Rande des Untersuchungsgebiets befindet sich ein stillgelegter Abbauteich. Die Terrassenkante der Aue, an der sich ein Dorf und eine Bahnlinie befindet, liegt gerade noch am westlichen Rande des Gebietes.

Bezüglich der vegetationskundlichen Untersuchungen wurde BDF012-L zusätzlich in den beiden folgenden Jahren (2002-2003) untersucht, da die Fläche eine mit dem Freisetzungsortort Sichte vergleichbare Fruchtfolge aufwies.

Die zweite Referenzfläche befindet sich im Osnabrücker Hügelland nördlich des Teutoburger Waldes (BDF058-L, Anhang A, Karte 14). Die Höhe ü. NN beträgt ca. 100 m. Die Niederschläge dieses Gebietes betragen etwa 750 mm im Jahr. Das Untersuchungsgebiet in 1 km Umkreis um die Dauerbeobachtungsfläche im Zentrum umschließt eine kleinräumig in zahlreiche Kuppen und z. T. steile Kerbtälchen gegliederte Landschaft mit Höhen zwischen 85 und 110 m ü. NN. Es handelt sich hier um eine landwirtschaftlich geprägte Region mit Ackerbau und Grünlandnutzung. Die mittel- bis hochwertigen Böden werden neben der Viehwirtschaft hauptsächlich zum Anbau von Raps, Weizen, Gerste und Rüben genutzt. In der stark zersiedelten Landschaft dieses Untersuchungsgebietes fehlen dörfliche Siedlungen fast völlig. Statt dessen ist die Gegend durch die typischen Einzelgehöfte geprägt. Nur im Norden befindet sich eine Siedlung. Neben den landwirtschaftlichen Flächen finden sich einige kleine Waldstücke in der ansonsten eher homogen gegliederten Landschaft.

Referenzflächen 2002: BDF008-L und 013-L

Die Fläche BDF008-L befindet sich am Nordrand der Braunschweig-Hildesheimer-Lössbörde (Anhang A, Karte 15). Die Höhe ü. NN beträgt ca. 80 m. Die Niederschläge dieses Gebietes

²gemäß einer Kooperationsvereinbarung mit dem NLFB ist die Weitergabe der genauen Ortsangaben nicht zulässig

bewegen sich um etwa 750 mm im Jahr. Das Untersuchungsgebiet mit der Dauerbeobachtungsfläche im Zentrum des 1 km Radius liegt in einer von großen Ackerflächen dominierten leicht welligen Landschaft mit Höhen zwischen 75 und 85 m ü. NN. Die hochwertigen Böden (Pseudogleye, Pseudogley-Schwarzerden, Pseudogley-Parabraunerden) werden vornehmlich zum Anbau von Raps, Weizen und Rüben genutzt. Im Untersuchungsgebiet befindet sich eine kleine dörfliche Siedlung. Neben den landwirtschaftlichen Flächen finden sich neben Wegen und Straßen, wenigen linearen oder flächigen Gehölzen auch einige anthropogen geprägte Gewässer (zwei Teiche, Entwässerungsgräben, kanalisierter Bach) in der ansonsten eher monoton strukturierten Landschaft.

Auf der zweiten, neu im Jahr 2002 untersuchten Referenzfläche des BDF-Programms (BDF 013-L) wurden keine eigenen vegetationskundlichen Untersuchungen durchgeführt, da in diesem Jahr eine Zwischeninventur im Rahmen des Bodendauerbeobachtungsprogramms erfolgte. Hier wurden lediglich Bodenproben zur Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften und zur Untersuchung auf transgene DNA aus Boden entnommen.

Die Fläche mit überwiegend Braunerden liegt in einer Höhe ü.NN von etwa 285 m, die Niederschläge betragen um 750 mm im Jahresmittel.

Referenzflächen 2003: BDF010-L und 065-L

BDF010-L liegt in der östlichen Umgebung Bremens am Südwestrand der Stader Geest im Übergangsbereich zum Weser-Aller-Flachland in einer Höhe von etwa 25 m ü. NN (Anhang A, Karte 16). Das Gebiet ist durch Pseudogley-Podsole gekennzeichnet, die sich auf sandiger Grundmoräne entwickelten. Ein Teil des Gebiets entfällt zudem auf entwässertes und umgebrochenes Hochmoor über grundwasserbeeinflussten Talsanden. Die landwirtschaftliche Nutzung des Gebietes überwiegt. Acker- und Grünlandnutzung halten sich etwa die Waage, wobei vornehmlich Roggen und Mais, seltener auch Weizen, Gerste und Raps gebaut wird. Neben einer sehr geringen forstwirtschaftlichen und gartenbaulichen Nutzung, entfallen weitere Flächenanteile des an einem Ortsrand befindlichen Untersuchungsgebietes auf Gewerbenutzung, auf ein ländlich geprägtes Wohngebiet sowie auf den Fernverkehr. Darüber hinaus existieren kleinere Entwässerungsgräben neben einem zentral gelegenen Vorfluter, anthropogene aber naturnah entwickelte Kleingewässer sowie flächige oder lineare Gehölzstrukturen entlang der Wege und Straßen. Der Jahresniederschlag beträgt etwa 700 mm.

Auf einer weiteren Fläche des BDF-Programms (BDF065-L) wurde 2003 ausschließlich eine Bodenprobe zur Untersuchung auf transgene DNA im Boden entnommen. Bei dem Bodentyp dieser Fläche handelt es sich um mittlere Braunerde-Rendzina mit mittlerer nutzbarer Feldkapazität (Tab. 6).

Tabelle 6: Untersuchungsflächen des BDF-Programms mit Angabe des Untersuchungsjahres, der durchgeführten Untersuchungen, des Bodentyps sowie der im Untersuchungsjahr angebauten Kulturpflanze im Vergleich zum Freisetzungsort Sickte.

*Kernflächenuntersuchungen fanden nur im ersten Jahr statt

Untersuchungsfläche	Jahr	Untersuchungen	Kulturpflanze	Bodentyp
BDF012-L	2001 2002 2003	Begleitvegetation*, Kreuzblütlerkartierung, mikrob. Gemeinschaft (2001+02), Transgennachweis (2001)	2001: Winterraps 2002: Winterweizen 2003: Weizen	Pseudo- vergleyter Auenboden
BDF058-L	2001	Kreuzblütlerkartierung, mikrobielle Gemeinschaft, Transgennachweis	2001: Winterraps	Pseudogley- Braunerde
BDF008-L	2002	Begleitvegetation, Kreuzblütlerkartierung, mikrobielle Gemeinschaft, Transgennachweis	2002: Winterraps	Pelosol
BDF013-L	2002	mikrobielle Gemeinschaft, Transgennachweis	2002: Winterraps	Braunerde
BDF010-L	2003	Begleitvegetation, Kreuzblütlerkartierung, mikrobielle Gemeinschaft, Transgennachweis	2003: Winterraps	Pseudogley- Podsol
BDF065-L	2003	Transgennachweis	2003: Winterraps (mit Getreideparzellen)	Mittlere Braunerde- Rendzina
Sickte	2001 2002 2003	Begleitvegetation*, Kreuzblütlerkartierung, mikrobielle Gemeinschaft, Trans- gennachweis (2001)	2001: Winterraps 2002: Winterweizen 2003: Wintergerste	Braunerde

2.2 Transgene Pflanzen und Konstrukte

Im Verlauf des Projektes wurden verschiedene transgene Pflanzen mit unterschiedlichen gentechnischen Veränderungen in die Untersuchungen einbezogen. Die untersuchten Kulturpflanzen sowie die darin vorliegenden transgenen Konstrukte sind in Tab. 7 zusammengestellt. Zusätzlich wurden DNA-Extrakte mit weiteren gebräuchlichen Konstrukten aus verschiedenen Kulturpflanzen in den Experimenten verwendet.

Tabelle 7: Verwendete transgene Pflanzen bzw. DNA-Extrakte und Konstrukte.

Kulturpflanze	Linie	Konstrukt	Freisetzungsort	RKI-Az.
Winterraps (Sorte Lister LL, RAW-Nr. 1528)	GS40/90	Glufosinatresistenz 35S/pat	Sickte/Braun- schweig	6786-01-0101
Winterraps	GS40/90	Glufosinatresistenz 35S/pat	Dahnsdorf	6786-01-0051
Mais	T25	Glufosinatresistenz 35S/pat	Sickte/Braun- schweig	
Mais	T25	Glufosinatresistenz 35S/pat	Dahnsdorf	6786-01-0062
Kartoffel (Sorte Desiree)	diverse	Kohlenhydratstoffwech- sel- Veränderung 35S- SST	Dahnsdorf	6786-01-0136
Kartoffel (Sorte Desiree)	diverse	Kohlenhydratstoffwech- sel- Veränderung 35S-SST/FFT	Dahnsdorf	6786-01-0122
Raps-DNA	GS 40/90	Glufosinatresistenz 35S/pat	-	-
Mais-DNA	T25	Glufosinatresistenz 35S/pat	-	-
Zuckerrüben- DNA	T-120-7	Glufosinatresistenz 35S/pat	-	-
Raps-DNA	GT 73	Glyphosatresistenz EPSPS	-	-
Zuckerrüben- DNA	#77	Glyphosatresistenz EPSPS	-	-
Raps-DNA	MS8/RF3	barnase, barstar, bar-Gen	-	-
Mais-DNA	Mon 810	Bt	-	-

2.3 Untersuchung der Flora und Vegetation

2.3.1 Floristische Kartierungen

Floristische Kartierungen in den Kernflächen und den 1 ha-Flächen der BDF-Referenzflächen und der Raps-Freisetzungsfäche in Sickte wurden in Anlehnung an das BDF-Programm durchgeführt. Die Art der Untersuchungen und der Untersuchungsumfang ist Tab. 6 und 9 zu entnehmen. Bei der Verwendung der deutschen und der wissenschaftlichen Namen wurde die Liste der wildwachsenden Farn- und Blütenpflanzen Niedersachsens (GARVE & LETSCHERT, 1991) zu Grunde gelegt.

Vegetationsaufnahmen in den Kernflächen (vFF, vBDF)

Die quantitative Erfassung der Ackerbegleitarten erfolgte in den 4 Kernflächen innerhalb der Freisetzungsfäche in Sickte (Größe 7x7 m, im Folgenden vFF genannt) bzw. den Daueruntersuchungsflächen (vBDF, Größe ca. 50 qm) innerhalb der Kernflächen der BDF-Referenzflächen. Die Aufnahmen wurden jeweils im Jahr des Rapsanbaus auf den entsprechenden Flächen durchgeführt und erfolgten Anfang Mai.

Die vegetationskundliche Untersuchung dieser Flächen umfaßte die Erstellung einer Artenliste und die jeweilige Angabe der Artmächtigkeiten unter Verwendung der in Tab. 8 dargestellten, vom BDF-Programm genutzten Skala, sowie die Erfassung weiterer standörtlicher Parameter, wie z.B. Deckung der Begleitvegetation, Hangneigung (Tab. 15).

Floristische Untersuchungen der 1-ha BDF bzw. 0,4 ha FF

Für die qualitative Aufnahme wurde für die etwa 0,4 ha große Freisetzungsfäche in Sickte (im Folgenden FF genannt) und die 1 ha-BDF 012-L durch wiederholtes Erfassen aller Gefäßpflanzenarten in allen drei Untersuchungsjahren eine möglichst vollständige Artenliste erstellt. Zur Gewinnung von Vergleichsdaten zur Ackerbegleitflora nicht transgener Rapskulturen wurden zusätzlich die ausgewählten BDF-Referenzflächen 008-L und BDF010-L zum Zeitpunkt des Rapsanbaus herangezogen. Die Begehungen erfolgten jeweils Anfang Mai.

Floristische Untersuchungen des Gesamtackers

Über die Untersuchungen im BDF-Programm hinaus wurden die Gefäßpflanzenarten der kompletten Äcker, in der die FF (aFF) bzw. BDF (aBDF) liegen, möglichst vollständig erfasst, um das Artenspektrum möglichst vollständig aufzunehmen und zudem die i.d.R. umfangreicheren Vorkommen der Begleitarten im inneren Ackerrand (Ackerrandbereich, der noch mit den entsprechenden Kulturpflanzen bestückt ist) zu berücksichtigen.

Unter den „kompletten Ackerflächen“ (aFF, aBDF) wird hier die Ackerfläche verstanden, die die eigentliche Versuchsfläche umgibt. Begrenzt wird sie durch randlich gelegenen, nicht beackerten Lebensräume wie z.B. Wegraine, Gehölzstreifen oder Gräben. Bei der Abgrenzung der „kompletten Ackerflächen“ war also weder die mit *einer* Kulturart bestandene Fläche noch die von *einem* landwirtschaftlichen Betrieb bestellte Parzelle ein Abgrenzungskriterium.

Tabelle 8: Skala zur Aufnahme der Artmächtigkeiten (Deckungswerte) der einzelnen Pflanzenarten im Bodendauerbeobachtungsprogramm (KLEEFISCH & KUES, 1997)

Benennung	Artmächtigkeit	Individuenzahl
0.1 r	< 1 %	1
0.1 +	< 1 %	2 – 5
0.1	< 1 %	> 5
0.2	1 - 3 %	bleibt unberücksichtigt
0.4	3 - 5 %	"
1 -	5 - 10 %	"
1 +	10 - 15 %	"
2 -	15 - 20 %	"
2 +	20 - 25 %	"
3 -	25 - 30 %	"
3 +	30 - 35 %	"
4 -	35 - 40 %	"
4 +	40 - 45 %	"
5 -	45 - 50 %	"
5 +	50 - 55 %	"
6 -	55 - 60 %	"
6 +	60 - 65 %	"
7 -	65 - 70 %	"
7 +	70 - 75 %	"
8 -	75 - 80 %	"
8 +	80 - 85 %	"
9 -	85 - 90 %	"
9 +	90 - 95 %	"
10	95 - 100 %	"

Anmerkung: Der Zusatz „m " wird vergeben, wenn bei Deckungswerten zwischen 0.1 und 0.4 mehr als 50 Individuen gezählt werden.

Tabelle 9: Übersicht über die floristischen und vegetationskundlichen Erhebungen der drei Untersuchungsjahre (mit Angabe der Größe der jeweiligen Untersuchungsfläche)

Erhebungen	Freiset- zungsgebiet Sicke	BDF012-L	BDF008-L	BDF010-L
Vegetationsaufnahmen (Kernfläche vFF bzw. Dauer- untersuchungsfläche vBDF)	4 Aufn. = vFF je 49 m ² in 2001	4 Aufn. = vBDF je ca. 50 m ² in 2001	4 Aufn. = vBDF je ca. 50 m ² in 2002	4 Aufn. = vBDF je ca. 50 m ² in 2003
Erfassung des Artenbestan- des der FF/BDF	FF: ca. 0,4 ha 2001-2003	BDF: 1 ha 2001-2003	BDF: 1 ha in 2002	BDF: 1 ha in 2003
Erfassung des Artenbestan- des des kompletten Ackers (aFF bzw. aBDF)	aFF: ca. 8,5 ha 2001-2003	aBDF: ca. 14 ha 2001-2003	aBDF: ca. 14,5 ha in 2002	aBDF: ca. 6 ha in 2003

2.3.2 Vorkommen von Raps und seinen potenziellen Kreuzungspartnern

Im Rahmen des Pilotprojektes wurden die in der Umgebung des Freisetzungsfeldes in Sickte wildvorkommenden potenziellen Kreuzungspartner von Raps quantitativ erfasst und kartiert (Tab. 10). Die Auswahl der Kreuzungspartner erfolgte in Absprache mit den Modellprojekten von Bayern und Nordrhein-Westfalen. Grundlage war eine Artenliste der OECD (1997) auf Grundlage von SCHEFFLER & DALE, 1994. Über die Registrierung hinaus wurden die Pflanzen beprobt, um sie auf das Transgen untersuchen zu können. Zu Vergleichszwecken und Erfassung einer Basislinie wurde auch die Umgebung der o.g. Bodendauerbeobachtungsflächen einer entsprechenden Kartierung und Beprobung unterzogen.

Zur Registrierung der potenziellen Kreuzungspartner wurden die fünf Untersuchungsgebiete (Sicke, BDF008-L, BDF010-L, BDF012-L und BDF058-L) mindestens im Jahr des Rapsanbaus in einem Umkreis von 1 km um die Freisetzungsfläche (FF) bzw. die Referenzflächen (BDF), zu drei Zeiträumen (Mai, Juli und September) jeweils über mehrere Tage verteilt komplett begangen. Die Erhebungen im Untersuchungsgebiet (UG) Sickte und BDF012-L wurde zudem 2002 und 2003 fortgeführt. Da die zu kartierenden Kreuzblütler-Arten vor allem in ruderal oder ackerbaulich geprägten Lebensräumen vorkommen, wurden entsprechende Biotope, wie z.B. Weg- und Ackerränder besonders berücksichtigt. Komplette Ackerflächen wurde nur dann abgesucht, wenn im Inneren der Fläche Vorkommen der betreffenden Arten mit Hilfe des Fernglases festgestellt werden konnten oder wenn aufgrund ihrer Präsenz am Ackerrand Vorkommen weiter innen wahrscheinlich erschienen. Für jedes registrierte Vorkommen wurde auf der entsprechenden topografischen Karte (Deutsche Grundkarte im Maßstab 1:5000, siehe Anhang A, Karten 1-16) ein Fundort verzeichnet sowie der betreffen-

de Lebensraumtyp festgestellt. Als Fundorte werden hier die möglichst am kleinsten abzugrenzenden Flächen verstanden, die Kreuzblütler-Vorkommen *einer* der aufgeführten Arten ohne größere Lücken (in der Regel < 100m), in vergleichbaren Entwicklungszustand und unter ähnlichen Standortbedingungen beherbergen und außerdem nur einem Lebensraumtyp zuzuordnen sind. Eine Gruppe aus nahe beieinander stehenden Kreuzblütlerindividuen wurde also nur dann als mehrere Vorkommen gewertet, wenn sie verschiedenen Arten angehörten, wenn sie sich in verschiedenen Bitotoptypen befanden oder wenn sie klar trennbaren standörtlichen Bedingungen oder Entwicklungsstadien zuzuordnen waren. Dementsprechend wurde als „Population“ die Gesamtheit aller Individuen einer Art an einem Fundort bezeichnet.

Für jeden Fundort wurde die Individuenzahl notiert, die ab etwa 50 Exemplaren geschätzt wurde. Kultivierte Kreuzblütler-Vorkommen, wie z. B. Rapsfelder oder Grünbrachen mit Ölrettich oder Weißem Senf wurden kartiert, blieben jedoch, bis auf Ausnahmen hinsichtlich der Beprobung (s. Kap. 2.3.3) unberücksichtigt.

Tabelle 10: Potenzielle Kreuzungspartner von Raps (Auswahl s. Text) und ihr Einbürgerungsstatus in der niedersächsischen Flora (H = Heimische oder Alteingebürgerte, E = Neueingebürgerte, U = Unbeständige, K = nur kultiviert oder nicht Vorkommende) nach GARVE & LETSCHERT (1991), WISBKIRCHEN & HAEUPLER (1998) u. OBERDORFER (1990).

Art	deutscher Name	Status	Art	deutscher Name	Status
<i>Brassica carinata</i>		K	<i>Eruca sativa</i>	Öl-Rauke	K-U
<i>Brassica fruticulosa</i>		K			
<i>Brassica juncea</i>	Ruten-Kohl	K-U	<i>Erucastrum gallicum</i>	Französische Hundsrauke	H-U
<i>Brassica nigra</i>	Schwarzer Senf	E	<i>Raphanus raphanistrum</i>	Hederich	H
<i>Brassica oleracea</i>	Wildkohl, Gemüsekohl	K	<i>Raphanus sativus</i>	Ölrettich, Rettich, Radieschen	K
<i>Brassica rapa</i>	Rübsen, Weiße Rübe	K	<i>Raphanus rugosum</i>		K
<i>Brassica tournefortii</i>		K			
<i>Diplotaxis muralis</i>	Mauer-Doppelsame	E	<i>Sinapis alba</i>	Weißer Senf	K-U
<i>Diplotaxis tenuifolia</i>	Schmalblättriger Doppelsame	E	<i>Sinapis arvensis</i>	Acker-Senf	H
<i>Diplotaxis eruroides</i>		K	<i>Hirschfeldia incana</i>	Grauer Bastardsenf	K-U

2.3.3 Untersuchung des Vorkommens von Transgensequenzen im Kreuzblütlerbestand

Probenahme

Pflanzen-Proben für Tests auf mögliche Vorkommen des Transgens in den Kreuzblütlerbeständen wurden im Freisetzungsbereich bei Sickte in allen drei Untersuchungsjahren (2001, 2002 und 2003) genommen. Die Referenzuntersuchungen der weiteren BDF-Gebieten wurden nur jeweils einmal durchgeführt: in den Untersuchungsgebieten BDF012-L und BDF058-L jeweils im Jahr 2001, im Gebiet BDF008-L im Jahr 2002 und im Gebiet BDF010-L in 2003 (Tab. 6).

Im Falle kleinerer Individuenzahlen pro Fundort wurden alle Pflanzen beprobt. Bei Populationsgrößen von 100 Exemplaren einer Art und mehr, wurden 100 Proben entnommen. Jede Probe bestand (in den Untersuchungsjahren 2002 und 2003 ausschließlich) aus einem Blatt oder Blattstück. Anders als im Jahr 2001 wurden die Probenahmen 2002 und 2003 sofort bei der Erfassung durchgeführt. Das Beprobieren im Zuge einer späteren Begehung hatte 2001 dazu geführt, dass nicht alle zuvor registrierten Pflanzen wieder aufgefunden werden konnten, da Straßen und Wegränder bereits vor der zweiten Begehung abgemäht waren. Bei einigen erfassten aber bereits völlig abgestorbenen Pflanzen konnten keine Proben genommen werden, sowie auch bei unzugänglichem oder eingefriedetem Gelände.

Wegen der Möglichkeit einer Übertragung transgener Rapspollen während der gemeinsamen Blütezeit mit anderen Kreuzblütlern wurde außerdem im Freisetzungsbereich Sickte 2001 bei allen Individuen (Anhang B, Tab. 2) die im Laufe des ersten Begehungszeitraumes (Mai 01) festgestellt wurden, eine zusätzliche Beprobung (Juli 01) durchgeführt. Pro Pflanze wurden 5 reife, bzw. in einigen Fällen unreife Schoten geerntet, um einen Test auf das Vorkommen des Transgens in der Tochtergeneration zu ermöglichen. An einigen Fundorten (Anhang B, Tab. 2 und Anhang A, Karte 1: Fundorte 4, 24, 25) wurden zusätzlich Fruchtstände gesammelt, um eine noch größere Zahl von Tochterindividuen zu erhalten. Bei diesen Fundorten handelte es sich jeweils um Ackerränder von Getreidefeldern mit Ausfallraps des Vorjahres, dessen Blühzeitraum sich mit dem des transgenen Feldes (in etwa 400 bis 700 m Abstand) teilweise überschneidet.

Weiterhin wurde Erntegut eines Versuchsfeldes der BBA mit 6 Parzellen konventionellem Raps beprobt. Die Parzellen lagen in 300 bis 600 m Entfernung zum Versuchsfeld in südlicher Richtung (Anhang A, Karte 1, Fundort 55) und wurden zeitgleich mit dem HR-Raps bewirtschaftet. Bei der Ernte wurde jede Parzelle in weitere 5 Teilparzellen eingeteilt und das Erntegut getrennt gesammelt. Jeweils ein Aliquot wurde dem NLÖ freundlicher Weise von der BBA überlassen.

Untersuchungen von Blattmaterial

In Vorversuchen wurde zunächst ermittelt, dass 1 transgenes Blatt unter 100 nicht-transgenen Blättern sicher nachzuweisen ist. Dazu wurden jeweils $\sim 0,5 \text{ cm}^2$ der einzelnen Blätter mittels eines Stopfenbohrers entnommen und durch Mörsern unter flüssigem Stickstoff zerkleinert. Aus jeweils max. 50 mg des homogenisierten Materials erfolgte die DNA-Extraktion

mittels eines kommerziellen Kits nach den Herstellerangaben (NukleoSpin Plant Kit, Fa. Macherey-Nagel GmbH). Die Überprüfung der prinzipiellen Amplifizierbarkeit der DNA Extrakte erfolgte mittels PCR anhand des Primerpaares A1-F/A2-R (Tab. 12, Kap. 2.6.), das eine hochkonservierte Region der t-RNA von Chloroplasten erfaßt (TABERLET *et al.*, 1991). Bei Maisextrakten wurde prinzipielle Amplifizierbarkeit anhand des Primerpaares 1F/1R überprüft (Tab. 12, Kap. 2.6). Jeder Reaktionsansatz enthielt 1x Enzymreaktionspuffer mit 1,5mM MgCl₂, 100µM dNTPs, 400nM je Primer sowie 0,5 U Taq-Polymerase (Amplitaq Gold, Applied Biosystems) in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Das in einem Biometra-Thermocycler verwendete Temperaturprogramm ist in Tab. 13 (Kap. 2.6.) aufgeführt. Die Kontrolle der aus Raps gewonnenen, 550 bp großen Amplifikate erfolgte gelelektrophoretisch.

Der Nachweis des Überganges 35S-Promotor/pat-Gen wurde gemäß der validierten Standardarbeitsanweisung des Unterausschusses "Methodenentwicklung" des Länderausschusses Gentechnik in einer PCR-Reaktion mit dem Primerpaar CAMV 1-F/ pac 3-R durchgeführt (Länderausschuss Gentechnik, 1998). Der Reaktionsansatz entsprach dem für die Primer A1-F/A2-R, das Temperaturprogramm Nr. 2 (Kap. 2.6.) wurde verwendet.

Auf die gleiche Art wurden daraufhin die in den Untersuchungsgebieten entnommenen Pflanzenproben - getrennt nach Untersuchungsgebiet und Pflanzenart - untersucht, indem mehrere Einzelproben, auch von verschiedenen Fundorten, zu Sammelproben vereinigt wurden.

Von jeder Einzelblattprobe wurden wiederum ~0,5 cm² entnommen und bis zu 100 dieser Einzelproben zusammen bearbeitet, wobei gewährleistet war, dass ein Teil der Einzelprobe als Rückstellprobe verwahrt wurde, um im Fall eines Nachweises des Transgens durch eine Wiederholung der Analysen mit definierten Einzelproben eine eindeutige Zuordnung zu einem Individuum und seinem Fundort treffen zu können.

Anschließend wurden die Proben wie oben beschrieben, auf das Vorhandensein der transgenen Sequenz überprüft.

Untersuchung von Samenmaterial

- Keimungstest

Das im ersten Untersuchungsjahr (2001) entnommene Samenmaterial (Erntegut des benachbarten Rapsfeldes, Fundort 55, sowie Samen der Fruchtstände von Ruderalraps, Fundort 4, 24, 25, Anhang A, Karte 1 bzw. 7) aus dem UG Sickte wurde mittels eines Keimungstestes untersucht. Vom Erntegut des Fundortes 55 wurden insgesamt vier Teilparzellen untersucht, drei von ihnen lagen in größtmöglicher Nähe zum Freisetzungsfeld, die vierte Teilparzelle lag am entgegengesetzten Ende. Die Lage der beprobten Teilparzellen (P1 – P4) des Fundortes 55 ist Anhang A, Karte 7 zu entnehmen.

Jeweils 3 mal 1000 Samen eines Fundortes bzw. einer Teilparzelle wurden in den Test eingesetzt. Mit diesem Keimungstest, der in einer Pflanzenklimakammer durchgeführt wird, können größere Mengen an Samen-Untersuchungsmaterial (Saat- oder Erntegut) auf das Vorhandensein des Transgens vorgetestet werden. Dabei wird die Empfindlichkeit nicht-

transgener Samen gegenüber dem Komplementärherbizid LIBERTY-LINK™ ausgenutzt (PFEILSTETTER *et al.*, 2000). In Pflanzschalen werden jeweils etwa 200 zu testende Samen und einige transgene Kontrollsamensamen unter definiertem Licht-/Dunkelrhythmus von 18 h Licht (Lichtstärke 8000 Lux) und 6 h Dunkel bei 21°C zur Keimung gebracht. Sie werden jeweils zu Beginn des Testes, sowie nach 3 Tagen mit einer 0,005%igen LIBERTY-LINK™-Lösung behandelt. Während sich die transgenen Samen normal entwickeln, keimen die nicht-transgenen Samen nur mit stark eingeschränkter Wurzelbildung unter Bildung verkümmelter bräunlicher Blätter (Abb. 9). Die Auswertung der Keimlingsentwicklung und Wurzelbildung erfolgt nach etwa 12 Tagen.

Testsamen, die trotz der Herbizidapplikation annähernd normales Wachstum zeigten, wurden anschließend analog zur Blattuntersuchung molekulargenetisch weiter untersucht.

Abbildung 9: Keimungstest zur Überprüfung größerer Mengen Saat- bzw. Erntegutes in Pflanzschalen. Am linken Bildrand ist das normale Wachstum der transgenen Raps-Kontrollsamensamen unter Herbizidapplikation zu erkennen. Die zu testenden Rapssamen zeigen dagegen nach 12 Tagen nur verkümmerte Wurzelbildung und bräunliche Blätter.



- DNA-Extraktion aus Tausendkornaliquots

Zur Methodenentwicklung wurden alternativ je 3 x 1000 Samen von 3 Teilparzellen des Standortes 55 molekulargenetisch untersucht. Dazu wurden die Samen mit einer Vorwerk-Thermomix-Mühle homogenisiert und aus 2g des Mahlgutes mittels NukleoSpin Plant Kit250 (Fa. Macherey-Nagel GmbH) nach einem modifizierten Aufarbeitungsprotokoll für größere Materialmengen die DNA isoliert (zusätzliche Inkubation des Mahlgutes (60°C, über Nacht) in 10 ml Puffer C1 (NukleoSpin Plant Kit) und weitere Extraktion ausgehend von 1 ml Suspension). Der DNA-Extrakt wurde daraufhin mit dem oben beschriebenen molekulargenetischen PCR-Verfahren auf das Vorkommen der transgenen Sequenz untersucht. Die Vorgehensweise entspricht dem Vorschlag des Unterausschuß Methodenentwicklung des LAG zur Untersuchung von Saatgut auf Anteile gentechnisch veränderter Pflanzen (LÄNDERAUSSCHUSS GENTECHNIK, in Vorbereitung). Die Nachweisempfindlichkeit von 0,1% wurde im Rahmen von Vorversuchen sichergestellt.

Untersuchung von unreifem Samenmaterial

Das 2001 in Sickte zusätzlich gesammelte, unreife Samenmaterial (s. Kap. 2.3.3) aus 5 Schoten pro Pflanze und Fundort wurde wie das Blattmaterial molekularbiologisch auf eine mögliche Übertragung der gentechnischen Veränderung hin untersucht. Dabei zeigte sich allerdings, dass die Analyse dieses Materials sehr aufwändig ist, da die unreifen Samen zunächst vom Schotenmaterial getrennt werden müssen, was im Gegensatz zur reifen Schote nicht ohne Mehraufwand möglich ist. Aus diesem Grund wurde bei den Beprobungen der folgenden Untersuchungsjahre (2002, 2003) auf die Entnahme von unreifen Samen/Schotenmaterial verzichtet. Analog zur Untersuchungsstrategie bei Blattproben wurden auch hierbei Mischproben getrennt nach Pflanzenart hergestellt. Die von der Schotenwand getrennten Samen (ca. 30 pro Schote) wurden zerkleinert und aus dem homogenisierten Material von jeder Schote wie bereits beschrieben mittels des kommerziellen Kits die DNA extrahiert. Die anschließende PCR-Reaktion zum Nachweis der transgenen Sequenz entsprach der für Extrakte aus Blattmaterial. Auf diese Weise wurden 60 Schotenproben mit je 30 Körnern getestet (insgesamt 1800 unreife Samen).

2.4 Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit transgener Sequenzen (Ringversuch)

Mit den Partnern der Modellprojekte aus Bremen (Entwicklung eines standardisierbaren Monitoring-Verfahrens auf der Basis von technischen und biologischen Pollenakkumulatoren und Gen-Screening für eine erste Stufe eines GVO-Monitorings im Hinblick auf eine flächendeckende, raum-zeitliche Dokumentation von Eintrag und Verbreitung von GVO; Förderkennzeichen UBA: 200 89 412, BIA: VE039) und Bayern (Umweltmonitoring möglicher Auswirkungen des landwirtschaftlichen Anbaus gentechnisch veränderter Pflanzen auf die einheimische Flora; Förderkennzeichen UBA 200 89 412/01) wurde ein Ringversuch zur Qualitätssicherung der verwendeten molekularen Nachweisverfahren durchgeführt. Dazu wurde freundlicher Weise von der Firma Aventis CropScience Saatgut der transgenen Winterrapslinie GS 40/90 (gleiche gentechnische Veränderung wie die des transgenen Versuchsfeldes in Sickte) zur Verfügung gestellt. Aus diesem wurde zunächst im niedersächsischen Labor (NLÖ) die DNA aus 2g Raps-Samenmaterial isoliert. Der DNA-Extrakt enthielt 4,45 µg/µl amplifizierbare DNA mit einem A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 1,9. 1:10 verdünnte Aliquots wurden an die Untersuchungslabore Bayern (LfU) und Bremen (Fa. Hanse Analytik) für die vergleichenden Untersuchungen verschickt.

Im niedersächsischen Labor wurden die Untersuchungen für den Nachweis des Überganges 35S-Promotor/pat-Gen bzw. des 35S-Promotors in drei unabhängigen Parallelen durchgeführt. Dazu wurden von den drei parallelen Ansätzen jeweils Verdünnungsreihen mit 500pg DNA/µl, 250pg/µl, 150pg/µl, 100pg/µl, 50pg/µl, 20pg/µl und 10pg/µl angefertigt und in mehreren unabhängigen Wiederholungen mittels PCR analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte im Rahmen des Bremer Forschungsprojektes.

2.5 Untersuchung von Bodenproben

2.5.1 Probenahmen

Aus den jeweils 4 Kernfläche in Sickte (vFF) und denen der BDF-Referenzflächen (vBDF) wurde an jeweils 4 Positionen in etwa 5-10 cm Bodentiefe mit einem "Zwiebelstecher" einige Gramm Boden entnommen (insgesamt 16 Einzelproben pro Feld). Abgesehen von der ersten Probenahme in Sickte (Febr. 2001) wurden bei allen weiteren Probenahmen die 4 Einzelproben einer Kernfläche vereinigt, so dass dann insgesamt 4 Mischproben (pro Feld) vorlagen. Analog dazu erfolgte bei den Teilparzellen in Dahnsdorf und dem Maisfeld in Sickte, wo keine Kernflächen eingerichtet wurden, jeweils an 4 Positionen im Feld die Entnahme von Mischproben, die jeweils aus 4 Einzelbeprobungen bestanden. Die Bodenproben wurden über Nacht in einer Sterilwerkbank getrocknet und dann weiter bearbeitet (s. Kap. 2.5.3 und 2.5.4.). Von jeder Probe wurden etwa 100 g als Rückstellprobe bei -20°C aufbewahrt. Eine Übersicht über die Probenahmezeitpunkte ist in Tab. 11 dargestellt.

Die molekularbiologischen Untersuchungen zum Eintrag und zur Anreicherung von transgener DNA im Boden (s. Kap. 2.5.3) wurden an Proben des transgenen Rapsfeldes und des Feldes mit transgenem Mais in Sickte, sowie an Bodenproben verschiedener Parzellen des langjährigen Freisetzungversuches in Dahnsdorf und den Referenzflächen durchgeführt.

Die Probenahme erfolgte auf der Versuchsfläche in Sickte 2001 im Anschluss an das Häckseln der Pflanzen zunächst in 2-tägigem, später in 1-wöchigem Abstand bis 8 Wochen nach Untergraben (Fräsen) des Pflanzenmaterials, um die Dauer der Nachweisbarkeit des Transgens im Boden möglichst exakt bestimmen zu können.

Auf der zweiten Untersuchungsfläche in Sickte mit transgenen Maispflanzen erfolgte die erste Probenahme 1 Woche nach Ernte (11.12. 2001) der Pflanzen, die folgenden 4 und 12 Wochen nach der Ernte.

Von den Referenzflächen des BDF-Programms (BDF008-L, BDF010-L, BDF012-L, BDF013-L, BDF058-L und BDF065-L) dienen die Bodenproben der jeweils ersten Beprobung der entsprechenden BDF als Grundlage für die Untersuchungen zum Transgennachweis, um den Ausgangszustand auf diesen Flächen bestimmen zu können.

Bei dem Freisetzungversuch zur Herbizidresistenz in Dahnsdorf wurden alle 16 Feldparzellen beprobt, eine erste Probenahme erfolgte Mitte Oktober 2002, d.h. etwa 12 Wochen nach Ernte der Raps- bzw. Maispflanzen. Es standen daher auch von solchen Feldabschnitten Proben zur Verfügung, die zum Beprobungszeitpunkt mit Winterroggen bzw. Winterweizen bestellt waren, die jedoch im Vorjahr mit transgenen Pflanzen bepflanzt waren (Abb. 8). Im Sommer 2003 wurden weitere Bodenprobenahmen aus den Parzellen mit transgenen Pflanzen direkt im Anschluss an die Ernte der Pflanzen durchgeführt, um von diesem Zeitpunkt ab die Überdauerungszeit der transgenen DNA im Boden nachverfolgen zu können. Die Probenahmezeitpunkte waren jeweils der Erntetermin der transgenen Pflanzen (Raps: 14.7.2003;

Mais: 29.8.2003) sowie 3, 6 und 9 Wochen nach der Ernte und anschließenden Bodenbearbeitung.

Zusätzlich zu dem beschriebenen Versuch mit Raps und Mais wurden in gleichen zeitlichen Abständen, also zur Ernte (8.9.2003) sowie nach 3, 6 und 9 Wochen Bodenproben aus den Feldparzellen mit Kohlenhydratstoffwechsel-veränderten Kartoffeln (Sorte Désirée, jeweils drei Linien mit den Konstrukten 35S-SST und 35S-SST/FFT) an diesem Standort entnommen.

Eine Beprobung der Kartoffelparzellen war Mitte Mai 2003, kurz nach dem Setzen der Kartoffeln vorangegangen, um einen Ausgangswert bestimmen zu können.

Abb. 10 zeigt das Anbauschema der Kohlenhydratstoffwechsel-veränderten Kartoffeln in der Fruchtfolge 2003. Auf 4 Flächen wurden parallel 6 transgene und 2 nicht transformierte Linien der Kartoffelsorte Désirée kultiviert (A III, B II, C I, D II). Die Parzellen mit transgenen Pflanzen, sowie eine Parzelle mit Wildtyp-Kartoffeln wurden zunächst getrennt beprobt. Zur Reduktion des Arbeitsaufwandes wurden jedoch von den Bodenproben mit Pflanzen jeweils einer gentechnischen Veränderung im Labor Mischproben hergestellt (Linie 1+2+3 = 35S-SST, Linie 4+5+6 = 35S-SST/FFT, 7 = Wildtyp) und so gemeinsam weiteranalysiert. Die Parzellenproben von Wildtyppflanzen wurden einzeln weiterbearbeitet. Parzellen auf denen 4 weitere konventionelle Kartoffelproben angebaut waren, wurden nicht beprobt.

Für die Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaft (Kap. 2.5.4.) lagen in den ersten 2 Untersuchungsjahren von Februar bis Oktober (bzw. Dezember) Proben vom Versuchsfeld in Sickte im Zeitabstand von jeweils etwa 4 Wochen vor, die auch über die Vegetationsperiode des transgenen Winterraps hinaus fortgeführt wurden (Tab. 11).

Auf den als Referenzflächen ausgewählten BDF erfolgte die Probenahme für die Analysen der Bakterienpopulationen im jeweiligen Untersuchungsjahr von Februar bis August / September im 8-Wochen-Abstand, auf der BDF012-L wurde sie darüber hinaus im Jahr 2002 in größeren Abständen fortgeführt (12 Wochen), da hier ebenfalls als Folgefrucht wie in Sickte Winterweizen angebaut wurde.

Tabelle 11: Probenahmezeitpunkte auf den verschiedenen Untersuchungsflächen mit Angabe der durchgeführten Untersuchungen *Die Untersuchungen zur Mikrobiellen Biomasse, der Basalatmung und dem daraus berechneten metabolischen Quotienten wurden durch das NLFb durchgeführt. Untersuchungen zur mikrobiellen Gemeinschaft s. Kap. 2.5.4 ____/____. Probe, aus der zusätzliche Untersuchungen durchgeführt wurden.

Untersuchungsgebiet	Probenahmezeitpunkt	Untersuchung
Sickte (HR Raps)	2001: Februar, März, <u>April</u> , Mai, Juni, Juli, August, September, Oktober, November, Dezember	Mikrobielle Gemeinschaft, <u>*Mikrobielle Biomasse</u> , <u>Basalatmung</u>
	2001: 28. Mai (=Ernte), 6. (=Fräsen), 8., 11., 19., 26. Juni, 2., 9., 16., 23. Juli, 6. August	Transgennachweis (nach Freisetzung)
Sickte (HR Mais)	2001: 17.12. (1 Woche nach Ernte). 2002: 7. Januar, 4. März	Transgennachweis
BDF012-L	2001: <u>Februar</u> , April, Juni, August	Mikrobielle Gemeinschaft <u>Transgennachweis</u>
BDF058-L	2001: <u>Februar</u> , April, Juni, August	Mikrobielle Gemeinschaft <u>Transgennachweis</u>
Sickte	2002: Januar, Februar, März, <u>April</u> , Mai, Juni, Juli, August, September, Oktober	Mikrobielle Gemeinschaft <u>Mikrobielle Biomasse</u> <u>Basalatmung</u>
BDF008-L	2002: <u>Februar</u> , April, Juni, August, September	Mikrobielle Gemeinschaft <u>Transgennachweis</u>
BDF013-L	2002: <u>Februar</u> , April, Juni, August, September	Mikrobielle Gemeinschaft <u>Transgennachweis</u>
BDF012-L	2002: Februar, Mai, August, Oktober	Mikrobielle Gemeinschaft
Dahnsdorf	2002: Oktober (Raps-, Maisparzellen)	Transgennachweis
Sickte	2003: <u>April</u> , Juni, August	Mikrobielle Gemeinschaft <u>Mikrobielle Biomasse</u> <u>Basalatmung</u>
BDF010-L	2003: <u>März</u> , April, Juni, August	Mikrobielle Gemeinschaft <u>Transgennachweis</u>
BDF065-L	2003: März	Transgennachweis
Dahnsdorf Kartoffeln	2003: Mai, Ernte (8. Oktober), 3, 6, 9 Wochen	Transgennachweis (nach Freisetzung)
Dahnsdorf Raps, Mais	2003: Ernte (Raps: 14. Juli; Mais: 29. August), 3, 6, 9 Wochen	Transgennachweis (nach Freisetzung)

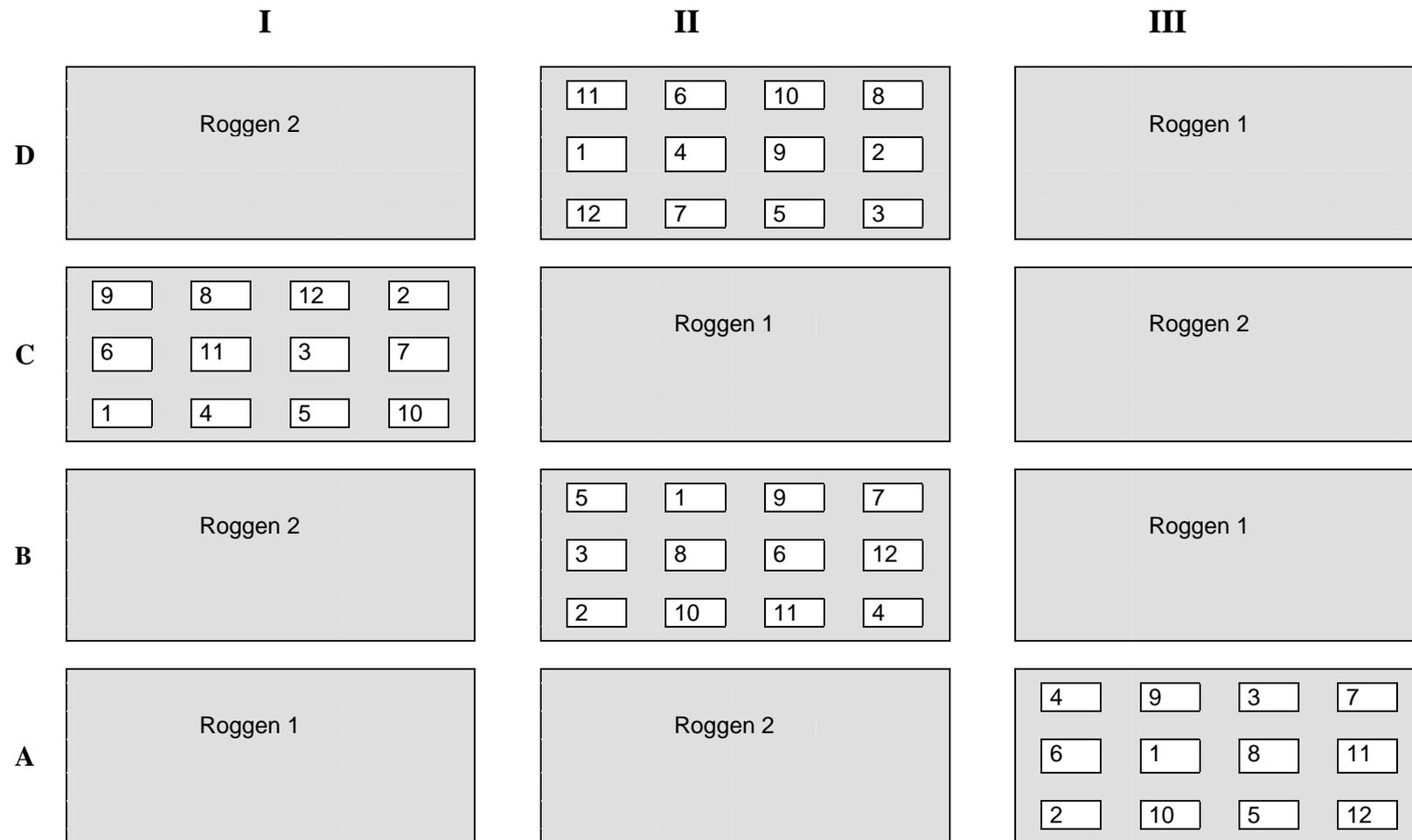


Abbildung 10: Anbauschema der Fruchtfolge 2003: 6 transgene und 2 nicht transformierte Linien der Sorte Désirée sowie 4 weitere konventionelle Sorten (Quelle: B. Hommel, persönliche Mitteilung)

1 = Linie SST # 18 , 2 = Linie SST # 36 , 3 = Linie SST # 20 , 4 = Linie SST/FFT # 22/19
 5 = Linie SST/FFT # 22/30 , 6 = Linie SST/FFT # 22/34, 7 = WT 1 (Golan), 8 = WT 2

Neben den molekularbiologischen Untersuchungen zur Analyse mikrobieller Bodengemeinschaften hat gemeinsam mit den Mitarbeitern des NLFb eine bodenmikrobiologische Untersuchung des BDF-Programms auch auf dem transgenen Versuchsfeld stattgefunden. Auf den BDF-Referenzflächen wurde diese Untersuchung im Rahmen der jährlichen Wiederholung durch das NLFb durchgeführt. Hierzu zeitlich parallel wurden Bodenproben vom Versuchsfeld in Sickte in allen drei Untersuchungsjahren analog zum Verfahren des BDF-Programms (KLEEFISCH & KUES, 1997) entnommen und gekühlt an das NLFb weitergeleitet. Dort wurden neben der mikrobiellen Biomasse auch die Basalatmung und der metabolische Quotient (s. Kap. 1.1.) ermittelt. Darüber hinaus wurden 2002 einige bodenphysikalische Kennwerte für das Versuchsfeld in Sickte im NLFb bestimmt. Hierbei wurden mit den standardisierten Methoden des BDF-Programms der Ton-, Gesamtschluff- und Gesamtsandgehalt gemessen, sowie der pH-Wert, der Kohlenstoff- und der Stickstoffanteil bestimmt.

2.5.2 DNA-Extraktion

Zur Ermittlung eines DNA-Extraktionsverfahrens aus Böden, das sich sowohl für den Nachweis von Transgensequenzen (Kap. 2.5.3) als auch für DGGE-Analysen (Kap. 2.5.4) eignet, wurden verschiedene Methoden ausgetestet.

- Methode A:

Aus den getrockneten und homogenisierten Bodenproben wurde mittels eines kommerziellen Kits (UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit, Fa. Mo Bio Laboratories) aus 0,50 g Boden die Gesamt-DNA nach der teilweise modifizierten Herstelleranweisung isoliert. Die Proben wurden zunächst 60 sek auf dem Whirlmix (MS1 Minishaker, Fa. IKA-Works, INC) bei 1400Upm geschüttelt und anschließend für 5 min auf 70°C erwärmt. Nach einer Wiederholung dieser Prozedur wurden die Proben abschließend noch einmal 60 sek geschüttelt und dann nach dem Herstellerprotokoll weiter bearbeitet.

- Methode B:

Modifikationen des Protokolls in Form veränderter Aufschlusstechnik mittels Retschmühle (MM2000, Omnilab) für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit.

- Methode C:

Extraktion mittels FastDNA™ Spin Kit for Soil nach Herstellerangaben (Fa. BIO 101).

- Methode D:

Extraktion mittels Nucleo Spin Plant Kit, modifiziert für die Aufarbeitung von Boden und Kompostproben (Fa. Macherey & Nagel).

Die prinzipielle Amplifizierbarkeit der so extrahierten DNA (50µl Gesamtvolumen) wurde je nach Fragestellung für Pflanzen-DNA mit dem universellen Primersystem A1-F/A2-R (s. Kap. 2.3.3.) und für bakterielle DNA mit einem Prokaryonten Nachweis-System (Primerpaar 27f/1492r, Tab. 12, Kap. 2.6.) zur Amplifikation des 16S rRNA-Gens überprüft.

Die Methoden A, B und C wurde bzgl. ihrer Eignung für DGGE Analysen (Amplifizierbarkeit der Extrakte mittels DGGE-spezifischen Primern, Qualität der erhaltenen Bandenmuster)

getestet, die Methoden A, C und D auf ihre Eignung zum quantitativen Nachweis von DNA aus Bodenproben. Ausgehend von diesen Ergebnissen (Kap. 3.3.1) erfolgte die DNA-Extraktion der im Rahmen des Pilotprojektes untersuchten Bodenproben anhand der Methode A.

2.5.3 Entwicklung von Methoden zum Nachweis von Transgensequenzen aus Bodenproben

Qualitative PCR-Analysen

Anhand von Vorversuchen wurde zunächst überprüft, inwieweit mit der Extraktionsmethode A frei im Boden vorliegende DNA erfasst und isoliert wird. Es wurden jeweils in zwei unabhängigen Wiederholungen 0,5 g Bodenproben angesetzt, denen entweder unzerteilte Blatt- oder Wurzelstücke (jeweils ~ 1cm² einer transgenen Rapspflanze), die gleiche Menge zerkleinertes Pflanzenmaterial oder extrahierte Pflanzen-DNA (1µg) zugegeben wurden. Zusätzlich wurde der Einfluss verschiedener Amplifikationsenzyme (Taq-Polymerasen) auf die Nachweisempfindlichkeit des Systems getestet. Hierbei wurden 0,5 g Boden mit einer definierten Menge DNA (1µg Gesamt-DNA aus transgenen Rapskörnern) versetzt, 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anhand der Methodik A die DNA wieder extrahiert. Verschiedene Verdünnungsstufen des DNA-Extrakts wurden daraufhin in die unter Kap. 2.3.3. beschriebene PCR-Reaktion mit dem Enzym „Amplitaq Gold“ (Applied Biosystems) und alternativ mit „Stoffel Fragment“ (5U, Applied Biosystems), und „HotStarTaq“ (0,3U, Qiagen) amplifiziert. Für das Enzym Hot StarTaq wurde das Temperaturprogramm Nr. 3 (Tab. 13) verwendet.

Außerdem wurde getestet, ob auch aus bereits abgestorbenem Pflanzenmaterial der Transgennachweis gelingt. Hierzu wurden in 2 Parallelen wiederum jeweils ~ 1cm² seneszenzente Pflanzenreste (Blatt, bzw. Stängel), die 6 Wochen nach Ernte des transgenen Raps´ bzw. 4 und 12 Wochen nach der Maisernte auf der Freisetzungsfäche in Sickle gesammelt werden konnten, zerkleinert und mittels des kommerziellen Kits nach den Herstellerangaben (NukleoSpin Plant Kit, Fa. Macherey-Nagel GmbH) DNA extrahiert. Die Überprüfung der prinzipiellen Amplifizierbarkeit und der transgenspezifische Nachweis erfolgt wie unter Kap. 2.3.3 beschrieben.

Ausgehend aus diesen Vorversuchen wurde die Nachweisempfindlichkeit von verschiedenen transgenen Sequenzen anhand von künstlich zugesetzter transgener DNA bestimmt. 0,5 g Boden aus Sickle und BDF013-L wurde mit einer definierten Menge genomischer pflanzlicher DNA (bis zu 3 µg) versetzt, 1 h bei RT inkubiert und anhand der Methode A die DNA wieder extrahiert. Die DNA-Extrakte wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen mit dem Enzym „Amplitaq Gold“ (Applied Biosystems) amplifiziert (Reaktionsbedingung s. Kap. 2.3.3). Zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit wurde zum Nachweis der 35S/pat-Region eine sogenannte booster-PCR durchgeführt, in der 1µl des Produktes der ersten

PCR-Reaktion in eine weitere unter denselben Bedingungen durchgeführte PCR-Reaktion eingesetzt wird.

Die Nachweisempfindlichkeit wurde für transgene DNA aus LIBERTY-LINK™-resistenten Raps, Mais und Zuckerrüben (Nachweis 35S/pat-Gen, Primer CaMV/pac 3R), für glyphosatresistente Raps- und Zuckerrübenpflanzen (Nachweis des EPSPS-Gens, Primer EPSPS-CP1/PFMV-2) sowie von männlich sterilen Rapspflanzen (barnase, barstar, bar-Gen, Primer PGS barA2/B2) und Bt-Mais (Linie MON 810, Primer VW 01/03) bestimmt (s. Kap. 2.2, Primersequenzen und Temperaturprogramme s. Tab. 12 und 13).

Da am Standort Dahnsdorf 2003 auch Freisetzungen mit transgenen Kartoffeln (Sorte Désirée, Tab. 7) stattfanden, wurde für die dort eingesetzten Konstrukte zur Veränderung des Kohlenhydratstoffwechsels eine PCR-basierende Nachweismethode aus Bodenproben im NLÖ-Labor etabliert. Hierzu wurde zunächst aus den von Herrn Dr. Hommel, BBA Kleinmachnow, freundlicher Weise zur Verfügung gestellten Kartoffelblattproben die genomische DNA mittels des NukleoSpin Plant Kit isoliert. Mit Hilfe der vorliegenden Informationen zu den eingeführten Veränderungen und ihren Regulationselementen (npt II-Gen in Kombination mit nos-Terminator) wurde ein spezifisches Primersystem (npt 8-F / nosT 8-R, Tab. 12, 13, Reaktionsansatz analog zum Nachweis 35S/pat) in der PCR-Analyse zum Nachweis der Transgensequenzen entwickelt und zur Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit in Bodenproben erfolgreich getestet.

Die entwickelten Verfahren wurden nach der Ernte der transgenen Pflanzen an den Freilandbodenproben in Sickte (HR Raps und HR-Mais; Primer CaMV/pac 3R) und Dahnsdorf (HR Raps, HR Mais und Kartoffel; Primer CaMV/pac 3R bzw. npt 8F/8R) angewendet. Die Überprüfung auf Vorliegen transgener Sequenzen in den Referenzflächen erfolgte exemplarisch auf allen BD-Flächen anhand des Primerpaar CaMV/pac 3R.

Quantitative PCR-Analysen

Am Beispiel von HR-Raps wurden stichprobenartig quantitative Analysen zur Reextraktionsfähigkeit von DNA aus Böden bei Verwendung verschiedener Extraktionskits und aus verschiedenen Bodentypen durchgeführt, sowie anschließend der Gehalt an transgener DNA in den Böden aus den Raps- und Maisparzellen der Freisetzungsstandorte Sickte und Dahnsdorf ermittelt.

Für den Vergleich verschiedener Extraktionsverfahren hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit in der PCR wurden die Extraktionsmethoden A, C und D (s. Kap. 2.5.2) jeweils mit und ohne weiterführende Aufreinigung mittels GeneClean Spin-Kit (Fa. BIO 101) geprüft.

Die Reextraktionsfähigkeit wurde analog zu den qualitativen Analysen durch Zugabe einer definierten Menge (700 ng transgene DNA) aus HR-Rapssamen isolierter DNA zu den Bodenproben bestimmt. Nach der Reextraktion erfolgte die quantitative Bestimmung der Kopienzahl der 35S/pat-Sequenz mittels Real-time PCR (Taqman-PCR, ABI PRISM 7000, Applied Biosystems) analog zur Methodensammlung des LAG (Quantifizierung des Anteils von 35S/pat-DNA-Sequenzen in Rapssaatgut mittels TaqMan PCR, Methodensammlung des

Länderausschusses Gentechnik, in Vorbereitung). Durch die Ermittlung des 35S/pat spezifischen Anteils in Bezug auf ein rapsspezifisches Gen können Rückschlüsse auf die Menge von transgenem Raps im Untersuchungsmaterial gezogen werden.

35S/pat-spezifische Oligonukleotide:

35SP03.f	5'- AAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGACA- 3'
pat-7.r	5'- CGGCCATATCAGCTGCTGTAG - 3'
GSS01.s:	5'-TAMRA- CCGGAGAGGAGACCAGTTGAGATTAGGC - FAM - 3'

Rapsspezifische Oligonukleotide:

pep-F	5'- GAGAACTGAATGAGAGGTGCATTGT - 3'
pep-R	5'- AGTTCCTAAATTCTTGAGACG GTT - 3'
pep-S-	5'-TAMRA-ACACGCTCGTTGATTCCAATGTTCTTCA - FAM - 3'

Die PCR-Reaktionslösungen enthielten für den 35S/pat Nachweis die entsprechenden Primer (je 200 nM) und Sonde (100 nM) sowie 0,12% BSA (Rinderserumalbumin, Promega) in 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems); für die rapsspezifische DNA wurden die Primer in einer Endkonzentration von je 300 nM und die Sonde in einer Endkonzentration von 200nM eingesetzt. Die Zugabe von BSA dient zur Reduktion von Inhibitoren in der TaqMan PCR durch Hemmstoffe in den DNA-Extrakten aus Umweltproben, wie von VOGEL (2002) gezeigt werden konnte. Die Amplifikation erfolgte nach Aktivierung der „Ampli-TaqGold“ (10 min, 95°C) während 45 Zyklen (15 sec, 95°C und 60 sec 60°C). Die Kalibrierung erfolgte gegen die in den PCR-Mikrotiterplatten enthaltenen Standards (Fa. Roboscreen, ArtNr. 020800122) sowie intern hergestellter Standards aus transgenem Rapssaatgut. Für die intern hergestellten transgenspezifischen Standards wurde DNA aus einzelnen Rapskörnern der Linie GS 40/90 extrahiert und jeder Extrakt auf das Vorhandensein des Transgens mittels PCR überprüft. Die DNA-Extrakte der transgenen Samen wurden anschließend vereint und photometrisch vermessen. Ausgehend von dem Gewicht eines haploiden Rapsgenomes von 1,3 pg (ARAMUGANATHAN *et al.* 1991) und einer Kopie des Transgens pro Genom wurde die Kopienzahl des Extraktes berechnet. Von dem Extrakt wurden Verdünnungen hergestellt und diese in der Real-time PCR als Standard vermessen (1 bis 20000 Kopien pro PCR-Ansatz).

2.5.4 Analyse mikrobieller Gemeinschaften im Boden mittels DGGE

DNA-Extraktion

Ausgehend von den Vorversuchen zur Extraktionsmethodik (s. Kap. 3.3.1) wurde die für den Nachweis des Transgens eingesetzte Methode A zur DNA-Isolierung aus Bodenproben auch für die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften genutzt. Für die nachfolgenden DGGE-

spezifischen PCR-Reaktion war jedoch eine Reinigung der DNA-Extrakte notwendig. Diese erfolgte mittels des GeneClean Spin Kit (Fa. BIO 101) nach Herstellerangaben.

Amplifikation

- Bakterielle Gemeinschaft (universeller Primer):

Für die Analyse der bakteriellen Gemeinschaft wurden die gereinigten DNA-Extrakte mit dem Primerpaar F-984-GC/1346-R amplifiziert, mit dem eine 16S rDNA basierende Sequenz der Mikroorganismen vervielfältigt wird (FELSKE *et al.*, 1996). Jeder PCR-Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 25µl neben 0,5µl der gereinigten Template-DNA, 1x Enzymreaktionspuffer, 200µM dNTPs, 4mM MgCl₂, 400nM je Primer sowie 3U Taq-Polymerase (Stoffel-Fragment, Applied Biosystems). In Vorversuchen wurden zunächst verschiedene Amplifikationsprogramme (Tab. 13, Temperaturprogramme 10, 11 und 12) vergleichend getestet, die Amplifikation der Bodenproben aus den Feldversuchen erfolgte anschließend anhand des Temperaturprogramms 10.

Alternativ wurde getestet, inwiefern eine Vorauswahl einzelner taxonomischer Bakteriengruppen (hier: Aktinomyceten und α-Proteobakterien) oder auch Pilze bei der Amplifizierung eine aussagekräftige Auswertung der DGGE-Gele erleichtern könnte.

- Aktinomyceten:

In einer ersten PCR-Reaktion wurde das Primerpaar F-243HGC / 1346-R (Tab. 12, 13) verwendet, das hauptsächlich die Amplifizierung des 16S rDNA-Bereiches von Actinomyceten mit hohem GC-Anteil erlaubt (HEUER *et al.*, 1997). 1 µl des Reaktionsgemisches dieser ersten Reaktion wurde in einer „seminested PCR“ in eine zweite Reaktion mit dem Primerpaar F-984-GC und 1346-R eingesetzt. Jeder PCR-Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 25µl neben 0,5µl der gereinigten Template-DNA, 1xEnzymreaktionspuffer, 200µM dNTPs, 3mM MgCl₂, 320nM je Primer, 1,5U Taq-Polymerase (Stoffel-Fragment, Applied Biosystems) sowie 5% v/v DMSO und 2,5µg BSA. Die Bedingungen für die seminested Reaktion entsprachen denen der DGGE-PCR für die bakterielle Gemeinschaften (s.o., Programm Nr. 10).

- α-Proteobakterien:

Die erste PCR-Reaktion wurde mit dem Primerpaar F-203 α / 1492-R durchgeführt, mit dem bevorzugt der 16S rDNA-Bereich von Bakterien aus der α-Proteobakteriengruppe vervielfältigt wird (GOMES *et al.*, 2001). 1 µl dieses Reaktionsgemisch wurde wiederum in eine zweite („nested“) PCR mit dem Primerpaar F-984-GC / 1346-R eingesetzt. Jeder PCR-Ansatz enthielt hierbei in einem Gesamtvolumen von 25µl neben 0,5µl der gereinigten Template-DNA 1xEnzymreaktionspuffer, 200µM dNTPs, 3,75mM MgCl₂, 400nM je Primer, 2U Taq-Polymerase (Stoffel-Fragment, Applied Biosystems) sowie 5% v/v DMSO.

- Pilze:

Eine weitere Alternative bestand in der Amplifikation des 18S rDNA Abschnittes von Pilzen in einer seminested PCR (ZUCCARO *et al.*, 2003, VAINIO & HATULA, 2000; SMIT *et al.*, 1999). Der PCR-Ansatz für die erste Reaktion (Primerpaar NS1/EF3) enthielt 2µl der gereinigten Template-DNA, 1xEnzymreaktionspuffer, 200µM dNTPs, 3,5mM MgCl₂, 320nM je Primer, 5U Taq-Polymerase (Stoffel-Fragment, Applied Biosystems) sowie 2% v/v DMSO in einem Ge-

samtvolumen von 25µl. Die seminested PCR-Reaktion wurde mit den Primern NS1 und FR1-GC durchgeführt (Tab. 12, 13). Der Reaktionsansatz entsprach dem der ersten Reaktion.

DGGE-Analyse

Zur DGGE-Analyse wurde das „Universal Mutation Detection System – Dcode™“ (BIO-RAD) verwendet. Die Separation bakterieller 16S rRNA-Genabschnitte erfolgte auf 6% igen Polyacrylamidgelen (Stammlösung 30% Acrylamid mit 0,8% Bisacrylamid, Rotiphoresegel 30, Roth) mit einem denaturierenden Gradienten von 27,5% bis 58%. Die Elektrophorese der 16 x 20 cm großen Gele wurde im Anschluss an einen 1-stündigen Vorlauf (70 V, 58°C), bei 220 V und 58°C für 4 Stunden in 1 x TAE-Puffer durchgeführt.

Die Separation der Pilz-18S rRNA-Genabschnitte erfolgte auf 6% igen Polyacrylamidgelen mit einem denaturierenden Gradienten von 18% bis 38%. Die Elektrophorese der 16 x 20 cm großen Gele wurde nach dem einstündigen Vorlauf bei 180 V und 58°C für 17 Stunden in 1 x TAE-Puffer durchgeführt.

Das Auftragsvolumen der Proben richtete sich nach der Produktstärke im vorangegangenen Agarosegel und betrug zwischen 4 - 7µl. Die DNA-Banden wurden durch eine Silberfärbung (SANGUINETTI *et al.*, 1994) sichtbar gemacht.

Bei jedem DGGE Lauf wurden externe Standards mitgeführt. Für die Analyse bakterieller Gemeinschaften wurden PCR-Amplifikate (Primerpaar 984GC/1346) von 11 Bakterienstämmen gemischt und auf der DGGE aufgetrennt. Für die Analyse pilzlicher Gemeinschaften wurde ein Standard bestehend aus den Amplifikaten (Primerpaar NS1/FR1-GC) von 13 Pilzstämmen hergestellt.

Um die erhaltenen Bandenmuster zu vergleichen, wurden Ähnlichkeitsdendrogramme mittels der Software „Gel Compar“ (Appl. Math.) erstellt. Nach Zuweisung der jeweiligen Standards wurden die Gele einer Clusteranalyse (Pearson, UPGMA) unterzogen.

Nach Etablierung der DGGE zur Analyse mikrobieller Gemeinschaften wurden die Bodenproben des Versuchstandortes in Sickte sowie die der BDF-Referenzflächen vergleichend untersucht. Die Probenahmezeitpunkte zur Analyse der bakteriellen Gemeinschaft (Primer 984-GC/1346) sind Tab. 11 zu entnehmen. Zu ausgewählten Zeitpunkten erfolgte die Analyse mittels taxonspezifischer Primer und der pilzlichen Gemeinschaft.

2.6 Verwendete Primer und Temperaturprogramme

Im Rahmen der verschiedenen Untersuchungen wurden unterschiedliche PCR-Reaktionen angesetzt. Die dabei verwendeten Primer sind mit Sequenz und angewendetem Temperaturprogramm in Tab. 12 aufgeführt. Die in einem Biometra Thermocycler eingesetzten Temperaturprogramme sind mit Angabe der verwendeten Primerpaare in Tab. 13 aufgeführt

Tabelle 12: Verwendete Primer.

Primerpaare Bezeichnung	Sequenz	Produktgröße (bp)	Literatur	Temperatur- programm
A1-F A2-R	5'-CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG-3' 5'-GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC-3'	384 (Raps)	TABERET <i>et al.</i> , 1991	1
CAMV1-F pac 3-R	5'-ATC CTT CGC AAG ACC CTT CCT C-3' 5'-CCC AAC CTT TGA TGC CTA TGT G-3'	385	LAG, 1998	2 (3 mit HotstarT)
npt 8-F nosT8-R	5'-AGG ACA TAG CGT TGG CTA-3' 5'-CAA GAC CGG CAA CAG GAT TC-3'	600	diese Studie	4
IVR-1F IVR-1R	5'-CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC C-3' 5'- GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT C-3'	226	EHLERS <i>et al.</i> 1997,	5
PGSbar A2 PGSbar B2	5'-GAA GTT GAC CGT GCT TGT CT-3' 5'-CAA GTC CAC CAG GCA AGT AA-3'	454	LAG, 2002	7
VW01 VW03	5'- TCG AAG GAC GAA GGA CTC TAA CG-3' 5'- TCC ATC TTT GGG ACC ACT GTC G-3'	170	LAG, in Druck	6
EPSPS-CP1 PFMV-2	Vertrauliche Sequenz	494	LAG, 2002	8
27-F 1492-R	5'- AGA GTT TGA TC(AC) TGG CTC AG -3' 5'- TAC GG(CT) TAC CTT GTT ACG ACT T -3'	1463	STACKEBRANDT & GOODFELLOW, 1991	9
F-984GC 1346-R	5'- CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG DAA CGC GAA GAA CCT TAC -3' 5'- TAG CGA TTC CGA CTT CA-3'	378	FELSKE <i>et al.</i> , 1996	10 (alternativ 11 und 12)
F-243HGC mit 1346-R	5'- GGA TGA GCC CGC GGC CTA -3'	1103	HEUER <i>et al.</i> , 1997	13
F-203 α mit 1492-R	5'- CCG CAT ACG CCC TAC GGG GGA AAG ATT TAT-3'	1289	GOMES <i>et al.</i> 2001	14
NS-1 EF-3	5'- GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3' 5'- TCC TCT AAA TGA CCA AGT TTG -3'	~1750	SMIT <i>et al.</i> , 1999	15
FR1-GC mit NS-1	5'- CCC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GCC G AiC CAT TCA ATC GGT AiT -3' (i = Inosin)	~1650	VAINIO & HATULA, 2000;	16

Tabelle 13: Verwendete Temperaturprogramme zur PCR Amplifikation.
 *Verwendung der Polymerase „HotstarTaq“ Polymerase (Qiagen) statt „AmpliTaQ Gold“ (Applied Biosystems).

Programm	Primerpaar	Prädenaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zykluszahl	Elongation
1	A1-F/ A2-R	95°C, 10 min	95°C, 30sek	60°C, 30sek	72°C, 1min	35	72°C, 10min
2	CAMV1-F/ pac 3-R	95°C, 10 min	95°C, 1min	60°C, 1min	72°C, 2min	35	72°C, 10min
3 HotstarT*	CAMV-1F/ pac-3R	95°C, 15 min	95°C, 1min	60°C, 1min	72°C, 2min	35	72°C, 10min
4	npt8-F/ nosT8-R	95°C, 10 min	95°C, 1min	53°C, 1min	72°C, 2min	35	72°C, 10min
5	IVR-1F/ IVR-2R	95°C, 10 min	95°C, 30sek	64°C, 30sek	72°C, 1min	35	72°C, 10min
6	VW01/ VW03	94°C, 3 min	94°C, 1min	64°C, 1min	72°C, 1min	35	72°C, 10min
7 HotstarT*	PGSbar-A2/ PGSbar-B2	95°C, 15 min	95°C, 1min	54°C, 1min	72°C, 1min	40	72°C, 10min
8	EPSPS-CP1/ PFMV-2	94°C, 10min	94°C, 1mijn	65°C, 1min	72°C, 80sek	40	72°C, 10min
9	27-F/1492-R	95°C, 10 min	95°C, 1min	62°C, 1min	72°C, 90sek	35	72°C, 10min
10	F-984GC/ 1346-R	94°C, 5min	94°C, 90sek	60°C, 40sek	72°C, 40sek	35	72°C, 5min
11 alternativ	F-984GC/ 1346-R	94°C, 5min	94°C, 90sek	59°C od 61°C 40sek	72°C, 40sek	35	72°C, 5min
12 alternativ	F-984GC/ 1346-R	96°C, 10´	95°C, 90sek 95°C, 90sek	59°C, 50sek 61°C, 40sek	72°C, 1min 72°C, 1min	11 26	72°C, 10min
13	F-243HGC/ 1346-R	94°C, 5min	94°C, 1min	63°C, 1min	72°C, 2min	35	72°C, 10min
14	F-203 1492-R	94°C, 5min	94°C, 1min	56°C, 1min	72°C, 2min	30	72°C, 10min
15	NS-1/EF-3	94°C, 5min	94°C, 30sek	47°C, 45sek	72°C, 3min	25	72°C, 10min
16	FR1-GC/NS1	94°C, 5min	94°C, 30sek	48°C, 45sek	72°C, 3min	20	72°C, 10min

2.7 Einbeziehung der im BDF-Programm erhobenen Daten

Ein weiterer Aspekt des Pilotprojektes befaßte sich mit der Frage, inwieweit neben den Datenerhebungen im BDF-Programm auch die im BDF-Programm durchgeführte Datenauswertung für ein GVO-Monitoring nutzbar ist. Daher wurden zunächst Recherchen über die Datenauswertung im BDF-Programm durchgeführt. Anschließend wurden die bisher durchgeführten Auswertungen als Grundlage für eine Charakterisierung von möglichen Referenzflächen zu transgenen Rapsfeldern verwendet.

Im Rahmen des BDF-Programms werden die vegetationskundlichen Erhebungen vom Niedersächsischen Landesamt für Ökologie durchgeführt. Datenreihen liegen hier seit 1992 vor, die in größeren zeitlichen Abständen ausgewertet werden. Im Jahr 2000 wurde die Firma Ecoplan vom NLO mit der Auswertung der vegetationskundlichen Daten aus den Jahren 1992 bis 2000 beauftragt (LINDERS & MEYER-SPETHMANN, 2001). Dabei wurden neben den floristischen und vegetationskundlichen Daten auch eine Vielzahl von Basisdaten ausgewertet, sowie Korrelationen zwischen den ermittelten Artenzahlen und abiotischen Faktoren erstellt. In Tab. 14 sind für ein GVO-Monitoring relevant erscheinende Datensätze dargestellt, im Rahmen der Ecoplan-Studie grafisch oder tabellarisch ausgewertet wurden. Allerdings wertete die Ecoplan-Studie nur die vegetationskundlichen Erhebungen in der Aufbauphase aus, somit lagen erst für wenige BD-Flächen Zeit-Datenreihen vor, die über die Veränderungen der Vegetation Auskunft geben können. In regelmäßigen Abständen sind jedoch weitere Auswertungen der weiteren Aufnahmen geplant.

Die im Rahmen der Ecoplan-Studie erstellten Karten dienen als Grundlage für die hier gewählte karteografische Darstellungen der Charakterisierung der BD Flächen bezüglich der abiotischen Faktoren und Kennwerte (Anhang A, Karten 17-32). In den Karten 17 ff., Anhang A werden beispielhaft Daten und grafische Darstellungen aus dieser Studie vorgestellt, die die Art und Weise der Auswertung der im BDF-Programm erhobenen abiotischen sowie vegetationskundlichen Parameter widerspiegeln. Die Darstellungen wurden im Hinblick auf die BD-Felder, in denen Raps in der Fruchtfolge auftritt bzw. Raps zum Aufnahmezeitpunkt angebaut wurde, modifiziert (Anhang A, Karten 34 bis 43).

Eine Zusammenstellung der bis zum Jahr 2000 erhobenen bodenmikrobiologischen Parameter sowie eine Bewertung bzgl. ihrer Aussagekraft finden sich bei HÖPER & KLEEFISCH, 2001.

Tabelle 14: Auflistung relevanter Datensätze bzw. Korrelationen für ein GVO-Monitoring, die im Rahmen der Auswertungen vegetationskundlichen Erhebungen der Aufbauphase (1992-2000) vom BDF-Programm grafisch oder tabellarisch ausgewertet wurden (LINDERS & MEYER-SPETHMANN, 2001).

Zeitraum: 1992-2000 unter Einbeziehung von 68 BDF-L

Basisdaten

- Böden
- Naturräume
- Bodenlandschaften
- Klima
- Luft
- Kennwerte BDF:
 - Gelände
 - Böden (Bodengenese, Bodenklassen, Bodentypen, Ertragspotential
 - Wasserhaushalt
 - Nutzung
 - Mineraldünger
 - Organische Düngung
 - Grundkalkung
 - Pflanzenschutzmittel

Gefäßpflanzen: Arten

- Kernflächen
 - Anzahl durchgeführte Erhebungen
 - Gesamt-Artenzahl, getrennt nach Jahren
 - Veränderungen in den Artenzahlen (Differenz zwischen Anzahl der ersten und der letzten Aufnahme)
- 1 ha Fläche
 - Artenzahl bei Erstaufnahme
 - Veränderung bei Wiederholungsinventur
- Umgebung
 - Gesamtartenzahl bei Erstaufnahme
 - Rote Liste Arten bei Erstaufnahme
 - Verhältnis Gesamtartenzahl/Rote Liste Arten
- Artenzahlen im Vergleich von Umgebung /1 ha-Fläche und Kernflächen
 - Auswertung nach Zeigerwerten
 - Feuchte-, Reaktions-, Nährstoffzeiger, Störungs- und Extremzeiger, Flechten

Korrelationen

- Artenzahl und Böden
- Artenzahl und Einsatz von Pflanzenschutzmittel
- Artenzahl und Dünger

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen der Flora und Vegetation

3.1.1 Floristische Kartierungen

Vegetationsaufnahmen in den Kernflächen (vFF, vBDF)

Die Ergebnisse der Vegetationsaufnahmen sind in Tab. 15 dargestellt. Aufgrund der nur rudimentär entwickelten Ackerbegleitfluren in den Vegetationsaufnahmen (vFF und vBDF) lassen sich hinsichtlich der Gesellschaftszugehörigkeit keine Aussagen machen. Nur in den Aufnahmen des Untersuchungsgebiets BDF008-L erreichte die Begleitvegetation 20% Deckung, wofür abgesehen vom Ausfallgetreide des Vorjahres nur eine Art, das Acker-Stiefmütterchen (*Viola arvensis*) verantwortlich war. Die übrigen Arten blieben in diesen wie auch in den Vegetationsaufnahmen der anderen Untersuchungsgebiete bei Deckungsgraden unter 5%, wobei in vielen Fällen nur ein einzelnes oder äußerst wenige Individuen festgestellt werden konnten. Die extreme Verarmung der Begleitfluren spiegelt sich auch in den geringen Artenzahlen der Einzelaufnahmen von 3 bis 9 pro 50 qm wider. Insbesondere die für eine pflanzensoziologische Einordnung wichtigen Charakterarten niedriger Syntaxa sind kaum vertreten, so dass die Benennung einer Assoziation unterbleiben muss. Nach DIERSCHKE (1994) ist dagegen eine Ansprache als so genannte Fragmentgesellschaft möglich. Dem Rechnung tragend werden die Aufnahmen 1 bis 4, 8, 9, 11 und 12 (Tab. 15) als Papaveretalia-Fragmentgesellschaft, die restlichen als *Violenea arvensis*-Fragmentgesellschaft aufgefasst.

Tabelle 15: Vegetationsaufnahmen in der Freisetzungsfäche bei Sichte (vFF, Spalte 1 bis 4) und innerhalb der Bodendauerbeobachtungsflächen (vBDF, Spalte 5 bis 16).

lfd. Nummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Fläche	vFF	vFF	vFF	vFF	vBDF012	vBDF012	vBDF012	vBDF012	vBDF008	vBDF008	vBDF008	vBDF008	vBDF010	vBDF010	vBDF010	vBDF010
Datum	9.5.01	9.5.01	9.5.01	9.5.01	10.5.01	10.5.01	10.5.01	10.5.01	9.5.02	9.5.02	9.5.02	9.5.02	5.5.03	5.5.03	5.5.03	5.5.03
Exposition	N	N	N	N	----	----	----	----	----	----	----	----	N	N	N	N
Hangneigung	ca. 5 %	ca. 5 %	ca. 5 %	ca. 5 %	----	----	----	----	----	----	----	----	< 1%	< 1%	< 1%	< 1%
Deckung	ca. 90%	ca. 95 %	ca. 90%	ca. 90%	ca. 90%	ca. 85 %	ca. 90%	ca. 90%	ca. 40%	ca. 60 %	ca. 40%	ca. 50%	ca. 95%	ca. 90%	ca. 90%	ca. 95%
Deckung der Begleitvegetation	ca. 1%	ca. 1%	ca. 1%	ca. 1%	ca. 1%	ca. 3%	ca. 3%	ca. 2%	ca. 20%	ca. 20%	ca. 20%	ca. 20%	ca. 5%	ca. 2%	ca. 2%	ca. 2%
Größe der Probestfläche	7 x 7 m ²	7 x 7 m ²	7 x 7 m ²	7 x 7 m ²	16 x 3 m ²											
Bemerkungen			2,5 m ² Wildlager													
Artenzahl ¹	3	4	4	4	3	4	3	5	8	7	8	7	9	9	9	8
Charakterarten der Klasse <i>Stellarietea mediae</i>, Ackerwildkraut- und Raukengesellschaften.																
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	0.1 r	.	0.1+	0.1	0.1	0.1+	0.1
<i>Chenopodium album</i>	0.1+	.	.	.
<i>Polygonum convolvulus</i>	0.1	0.1	0.1	0.1
<i>Stellaria media</i>	0.1	.	.	0.1+	.	0.1r	0.1+	.
<i>Tripleurospermum perforatum</i>	.	0.1 r
<i>Tripleurospermum perforatum</i> jv. ²	0.1 r	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Charakterarten der Unterklasse <i>Violenae arvensis</i>, Ackerwildkraut-Gesellschaften																
<i>Viola arvensis</i>	0.1+	0.1+	0.1	0.1+	0.1+	0.1	0.1	0.1 r	0.4	1-	1+	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1
<i>Myosotis arvensis</i>	0.1+	0.1r	.	.	.	0.1r	.	.	.
Charakterarten der Ordnung <i>Papavretalia rhoeadis</i>, Klatschmohn-Gesellschaften																
<i>Alopecurus myosuroides</i> (z. T. jv.)	0.1+	0.1	0.1	0.1	.	.	.	0.1	.	.	.	0.1+
<i>Thlaspi arvense</i>	0.1	.	0.1r
Charakterarten des Verbandes <i>Fumario Euphorbion</i>, Erdrauch-Wolfsmilch-Gesellschaften																
<i>Fumaria officinalis</i>	.	.	.	0.1+
Charakterarten de Unterverbandes <i>Aphanenion</i>, Ackerfrauenmantel-Gesellschaften																
<i>Veronica hederifolia</i> ssp. <i>hederifolia</i>	.	0.1+	0.1 r	0.1 r	0.1r
Begleiter																
<i>Acer pseudoplatanus</i> jv.	.	.	0.1 r
<i>Cirsium arvense</i>	0.1
<i>Elymus repens</i>	0.1r	.	.	.
<i>Galium aparine</i>	0.1	0.1	0.1+	.	0.1	0.1	0.1
<i>Polygonum aviculare</i>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1+	0.1+	0.1
<i>Senecio vulgaris</i>	0.1r
<i>Sisymbrium officinale</i>	0.1r
<i>Trifolium pratense</i>	0.1r	0.1r	0.1r
nicht identifizierte																
<i>Epilobium</i> spec.	0.1r
<i>Triticum aestivum</i> / <i>Hordeum vulgare</i> (Vorfrü.)	0.1	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4	1-	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1
<i>Vicia</i> spec.	0.1	0.1	0.1	0.1+
Dikotyle Keimlinge unbek. Artzugehörigkeit	0.1	0.1	0.1	0.1+	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Poaceae, Kümmerwüchsige u. Jungpflanzen	0.1+	0.1+	0.1	0.1+	0.1	0.1	0.1	0.1

¹ Minimumangabe, da nicht alle Individuen identifiziert werden konnten; ² Verwechslungen mit Jungpflanzen von *Matricaria recutita* nicht auszuschließen

Floristische Untersuchungen der 1-ha BDF bzw. 0,4 ha FF

Sowohl die Untersuchungsflächen des Bodendauerbeobachtungsprogramms (1 ha-BDF) als auch die eigentliche Freisetzungsfläche in Sickte (FF, 0,4 ha) zeichneten sich in allen drei Untersuchungsjahren durch ein äußerst geringes Aufkommen von Ackerbegleitarten aus (Tab. 16). Betrachtet man die beiden über mehrere Jahre untersuchten Flächen, die Freisetzungsfläche und die BDF012-L, wird deutlich, dass die in einem Jahr erfasste Ackerbegleitflora nur ein unzureichendes Bild der Gesamtheit der auf diesen Flächen vorkommenden Arten wiedergibt. So wurde auf der Freisetzungsfläche in Sickte in den einzelnen Untersuchungsjahren nur ca. 63% (in 2001 und 2002) bzw. 32% (2003) von allen dort registrierten Arten festgestellt. Auf der Untersuchungsfläche BDF012-L betrug die entsprechenden Anteile 81% (2001), 48% (2002) und 33% (2003). Dass durch die Standortfaktoren von Jahr zu Jahr sehr verschiedenartige Begleitfloren gefördert werden, wird besonders deutlich, wenn man den Anteil der in allen drei Jahren vorkommenden Arten berechnet (Abb. 11). Im Untersuchungsgebiet (UG) Sickte (FF) beträgt er etwa 17%, im UG BDF012-L 19%. Weitere 24% (beide UG's) wurden in 2 Untersuchungsjahren festgestellt. Der Anteil der nur in einem der drei Jahre registrierten Arten beträgt dagegen 59% bzw. 57%.

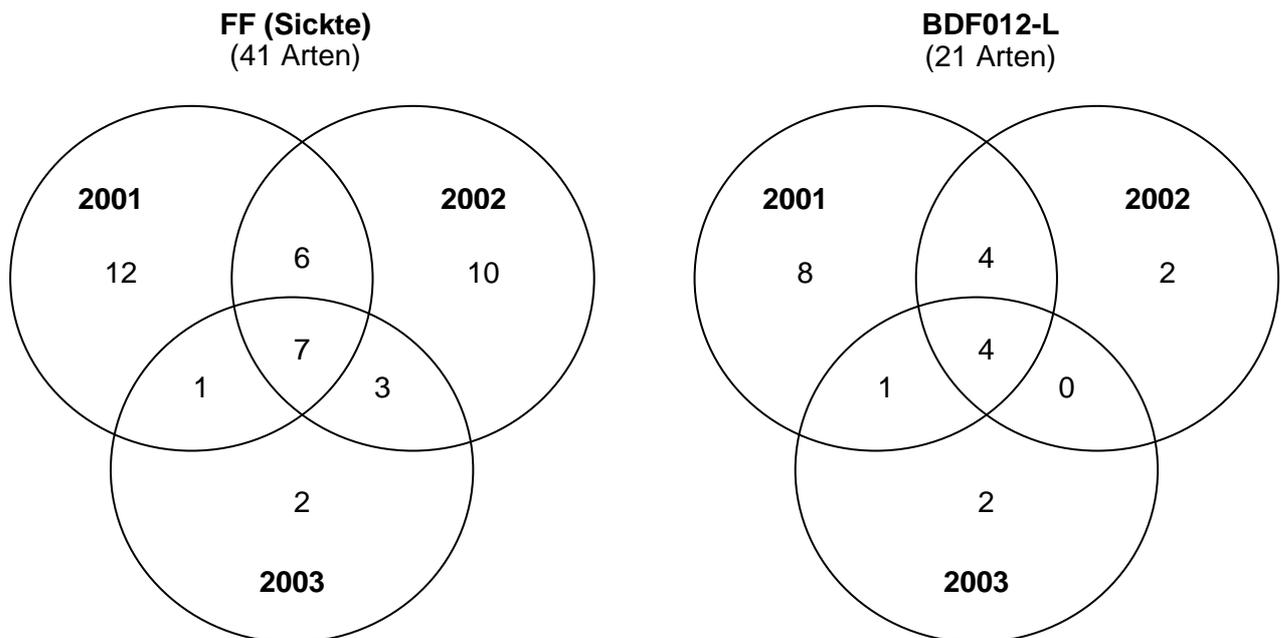


Abbildung 11: Die Artenzahlen der Freisetzungsfläche (FF) und der BDF012-L im Verlauf der drei Untersuchungsjahre. Die Schnittmengen geben jeweils die Anzahl der Arten wieder, die in mehreren Jahren registriert wurden.

Tabelle 16: Gefäßpflanzenarten der FF Sickte (0,4 ha) und der 1 ha-BDF aller drei Untersuchungsjahre (x,y,z) sowie die pflanzensoziologische Zugehörigkeit.

erfasste Arten	FF 2001	FF 2002	FF 2003	BDF012-L 2001	BDF012-L 2002	BDF012-L 2003	BDF008-L 2002	BDF010-L 2003
Charakterarten der Klasse <i>Stellarietea mediae</i> und der Unterkl. <i>Violenea arvensis</i> (Ackerwildkraut- u. Rauken-Gesellschaften)								
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	x	y	z	x	y	.	y	z
<i>Viola arvensis</i>	x	y	z	x	y	z	y	z
<i>Myosotis arvensis</i>	x	y	z	x	.	z	y	z
<i>Tripleurospermum perf.</i>	x	y	z	x	y	.	y	.
<i>Stellaria media</i>	.	y	.	.	y	.	y	z
<i>Lamium purpureum</i>	x	y	.	x
<i>Veronica arvensis</i>	.	y	.	x
<i>Anagallis arvensis</i>	x
<i>Sonchus oleraceus</i>	x
<i>Urtica urens</i>	x
<i>Lamium amplexicaule</i>	.	y
<i>Senecio vulgaris</i>	.	y
<i>Polygonum convolvulus</i>	.	y	z	.	.	.	y	z
Charakterarten der Ordnung <i>Papaveretalia rhoeadis</i> (Klatschmohn-Gesellschaften)								
<i>Alopecurus myosuroides</i>	x	y	z	x	y	.	y	.
<i>Thlaspi arvense</i>	x	y	z	.	.	z	y	.
<i>Veronica persica</i>	x	y	.	x
<i>Papaver rhoeas</i>	x	y
<i>Sinapis arvensis</i>	y	.
Charakterarten des Verbandes <i>Fumario-Euphorbion</i> (Erdrauch-Wolfsmilch-Gesellschaften) und untergeordneter Gesellschaften								
<i>Fumaria officinalis</i>	x	y	z	x	.	.	y	.
<i>Veronica polita</i>	x	y
Charakterarten d. Verbandes <i>Aphanenion</i> (Windhalm-Ges.) u. untergeord Ges. i. d. Ordnung <i>Sperguletalia arvensis</i> (Ackerspergel-Ges.)								
<i>Veronica hed. ssp. hed.</i>	x	y	y	.
<i>Matricaria recutita</i>	.	y	.	x	.	.	.	z
<i>Apera spica-venti</i>	z	.	z
<i>Galeopsis tetrahit</i>	z
<i>Vicia sativa agg.</i>	z
<i>Vicia tetrasperma</i>	z
Begleiter								
<i>Cirsium arvense</i>	.	y	z	x	y	z	y	z
<i>Galium aparine</i>	x	y	.	x	y	z	y	z
<i>Triticum, Hordeum, Vorrucht</i>	x	.	z	x	.	.	y	.
<i>Poa annua</i>	.	y	.	x	y	z	.	.
<i>Acer pseudoplatanus*</i>	x
<i>Carduus crispus jv. *</i>	x
<i>Conyza canadensis</i>	x
<i>Epilobium tetragonum*</i>	x
<i>Erysimum cheiranthoides</i>	x
<i>Lactuca serriola*</i>	x
<i>Matricaria discoidea</i>	x
<i>Urtica dioica*</i>	x
<i>Taraxacum officinale agg.</i>	.	y	z
<i>Cirsium vulgare*</i>	.	y
<i>Brassica napus</i>	.	y
<i>Artemisia vulgaris*</i>	.	y
<i>Polygonum amphibium</i>	.	.	z
<i>Atriplex patula</i>	.	.	z	.	.	.	y	.
<i>Sisymbrium officinale</i>	x	y	.
<i>Epilobium spec.*</i>	.	y	y	.
<i>Elymus repens</i>	.	.	.	x	.	.	y	z

Tabelle 16: Gefäßpflanzenarten der FF Sickte (0,4 ha) und der 1 ha-BDF aller drei Untersuchungsjahre (x,y,z) sowie die pflanzensoziologische Zugehörigkeit.

erfasste Arten	FF 2001	FF 2002	FF 2003	BDF012-L 2001	BDF012-L 2002	BDF012-L 2003	BDF008-L 2002	BDF010-L 2003
<i>Plantago major</i>	.	.	.	x
<i>Poa trivialis</i>	.	.	.	x	y	.	.	z
<i>Bromus sterilis</i>	y	.	.	.
<i>Polygonum aviculare agg.</i>	y	z
<i>Trifolium pratense*</i>	z
<i>Polygonum lapathifolium</i>	z
<i>Bromus hordeaceus*</i>	z
<i>Rumex obtusifolius*</i>	z
Artenzahl pro Jahr	26	26	13	17	10	7	19	19
Artenzahl gesamt	41			21			19	19

*Arten, die nicht zur charakteristischen Ackerbegleitflora zählen

Floristische Untersuchungen der Gesamtäcker (aFF, aBDF)

Die auf den Äckern festgestellten Gefäßpflanzenarten sind im Anhang B, Tab. 1 aufgelistet. Die Wiederholung der Aufnahme der Artenbestände des gesamten Ackers, in dem die Freisetzungsfäche lag (aFF) und auch des kompletten Ackers aBDF012-L in den Untersuchungsjahren 2002 und 2003 hat zu einer wesentlichen Vervollständigung der ackerbezogenen Artenlisten geführt. So wurden auf dem Freisetzungssacker im zweiten Untersuchungsjahr weitere 19 Arten neu gefunden, was 25 % aller Arten auf diesem Acker entspricht. Im Jahr 2003 waren dies weitere 6 Arten (7,9%). Auf dem Acker des Untersuchungsgebiets BDF012-L (aBDF) wurden in 2002 11 Arten (21,2%) neu gefunden und in 2003 10, also etwa 19,2% aller dort festgestellter Arten (Tab.17).

Tabelle 17: Die Artenzahlen auf den gesamten Flächen der untersuchten Äcker und der Anteil der in den einzelnen Untersuchungsjahren neu registrierten Arten in absoluten Artenzahlen und in % der jeweiligen Gesamtartenzahlen; berechnet unter Berücksichtigung aller Arten und alternativ unter Berücksichtigung ausschließlich ackertypischer Arten

Untersuchter Acker	Artenzahlen in 2001	Zusätzliche Arten in 2002	Zusätzliche Arten in 2003	Gesamter Untersuchungs- zeitraum
aFF (Sickte) berechnet für alle registrierten Arten	51 (67,1%)	19 (25,0%)	6 (7,9%)	76 (100%)
aFF (Sickte) abzügl. untypischer Vorkommen	43 (84,3%)	6 (11,8%)	3 (3,9%)	51 (100%)
aBDF012-L berechnet für alle registrierten Arten	31 (59,6%)	11 (21,2%)	10(19,2%)	52 (100%)
aBDF012-L abzügl. untypischer Vorkommen	29 (85,3%)	2 (5,9%)	3(8,8%)	34 (100%)

Da ein wesentlicher Anteil der Neufunde durch Arten zustande kam, die in die Randbereiche der Äcker hereingetragen werden und dort nur für kurze Zeit fortbestehen können, wurde die oben genannte Betrachtung nach Bereinigung um eben diese Arten erneut vollzogen. Dabei blieben alle Arten unberücksichtigt, die nicht zu der charakteristischen Ackerbegleitflora gerechnet werden. (In Tab. 16 und Anhang A, Tab. 1 sind diese Arten mit „*“ gekennzeichnet). Beispielhaft seien hierfür Arten der Grünlandgesellschaften oder der mehrjährigen Ruderalgesellschaften erwähnt, die zwar gelegentlich in den Acker hinein getragen werden können, die aber aufgrund ihrer Mehrjährigkeit keine Überlebenschance im jährlichen Bewirtschaftungstakt der Bodenbearbeitung haben. Danach ergeben sich für den Freisetzungssacker in Sichte 6 (11,8% von insgesamt 51) typische Ackerbegleitarten (Tab. 17) die im zweiten Untersuchungsjahr gefunden wurden. In 2003 wurden weitere 3 Ackerbegleitarten neu festgestellt, was 3,9% entspricht. Auf dem Acker der BDF012-L wurden dem entsprechend 2 von 34 (5,9%) im zweiten Jahr und 3 weitere (8,8%) in 2003 registriert.

- Pflanzensoziologische Charakterisierung

Bei Betrachtung der Arten, die auf den Probeflächen (FF und BDF) festgestellt wurden, lassen sich verschiedene Gruppen entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu den verschiedenen Einheiten des pflanzensoziologischen Systems unterscheiden. Zunächst sind die Begleiter abzugrenzen, die Charakterarten ganz anderer Gesellschaften darstellen, die jedoch regelmäßig oder auch nur in seltenen Ausnahmefällen auf Äckern zu finden sein können. Bezogen auf die jeweilige Gesamtartenzahl beträgt ihr Anteil zwischen 30% und 50%. Des Weiteren wurden zahlreiche Charakterarten der Klasse *Stellarietea mediae* und der Unterklasse *Violenea arvensis* erfasst. Sie kennzeichnen generell die Begleitgesellschaften der Äcker. Diese überwiegend sehr häufigen und weit verbreiteten Arten lassen meist keine Schlüsse auf spezielle standörtliche Gegebenheiten auf den betrachteten Flächen zu.

Die diesbezüglich spezifischeren Charakterarten der Ordnung *Papaveretalia rhoeadis* und des Verbandes *Fumario-Euphorbion* kennzeichnen demgegenüber Ackerbegleitgesellschaften der gut nährstoffversorgten basenreichen Lehm- und Lößböden, wie sie im niedersächsischen Hügelland weit verbreitet sind. Im Gegensatz dazu sind die Charakterarten der Ordnung *Sperguletalia arvensis* mit dem Verband *Aperion spicae-venti* als kennzeichnend für basenärmere Böden anzusehen. Die Betrachtung der Artenlisten legt den Schluss nahe, dass die Gesellschaften aller Flächen mit Ausnahme der der BDF010-L in der Ordnung der Klatschmohn-Gesellschaften anzusiedeln sind. Das Fehlen von *Papaveretalia*-Arten in der BDF010-L sowie die deutliche Häufung von Charakterarten der Ackerspergel-Gesellschaften lässt dagegen eine Zugehörigkeit zu dieser Ordnung wahrscheinlich erscheinen.

3.1.2 Vorkommen von Raps und seinen potenziellen Kreuzungspartnern

In allen drei Untersuchungsgebieten wurden während des gesamten Untersuchungszeitraumes hauptsächlich Vorkommen von *Sinapis arvensis* und *Brassica napus* registriert. Darüber hinaus wurden *Brassica rapa*, *Diplotaxis muralis*, *Raphanus sativus*, *Raphanus raphanistrum* und *Sinapis alba* festgestellt; das allerdings nur an wenigen Fundorten. Die Fundorte der potenziellen Kreuzungspartner in der Umgebung der Untersuchungsgebiete sind in den Karten 1-3, 8-10 und 14-16 (Anhang A) dargestellt. Im UG Sickte und BDF012-L wurden die Aufnahmen über 3 Jahre durchgeführt. Die Fundorte von potenziellen Kreuzungspartnern, die in den verschiedenen Jahren am selben Standort erneut aufgefunden worden sind, sind in den Karten 4-6 und 11-13 (Anhang A) dargestellt. Eine komplette Auflistung aller in den fünf Gebieten registrierten Funde befindet sich im Anhang B, Tab. 2-10. In Tab. 18 sind die Individuenzahlen und Fundorte der erfassten Kreuzblütler-Arten in den verschiedenen Lebensraumtypen dargestellt. Tab. 19 gibt eine Übersicht über die Häufigkeit von Vorkommen des Rapses und Acker-Senfs in verschiedenen Lebensraumtypen.

Tabelle 18: Übersicht über alle Individuenzahlen (erste Angabe) und Anzahl der Fundorte (zweite Angabe) der erfassten Kreuzblütler-Arten in den verschiedenen Lebensraumtypen sortiert nach Untersuchungsgebiet und -jahr.

Registrierte Art	Unter- suchungs- gebiet	Jahr	Lager- u. Brach- flächen	Straßen- und Weg- ränder	Äcker	Acker- ränder	sonstige	gesamt (gerundet)
<i>Brassica napus.</i>	Sickte	2001	29/4	33/7	ca. 1700/3	ca. 1300/9	5/4	ca. 3000/27
		2002	1/1	33/6	ca. 38/6	ca. 200/3	4/1	ca. 280/17
		2003		12/3	ca.	ca. 3000/5		ca.
	BDF012-L	2001		9/6	ca. 4000/2	7/2	10/1	ca. 4000/11
		2002			ca. 280/2			ca. 280/2
		2003		1/1	ca. 23000/7	ca. 600/6		ca.
	BDF058-L	2001	40/2	ca. 130/9	28/2	50/2		ca. 250/15
	BDF008-L	2002			ca. 1500/6			ca. 1500/6
	BDF010-L	2003		ca. 200/4	ca. 5300/3	ca. 540/4		ca. 6000/11
<i>Brassica rapa</i>	Sickte	2001		ca. 72/2				ca. 72/2
		2002						
		2003						
	BDF012-L	2001						
		2002						
		2003						
	BDF058-L	2001						
BDF008-L	2002							
BDF010-L	2003							
<i>Brassica spec.</i>	Sickte	2001						
		2002						
		2003		ca. 200/1				ca. 200/1
	BDF012-L	2001						
		2002						
		2003						
	BDF058-L	2001						
	BDF008-L	2002			2/1	1/1		3/2
BDF010-L	2003							
<i>Diplotaxis muralis</i>	Sickte	2001		11/1				11/1
		2002		120/1				120/1
		2003		15/1				15/1
	BDF012-L	2001						
		2002						
		2003						
BDF058-L	2001							

Registrierte Art	Unter- suchungs- gebiet	Jahr	Lager- Brach- flächen	u. Straßen- und Weg- ränder	Äcker	Acker- ränder	sonstige	gesamt (gerundet)
	BDF008-L	2002						
	BDF010-L	2003						
<i>Raphanus raphanistrum</i>	Sickte	2001						
		2002						
		2003						
	BDF012-L	2001		1/1				1/1
		2002						
		2003						
	BDF058-L	2001						
	BDF008-L	2002						
	BDF010-L	2003	1/1				ca.1100/2	1/1
2003								
BDF058-L	2001							
	2002							
BDF010-L	2003	1/1				ca.1100/2	1/1	ca. 1100/4
	2003							
<i>Raphanus sativus</i>	Sickte	2001						
		2002						
		2003						
	BDF012-L	2001		1/1				1/1
		2002						
		2003						
BDF058-L	2001							
BDF008-L	2002			3/1			3/1	
BDF010-L	2003							
<i>Sinapis alba</i>	Sickte	2001						
		2002						
		2003						
	BDF012-L	2001					1/1	1/1
		2002						
		2003				21/1		21/1
BDF058-L	2001			1/1	1/1	4/1	6/3	
BDF008-L	2002				1/1		1/1	
BDF010-L	2003							
<i>Sinapis arvensis</i>	Sickte	2001	ca. 1400/12	7/3	ca. 750/3	ca. 210/9	41/1	ca. 2400/28
		2002	22/1	67/5	ca. 1000/6	ca. 80/10	ca. 400/1	ca. 1600/23
		2003	ca. 5400/7	46/3	ca. 210/3	2/2		ca. 5700/15
	BDF012-L	2001		1/1	ca. 500/3	ca. 230/6		ca. 730/10
		2002			20/3			20/3
		2003			ca. 15000/2	ca. 5700/6	1/1	ca. 21000/9
	BDF058-L	2001	3/2	1/1	1/1	8/2	1/1	14/7
	BDF008-L	2002			ca. 570/3	2/2		ca. 580/5
BDF010-L	2003		1/1				1/1	

Tabelle 19: Übersicht über die Häufigkeit von Vorkommen des Rapses (*Brassica napus*) und des Acker-Senfes (*Sinapis arvensis*) in verschiedenen Lebensraumtypen. Die Angaben beruhen auf geschätzten Individuenzahlen und sind gerundet.

Art und Messgröße	Lager- u. Brach- flächen	Straßen- u. Weg- ränder	Äcker	Acker- ränder	sonstige	gesamt
<i>Brassica napus</i> (Raps)						
Individuenzahl (abs.)	70	420	58000	5700	19	65000
Individuenzahl (%)	0,1	0,7	89	9	0,03	100
Fundorte (abs.)	7	36	36	31	6	116
Fundorte (%)	6	31	31	27	5	100
durchschnittliche Individuenzahl pro Fundort	10	12	1600	180	3	560

Fortsetzung Tab. 19						
Art und Messgröße	Lager- u. Brachflächen	Straßen- u. Wegränder	Äcker	Acker-ränder	sonstige	gesamt
<i>Sinapis arvensis</i> (Ackersenf)						
Individuenzahl (abs.)	6900	120	17000	6200	440	32000
Individuenzahl (%)	22	0,4	56	19	1	100
Fundorte (abs.)	22	14	24	37	4	101
Fundorte (%)	22	14	24	37	4	100
durchschnittliche Individuenzahl pro Fundort	310	9	750	170	110	320

3.1.3 Vorkommen des Transgens in den Kreuzblütlerbeständen

Um die Möglichkeit der Auskreuzung der gentechnischen Veränderung in die Kreuzblütlerbestände zu überprüfen, wurden die in der Umgebung des Versuchsackers erfassten Kreuzblütler beprobt, um sie auf das Transgen untersuchen zu können. Die Untersuchung der kartierten und beprobten Pflanzen aus der Umgebung der BDF diente der Erfassung eines Ausgangszustandes. Die Beprobung erfolgte im ersten Untersuchungsjahr im Umkreis der Freisetzungsfäche in Sickte durch Entnahme von sowohl Blatt-, als auch reifem und unreifem Samenmaterial. In den folgenden Jahren, sowie auch auf allen Referenzflächen bestanden die Proben ausschließlich aus Blattmaterial, da sich Sammlung und Analyse des Samenmaterials im ersten Jahr als zu aufwendig erwiesen hatte.

Untersuchung der Blattproben 2001

Im Untersuchungsgebiet Sickte wurden 2001 an 55 Standorten Kreuzblütler der Arten *Brassica napus*, *Sinapis arvensis*, *Sinapis alba*, *Brassica rapa* sowie *Diplotaxis muralis* aufgefunden und soweit möglich, beprobt. Blattproben wurden von 1128 Individuen entnommen und getrennt nach Arten als 16 Sammelproben mit maximal 100 Einzelblättern untersucht. Im Untersuchungsgebiet BDF012-L resultierten auf die gleiche Weise 7 Sammelproben aus 319 Individuen und im UG BDF058-L 4 Sammelproben aus 134 Einzelblättern. In keiner der insgesamt 27 Sammelproben (bestehend aus 1580 Einzelblattproben) der drei Untersuchungsgebiete wurde dabei die transgene Sequenz nachgewiesen.

Blattproben 2002

Für eine routinemäßige molekulargenetische Untersuchung auf das Vorkommen des Transgens in den Kreuzblütlerbeständen hatte sich die 2001 entwickelte Verfahrensweise bewährt, da dieses Vorgehen den Arbeitsaufwand für ein "Screening" auf ein praktikables Maß reduziert. Im Untersuchungsgebiet Sickte resultierten 2002 auf diese Weise aus dem Material von 582 Individuen 18 Sammelproben, im Untersuchungsgebiet BDF008-L waren es 11 Sammelproben aus 542 Einzelblattproben. In keiner der insgesamt 29 Sammelproben (be-

stehend aus 1124 Einzelproben) aus beiden Untersuchungsgebieten konnte die transgene Sequenz nachgewiesen werden.

Blattproben 2003

Auch im dritten Untersuchungsjahr wurden Blattproben aus dem Untersuchungsgebiet Sickte und einem neu hinzugenommenen Referenzgebiet des BDF-Programms (BDF010-L) gesammelt. Vom UG Sickte wurden 462 Einzelblattproben in 8 Sammelproben, sowie vom UG BDF010-L 558 Blätter in 12 Sammelproben molekulargenetisch auf das Vorkommen des Transgens hin untersucht. Auch in keiner dieser insgesamt 20 Sammelproben (resultierend aus 1020 Einzelblattproben) wurde die transgene Sequenz nachgewiesen.

Schotenuntersuchungen 2001 aus Sickte

Wie unter Kap. 2.3.3. beschrieben, wurden von weiteren Kreuzungspartnerfunden im UG Sickte Samen entnommen und untersucht, um Informationen über eine möglicherweise erfolgte Auskreuzung durch den transgenen Winterraps im ersten Untersuchungsjahr zu erhalten. Die Untersuchungen unreifer Samen umfaßten 60 Schotenproben mit jeweils etwa 30 Körnern. Insgesamt wurden auf diese Weise ungefähr 1800 unreife Samen untersucht. Dabei war keine der analysierten Proben positiv für das untersuchte Transgen (Tab. 20).

Tabelle 20: Anzahl untersuchter Blatt- und Schotenproben in den verschiedenen Untersuchungsgebieten

Untersuchungs-Gebiet	Untersuchungs-jahr	Einzelblätter	Sammelproben	Transgen-nachweis
Sickte	2001	1128	16	-
BDF012-L	2001	319	7	-
BDF058-L	2001	134	4	-
Sickte	2002	582	18	-
BDF008-L	2002	542	11	-
Sickte	2003	462	8	-
BDF010-L	2003	558	12	-
		unreife Samen	Schoten	
Sickte	2001	1800	60	-

Untersuchung der Samenproben 2001 aus Sickte

Die zusätzlich 2001 im Gebiet des Raps-Freisetzungversuches in Sickte gesammelten reifen Samenproben wurden ebenfalls analysiert. Zu diesem Zweck wurde das von den Fundorten 4, 24 und 25 (Anhang A, Karte 1 bzw. 7) entnommene reife Raps-Samenmaterial mit Hilfe des Keimungstestes auf eine mögliche Auskreuzung hin voruntersucht. Bei diesen Fundorten handelte es sich jeweils um Ackerränder von Getreidefeldern mit Ausfallraps des Vorjahres, der Abstand zum transgenen Feld betrug zwischen 400 m (Fundort 4) und 700 m (Fundort 25). Von den insgesamt etwa 9000 getesteten Samen (3000 je Fundort) zeigten lediglich 110 Keimlinge ein begrenztes Wachstum nach der Herbizidapplikation. Diese wur-

den für die weiterführende molekulargenetische Überprüfung entnommen. In diesen einzeln weiter getesteten Proben konnte in 3 Keimlingen der Fundorte 4 und 25 das Transgen nachgewiesen werden (Tab. 21).

Des Weiteren wurden mittels des Keimungstests auch Samen von Feldparzellen mit konventionellem Winterraps überprüft. Die Parzellen lagen in 300 bis 600 m Entfernung zum Versuchsfeld in südlicher Richtung (Fundort 55, Anhang A, Karten 1 und 7).

Von den 9000 untersuchten Samen wurden 41 Keimlinge in weitere molekulare Analysen einbezogen. In zwei Keimlingen wurde die transgene Sequenz mittels PCR-Analytik nachgewiesen. Diese stammten aus den Parzellen P1 und P3 (Tab. 21, Anhang A, Karte 7).

Alternativ zum Keimungstest wurde die gleiche Anzahl von Samen (jeweils etwa 3000) von denjenigen Teilparzellen, bei denen mittels Keimungstest Auskreuzungsereignisse festgestellt worden waren (P1 und P3), sowie von einer weiteren Parzelle im größtmöglichen Abstand zum transgenen Feld (P4), molekularbiologisch analysiert (DNA-Extraktion aus Tausendkornaliquots). Dazu wurden pro Teilparzelle 3x 1000 Samen mit der Vorwerkmühle gemahlen, die DNA isoliert und anschließend mittels PCR analysiert. In der Teilparzelle P1 konnte in einem der drei Tausend-Kornaliquots die gentechnische Veränderung nachgewiesen werden, damit lag die Auskreuzungsrate unter 0,1% (Auswertung anhand des Konzeptes zur Untersuchung von Saatgut auf Anteile von gentechnisch veränderten Linien des Unterausschuß „Methodenentwicklung“ des LAG für eine einheitliche länderübergreifende Überwachung).

Die beiden Verfahren (Keimungstest und DNA-Extraktion aus Tausendkornaliquots) ergaben übereinstimmende Ergebnisse und zeigten damit eine vergleichbare Nachweisempfindlichkeit. Der Arbeits- und Zeitaufwand ist beim Keimungstest jedoch höher. Dies ist hauptsächlich durch die zeitaufwendige Auslage der Samen in der Klimakammer und die nachfolgende Auswertung (Auswahl von potenziell transgenen Pflanzen und anschließende molekulare Untersuchung der einzelnen Keimlinge) bedingt. Zudem ist im Hinblick auf einen großen Probendurchsatz- was bei Routineuntersuchungen gängig ist - die DNA-Extraktion aus Tausendkornaliquots deutlich praktikabler.

Tabelle 21: Untersuchung reifer Samen mittels Keimungstest bzw. alternativ mittels molekularbiologischer Analysen von Tausendkornaliquots.

Sicke 2001 ----- Fundort	getestete Einzel- samen	molekulargenetisch untersuchte Keim- linge	Transgennachweis (Anzahl pos. geteste- ter Keimlinge)
4	3 x 1000	13	2
24	3 x 1000	20	-
25	3 x 1000	77	1
55, Teilparzelle P1	3 x 1000	21	1
55, Teilparzelle P2	3 x 1000	6	-
55, Teilparzelle P3	3 x 1000	14	1
DNA-Extraktion aus Tausendkornaliquots			
	Anzahl untersuchter Tausendkornali- quots		Transgennachweis (Anzahl pos. Tau- sendkornaliquots)
55, Teilparzelle P1	3		1
55, Teilparzelle P3	3		-
55, Teilparzelle P4	3		-

3.2 Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit transgener Sequenzen (Ringversuch)

Wie in Kap. 2.4. beschrieben, wurde ein Ringversuch zur Qualitätssicherung zum molekularbiologischen Nachweis des 35S/pat-Gens mit den Partnern der Teilvorhaben aus Bremen und Bayern durchgeführt.

Es zeigte sich in allen teilnehmenden Laboren eine sichere Nachweisbarkeit des Transgens beim Einsatz von 100 pg DNA in die qualitative PCR. Dies entspricht etwa 77 Kopien des Transgens (Umrechnung s. Kap. 2.5.3). Im NLÖ-Labor war in einzelnen qualitativen Analysen ein Nachweis bis zu 20 pg DNA im Reaktionsansatz möglich, was etwa 15 Kopien des Transgens entspricht, die mit dem Primerpaar CaMV/pac 3R noch nachgewiesen werden können. Bei nachträglich durchgeführten quantitativen PCR-Analysen konnten im NLÖ-Labor Verdünnungen mit bis zu zwei Kopien noch nachgewiesen werden. Ähnliche Nachweisgrenzen wurden auch vom Partner des Teilvorhabens aus Bayern ermittelt.

Die Ergebnisse wurden im Auftrag des Ökologiebüros Hofmann am Institut für Statistik der Universität Bremen einer statistischen Auswertung unterzogen. Aus der statistischen Prüfung der Ergebnisse aller Ringversuchspartner geht hervor, dass ein sicherer Nachweis mit Doppelbestimmungen bei 40pg DNA/PCR, entsprechend 30 Kopien des untersuchten Merkmals, zu erwarten ist. Detailliertere Angaben sind dem Bericht des Bremer Partners zu entnehmen.

3.3 Untersuchungen des Bodens

3.3.1 DNA-Extraktion aus Boden

Vergleich verschiedener DNA-Extraktionsmethoden aus Boden und deren Validierung

Zur Dokumentation des Verbleibs von Transgenen im Boden und zur Analyse mikrobieller Gemeinschaften war es zunächst erforderlich, geeignete Methoden zur routinemäßigen Isolierung von Nukleinsäuren aus Bodenproben zu entwickeln. Wie in Kap. 2.5.2. beschrieben wurden im Verlauf des Projektes verschiedene Aufarbeitungsmethoden getestet. Zusammenfassend wird im Folgenden die Eignung der verschiedenen Methoden dargestellt.

Die durch Methode A (MOBIO-Kit mit vortexen) extrahierte DNA konnte mit den verschiedenen PCR-Nachweissystemen für Transgensequenzen gut amplifiziert werden und eignete sich auch für die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften (Kap. 3.3.3.2).

Methode B (MOBIO-Kit mit Retschmühle) eignete sich nicht zur Analyse mikrobieller Gemeinschaften, da Amplifikationen mit den für DGGE-Analysen notwendigen GC-Klammern nicht erfolgreich waren (s. Abb. 14).

Methode C (BIO 101-Kit) ergab zwar zu Methode A vergleichbar gute Amplifikate für DGGE-Analysen (Abb. 14, DGGE-Läufe nicht gezeigt), jedoch war die PCR-Nachweisempfindlichkeit transgener Sequenzen deutlich geringer als bei Methode A oder D. Bei quantitativen PCR-Analysen (Real-time PCR) konnten aus DNA-Reextrakten aus Bodenproben nach Methode C -auch nach Aufreinigung- keine transgenen Sequenzen nachgewiesen werden, im Gegensatz zur Extraktionsmethode A und D, die eine vergleichbare Nachweisempfindlichkeit aufwiesen (nicht gezeigt).

Methode D (Macherey & Nagel-Kit für Boden) wurde für die weiteren Analysen nicht weiter angewendet, da der Extraktionsaufwand deutlich größer ist als bei den anderen Methoden. Dies ist unter dem Kostenaspekt für ein Monitoring als nachteilig zu bewerten.

Anhand dieser Ergebnisse wurde im vorliegenden Projekt für die routinemäßige Untersuchung von DNA die Methode A ausgewählt.

- Qualitative PCR

Mittels Methode A konnte aus allen untersuchten Bodenproben (Tab. 22, 23) gut amplifizierbare DNA extrahiert werden. Dies wurde wie unter Kap. 2.3.3. beschrieben für Pflanzen-DNA mit einem universellen Primersystem (A1-F/A2-R) und für bakterielle DNA mit einem Prokaryonten Nachweis-System zur Amplifikation des 16S-rRNA-Gens überprüft. Die Gesamt-DNA-Ausbeute nach der Isolierung aus 0,5 g Bodenprobe betrug zwischen 0,5 und 5 µg DNA und richtete sich sowohl nach dem Bodentyp (Abb. 12) als auch dem Zeitpunkt der Probenahme. So wurden aus Bodenproben, die im Winter genommen wurden, teilweise niedrigere Ausbeuten erzielt (nicht gezeigt).

Tabelle 22: Bodentypen, an denen die DNA-Extraktionsmethode (Methode A) anhand von qualitativen PCR-Analysen erfolgreich getestet wurde.

Untersuchungsfläche	Hauptbodenart
Sickte	sandiger Schluff
Dahnsdorf	schluffiger Sand
BDF008-L	schluffiger Ton
BDF010-L	schwach- bis stark-lehmiger Sand
BDF012-L	toniger Schluff
BDF013-L	schluffig-sandiger Lehm
BDF058-L	mittel-lehmiger Sand
BDF065-L	mittel- bis stark-schluffiger Ton

oben:

- Spur 1: DNA Längenstandard
- Spur 2-5: DNA-Preparation aus schluffig-lehmigem Sandboden
- Spur 6-9: DNA-Preparation aus feinsandigem Mittelsand

unten:

- Spur 1: DNA Längenstandard
- Spur 2-5: DNA-Preparation aus schluffigem Tonboden
- Spur 6-9: DNA-Preparation aus sandigem Schluff

alle Preparationen mittels
UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit

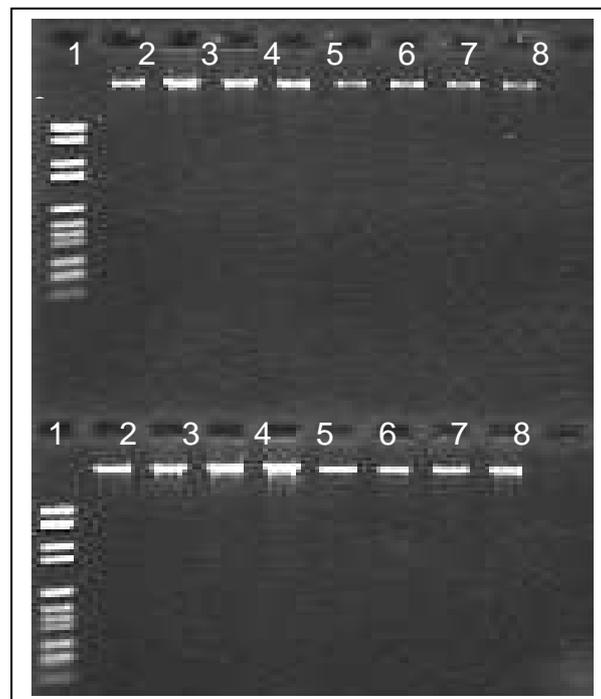


Abbildung 12: Elektropherogramm der Gesamt-DNA aus Bodenproben (Probenahme im Frühjahr)

Anhand von den Vorversuchen zum Nachweis des Transgens im Boden bei künstlich zuge-setzter Raps-DNA und anschließender Reextraktion wurden verschiedene PCR-Poly-merasen ausgetestet. Es zeigte sich, dass die alternativ zur „AmpliAq Gold“ Polymerase eingesetzten Enzyme „HotStarTaq“ und „Stoffel Fragment“ nicht zu einer Steigerung der Nachweisempfindlichkeit führten. In weiteren Laborversuchen wurde zudem überprüft, ob durch das angewendete Extraktionsverfahren nur extrazelluläre DNA und nicht DNA aus intaktem Pflanzenmaterial isoliert wird. Dazu wurde Bodenproben unzertheilt oder zerklei-

iertes transgenes Pflanzenmaterial zugesetzt. In der reextrahierten DNA konnten transgene Sequenzen nur in Ausnahmefällen nachgewiesen werden. Zudem wurde bei der Einwaage der zu analysierenden Bodenaliquote von 0,5 g darauf geachtet, dass keine Pflanzenteile mit einbezogen wurden.

Tabelle 23: Reextraktionseffizienz von DNA aus verschiedenen Böden. Je 0,5 g Boden wurden mit 700 ng DNA (500 ng DNA in Boden aus Sickte) aus transgenen Rapsamen versetzt. Die DNA wurde anhand der Methode A (MOBIO-Kit mit vorteilen) reextrahiert. Die in der Real-time PCR ermittelte Kopienzahl wurde in Relation zur eingesetzten Kopienzahl ermittelt, wobei für die Berechnung Verluste durch die Extraktion nicht berücksichtigt wurden. Bei allen Böden konnte ohne Zusatz von transgener DNA in den entsprechenden Extrakten keine transgenen Sequenzen nachgewiesen werden. Die Bodenproben von Sickte und Dahnsdorf stammten von Standorten, an denen mindestens 12 Monate keine transgenen Pflanzen angebaut wurden.

Boden	Hauptbodenart	% Reextraktion
BDF001-L	Toniger Schluff	16,8
BDF008-L	Schluffiger Ton	5,6
BDF013-L	Schluffig sandiger Lehm	21,7
BDF024-L	Sandiger Schluff	<0,1
BDF027-L	Feinsand	0,6
BDF032-L	Schluffiger sandiger Lehm	<0,1
Dahnsdorf	Schluffiger Sand	14
Sickte	Sandiger Schluff	25,8

- Quantifizierung der Extraktionsfähigkeit

Um die Reextraktionsfähigkeit von genomischer DNA aus verschiedenen Böden zu quantifizieren, wurden stichprobenartig Real-time PCR-Analysen durchgeführt (Tab. 23). Dazu wurden unterschiedliche Böden mit einer definierten Menge DNA aus transgenen HR-Rapsamen versetzt. Die in der Real-time PCR ermittelte Kopienzahl wurde in Relation zur eingesetzten Kopienzahl gesetzt, wobei für die Berechnung Verluste durch die Extraktion nicht berücksichtigt wurden. Da jeder Boden nur in zwei unabhängigen Wiederholungen aufgearbeitet wurde und nur 2 mal 2-4 Parallelmessungen jeder Probe in der Real-time PCR durchgeführt wurden, können die Ergebnisse nur als Hinweise gewertet werden. Sie ergaben jedoch bei allen Böden relativ niedrige Reextraktionsraten. Diese konnten auch bei Verwendung anderer Extraktionsverfahren (Methode C und D) nicht gesteigert werden (nicht gezeigt). Ebenso wie bei den qualitativen PCR-Untersuchungen zeigte sich auch hier eine deutliche Beeinflussung der Reextraktionseffizienz je nach Boden. Unabhängig von der Extraktionsmethode führte eine Aufreinigung der DNA-Extrakte mittels Genclean Spin-Kit (Fa.

Qbiogene) in der Regel zu weiteren, sehr hohen Verlusten (durchschnittlich 70%) im Vergleich zu nicht aufgereinigter DNA (nicht gezeigt). Mit einer Ausnahme (BDF008-L) konnten bei allen getesteten Böden, denen transgene DNA zugesetzt wurde, in den aufgereinigten Extrakten entweder keine transgenen Sequenzen (BDF027-L und 032-L) oder nur in geringeren Mengen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde die aus Boden isolierte DNA in den folgenden Untersuchungen sowohl für den qualitativen als auch quantitativen Nachweis von transgenen Sequenzen nicht mehr aufgereinigt.

3.3.2 Nachweis verschiedener Transgensequenzen aus Boden

3.3.2.1 Bestimmung der PCR-Nachweisempfindlichkeit

Qualitative PCR

Ausgehend von den in Kap. 3.3.1 dargestellten Validierungen wurde die PCR-Nachweisempfindlichkeit von verschiedenen transgenen Konstrukten in Bodenproben aus Sickte und BDF013-L untersucht.

In Vorversuchen wurden dazu zunächst Bodenproben aus Sickte verschiedene Mengen Gesamt-DNA (zwischen 325 ng und 3 µg) aus HR-Raps, HR-Mais und HR-Zuckerrüben (35S/pat-Gen) zugegeben und diese reextrahiert. Die reextrahierte DNA wurde anschließend in die beschriebenen PCR-Reaktionen (Kap. 2.3.3 und 2.5.3) in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt (Abb. 13, Tab. 24). Unter der Annahme, dass bei der Extraktion 100% der eingesetzten DNA wieder re-isoliert werden können, ergibt sich beispielsweise bei der Zugabe von 1 µg DNA pro 0,5 g Boden eine Konzentration von 20 ng/µl DNA im re-isolierten Extrakt. Durch die verschiedenen in die PCR eingesetzten Verdünnungsstufen ergeben sich die nachfolgend dargestellten PCR-Nachweisempfindlichkeiten.

Es zeigte sich, dass die Nachweisempfindlichkeit sowohl von der Menge zugesetzter DNA in den Boden als auch von der jeweiligen in die PCR eingesetzten Verdünnung abhing. Eine Verdünnung des in die PCR eingesetzten DNA-Extraktes verringert zwar einerseits die nachzuweisende Kopienzahl, andererseits werden dadurch ebenso die im Bodenextrakt vorliegenden Hemmstoffe (z.B. Huminsäuren) verdünnt, was dann eine Detektion prinzipiell ermöglicht. So konnte bei Zugabe von 500 ng DNA aus HR-Zuckerrüben, HR-Raps bzw. alternativ von HR-Mais zu den Bodenproben eine Nachweisempfindlichkeit von 1 ng bei Zuckerrübe, von 500 pg bei Mais und 65 -100 pg bei Raps (s. Abb. 13) ermittelt werden. Wurde dagegen 1 µg transgene DNA dem Boden zugesetzt, konnten auch in den Ansätzen mit HR-DNA aus Mais und Zuckerrüben jeweils Nachweisempfindlichkeiten von 100 pg ermittelt werden. Daher wurden im Folgenden den Bodenproben 1 µg DNA von verschiedenen Kulturpflanzen und Konstrukten zugesetzt. Dies ermöglichte den Vergleich verschiedener Primersysteme bzgl. ihrer PCR-Nachweisempfindlichkeit.

oben: Nachweis Amplifizierbarkeit (A1-F/A2-R)

Spur 1: DNA-Längenstandard
Spur 2-9: Amplifikate aus re-isolierter HR-Raps-DNA
in verschiedenen Konzentrationen:
Spur 2+6: 650pg Spur 3+7: 325pg
Spur 4+8: 162pg Spur 5+9: 65pg
Spur 10-12: Positivkontrollen
Spur 13: Blindwert

unten: Nachweis transgene Sequenz (CAMV1-F/pac3-R):

Spur 1: DNA-Längenstandard
Spur 2-9: Amplifikate aus re-isolierter HR-Raps-DNA
in verschiedenen Konzentrationen
Spur 2+6: 650pg Spur 3+7: 325pg
Spur 4+8: 162pg Spur 5+9: 65pg
Spur 10+12: Positivkontrollen
Spur 11: Negativkontrolle
Spur 13: Blindwert

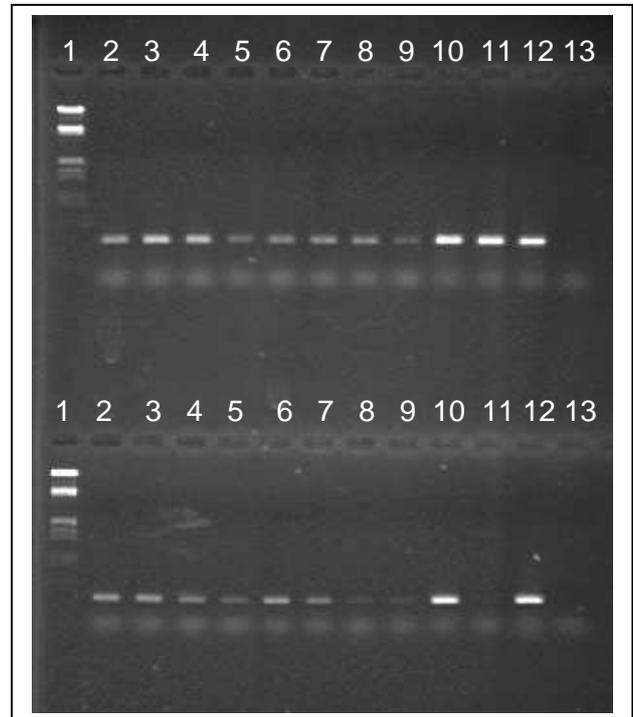


Abbildung 13: Amplifikation reextrahierter DNA nach Zugabe von HR-Raps DNA in Bodenproben aus Sickte mit universellem Eukaryonten-System (oben) und spezifischen Transgennachweis (unten), jeweils in zwei unabhängigen Wiederholungen. In Bodenproben ohne Zusatz transgener DNA konnten keine transgenspezifischen Nachweise geführt werden (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der PCR-Nachweisempfindlichkeit sind in Tab. 24 dargestellt. Dabei zeigte sich im Boden BDF013-L in der Regel eine geringere Nachweisempfindlichkeit als in Sickte. Dies ist vermutlich durch die verschiedenen Bodenarten bedingt.

Ebenso ergaben sich erwartungsgemäß Unterschiede je nach verwendetem Primersystem. Verschiedene Primersysteme weisen in der Regel an sich eine unterschiedliche Nachweisempfindlichkeit auf. Zudem reagieren sie erfahrungsgemäß auch je nach Sequenz unterschiedlich stark auf die PCR-Hemmstoffe in den Bodenextrakten. So konnte mit dem Primerpaar PGS barA2/B2 nur eine geringere Nachweisempfindlichkeit erreicht werden. Mit dem Primer VW 01/03 (Bt-Mais) konnten auch bei Zugabe von bis zu 3 µg DNA in den Boden keine Nachweise erzielt werden. Somit ist dieses Primerpaar für den Einsatz im Rahmen eines Monitorings nicht geeignet. Die Eignung der anderen Nachweissysteme konnte dagegen gezeigt werden (Tab. 24).

Tabelle 24: Nachweisempfindlichkeit reextahierter DNA aus Boden. Den Bodenproben aus Sickte und BDF013-L wurden jeweils 1 µg DNA (beim Primerpaar VW 01/03 und PGS bar A2/B2 bis zu 3 µg DNA) zugesetzt und die Reextrakte in verschiedenen Verdünnungen in die entsprechenden transgenspezifischen PCR Reaktionen eingesetzt. Die Untersuchungen wurden in mind. 2 unabhängigen Wiederholungen durchgeführt. Der Wert gibt die Menge eingesetzter DNA pro PCR an, die in den meisten Analyseansätzen der Parallelmessungen nachgewiesen werden konnte. In einzelnen Ansätzen in Dahnsdorf wurden z.T. höhere Nachweisempfindlichkeiten erreicht, die jedoch nicht in allen Wiederholungen reproduziert werden konnten. N.b.: nicht bestimmt.

Transgen (Primerpaar)	Kulturart	Nachweisempfindlichkeit (pg DNA / PCR)	
		Boden Sickte	Boden BDF013-L
HR: 35S/pat (CaMV/pac 3R)	Raps	65 pg	200 pg
HR: 35S/pat (CaMV/pac 3R)	Mais	100 pg	200 pg
HR: 35S/pat (CaMV/pac 3R)	Zuckerrübe	100 pg	200 pg
HR: EPSPS (EPSPS-CP1/PFMV-2)	Raps	200 pg	200 pg
HR: EPSPS (EPSPS-CP1/PFMV-2)	Zuckerrübe	400 pg	kein Nachweis
Bt (VW 01/03) Zugabe 3 µg DNA	Mais	n.b.	kein Nachweis
Männliche Sterilität (PGS barA2/B2) Zugabe 1 µg DNA	Raps	n.b.	kein Nachweis
Männliche Sterilität (PGS barA2/B2) Zugabe 2 µg DNA	Raps	n.b.	400 pg
		Boden Dahnsdorf	
Stärkemodifizierung: npt 8F/nosT-8R	Kartoffel	200- 400 pg	

Das zum Nachweis der transgenen Kartoffellinien in Dahnsdorf im Rahmen des Projektes entwickelte Primerpaar (npt 8F/nosT-8R) wurde im Vorfeld auf seine Spezifität anhand von verschiedenen transgenen und nicht transgenen Kartoffellinien überprüft (nicht gezeigt). Dabei wurden in keinem Fall falsch positive oder falsch negative Ergebnisse erzielt.

Real-time PCR

Analog zu den beschriebenen PCR-Nachweisempfindlichkeitsuntersuchungen in der qualitativen PCR wurde exemplarisch die Nachweisempfindlichkeit in der Real-time PCR für die 35S/pat-Region bestimmt. Bodenproben aus Sickte, Dahnsdorf und einer BD-Fläche (BDF001-L) wurde eine definierte Menge DNA aus HR-Raps zugesetzt und die Reextrakte in verschiedenen Verdünnungen (1: 100 bis 1: 3000, jeweils in 2 mal 2 Parallelen) in der Real-time PCR analysiert. Dabei ergaben sich folgende Nachweisempfindlichkeiten:

Boden Sickte	10 pg
Boden Dahnsdorf	35 pg
Boden BDF001-L	23 pg

Verglichen zu den Analysen in der qualitativen PCR konnte anhand der Real-time PCR eine bessere Nachweisempfindlichkeit erreicht werden (65 pg im Vergleich zu 10 pg für HR-Raps-DNA im Boden Sickte). Zudem konnten die Unterschiede in der Reextraktionseffizienz je nach Boden erneut bestätigt werden.

3.3.2.2 Nachweis transgener Sequenzen in Bodenproben aus den Freisetzungstandorten bzw. Referenzflächen

Die für Boden etablierte DNA-Extraktionsmethode A und die daran anschließende PCR-Analyse zum Nachweis der 35S/pat-Übergangsregion wurden zur Untersuchung der verschiedenen Bodenproben der transgenen Versuchsfelder mit Raps und Mais sowie der BDF-Referenzflächen angewendet. Analog dazu erfolgten die Untersuchungen mit dem Primerpaar npt 8F/nos T 8R an den Bodenproben der transgenen Kartoffelparzellen (Tab. 25). Aufbauend auf den Versuchen zur PCR-Nachweisempfindlichkeit in Bodenproben wurden die Bodenextrakte aus den Feldversuchen in einer 1:50 und 1:100 Verdünnung in die qualitative PCR und in einer 1:100 Verdünnung in die Real-time PCR eingesetzt, da in diesen Verdünnungen die höchsten Reextraktionsraten ermittelt wurden.

Im Anschluss an den Freisetzungversuch in Sickte konnte im ersten Untersuchungsjahr aus den Bodenproben des transgenen Raps-Feldes die gentechnische Veränderung in jeweils 1 - 2 Mischproben der verschiedenen Kernflächen bis 6 Wochen nach dem Häckseln der Pflanzen anhand von qualitativen PCR-Analysen nachgewiesen werden (das entspricht 5 Wochen nach dem Fräsen). Anhand von Real-time PCR-Analysen konnten bis 10 Wochen nach dem Häckseln transgene Sequenzen nachgewiesen werden (Tab. 25). Im Anschluss an diesen Zeitraum war keine Detektion mehr möglich, obwohl noch seneszenten Pflanzenmaterial auf dem Feld sichtbar war. Eine Überprüfung auf die gentechnische Veränderung in 6 Wochen alten Pflanzenresten, sowie mit einem Eukaryonten-spezifischen und einem Raps-spezifischen PCR-System ergab jedoch ebenfalls keine PCR-Produkte, so dass davon ausgegangen werden kann, dass keine amplifizierbare DNA in den Pflanzenresten mehr vorlag.

Demgegenüber gelang 2001 aus Bodenproben des transgenen HR-Maisfeldes in Sickte der Nachweis der transgenen Sequenz bereits eine Woche (und ebenso 4 Wochen) nach der Ernte der Pflanzen weder mittels qualitativer noch mittels Real-time PCR-Analysen. Allerdings erfolgte die Ernte der Pflanzen auf diesem Versuchsfeld entgegen der landwirtschaftlichen Praxis erst im Dezember. So verlief auch eine qualitative Überprüfung des Erntematerials auf das Vorhandensein amplifizierbarer DNA negativ. 4 und 12 Wochen nach der Ernte konnte auf dem Feld in Blatt- und Stängelmaterial keine DNA mehr nachgewiesen werden.

Am Versuchsstandort Dahnsdorf wurden im Jahr 2002 16 Parzellen beprobt. Auf je 4 der 16 Parzellen war transgener Raps bzw. Mais angebaut und 12 Wochen vor der Probenahme geerntet worden. Auf den übrigen 8 Parzellen hatten in den Vorjahren transgene Pflanzen gestanden (s. Abb. 8). Anhand der qualitativen PCR konnte in keiner der Proben die transgene Sequenz nachgewiesen werden, mittels Real-time PCR jedoch in 2 der 4 untersuchten

Rapsparzellen und in einer von 4 untersuchten Maisparzellen. Somit konnte hier 12 Wochen nach der Ernte von den HR-Raps und Maisparzellen noch transgene DNA nachgewiesen werden (Tab. 25).

Im Jahr 2003 wurden die Parzellen zum Erntezeitpunkt sowie 3, 6 und 9 Wochen nach der Ernte beprobt, die entsprechend der landwirtschaftlichen Praxis nach der Samenreife des Rapses bzw. Mais erfolgte. Anhand von qualitativen PCR Analysen konnten in keiner Probe transgene Sequenzen nachgewiesen werden. Dagegen wurde anhand der Real-time PCR in jeweils 1 bis 2 der 4 untersuchten Rapsparzellen nach 3, 6 und 9 Wochen das Transgen im Boden noch nachgewiesen. In den Maisparzellen gelang der Nachweis mittels Real-time PCR jedoch nur noch bis zu 3 Wochen nach Ernte (Tab. 25). Die ermittelte Kopienzahl (< 10 Kopien im Reaktionsansatz) lag im Jahr 2003 sowohl auf den Raps- als auch Maisparzellen nahe an der Nachweisgrenze. Dies ist vermutlich die Ursache dafür, dass nicht in allen Parzellen das Transgen nachgewiesen werden konnte.

Die Beprobung der transgenen Kartoffelparzellen in Dahnsdorf im Jahr 2003 erfolgte ebenfalls zum Erntezeitpunkt der Kartoffeln sowie nach 3, 6 sowie 9 Wochen. Pro Beprobungstermin wurden 12 Mischproben untersucht, jeweils 4 davon von Probepunkten ohne transgene Pflanzen (s. Kap. 2.5.1.). Anhand von qualitativen PCR-Analysen wurde in keiner dieser insgesamt 48 Bodenproben das Konstrukt mit dem Primerpaar npt 8F/nosT-8R nachgewiesen. Auch bei der ersten Kartoffel-Beprobung im Frühjahr 2003, als die Kartoffeln gesetzt wurden, konnte das Transgen nicht nachgewiesen werden.

In den Bodenproben der Referenzflächen des BDF-Programms (BDF008-L, BDF010-L, BDF012-L, BDF013-L, BDF058-L und BDF065-L) konnte erwartungsgemäß die 35S/pat-Übergangsregion weder mittels qualitativer noch mittels Real-time PCR nachgewiesen werden (Tab. 26).

Tabelle 25: Transgennachweis aus Bodenproben der Versuchsflächen zu verschiedenen Probennahmezeitpunkten nach Ernte der transgenen Pflanzen. Die obere Zeile des jeweiligen Untersuchungsgebietes zeigt die Ergebnisse der qualitativen PCR-Analysen, die untere die der quantitativen PCR-Analysen mit Angabe der max. gemessenen Kopienzahl („K“). +: positiver Transgennachweis. -: kein Transgennachweis. Leere Felder: nicht untersucht.

Fläche	Jahr	Ernte	Probennahmezeitpunkte nach Ernte in Wochen												
			1 Woche (Fräsen)	1,5	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	14
Sickte Raps	2001	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-		-	
				+	+	-			+				+		-
			(870 K)	(660 K)				(370 K)					(<10 K)		
Sickte Mais	2001		-				-								
			-				-							-	
Dahnsdorf Raps	2002													-	
														+	
														(390 K)	
Dahnsdorf Mais	2002													-	
														+	
														(<10 K)	
Dahnsdorf Raps	2003	-				-			-			-			
		-				+			+			+			
						(<10 K)			(<10 K)			(<10 K)			
Dahnsdorf Mais	2003	-				-			-			-			
						+			-			-			
						(<10 K)									
Dahnsdorf Kartoffel	2003	-				-			-			-			

Tabelle 26: Untersuchung von Bodenproben der BDF-Referenzflächen zum Zeitpunkt des Rapsanbaus.

Fläche	Jahr	Transgennachweis (35S/pat)
BDF012-L	2001	-
BDF058-L	2001	-
BDF008-L	2002	-
BDF013-L	2002	-
BDF010-L	2003	-
BDF065-L	2003	-

3.3.3. Mikrobielle Gemeinschaften im Boden

3.3.3.1 Untersuchung bodenbiologischer Parameter

Durch die methodisch enge Anbindung an das Bodendauerbeobachtungsprogramm Niedersachsens wurde die Einbeziehung verschiedener Parameter der Bodenuntersuchungen des BDF-Programms möglich. Die Ergebnisse der bodenmikrobiologischen Untersuchungen (mikrobielle Biomasse und Basalatmung) des BDF-Programms für das transgene Versuchsfeld in Sickte sind in Tab. 27, die der Referenzflächen in Tab. 28 aufgeführt.

Die vom NLFb erhobenen physikalischen Kennparameter des Versuchsfeldes in Sickte sind in Tab. 29 zusammengestellt; die Hauptbodenart ist als sandiger Schluff zu bezeichnen. Auffällig sind die Abweichungen in Kernfläche II bzgl. der physikalischen Parameter (höherer Sandgehalt, pH-Wert und Karbonatgehalt) sowie der bodenmikrobiologischen Parameter, die darauf hindeuten, dass die vier Kernflächen in Sickte nur bedingt homogen sind.

Tabelle 27: Messergebnisse für Basalatmung und mikrobielle Biomasse, sowie daraus berechneter metabolischer Quotient getrennt nach Kernflächen des Versuchsfeldes in Sickte (2001 - 2003).

Methode	Kernfläche	Messwert	Messwert	Messwert	Einheit
		2001	2002	2003	
Basalatmung	I	0,2	0,53	0,17	mg CO ₂ -C kg ⁻¹ Boden h ⁻¹
Basalatmung	II	0,29	0,49	0,27	mg CO ₂ -C kg ⁻¹ Boden h ⁻¹
Basalatmung	III	0,23	0,35	0,21	mg CO ₂ -C kg ⁻¹ Boden h ⁻¹
Basalatmung	IV	0,22	0,38	0,24	mg CO ₂ -C kg ⁻¹ Boden h ⁻¹
Biomasse (SIR)	I	305,8	599,8	222,8	mg Cmik kg ⁻¹ Boden
Biomasse (SIR)	II	341,5	718,5	253,5	mg Cmik kg ⁻¹ Boden
Biomasse (SIR)	III	299,6	568,7	242,1	mg Cmik kg ⁻¹ Boden
Biomasse (SIR)	IV	290,9	466,8	259,4	mg Cmik kg ⁻¹ Boden
metab. Quotient	I	0,65	0,89	0,78	mg CO ₂ -C g ⁻¹ Cmik h ⁻¹
metab. Quotient	II	0,85	0,68	1,05	mg CO ₂ -C g ⁻¹ Cmik h ⁻¹
metab. Quotient	III	0,77	0,62	0,87	mg CO ₂ -C g ⁻¹ Cmik h ⁻¹
metab. Quotient	IV	0,76	0,81	0,94	mg CO ₂ -C g ⁻¹ Cmik h ⁻¹

Tabelle 28: Messergebnisse für Basalatmung und mikrobielle Biomasse, sowie daraus berechneter metabolischer Quotient des Versuchsfeldes in Sickte sowie der untersuchten Referenzflächen des BDF-Programms (Mittelwert aus den Kernflächen) der Jahre 2001-2003.

Mikrobielle Biomasse (mg Cmik kg⁻¹ Boden)			
	2001	2002	2003
Sickte	309,4	588,4	244,5
BDF008-L	421,1	507,9	495,3
BDF012-L	299,6	334,7	243,3
BDF013-L	341,3	388,7	336,4
BDF058-L	194,8	255,4	204,3
Basalatmung (mg CO₂-C kg⁻¹ Boden h⁻¹)			
	2001	2002	2003
Sickte	0,24	0,44	0,22
BDF008-L	0,36	0,36	0,41
BDF012-L	0,27	0,3	0,24
BDF013-L	0,31	0,3	0,32
BDF058-L	0,13	0,26	0,18
metabolischer Quotient (mg CO₂-C g⁻¹ Cmik h⁻¹)			
	2001	2002	2003
Sickte	0,76	0,75	0,91
BDF008-L	0,86	0,71	0,83
BDF012-L	0,88	0,89	0,99
BDF013-L	0,92	0,78	0,95
BDF058-L	0,68	1,13	0,86

Tabelle 29: Physikalische Parameter der 4 Kernflächen in Sickte (2002).

physikalische Parameter	Kernflächen des Versuchsfeldes (Sicke)			
	I	II	III	IV
Gesamttongehalt (in Gew.%)	20,7	20,6	21,8	19,6
Gesamtschluffgehalt (in Gew.%)	52,3	49	50,5	54,9
Gesamtsandgehalt (in Gew.%)	27	30,4	27,7	25,5
pH-Wert	7,0	7,4	7,2	7,1
CaCO ₃ (%)	0,17	0,67	0,33	0,25
CaCO ₃ - C _{org}	0,02	0,08	0,04	0,03
C _{org} (%)	1,1	1,1	1,21	1,09
N	0,12	0,12	0,13	0,12
C/N [- /-]	9,2	9,2	9,3	9,1

3.3.3.2 Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften im Boden mittels DGGE

Neben der Aufnahme bodenmikrobiologischer Kennwerte wurden im Rahmen der vorliegenden Studie DGGE-Analysen zur Darstellung der mikrobiellen Bodengemeinschaften durchgeführt. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Erprobung dieser Methode für den Einsatz in einer Routineuntersuchung. Grundvoraussetzung hierfür ist das Vorliegen von standardisierten Aufarbeitungsmethoden (DNA-Extraktion und PCR-Analysen), die für möglichst alle Bodentypen geeignet sind. Die für DGGE-Analysen notwendige GC-Klammer an einem Ende der PCR-Produkte, die während der Amplifikation an die Sequenzen gehängt wird, stellt besondere Anforderungen an die Qualität der DNA-Extrakte. Daher wurde die PCR mit unterschiedlich aufgearbeiteten DNA-Extrakten und verschiedenen PCR-Protokollen ausgetestet und optimiert. Abb. 14 zeigt die Ergebnisse einer Gegenüberstellung verschiedener Extraktionsmethoden und PCR-Programme. Unterschiede sind sowohl bei der Qualität der Amplifikate aus gereinigtem bzw. ungereinigtem Extrakt, als auch bei verschiedenen Amplifikations/Temperaturprogrammen zu erkennen. Es zeigte sich, dass Methode B (MOBIO-Kit mit Retchmühle) für DGGE-Analysen nicht geeignet ist. Die PCR-Ausbeuten von DNA-Extrakten aus Methode A (MOBIO-Kit mit vortexen) und C (BIO 101-Kit) konnten durch Aufreinigung der Produkte mittels des GeneClean Spin Kit gesteigert werden. Obwohl durch die DNA-Reinigung hohe Verluste auftreten, wie durch die quantitativen PCR-Analysen gezeigt werden konnte (Kap. 3.3.1), führt die Reduktion von PCR-Hemmstoffen in den gereinigten Extrakten offensichtlich zu einer besseren PCR-Produktausbeute. Die höchsten PCR-Produktausbeuten ergaben sich nach Amplifikation mit dem Programm 10.

Für die Analyse der Freilandproben wurde das Extraktionsverfahren Methode A (MOBIO-Kit mit vortexen) mit anschließender Reinigung und das PCR-Protokoll für bakterielle Gemeinschaften (Primerpaar 948-GC/1346, PCR-Protokoll 10, Tab. 13) ausgewählt. Dies führte bei allen analysierten Bodenproben zu gut auswertbaren Bandenmustern auf der DGGE.

Die Untersuchung von Bakterienpopulationen erfolgte auf dem Raps-Versuchsfeld in Sickte über die Dauer des gesamten Pilotprojektes. So konnten die Analysen einerseits Erkenntnis-

se über die Entwicklung der mikrobiellen Gemeinschaft im zeitlichen Verlauf erbringen, andererseits wurde auch ein Augenmerk auf evtl. Veränderungen in den Populationen vor und nach bzw. mit und ohne Komplementärherbizideinsatz gelegt, da im April 2001 zwei der vier Kernflächen (II und III) zusätzlich mit dem Komplementärherbizid LIBERTY-LINK™ behandelt wurden. Die Ergebnisse wurden anschließend mit den Analysen der Bakteriengemeinschaften auf den Referenzflächen verglichen.

Eine Übersicht über die bearbeiteten Proben zur Analyse der bakteriellen Gemeinschaften in Bodenproben der verschiedenen Felder (Primer 984-GC/1346) gibt Tab. 30.

oben: Primer F984-GC/1346-R

- Spur 1: DNA-Längenstandard
- Spur 2-9: PCR-Protokoll 1:
 - Spur 2: Extraktionsmethode A, ungereinigt
 - Spur 3: Extraktionsmethode A, gereinigt
 - Spur 4: Extraktionsmethode B, ungereinigt
 - Spur 5: Extraktionsmethode B, gereinigt
 - Spur 6: Extraktionsmethode C, ungereinigt
 - Spur 7: Extraktionsmethode C, gereinigt
 - Spur 8: Positivkontrolle
 - Spur 9: Blindwert
- Spur 10-16: PCR-Protokoll 2, gleiche Probenabfolge wie Spur 2-9

unten: Primer F984-GC/1346-R

- Spur 1: DNA-Längenstandard
- Spur 2: Blindwert
- Spur 3-10: PCR-Protokoll 3, gleiche Probenabfolge wie oben

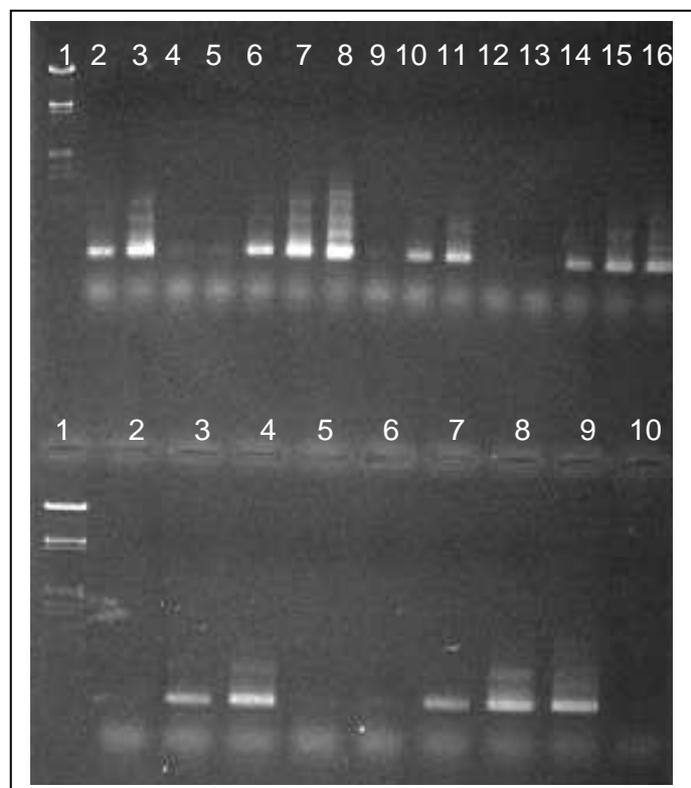


Abbildung 14: Vergleich von Amplifikaten eines Bereiches innerhalb der 16S-rDNA bei verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden und unterschiedlichen PCR-Protokollen aus Bodenproben von Sickte. Die PCR-Protokolle 10, 11 und 12 differieren durch die Annealingtemperaturen und die Dauer des Cyclingprogramms (Tab. 13). Reinigung mittels GeneClean Spin Kit.

Tabelle 30: DGGE-Gele mit den in die Analysen eingesetzten Proben (Amplifikation mit Primerpaar 984-GC/1346) von verschiedenen Probenahmezeitpunkten im Jahreszeitlauf (2001-2003).

Gel lfd.Nr.	Fläche	Probenahmezeitpunkt			
1	Sickte (Raps)	Februar 01	Einzelprobenahmen aller Kernflächen		-
2	Sickte (Raps)	März 01	April 01	Mai 01	-
3	Sickte (Raps)	April 01	Mai 01	Juni 01	Juli 01
4	Sickte (Raps)	September 01	Oktober 01	November 01	Dezember 01
5	Sickte (Raps)	Februar 01	April 01	Juni 01	August 01
6	BDF012-L (Raps)	Februar 01	April 01	Juni 01	August 01
7	BDF058-L (Raps)	Februar 01	April 01	Juni 01	August 01
8	Sickte (Weizen)	Februar 02	Mai 02	August 02	Oktober 02
9	BDF012-L (Weizen)	Februar 02	Mai 02	August 02	Oktober 02
10	BDF008-L (Raps)	Februar 02	April 02	Juni 02	September 02
11	BDF013-L (Raps)	Februar 02	April 02	Juni 02	September 02
12	Sickte (Gerste)	-	April 03	Juni 03	August 03
13	BDF010-L (Raps)	März 03	April 03	Juni 03	August 03

Das erste Gel wurde zur Überprüfung der Einheitlichkeit einzelner Probenahmepunkte angefertigt (Abb. 15). Es zeigt Proben vom Freisetzungsfeld in Sickte bei denen die einzelnen Probenahmepunkte innerhalb einer Kernfläche getrennt als Einzelproben weiterbearbeitet wurden. Am einheitlichen Bandenmuster ist die Vergleichbarkeit der einzelnen Proben abzulesen, die dazu führte, dass bei späteren Probenahmen die Einzelproben einer Kernfläche zu einer Mischprobe vereinigt wurden und als solche analysiert werden konnten.

Spur 1: Standard

Spur 2 - 5:

Kernfläche I

Spur 6 - 9:

Kernfläche II

Spur 10 - 13:

Kernfläche III

Spur 14 - 17:

Kernfläche IV

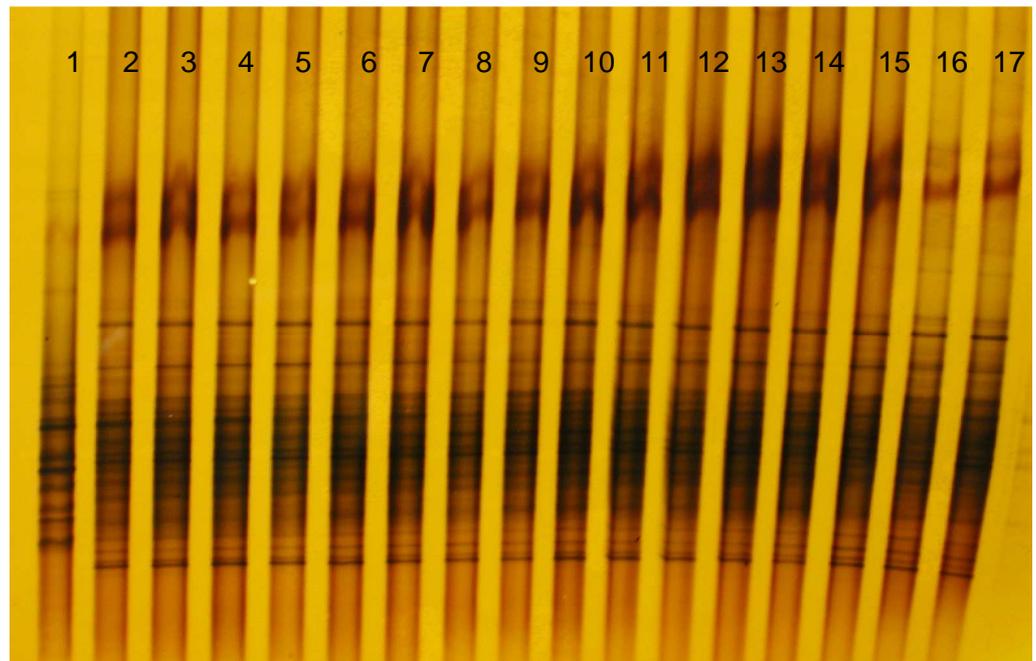
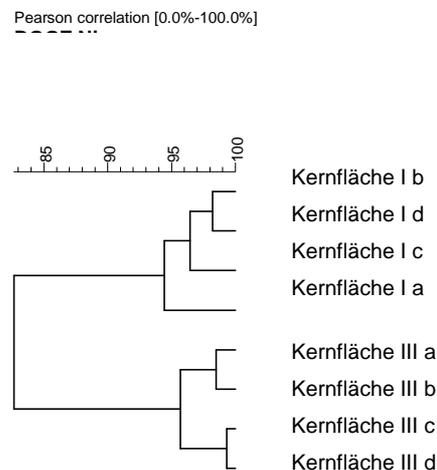


Abbildung 15: DGGE-Bandenmuster (Gel 1) von Einzelbodenproben aus Sickte 2001. Spuren 2-5 vier einzelne Probeentnahmen aus Kernfläche I, Spuren 6- 9 die der Kernfläche II, Spuren 10-13 Einzelproben der Kernfläche III, Spuren 14-17 die der Kernfläche IV.

Für die durchgeführten DGGE-Untersuchungen wurde im Anschluss eine Clusteranalyse vorgenommen, die eine Quantifizierung der Musterunterschiede ermöglicht. Die optische Auswertung des Geles (Gel 1, Abb. 15) wurde durch die Clusteranalyse bestätigt. Wie Abb. 16 für die Kernflächen I und III zeigt, clustern die 4 Proben der einzelnen Probeentnahmestellen (a bis d) innerhalb einer Kernfläche zusammen (Kernflächen II und IV nicht gezeigt).

Abbildung 16: Dendrogramm der Einzelproben der 4 Entnahmestellen einer Kernfläche (hier Kernflächen I und III. Gel 1, Sickte Februar 2001)



Bei den Mischproben des ersten Untersuchungsjahres aus den Dauerbeobachtungstransekten in Sickte sind dagegen bereits teilweise Unterschiede in den Bakterienpopulationen zwischen den einzelnen Kernflächen zu einem Probenahmezeitpunkt zu erkennen (Abb. 17, Gel 3). Besonders bei Kernfläche II traten mehrfach Schwierigkeiten (geringe PCR-Produktausbeute) bei der Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft auf.

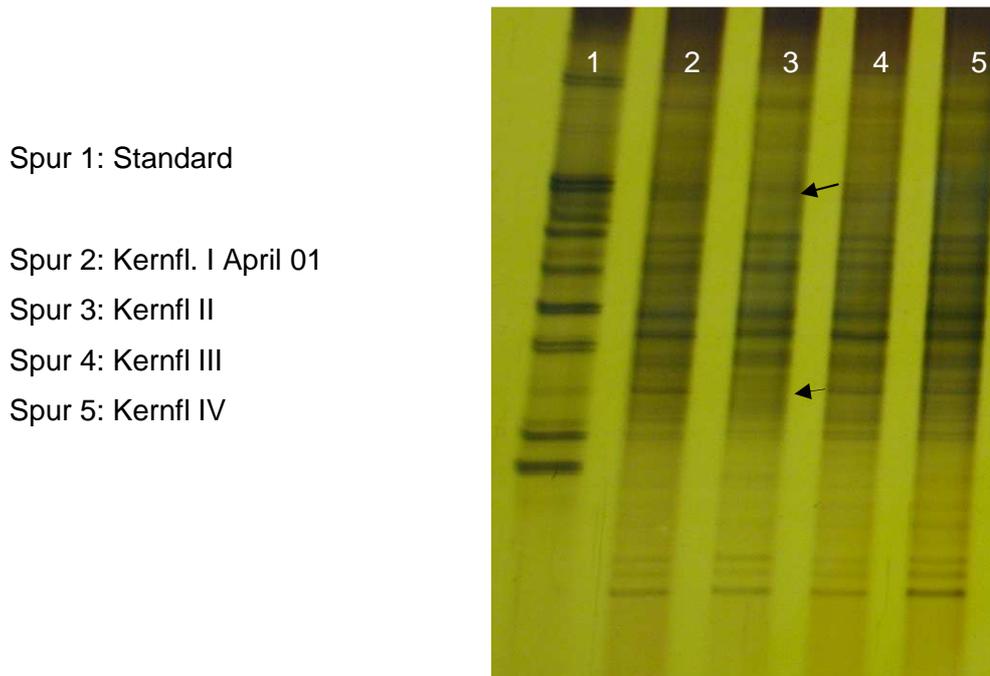


Abbildung 17: DGGE-Bandenmuster von Bodenproben aus Sickte 2001 (Ausschnittvergrößerung Gel 3). Die Pfeile markieren Positionen, an denen die Muster zwischen den 4 Kernflächen – hier Kernfläche II- eines Probenahmezeitpunktes (April 2001, vor Herbizidapplikation) leicht variieren.

Trotz der Abweichungen in der Probenstruktur lassen sich Änderungen im Populationsmuster vor und nach Einsatz des Komplementärherbizids LIBERTY-LINK™ auf den Kernflächen II und III im April 2001 erkennen. Abb. 18 zeigt die Populationsmuster von Proben vom Standort Sickte im Februar, April, Juni und August 2001, jeweils für die Kernflächen I-IV.

Bei den Kernflächen II und III (Spur 11 und 12, Ausschnittvergrößerung, Abb. 19) lassen sich in den Juni-Proben (8 Wochen nach Applikation) leichte Verschiebungen im Bandenmuster erkennen, die bei der folgenden Probenahme (August, 16 Wochen nach Applikation, Spur 15 und 16, Abb. 18) jedoch nicht wieder auftraten.

Spur 1 + 18: Standard

Spur 2: Kernfl. I Feb. 01
 Spur 3: Kernfl. II Feb. 01
 Spur 4: Kernfl. III Feb. 01
 Spur 5: Kernfl. IV Feb. 01

Spur 6: Kernfl. I Apr. 01
 Spur 7: Kernfl. II Apr. 01
 Spur 8: Kernfl. III Apr. 01
 Spur 9: Kernfl. IV Apr. 01

Spur 10: Kernfl. I Jun. 01
 Spur 11: Kernfl. II Jun. 01
 Spur 12: Kernfl. III Jun. 01
 Spur 13: Kernfl. IV Jun. 01

Spur 14: Kernfl. I Aug. 01
 Spur 15: Kernfl. II Aug. 01
 Spur 16: Kernfl. III Aug. 01
 Spur 17: Kernfl. IV Aug. 01



Abbildung 18: DGGE-Bandenmuster von Bodenproben aus Sickte 2001 (Gel 5). Spuren 2-9 vor Herbizidapplikation, Spuren 10-17 danach.

April 2001
 (vor Applikation)

Spur 6: Kernfl. I
 Spur 7: Kernfl. II
 Spur 8: Kernfl. III
 Spur 9: Kernfl. IV

Juni 2001
 (8 Wochen nach Applikation)

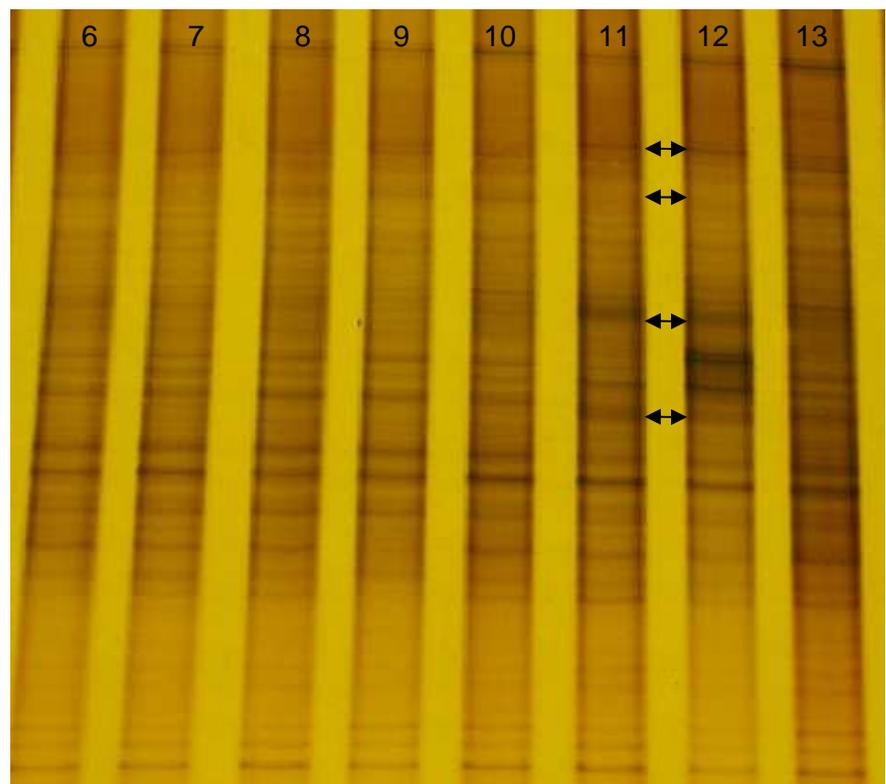


Abbildung 19: Ausschnittvergrößerung aus Gel 5 (Abb. 18). Die schwarzen Pfeile markieren Positionen, an denen die Muster in den Spuren 11 und 12 von denen der anderen Spuren abweichen.

Die Clusteranalyse (Abb. 20) von Gel 5 (Abb. 18) bestätigt die Veränderungen in der bakteriellen Gemeinschaft im jahreszeitlichen Verlauf. Die Proben aus dem Frühjahr bilden (mit einer Ausnahme) eine Gruppe, während die Proben von Sommer und Herbst zusammen clustern.

Außerdem lässt sich ebenfalls der Einsatz des Komplementärherbizides wiederfinden, da die beiden Proben aus den mit dem Komplementärherbizid behandelten Kernflächen (Beprobung 8 Wochen nach der Herbizidbehandlung) einen eigenen Komplex bilden. Diese Veränderung ist jedoch nur vorübergehend, da 16 Wochen nach Applikation (August-Probe) die Gruppierung nicht mehr nachzuweisen ist. Relativ gesehen zur jahreszeitlichen Variabilität ist diese Beeinflussung zudem gering.

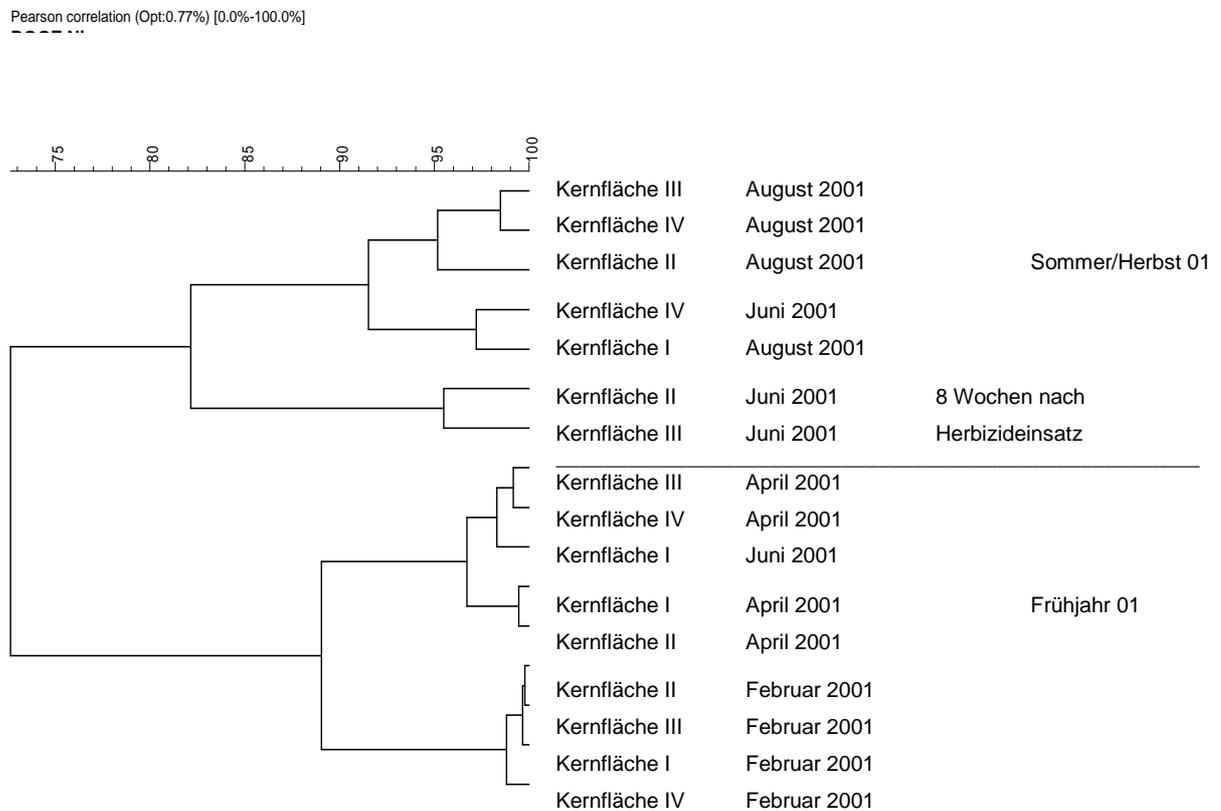


Abbildung 20: Dendrogramm der Proben vor und nach Anwendung des Komplementärherbizides (Gel 5, Abb. 18). Aufwuchs zum Zeitpunkt der Probenahme: Februar und April: Raps; Juni: gefräst; August: Brache

Bei allen BDF-Referenzflächen wurden die Bedingung der Homogenität und Vergleichbarkeit der Proben ebenfalls erfüllt. Im Vergleich zu den Bodenproben aus Sickte zeigten diese zudem eine höhere Homogenität zwischen den einzelnen Kernflächen. So ergaben die Mischproben der jeweils 4 Kernflächen ein nahezu identisches Muster, Amplifikationsprobleme

bzw. abweichende Bandenmuster einer Kernfläche, wie in Sichte bei der Kernfläche II traten hier nicht auf. Beispielhaft ist dies in Abb. 21 für BDF013-L gezeigt.

Analog zur Abb. 21 (BDF013-L) zeigten auch die Clusteranalysen der Proben von den Referenzflächen BDF012-L und BDF058-L im jahreszeitlichen Verlauf (Gelbilder nicht dargestellt), dass die 4 Proben der 4 Kernflächen eines Beprobungszeitpunktes (jeweils mit einer Ausnahme) zusammen clustern (Abb. 22 u. 23).

Spur 1 + 18: Standard

Spur 2: Kernfl. I Febr. 02

Spur 3: Kernfl II

Spur 4: Kernfl III

Spur 5: Kernfl IV

Spur 6: Kernfl I April 02

Spur 7: Kernfl II

Spur 8: Kernfl III

Spur 9: Kernfl IV

Spur 10: Kernfl I Juni 02

Spur 11: Kernfl II

Spur 12: Kernfl III

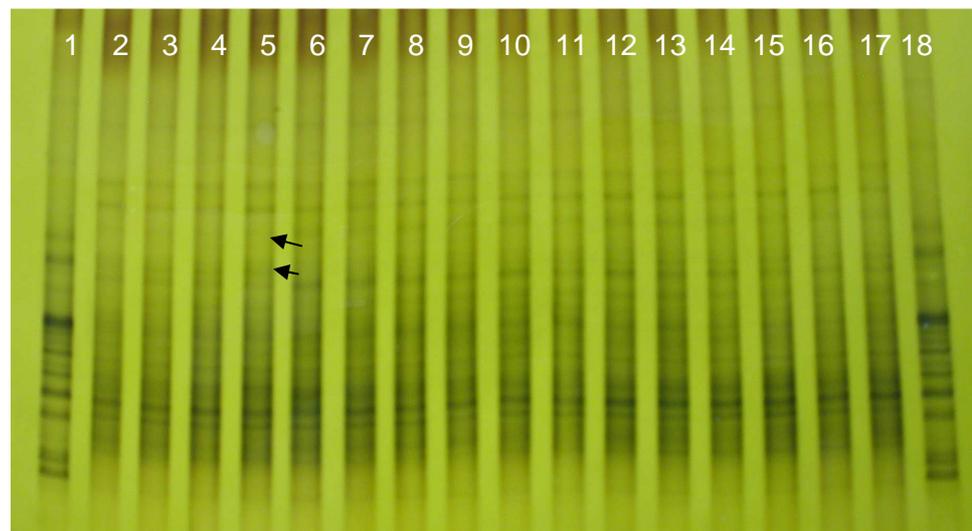


Abbildung 21: DGGE-Bandenmuster von Bodenproben der Referenzfläche BDF-013-L aus 2002 (Gel 11). Die Pfeile markieren exemplarisch Positionen, an denen das Muster der 4 Kernflächen zum Probenahmezeitpunkt im Februar von denen im April, Juni und September leicht abweicht. Die Muster aller 4 Kernflächen eines Probenahmezeitpunktes sind dagegen jeweils einheitlich. Aufwuchs zum Zeitpunkt der Probenahme: Februar, April und Juni: Raps; September: Senf.

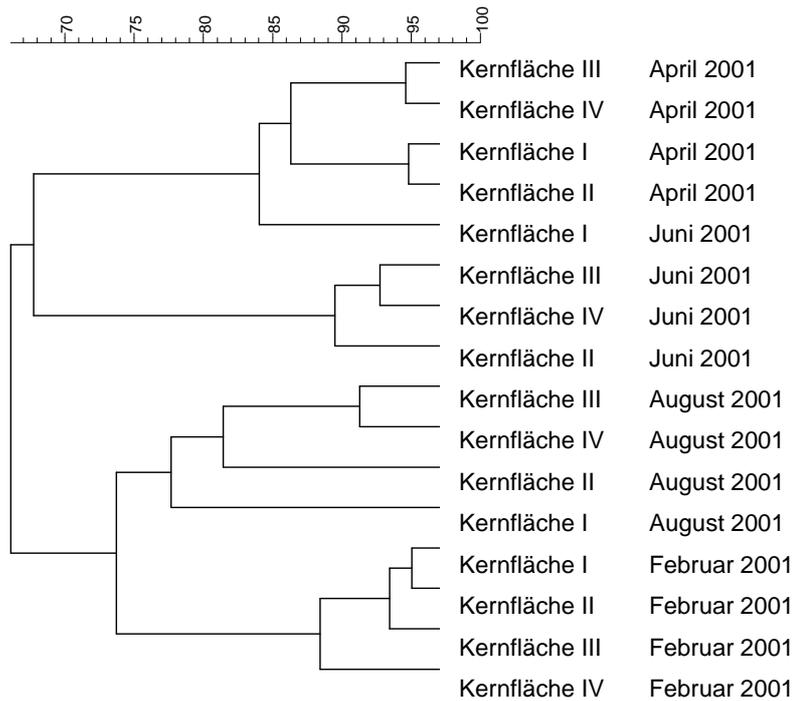


Abbildung 22: Dendrogramm BDF012-L, 2001, Gel 6. Aufwuchs zum Zeitpunkt der Probenahme: Februar, April und Juni: Raps; August: Winterweizen

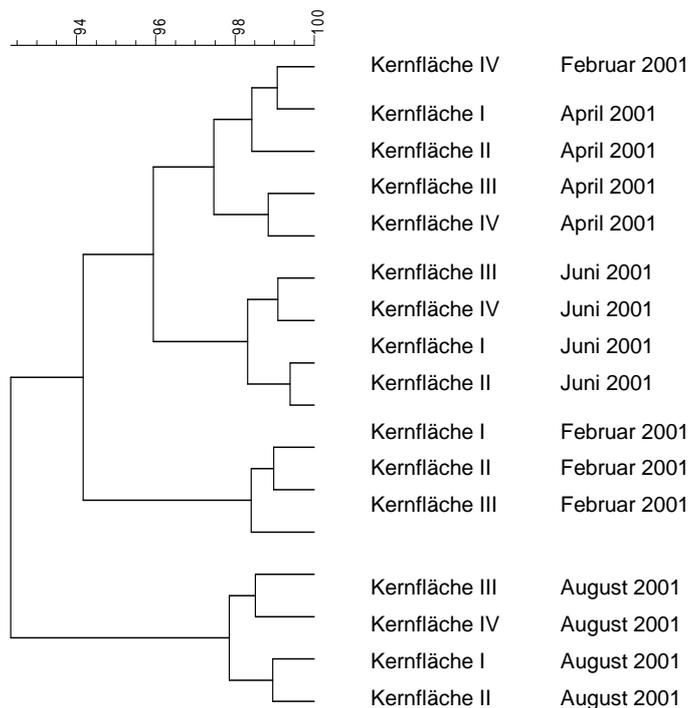


Abbildung 23: Dendrogramm BDF058-L, 2001, Gel 7. Aufwuchs zum Zeitpunkt der Probenahme: Februar, April und Juni: Raps; August: Winterweizen

Bei allen untersuchten BD-Flächen mit Rapsanbau (BDF012-L und 058-L im Jahr 2001, BDF008-L und 013-L im Jahr 2002 sowie BDF010-L im Jahr 2003) konnte zudem eine jahreszeitliche Variabilität aufgezeigt werden. So zeigten häufig die Muster von den April- und Juni-Probenahmen eine hohe Ähnlichkeit zueinander, während die Februar- und August-Proben davon getrennt clustern (beispielhaft für BDF012-L und 058-L s. Abb. 22 u. 23). Die Februarprobenahme erfolgte in der Regel direkt zu Beginn der Vegetationsperiode, wo die Rapspflanzen noch relativ klein waren. Bei der Augustprobenahme war der Raps geerntet, auf den Feldern war entweder schon die Folgefrucht angebaut, oder die Neuaussaat stand unmittelbar bevor. Es ist zu vermuten, dass neben den klimatischen Änderungen auch die unterschiedlichen Vegetationsphasen bzw. angebauten Kulturpflanzen die jahreszeitlichen Variationen der mikrobiellen Gemeinschaft bedingen.

In Sickte zeigte sich dagegen eine deutliche Trennung der Frühjahrsproben (Februar und April) und der Sommer- /Herbstproben (Juni und August, s. Abb. 20). Dies ist vermutlich dadurch bedingt, dass hier - im Gegensatz zu den BD-Feldern - Raps nur im Februar und April wuchs. Aufgrund der vorzeitigen Ernte vor der Samenreife war das Feld zum Zeitpunkt der Juni-Probenahme schon geerntet, im August lag das Feld brach.

Entsprechende zeitliche Variation in der mikrobiellen Gemeinschaft je nach Jahreszeit bzw. angebaute Feldfrucht konnten auch im Jahr 2002 auf dem Feld in Sickte und BDF012-L festgestellt werden (nicht gezeigt). Auf beiden Feldern wurde nach dem Rapsanbau im Jahr zuvor Winterweizen angebaut.

Da die Bandenmuster der Gesamtpopulationen komplex und Verschiebungen daher teilweise nur schwer zu erkennen sind, wurde zusätzlich versucht, eine Vorauswahl für einzelne Bakteriengruppen zu treffen. Hierbei werden in einem ersten Amplifikationsschritt spezifische Primer für bestimmte taxonomische Gruppen eingesetzt, die vornehmlich die Vervielfältigung der speziellen DNA-Sequenzen von Actinomyceten (High GC-Organismen) oder α -Proteobakterien erlauben. Es zeigte sich, dass tatsächlich einzelne Banden innerhalb des Musters klarer hervortreten, wenn hauptsächlich die Organismengruppe der Actinomyceten (bzw. high-GC-Organismen) betrachtet wird. Die Variabilität der Muster zwischen den 4 Kernflächen einer Bodenprobe war auf der exemplarisch ausgewählten BDF058-L ausreichend gering, so dass die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Probenahmen prinzipiell gegeben ist (nicht gezeigt).

In Abb. 24 wird allerdings deutlich, dass in Sickte die High GC-Bandenmuster der einzelnen Kernflächen zu einem Probenahmezeitpunkt sehr deutlich voneinander abweichen. Dieser Ansatz wurde daher nicht weiter verfolgt.

Spur 1 - 4: Actinomyceten
im Juli 2001

Spur 1: Kernfläche I
Spur 2: Kernfläche II
Spur 3: Kernfläche III
Spur 4: Kernfläche IV

Spur 5 - 8: Actinomyceten
im August 2001

Spur 5: Kernfläche I
Spur 6: Kernfläche II*
Spur 7: Kernfläche III
Spur 8: Kernfläche IV

Spur 9: Standard

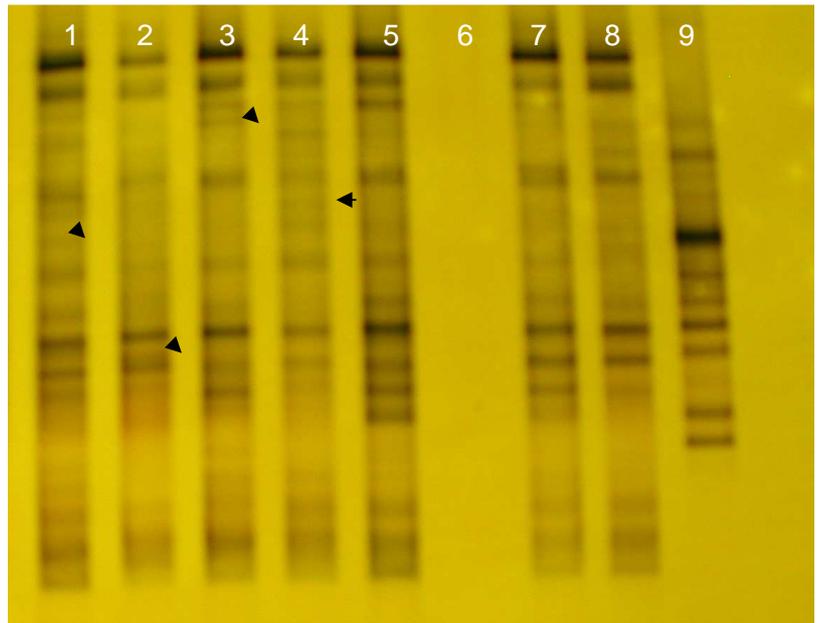


Abbildung 24: DGGE-Bandenmuster von high-GC-Organismen aus Bodenproben (Sickte 2001). In Spur 6 ist zu erkennen, dass hier ebenfalls Schwierigkeiten bei der Analyse von Bodenproben aus Kernfläche II auftraten. Die Pfeile markieren nur einige der auftretenden Abweichungen zwischen den 4 Kernflächen zu einem Probezeitpunkt. *Eine Amplifikation mit den High-GC spezifischen Primern war nicht erfolgreich.

Bei der alternativ angewendeten Voramplifikation der α -Proteobakterien erwies sich das eingesetzte Primerpaar in dieser Studie als zu unspezifisch (Ergebnisse nicht gezeigt), da auch die 16S rDNA anderer Organismengruppen vervielfältigt wurde. Optimierungsversuche wurden aufgrund des ohnehin größeren Arbeitsaufwandes bedingt durch die seminested PCR bei dieser Methodik nicht durchgeführt und somit dieser Ansatz ebenfalls nicht weiter verfolgt.

Eine weitere Alternative der Methodik stellte die Analyse der Bodenproben der Freisetzungsbzw. der Referenzflächen unter besonderer Berücksichtigung der Pilzgemeinschaften mittels der DGGE dar. Im Gegensatz zu der Analyse bakterieller Gemeinschaften oder bakterieller Gruppen zeigten die unabhängigen Wiederholungen eines Feldes (also die Proben der 4 Kernflächen) jedoch eine sehr hohe Variabilität, was die Detektion der Beeinflussung pilzlicher Gemeinschaften erschwert. Dies galt sowohl für die Bodenproben aus den BD-Flächen als auch von den Versuchsfeldern Sickte und Dahnsdorf (Abb. 25 und 26). Spezifische, z.B. auf die Behandlung mit dem Komplementärherbizid zurückzuführende Änderungen im Bandenmuster waren daher nicht zu erkennen, wie beispielhaft Abb. 26 zeigt.

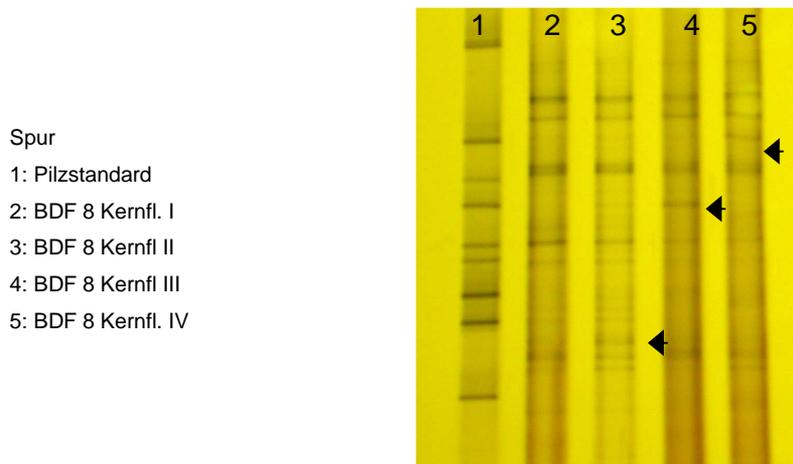


Abbildung 25: DGGE-Bandenmuster der Pilzgemeinschaft aus Bodenproben der 4 Kernflächen von BDF008-L. Die Pfeile markieren nur einige der auftretenden Abweichungen zwischen den 4 Kernflächen zu einem Probenahmezeitpunkt.

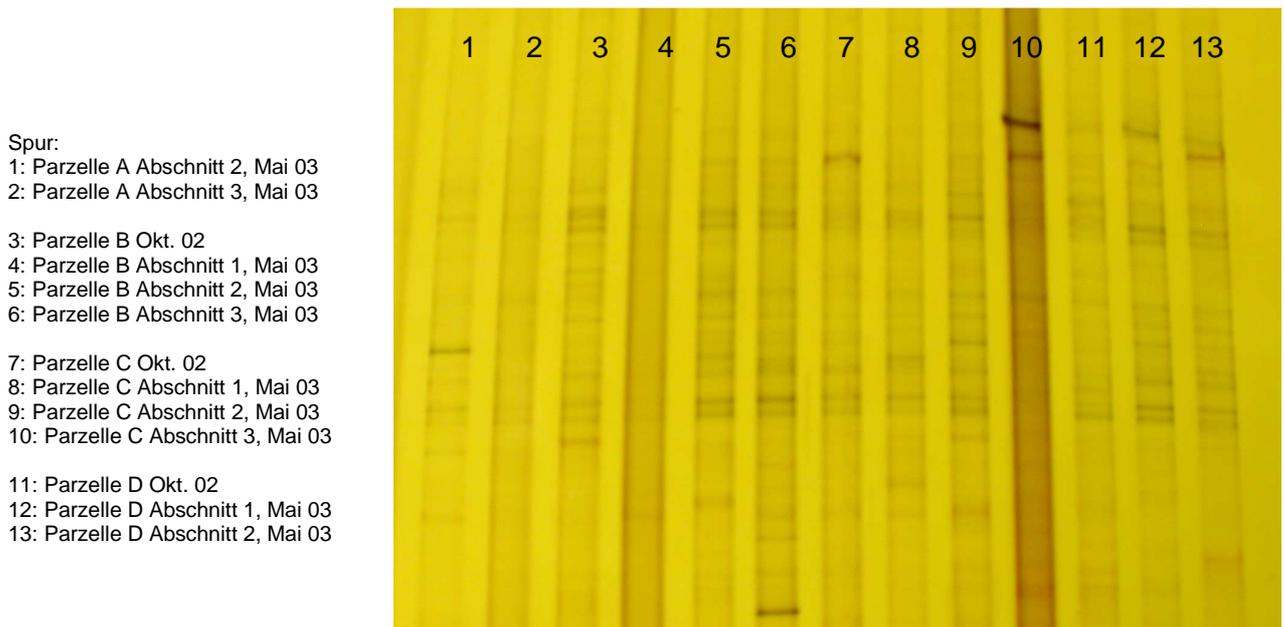


Abbildung 26: DGGE-Bandenmuster (Ausschnittvergrößerung) der Pilzgemeinschaft aus Bodenproben vom Standort Dahnsdorf (Gel 16). Die Abschnitte 2 und 3 sind jeweils mit dem Komplementärherbizid (Applikation September 2002) behandelt, die Abschnitte 1 der Parzellen mit einem konventionellen Herbizid. Die Beprobungen im Oktober 2002 erfolgten jeweils aus einem Abschnitt mit Komplementärherbizidbehandlung.

4. Diskussion

Bei der Fragestellung nach möglichen Auswirkungen des GVP-Anbaus auf die Vegetation und den Boden wurden im Rahmen der Konzeptentwicklung für ein Monitoring von HR-Raps sowohl die Vegetation innerhalb der Äcker (Kernflächen und 1 ha-BDF) als auch der Umgebung betrachtet sowie bodenmikrobiologische Untersuchungen durchgeführt. Aussagen zu tatsächlichen Auswirkungen konnten aus methodischen Gründen nur begrenzt gemacht werden, da nur ein einjähriger Anbau von HR-Raps auf einer verhältnismäßig kleinen Fläche (0,4 ha) für Untersuchungen im Rahmen des Projektes möglich war. Entsprechende Befunde sollten daher nur als Hinweise auf die eingangs formulierten Fragestellungen (Tab. 1) gelten. Vielmehr dient die vorliegende Studie der Konzeptentwicklung und Erprobung von Methoden für ein GVP-Monitoring unter Einbeziehung und Bewertung schon bestehender Umweltbeobachtungssysteme, in dieser Studie des BDF-Programms. Die bisher in diesem Programm erhobenen Daten, die auch relevante Parameter für ein GVP-Monitoring darstellen, bieten als Hintergrundparameter wichtige Interpretationshilfen und können für die vegetations- und bodenmikrobiologischen Parameter als Baseline dienen. Die vorliegenden Zeitreihen, teilweise seit 1991, geben wertvolle Hinweise auf die zeitliche Dynamik der erhobenen biologischen Parameter. Durch den großen Stichprobenumfang in Niedersachsen (70 BDF-L) bieten sich zudem ausreichend große Vergleichsmöglichkeiten bzgl. der bestehenden Variabilitäten. Die bisherigen im Rahmen des BDF-Programms durchgeführten Datenauswertungen bieten deutliche Synergieeffekte bei der Auswertung vegetationskundlicher und bodenmikrobiologischer Daten in einem GVP-Monitoring (s. auch Anhang A, Karten 17-43).

4.1 Flora und Vegetation

Die derzeitige Situation der Ackerbegleitvegetation in Niedersachsen kann anhand der im BDF-Programm erhobenen Daten in den Kernflächen und der 1ha-BDF abgeleitet und somit als Baseline bzw. Referenz benutzt werden.

Vegetationsaufnahmen in den Kernflächen

Die Entwicklung der Artenzahlen in den Kernflächen (Mittelwerte der vier Kernflächen) aller BDF-L seit Erhebungsbeginn ist in der folgenden Tab. dargestellt (Tab. 31). Die Artenzahl liegt im Schnitt bei 13 Arten pro Kernfläche. Die geographische Verteilung der Artenzahl in Niedersachsen lässt dabei keine auffälligen Muster erkennen (LINDERS & MEYER-SPETHMANN, 2001, Anhang A, Karten 34 und 35).

Tabelle 31: Artenzahlen in den Kernflächen der BDF-L (Quelle: LINDERS & MEYER-SPETHMANN, 2001). *Mittelwert aus den 4 Kernflächen.

Erhebungszeitraum	Anzahl BDF-L	Mittlere Artenzahl*	Spannbreite der mittleren Artenzahlen
1992/1993	18	10,6	0,3-26,8
1994/1995	18	12,3	1,0-51,3
1996/1997	41	13,8	1,0-52,5
1998/2000	67	12,9	1,8-55,3
1992 – 2000	68	12,7	0,3-55,3

Da die Artenzahl neben abiotischen Faktoren auch von der Nutzung der Felder und somit auch von der angebauten Kulturart abhängt, sind in Tab. 32 die mittleren Artenzahlen von den BD-Feldern dargestellt, auf denen zum Aufnahmezeitpunkt Raps kultiviert wurde. Im unteren Abschnitt der Tabelle sind im Vergleich dazu die Artenzahlen aufgeführt, die im Rahmen dieser Studie ermittelt wurden:

Tabelle 32: Mittlere Artenzahl in den Kernflächen von BD-Feldern, auf denen zum Zeitpunkt der Aufnahme Raps kultiviert wurde. Zusammenstellung aus dem BDF-Programm, Auswertung der Grund- bzw. Wiederholungsinventuren ausgewählter Kernflächen. Kursiv: Aufnahme im Rahmen der vorliegenden Studie. Sickte: Freisetzungsfeld mit transgenem Rapsanbau. *: Anbau Raps mit Zottelwicke.

BDF-L	Jahr	mittlere Artenzahl
012	1992	5,75
013	1999	10,25
013	2002	5,75
014	1992	8,75
014	2000	6,25
046	1998	9,25
050*	1995	11,25
055	2000	3,50
065	1999	11,5
<i>012</i>	<i>2001</i>	<i>3,75</i>
<i>008</i>	<i>2002</i>	<i>7,5</i>
<i>010</i>	<i>2003</i>	<i>8,75</i>
<i>Sickte</i>	<i>2001</i>	<i>3,75</i>

Die mittlere Artenzahl auf den BDF-Kernflächen mit Rapsanbau liegt bei 7,7 (Spannbreite von 3,5 bis 11,5 Arten) und damit deutlich geringer als die mittlere Kernflächenartenzahl aller BDF-L. Die gefundene Artenzahl auf der Freisetzungsfläche in Sickte mit 3,75 liegt innerhalb dieser Spannbreite, jedoch am unteren Ende. Offensichtlich führt das frühzeitige Erreichen einer hohen Deckung in Rapskulturen zusammen mit einem effektiven Herbizideinsatz zu einer extremen Verarmung der Begleitfluren.

Zwischen den Kernflächen, die in Sickte zusätzlich einmalig mit dem Komplementärherbizid LIBERTY-LINK™ behandelt wurden und denen, die nur mit dem herkömmlichen Herbizid Butisan Top behandelt wurden, ergaben sich keine Unterschiede in den Artenzahlen. In allen Kernflächen wurden zwischen 3 und 4 Arten gefunden. Eine Aussage darüber, ob die Applikation eines Totalherbizides die Ackerbegleitflora innerhalb der Ackerfläche beeinträchtigt, ist aus der vorliegenden Studie nicht abzuleiten, da nur eine einmalige Applikation des Komplementärherbizides LIBERTY-LINK™ erfolgte und die Artenzahl auf den Kernflächen ohnehin sehr gering war. Dies könnte u.a. bedingt sein durch die ca. 6 Monate vor der Spritzung des Komplementärherbizides erfolgte Applikation mit einem konventionellen Herbizid auf der gesamten Freisetzungsfläche.

Bezüglich der Artenzahl in den Kernflächen und der Zuordnung zu Charakterarten zum Zeitpunkt des Rapsanbaus bot sich in Sickte ein ähnliches Bild wie in BDF012-L, im Unterschied zu den BDF008-L und 010-L, wo deutlich mehr Arten gefunden wurden. Unterschiede in der Artenzusammensetzung der Kernflächen verschiedener Felder können neben der Fruchtfolge durch natürliche Faktoren, z.B. Bodeneigenschaften, die das Vorkommen einer Art grundsätzlich beeinflussen oder aber auch durch anthropogene Faktoren (Bewirtschaftungsmaßnahmen) bedingt sein. Der Vergleich mit den entsprechenden Artenlisten der Gesamtäcker oder auch der 1 ha-Flächen kann darüber Auskunft geben, ob die entsprechenden Arten prinzipiell auf dem Acker vorkommen können und somit Hinweise auf die Effektivität der Vernichtung von Begleitarten durch eine Herbizidapplikation geben. Bei einem Vergleich zu den 1 ha-Flächen ist jedoch die Lage der 1 ha-Fläche innerhalb des Ackers zu berücksichtigen, da Randeffekte die Artenzahl massiv beeinflussen können.

Um Informationen über Veränderungen der Vegetation in den Kernflächen von Rapsfeldern zu erhalten, wurden die bisher erhobenen Daten aus dem BDF-Programm ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass von den derzeit 10 Feldern mit Raps in der Fruchtfolge bisher auf 7 Feldern die Aufnahmen in den Kernflächen zu dem Zeitpunkt, wo Raps auch angebaut wurde, erfolgte. Nur auf 2 Feldern überschneidet sich jedoch auch die Wiederholungsinventur mit dem Rapsanbau (BDF013-L und 014-L). Sollten die BDF-L als Referenzflächen für ein Rapsmonitoring dienen, wird vorgeschlagen, die Aufnahmezeitpunkte mit dem Rapsanbau zeitlich abzustimmen, um einen höheren Stichprobenumfang an Vergleichsdaten zu erhalten. Die bisherigen Vergleichsmöglichkeiten sind daher begrenzt, sie deuten jedoch auf eine Abnahme der Beikrautvegetation in den Rapsfeldern hin. So nahm auf BDF013-L die mittlere Artenzahl in den Kernflächen von 10,25 (1999) auf 5,75 (2002), auf BDF014-L von 8,75 (1992) auf 6,25 (2000) und auf BDF012-L von 5,75 (1992) auf 3,75 (2002, diese Studie) ab (Tab. 32). Die

vegetationskundliche Auswertung in der Aufbauphase des BDF-Programms von 1992 bis 2000 ergab unter Berücksichtigung aller BDF-L dagegen eine Erhöhung der mittleren Artenzahl um 0,22, was jedoch als nicht signifikante Schwankung zu werten ist (LINDERS & MEYER-SPETHMANN, 2001). Auffällige Veränderungen der Artenzahlen (d.h. Differenz > 1 Standardabweichungen zwischen der ersten und der letzten Aufnahme) wurden hauptsächlich im niedersächsischen Flachland festgestellt (Anhang A, Karte 36). So wurde eine starke Abnahme der Artenzahl auf 7 BDF-L und eine starke Zunahme der Artenzahl auf 9 BDF-L beobachtet. (LINDERS & MEYER-SPETHMANN, 2001). Diese Auswertungen im BDF-Programm erfolgten jedoch vorerst ohne Berücksichtigung der angebauten Feldfrucht oder anderer Faktoren, die die Artenzahl beeinflussen könnten, was ihre Aussagekraft reduziert.

Floristische Untersuchungen in der 1 ha Fläche

Sowohl die in dieser Studie gewählten Untersuchungsflächen des Bodendauerbeobachtungsprogramms (BDF, 1 ha) als auch die eigentliche Raps-Freisetzungsfläche in Sickte (FF, 0,4 ha) zeichneten sich in allen drei Untersuchungsjahren durch ein äußerst geringes Aufkommen von Ackerbegleitarten aus. Solche stark reduzierten Begleitfluren stellen bekanntermaßen in der gegenwärtigen Agrarlandschaft vielerorts die Normalität dar und spiegeln sich auch im Vergleich der Artenzahlen der anderen BDF-L wider (LINDERS & MEYER-SPETHMANN, 2001, und Tab. 33). Von allen BDF-L Flächen wurde im Rahmen des BDF-Programms bisher mindestens einmal eine Erfassung des Gesamtartenbestandes in der 1 ha Fläche durchgeführt. Die nachgewiesene Artenzahl bei der Erstaufnahme der 1 ha-Fläche lag zwischen 6 und 110 Arten, der Mittelwert betrug 30,6 Arten (LINDERS & MEYER-SPETHMANN, 2001). Wiederholungsaufnahmen, die in max. 10 jährigem Abstand erhoben werden, werden seit dem Jahr 2000 durchgeführt, so dass langfristig Zeitdatenreihen aufgebaut werden können. Derzeit liegen jedoch erst für wenige Flächen Wiederholungsaufnahmen vor, daher sollten die bisher gefundenen Veränderungen (z.B. BDF014-L, Tab. 33) aufgrund der zu geringen Stichprobenzahl nicht zu hoch bewertet werden.

Umfangreiche Artenvorkommen innerhalb der Ackerfläche sind i.d.R. seltener zu beobachten, z. B. bei misslungenem Herbizideinsatz oder auch in kleinräumigen Teilbereichen der Äcker, wo der Maschineneinsatz nur schlecht zu bewerkstelligen ist. Im Rahmen der F& E Studie konnten nur innerhalb der BDF008-L 2002 einige solcher Stellen mit etwas höheren Deckungsgraden an Ackerbegleitarten festgestellt werden. Hier war es offenbar durch lang anhaltende Staunässe oder Frostschäden zu inselartigen Lücken in der dortigen Rapskultur gekommen und infolgedessen zu einer Verschiebung der Konkurrenzverhältnisse zu Gunsten der Begleitarten. Dies hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Artenvielfalt, denn mit 19 Arten in der mit etwas umfangreicheren Ackerbegleitfluren bestandenen BDF008-L lag die Artenzahl trotzdem nur im mittleren Bereich (Tab. 33).

Darüber hinaus sind auch die Ackerränder häufig reicher an Begleitkräutern, einerseits aufgrund der geringeren Bestandsdichte der Kulturpflanzen, andererseits wegen des zum Rande hin nicht immer durchgängigen Herbizideinsatzes. Das in der 0,4 ha großen FF im ersten Untersuchungsjahr (2001) zu beobachtende relativ hohe Aufkommen der Begleitarten am Rande ist als ein solcher Effekt zu bewerten, da sie ein zum Teil mehrere Meter breiter Strei-

fen ohne Raps und mit einem vermindertem Herbizideinsatz umgab. Aufgrund der relativ artifiziellen Anordnung der Freisetzungsfäche und ihrer geringen Größe waren somit im Rahmen dieser Studie keine Aussagen über die Wirkungen der Spritzung des Komplementärherbizides auf die Ackerbegleitflora möglich. Der ehemaligen Freisetzungsfäche in den Folgejahren und den 1 ha BDF fehlte ein solcher Rand; sie stellten somit im Gegensatz zur FF im Jahr 2000/2001 einen repräsentativen Ausschnitt aus dem Innenbereich eines Ackers dar.

Die in dieser Studie erfassten Gesamtartenbestände mit den geringsten Artenzahlen auf der BDF012-L in 2002 und 2003 sowie auf der FF in 2003 mit nur 10, 7, bzw. 13 Arten zeichneten sich durch besonders dichte Bestände der Kulturart (Winterweizen bzw. Wintergerste) und gleichmäßigen effektiven Herbizideinsatz aus. Bereiche mit Standortbedingungen, die Ackerbegleitfluren zu besonderer Entwicklung verholfen hätten, waren hier nicht zu beobachten. Die in 2002 untersuchte Fläche in Sickte (FF 2002) stellt gewissermaßen eine Besonderheit dar. Trotz dichter Winterweizenbestände und geringer Begleitkrautdeckung und obwohl eine Randzone wie im Vorjahr fehlte, wurden 26 Ackerbegleitarten festgestellt.

Vergleicht man die Artenzahlen in den Rapsfeldern, so lagen - abgesehen von den genannten Randeffekten in Sickte - die gefundenen Artenzahlen im Rahmen der im BDF-Programm ermittelten Artenzahlen der 1 ha-Flächen. Die Artenzahl auf diesen Flächen schwankt zwischen 11 und 26, sie liegt im Mittel bei 18 Arten (Tab. 33).

Tabelle 33: Artenzahlen in der 1 ha-Fläche von ausgewählten BDF-L, die Raps im Fruchtfolgewechsel haben. Zusammenstellung aus dem BDF-Programm, Auswertung der Grund- bzw. Wiederholungsinventuren ausgewählter 1 ha-Flächen. Kursiv dargestellt sind die Flächen, auf denen Raps zum Aufnahmezeitpunkt kultiviert wurde. *: Floristische Kartierungen im Rahmen der vorliegenden Studie. Sickte: Freisetzungsfäche mit transgenem Rapsanbau im Jahr 2001. Die Angaben der Jahre 2001-2003 beziehen sich hier auf die 0,4 ha große Freisetzungsfäche.

BDF-L	Jahr	Anbaufrucht	Artenzahl	Jahr	Anbaufrucht	Artenzahl	Jahr	Anbaufrucht	Artenzahl
008	1992	Weißklee	43	2000	Weizen	19	-	-	-
013	1996	Rüben/Hafer	26	2002	<i>Raps</i>	16	-	-	-
058	1997	Gerste	17	-	-	-	-	-	-
046	1998	<i>Raps</i>	18	-	-	-	-	-	-
050	1995	<i>Raps</i>	26	2001	Roggen	30	-	-	-
012	1992	<i>Raps</i>	16	2000	Weizen	10	-	-	-
014	1992	<i>Raps</i>	20	2000	<i>Raps</i>	11	-	-	-
010	1998	Roggen	24	-	-	-	-	-	-
055	1997	Gerste	6	-	-	-	-	-	-
065	1999	<i>Raps</i>	20	-	-	-	-	-	-
012*	2001	<i>Raps</i>	17	2002	Weizen	10	2003	Weizen	7
008*	2002	<i>Raps</i>	19	-	-	-	-	-	-
010*	2003	<i>Raps</i>	19	-	-	-	-	-	-
Sickte*	2001	<i>Raps</i>	26	2002	Weizen	26	2003	Gerste	13

Der Vergleich der beiden in dieser Studie über mehrere Jahre untersuchten Flächen (Sickte und BDF012-L) macht deutlich, dass die in einem Jahr erfasste Ackerbegleitflora einer Probestfläche von 0,4 bzw. 1 ha Größe nur ein unzureichendes Bild der Gesamtheit der auf diesen Flächen vorkommenden Arten wiedergibt. Um Veränderungen in der Zusammensetzung der Ackerbegleitflora festzustellen, kann somit die vorliegende Erhebung nur begrenzt herangezogen werden. Der Ausfall oder das Hinzutreten von Arten kann auf zu viele von Jahr zu Jahr wechselnde standörtliche Faktoren zurückzuführen sein, insbesondere auf diejenigen, die mit dem Anbau der im betreffenden Jahr angebauten Kulturart verbunden sind. Bezüglich der Vergleichbarkeit erscheint es daher ebenso wie den vegetationskundlichen Aufnahmen in den Kernflächen wünschenswert, bei den floristischen Erhebungen in den 1 ha-Flächen darauf zu achten, dass bei den Wiederholungsinventuren dieselbe Kulturart angebaut wird. Auf der anderen Seite schränkt dies jedoch die Erfassung des prinzipiell möglichen Artenbestandes ein, der durch die standörtlichen Gegebenheiten bedingt ist und sich durch jährliche Aufnahmen innerhalb eines Fruchtfolgezykluses erfassen lässt. Daher wird empfohlen, in der Anfangsphase des Monitorings die Untersuchungen zunächst über drei Jahre in jedem Jahr durchzuführen, um die Erfassung des Ausgangszustandes zu gewährleisten und dann in größerem Abstand zu wiederholen.

Der im BDF-Programm durchgeführte Wiederholungsrhythmus von höchstens 10 Jahren erscheint unter den oben genannten Gesichtspunkten, dass in einzelnen Erhebungen jeweils nur ein Ausschnitt der Artenvielfalt ermittelt werden kann, relativ grob. Für eine genauere Erhebungen sind kürzere Wiederholungsintervalle von z.B. 3 Jahren wünschenswert. Andererseits ist zu bedenken, dass Veränderungen in der Ackerbegleitflora durch viele anthropogene wie auch Umweltfaktoren bedingt sein können. Für eine Rückführung auf GVO verursachte Effekte ist somit ein ausreichend großer Stichprobenumfang, d.h. die Einbeziehung aller BDF-L, notwendig. Dies führt bei der Wahl eines kürzeren Wiederholungsintervalls jedoch zu einem hohen Arbeits- und damit Kostenaufwand. Weiterhin ist zu bedenken, dass das Monitoring auch zur Detektion von langfristigen Veränderungen dienen soll, die sich über viele Jahre, evtl. auch Jahrzehnte hinziehen können. Unter diesem Gesichtspunkt erscheint ein größeres Wiederholungsintervall für die floristischen Erhebungen in den 1 ha-Flächen gerechtfertigt. Hinzu kommt, dass nach der bisherigen Praxis im BDF-Programm in der Regel kürzere Intervalle gewählt wurden. Die ersten Wiederholungsinventuren fanden bereits nach 6 Jahren statt, so dass eine Verkürzung des Intervalls durchaus im Rahmen des bestehenden Programms möglich erscheint. Von den 38 bis 2002 durchgeführten Wiederholungsinventuren der 1 ha Flächen wurden 12 Flächen nach 6 Jahren, 5 Flächen nach 7 Jahren, 13 Flächen nach 8 Jahren und 8 Flächen nach 9 Jahren erneut kartiert.

Floristische Inventarisierung in der Umgebung der 1-ha BDF/ Artenzahl der Gesamtäcker

Als Gesamtacker wurde in dieser Studie die Ackerfläche verstanden, die die eigentliche Versuchsfläche umgibt und durch randlich gelegene, nicht beackerte Lebensräume wie Wegraine, Gehölzstreifen oder Gräben u.s.w. (äußerer Ackerrand) begrenzt wurde. Dadurch konnte eine in der Praxis gut abgrenzbare und über mehrere Jahre vergleichbare Fläche beschrieben werden, die den inneren Ackerrand des Gesamtackers mit umfaßte. Im Gegensatz dazu variieren häufig die Landwirte die Parzellengröße innerhalb dieser Fläche, die mit einer bestimmten Kulturart bebaut wird. Ein Vergleich der Parzellen mit jeweils einheitlicher Feldfrucht über mehrere Jahre hinweg ist daher aufgrund der u.U. veränderten Parzellengröße problematisch. Hinzu kommt, dass bei der Kartierung einer einzelnen Parzelle z.T. kein eigentlicher Ackerrand erfasst werden kann, wenn nämlich die Parzelle direkt angrenzend zu anderen Ackerparzellen liegt, was in der Praxis häufig der Fall ist.

Stellt man die Artenzahlen der FF und der 1 ha-BDF012-L aller Untersuchungsjahre jeweils den in dieser Studie erhobenen Artenzahlen der entsprechenden gesamten Äcker (aFF bzw. aBDF) gegenüber, wird erkennbar, dass in den etwa 0,4 bzw. 1 ha großen Flächen nur ein relativ geringer Anteil des gesamten Ackerartenbestandes wiederzufinden ist. Hierdurch wird offenbar, wie stark der Anbau der Kulturart die Standortbedingungen im Inneren des Ackers einengt und damit die Entwicklung zahlreicher Arten unterbindet.

Die Wiederholung der Aufnahme der Artenbestände des gesamten Ackers in dem die Freisetzungsfläche lag (aFF) und auch des kompletten Ackers aBDF012-L in den Untersuchungsjahren 2002 und 2003 hat zu einer wesentlichen Vervollständigung der ackerbezogenen Artenlisten geführt. Hieraus wird deutlich, dass nach zwei oder drei Jahren Artenerfassung ein hohes Maß an Vollständigkeit des Arteninventars eines Ackers erreicht werden

kann. Bei derlei Überlegungen ist jedoch zu berücksichtigen, dass neben der Samenbank im Boden auch Neueinträge von Samen oder auch das Aussterben von Arten die aktuelle Flora eines Ackers formen. Da darüber hinaus die spezifischen Kulturbedingungen der verschiedenen Feldfrüchte darüber bestimmen, welche der Arten aus der Samenbank eines Ackers zur Entwicklung kommen, sollte auf eine ausreichend lange Untersuchungsdauer (2-3 Jahre) keinesfalls verzichtet werden, um ein breites Spektrum angebaute Kulturarten im Laufe des gesamten Untersuchungszeitraumes abzudecken.

Die Erfassung des Artenbestandes der Gesamtäcker dient zur Bestimmung des Artenpotenzials eines Ackers, also welche Arten prinzipiell auf den dann mit einer bestimmten Kulturart bestellten Teilparzellen vorkommen können. Gerade wenn Referenzflächen nicht direkt an ein transgenes Feld angrenzen, und somit nicht die selben standörtlichen, biotischen und abiotischen Gegebenheiten aufweisen, stellt die Potenzialbestimmung eine elementare Hintergrundinformation dar, da sowohl die absoluten Artenzahlen in den Kernflächen und den 1 ha-Flächen sowie deren Veränderungen über die Zeit in Relation zur Umgebung interpretiert werden müssen. Wenn beispielsweise zwei Rapsparzellen ähnliche Artenzahlen im Feldinneren (Kernfläche oder 1 ha-Fläche) aufweisen, aber unterschiedliche Potenziale bzgl. des Gesamtackers aufweisen, dann kann die in Relation dazu gesehene geringe Artenzahl im Feldinneren des einen Feldes auf einen effektiveren Herbizideinsatz hindeuten.

Der Vergleich der Artenzahlen von Gesamtäckern von verschiedenen Standorten bzw. deren zeitliche Veränderungen wird dagegen nur begrenzt zur Dokumentation von Veränderungen dienen können, da viele Faktoren die absolute Artenzahl der Gesamtäcker beeinflussen, wie z.B. die landwirtschaftlichen Maßnahmen der anderen Teilparzellen, oder Veränderungen in den angrenzenden Bereichen. Ebenso werden Beeinflussungen der Ackerrandvegetation, die als eine mögliche Auswirkung des Anbaus herbizidresistenter Pflanzen und der damit bedingten Anwendung von Totalherbiziden diskutiert werden, anhand dieser Erhebungen nur sehr begrenzt feststellbar sein. HR-Rapskulturen können auch zu einem Zeitpunkt fortgeschrittenen Wachstums bespritzt werden. Dafür muss eine höhere SpritzhöhenEinstellung gewählt werden, die die Wahrscheinlichkeit einer verstärkten Spritzmittelabdrift in den Ackerrand erhöht (ZÜGHART & BRECKLING, 2003). Die genannten floristischen Aufnahmen des Gesamtackers umfassen zwar den inneren Ackerrand, aufgrund der variierenden Intensität der landwirtschaftlichen Bearbeitung ist dieser Bereich bzgl. der Artenzahl in der Regel aber so hoch variabel, dass Beeinflussungen bedingt durch Veränderungen im Herbizidmanagement nur schwer zu erfassen sein werden, zumal keine quantitativen Daten erfaßt werden.

Der äußere Ackerrand wurde im Rahmen dieser Studie nicht einbezogen. Veränderungen in diesen Bereichen könnten aber prinzipiell z.B. durch die Einrichtung von Dauertransekten im Ackerrand und pflanzensoziologischen Aufnahmen wie in den Kernflächen untersucht werden. Möglich wäre z.B. die Anlage von je zwei Transekten mit einer Länge von mindestens 10 m und 1 m Breite pro Untersuchungsgebiet in einem homogenen Strukturbereich und nicht direkt angrenzend an benachbarte Äcker.

Im Rahmen des BDF-Programms werden floristische Inventarisierungen in der Umgebung der BD-Flächen durchgeführt, allerdings sind die untersuchten Flächen sehr groß (500 m

Radius um die 1 ha-BDF) und umfassen diverse Biotopstrukturen, die i.d.R. weit über den Gesamtacker hinausgehen. Die erfassten Biotopstrukturen werden bzgl. der gefundenen Arten jedoch nicht aufgeschlüsselt. Wünschenswert wäre daher eine getrennte Dokumentation der Funde innerhalb des Gesamtackers und ggf. des Ackerrandes bei den entsprechenden Begehungen, die dadurch weiterführende Aussagen zulassen könnten. Den derzeit durchgeführten Erfassungen der Artenlisten in max. 10 jährigen Wiederholungsintervallen wird nur geringe Relevanz bzgl. eines GVO-Monitoring zugeordnet, sie können jedoch u.U. bei zukünftigen Fragestellungen oder Zustandsbeschreibungen Hintergrundinformationen liefern. So erfolgt bei den im BDF-Programm durchgeführten Auswertungen die Darstellung und die zeitliche Entwicklung der Gesamtartenzahl der Umgebung (Anhang A, Karte 38), der bedrohten Arten (Rote Liste-Arten, Anhang A, Karte 39), des Verhältnisses der Gesamtartenzahl zu den Rote Liste Arten (Anhang A, Karte 40) sowie des Vergleiches der Artenzahlen in der Umgebung, 1 ha- und Kernflächen (Anhang A, Karten 41-43). Beispielsweise ergab die floristische Auswertung der Aufbauphase im BDF-Programm 1992-2000, dass im Mittel die 1 ha-Flächen 22,3% der Artenzahl der 500 m Umgebung der 1 ha-BDF erreichen (mit einer Spanne von 4,9% - 53,7%). Die Kernflächen erreichen im Mittel 9,3% der Artenzahl der Umgebung (Spanne von 1,5% - 25,9%). Dabei zeichneten sich besonders die Ackerflächen durch eine sehr geringe Artenzahl aus. So befanden sich - mit einer Ausnahme - unter den 31 BDF-L mit Artenanteilen von max. 7,3% in den Kernflächen ausschließlich Ackerflächen (LINDERS & MEYER-SPETHMANN, 2001). Weiterhin konnten signifikante Zusammenhänge zwischen den ermittelten Artenzahlen auf den BDF-L und den Bodenklassen, den Bewirtschaftungsmaßnahmen (Pflanzenschutzmittel-Anwendungen) und dem Umfang der Mineraldüngung in der Aufbauphase des BDF-Programms ermittelt werden (LINDERS & MEYER-SPETHMANN, 2001), die weiterführende Interpretationen der Artenzahlen zulassen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass trotz der genannten Limitierungen die im BDF-Programm durchgeführten floristischen und vegetationskundlichen Arbeiten maßgeblich dazu beitragen können, negative Auswirkungen des Anbaus transgener Pflanzen bzw. der damit ggf. einhergehenden Veränderungen in der landwirtschaftlichen Praxis zu detektieren. Dies gilt insbesondere unter Einbeziehung der vorgeschlagenen Modifikationen für ein GVP-Monitoring. Dass eine über einen längeren Zeitraum bzw. in größerem Umfang durchgeführte Applikation von Totalherbiziden grundsätzlich die Ackerbegleitvegetation drastisch beeinflussen kann, zeigt die über einen Zeitraum von 4 Jahren in Großbritannien durchgeführte Farm-Scale Evaluation Studie. Auf mit konventionellen Herbiziden behandelten Rapsfeldern im Vergleich zu transgenen Feldern, die mit dem Totalherbizid Glufosinat behandelt wurden, waren 1,7 mal mehr Beikräuter zu finden. Die produzierte Menge an Beikrautsamen war in den konventionellen Feldern fünfmal höher und die Samenüberdauerung im Boden war doppelt so hoch wie in den Feldern mit transgenen Kulturpflanzen.

Es ist anzunehmen, dass solche Auswirkungen auf die Artenzahl langfristig auch über die derzeit im BDF-Programm durchgeführten vegetationskundlichen Erhebungen in den Kernflächen und den 1 ha-BD-Flächen ermittelt werden können. Zusätzliche Kartierungen bzw. eine detailliertere Zuordnung zu Biotopstrukturen (Gesamtacker/ innerer und äußerer Acker-

rand) in der Umgebung der 1 ha-BDF könnten zudem Beeinflussungen der Ackerrandvegetation aufzeigen. Ebenso sind für die Detektion langfristiger Veränderungen die im BDF-Programm gewählten Intervalle ausreichend. Die gefundenen Arten, Artenzahlen und Deckungsgrade werden bei jeder Kartierung mit den Funden der vorherigen Kartierungen verglichen, es werden Angaben zur Beständigkeit für die jeweiligen Arten gemacht sowie Tendenzabschätzungen durchgeführt. Dadurch können tendenzielle Veränderungen zeitnah erfaßt werden. Beispielhaft wird dies im Anhang C, Tab. 1 anhand einer Kernfläche der BDF013-L dargestellt.

Zudem ermöglichen die im BDF-Programm erhobenen Daten der weiteren BDF-L mit anderen Fruchtfolgen eine Einordnung bzw. Interpretationshilfe bzgl. des allgemeinen Entwicklungstrends der Ackerbegleitvegetation. Speziell für ein HR-Raps Monitoring wäre es jedoch wünschenswert, die floristischen Erhebungen sowie die Vegetationsaufnahmen im BDF-Programm mit dem Anbau von Raps zeitlich abzustimmen.

Die Verbreitung von transgenen Pflanzen außerhalb der Anbaufläche sowie Beeinflussungen durch Auskreuzungen bzw. Bestandsveränderungen in potenziellen Kreuzungspartnern werden im BDF-Programm nicht erhoben. Entsprechende Erweiterungen im Untersuchungsprogramm wurden im Rahmen dieser Studie geprüft und werden im Folgenden dargestellt.

Vorkommen von Raps und seinen potenziellen Kreuzungspartnern

In allen Untersuchungsgebieten (Sicke, BDF008-L, BDF010-L, BDF012-L, BDF058L) wurden während des gesamten Untersuchungszeitraumes hauptsächlich Vorkommen von *Sinapis arvensis* und *Brassica napus* registriert. Darüber hinaus wurden *Brassica rapa*, *Diplotaxis muralis*, *Raphanus sativus*, *Raphanus raphanistrum* und *Sinapis alba* festgestellt, allerdings an nur an wenigen Fundorten. Von den übrigen potenziellen Kreuzungspartnern (s. Tab. 10, Kap. 2.3.2) zählen nur noch *Brassica nigra*, *Brassica juncea*, *Diplotaxis tenuifolia*, *Eruca sativa*, *Erucastrum gallicum* und *Hirschfeldia incana* zu den in der Bundesrepublik Deutschland spontan vorkommenden Arten. Berücksichtigt man allerdings die Verbreitung (HAEUPLER & SCHÖNFELDER, 1988) und Häufigkeit dieser Arten in Niedersachsen sowie ihre standörtliche Einnischung, erscheint ihr Auftreten in den Untersuchungsgebieten nicht sehr wahrscheinlich, aber nur für die letztgenannte Art praktisch ausgeschlossen.

Raps (*Brassica napus*) zeigt nur eine geringe Konkurrenzfähigkeit in ungestörten Habitaten. Nur an gestörten Standorten kann Raps prinzipiell verwildern, wobei diese Standorte in der Regel kurzzeitig sind (ADOLPHI, 1995, SEBALD *et al.*, 1993, NORRIS & SWEET, 2002). Als Ausnahmen hiervon sind allerdings Bahndämme zu nennen, an denen Dauervorkommen von Raps beschrieben wurden (MENZEL *et al.* 2003). Dementsprechend lag der Häufigkeitsschwerpunkt der Rapsvorkommen in den untersuchten Gebieten im Bereich von Ackerflächen und ihren Randbereichen (etwa 58% aller Fundorte, Tab. 18 u. 19), wobei Zuckerrübenäcker als Standort individuenreicher Vorkommen besondere Bedeutung haben (s. auch Feldmann, 2000). In ruderal geprägten Lebensräumen, im Bereich von Weg- und Straßenrändern sowie auf Lager- und Brachflächen wurden etwa 37% aller Rapsfundorte gezählt, doch handelt es sich um vergleichsweise individuenarme Vorkommen. So wurden auf Ä-

ckern und im Bereich ihrer Ränder durchschnittliche Individuenzahlen von etwa 180 bzw. 1600 ermittelt, während die ruderalen Vorkommen nur ca. 10 Pflanzen pro Fundort umfassen. Ob es sich bei den Rapsvorkommen auf Äckern um dauerhafte Populationen handelt, d. h. ob sie in der Lage sind, als Begleitkrautbestände genug Nachkommen zu produzieren, um ihr Fortbestehen über mehrere Jahre oder sogar Jahrzehnte zu sichern, muss offen bleiben. Zwar scheint in einigen Ackerflächen ein größerer Samenvorrat zu existieren als in anderen. Die Beobachtung, dass an oder in direkter Nachbarschaft der 50 Acker- bzw. Ackerand-Fundorte nicht nur in einem Untersuchungsjahr Raps gefunden wurde (Anhang A, Karte 4 und 11), macht diese Annahme wahrscheinlich. Doch muss davon ausgegangen werden, dass ausfallende Samen im Zuge des Rapsanbaus die Hauptursache für die offenbar beträchtlichen Samenmengen in der Samenbank bestimmter Äcker darstellen.

Beim Vergleich der Ergebnisse der Gebiete Sickte und BDF012-L aus den einzelnen Untersuchungsjahren wird deutlich, dass die Individuenzahlen von Jahr zu Jahr erheblich schwanken können. In beiden UG's sind wenige sehr umfangreiche Vorkommen (jeweils zw. 1000 und 10000 Pflanzen) für die besonders hohen Individuenzahlen im Jahr 2003 verantwortlich. Derartige Massenvorkommen, die beinahe ausschließlich auf Äckern oder auf Grünbrachen zu finden sind und sich auf einen fehlenden oder ineffektiven Herbizideinsatz zurückführen lassen, konnten 2002 in beiden Gebieten nicht festgestellt werden. Die ermittelte Gesamtindividuenzahl betrug hier nur etwa ein hundertstel der in 2003 gezählten Individuen.

Ruderaler Rapsvorkommen auf Lager- und Brachflächen oder an Straßen- und Wegrändern haben nicht in allen Untersuchungsgebieten gleichermaßen Bedeutung. In den Gebieten BDF012-L und BDF008-L sowie mit Einschränkungen auch im Gebiet BDF010-L wurden sie nur in geringem Maß registriert oder fehlten ganz. Die Ursache liegt wahrscheinlich im hier nur geringen Flächenanteil geeigneter, d.h. gestörter Standorte begründet. So zeichnen sich die betreffenden Untersuchungsgebiete durch die typischen Vegetationsbestände der Ackerlandschaft aus mit regelmäßig gemähten, dichten grünlandähnlichen Beständen an Weg- und Straßenrändern und mit nur wenig Flächen, die Ruderalvegetation tragen. Im viel weniger monoton gegliederten Randbereich des Ortes Sickte und der benachbarten Siedlungen im Übergangsbereich zwischen Siedlungsgebiet und Ackerlandschaft waren dagegen viel mehr ruderaler Standorte zu finden, als in den übrigen Gebieten. Als typische Beispiele seien hier nur Lagerflächen, Bauerwartungsbrachen und auch zahlreiche, auf sehr unterschiedliche Weise bewirtschaftete Raine zu nennen. Dementsprechend häufig konnten hier Rapsvorkommen festgestellt werden.

Bedeutende Rapsvorkommen an Rändern von Landstraßen wurden im Verlauf der ganzen Untersuchung ausschließlich im Untersuchungsgebiet BDF058-L festgestellt. Nach SEBALD *et al.* (1993) halten sich an solchen Standorten Populationen z. T. über mehrere Jahre, da eine erhöhte Toleranz von *Brassica napus* gegenüber Streusalz beobachtet wurde.

Auch der Ackersenf (*Sinapis arvensis*) hat einen Schwerpunkt in den Äckern und Ackerrändern (etwa 61% aller Funde, Tab. 18, 19). Vorkommen in ruderalen Lebensräumen sind nur im UG Sickte häufig und dort besonders auf Lager- und Brachflächen festgestellt worden. Mit mittleren Individuenzahlen von etwa 300 Pflanzen pro Fundort können sie in diesen Lebens-

räumen ähnlich individuenreich ausfallen wie auf Äckern und in ihren Ackerrandbereichen. In den übrigen UG's sind die *Sinapis arvensis*-Funde fast nur auf den beackerten Flächen zu finden, was vermutlich ähnlich zu erklären ist wie beim Raps. In allen Untersuchungsgebieten zusammen umfassen die Vorkommen an Ruderalstandorten etwa 36% aller Fundorte. Als heimische Art ist der Ackersenf in der Ackerbegleitflora Niedersachsens fest etabliert, mit besonderem Schwerpunkt in den Gebieten basenreicher Lehmböden und Verbreitungslücken im Bereich der Sand- und Moorböden des Tieflandes (HAEUPLER & SCHÖNFELDER; 1988). Dies ist vermutlich auch die Ursache für die Tatsache, dass im UG BDF010-L nur ein einziges Individuum dieser Art gefunden wurde. Anders als beim Raps ist es dagegen relativ wahrscheinlich, dass in seinem übrigen Verbreitungsgebiet ein umfassender Samenvorrat im Boden existiert. Das Ausmaß seines aktuellen Auftretens wird daher vermutlich vorrangig von den von Jahr zu Jahr wechselnden Standortbedingungen auf den Äckern, wie z. B. von der Kulturart oder der Intensität des Herbizideinsatzes, abhängen. Hierauf ist wahrscheinlich das im Untersuchungsgebiet BDF012-L zurückzuführen. Auf der anderen Seite ist anzunehmen, dass nicht auf allen Äckern eines Gebietes eine vergleichbar umfangreiche Samenmenge im Boden vorhanden ist. Erkennbar wird dies durch die Tatsache, dass an mehreren Fundorten im UG Sickte Überlappungen zu Fundorten aus einem anderen Untersuchungsgebiet auftraten (Anhang A, Karte 5). Es scheint also Ackerflächen zu geben, auf denen *Sinapis arvensis* unabhängig von der aktuellen Bewirtschaftungsweise mit erhöhter Wahrscheinlichkeit zu finden ist.

Das unbeständige Auftreten von Örettich (*Raphanus sativus*) oder Weißem Senf (*Sinapis alba*) in Form weniger Exemplare wurde zwar in mehreren Untersuchungsgebieten, insgesamt aber selten beobachtet. In der gegenwärtigen Kulturlandschaft sind beides gängige Zwischenfrüchte zur Bodenverbesserung. Durch Verlust des Saatgutes im Zuge der Aussaat findet offensichtlich eine gelegentliche „Auswilderung“ dieser Kulturarten statt. Unwahrscheinlicher ist dagegen, dass die Samen auf der Kulturfläche ausreifen und dadurch in größerer Zahl in der Samenbank des Bodens vorhanden sind. Im Gegensatz zum Raps werden diese Zwischenfruchtkulturen vor der Samenreife untergepflügt, so dass eine Ausbreitung und Etablierung dieser Arten nur schwerlich vorstellbar erscheint.

Das Vorkommen des Mauer-Doppelsames (*Diploaxis muralis*) im Untersuchungsgebiet Sickte ist möglicherweise weniger stabil als in den ersten beiden Untersuchungsjahren angenommen. Die Population, die im Jahr 2002 etwa 120 Individuen umfasste, schrumpfte im Jahr 2003 auf nur 15 Exemplare. Sie befindet sich in den Asphalttrassen bzw. Pflasterfugen eines Fußweges in Sickte und wurde offenbar durch Herbizideinsatz nachhaltig beeinträchtigt. Auch wenn die wärmeliebende Art auf Äckern vorkommen kann, hat sie im mittleren Niedersachsen ihren Schwerpunkt eher in den Siedlungslebensräumen (PREISING *et al.*, 1995).

Die Vorkommen des Hederichs (*Raphanus raphanistrum*) beschränken sich, von einer einzelnen Pflanze im UG BDF012-L abgesehen, auf das Untersuchungsgebiet in der Stader Geest (BDF010-L), was mit den dortigen basenarmen Böden erklärt werden kann. Anders als der Ackersenf (*Sinapis arvensis*), der seinen Schwerpunkt auf basenreichen Böden hat

und infolgedessen in diesem UG fast fehlt, bevorzugt der Hederich kalkärmere Böden (OBERDORFER, 1990). Über die standörtlichen Gründe hinaus, muss allerdings berücksichtigt werden, dass *Raphanus raphanistrum* in Niedersachsen vielerorts rückläufig ist und als gefährdete Art aufzufassen ist (GARVE, 1993).

Die molekulare Analyse auf Transgenität (Übergang 35S/pat-Gen) der gefundenen Kreuzungspartner fiel in den Untersuchungsgebieten der BD-Flächen erwartungsgemäß negativ aus. Ebenso konnten in Sickte vor der Blüte des transgenen Rapses in den benachbarten Kreuzblütlerbeständen keine entsprechenden gentechnischen Veränderungen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass zum Zeitpunkt vor einer möglichen Auskreuzung durch den untersuchten Freisetzungsversuch in Sickte, bzw. in den BDF-Referenzgebieten noch keine transgenen Individuen in den Kreuzblütlerbeständen vorkamen. Nach der Blüte des transgenen Rapses konnten im selben Jahr an 2 Fundorten im Abstand von 400 und 700 m von der Freisetzungsfläche das Transgen in ruderalen Rapspflanzen nachgewiesen werden. Die Auskreuzungsrate lag bei 0,07% in 400 m und 0,03% in 700 m Entfernung. Diese Rapspflanzen wurden an Ackerrändern gefunden, auf denen im Jahr zuvor jeweils konventioneller Raps kultiviert wurde, dementsprechend handelt es sich bei diesen Funden vermutlich um Ausfallraps. Des Weiteren konnten Auskreuzungen im Erntegut eines benachbarten Rapsfeldes in ca. 300 m Abstand nachgewiesen werden. Die Auskreuzungsrate lag jedoch an allen Teilparzellen unter 0,1%.

Die Ausbreitung von Rapspollen durch Wind und Insekten wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. So werden Abhängigkeiten vom experimentellen Design, von der Feldgröße, der Lage der Anbaufläche, der Windrichtung und -geschwindigkeit, den Wetterbedingungen, der Pollenmenge und der jahreszeitlich wechselnden Bestäuberdichte, -aktivität und –vielfalt diskutiert (Übersicht bei ZÜGHART & BRECKLING, 2003, EASTHAM & SWEET 2002). Entsprechend unterschiedlich hohe Auskreuzungsraten in kultivierte Bestände oder Fangpflanzen wurden in der Literatur beschrieben (Übersicht z.B. bei TREU & EMBERLIN, 2000, EASTHAM & SWEET 2002). Eine Auskreuzungsrate von unter 0,1% im Nachbarfeld in 300 m Abstand von dem transgenen Feld in Sickte ist damit verglichen nicht ungewöhnlich. Studien über Auskreuzungsraten und –distanzen in Ruderal- oder Ausfallraps wurden dagegen bisher seltener durchgeführt. Es ist bekannt, dass Ruderalraps längere Blühfenster als Kulturraps aufweist, und sich die Blühfenster auch zeitlich überlappen (HAEUPLER *et al.*, 2004). Da jedoch nicht alle Ruderalrapspflanzen zeitgleich zu dem Kulturraps blühen, sind geringere Auskreuzungsraten in die Ruderalrapsbestände als in benachbarte Kulturrapsbestände zu erwarten (NORRIS & SWEET, 2002). In England wurden entsprechende Untersuchungen im Rahmen einer großangelegten Monitoringstudie zwischen 1994 und 2000 durchgeführt und in geringem Umfang Auskreuzungen in Ruderal- oder Ausfallraps gefunden (NORRIS & SWEET, 2002). Innerhalb eines Radius von 500m um fünf transgene Rapsfelder wurden dabei Auskreuzungen in potenzielle Kreuzungspartner untersucht. Die Anbaufläche mit transgenen Pflanzen betrug zwischen 1 und 38 ha. Nur bei zwei Untersuchungsgebieten konnten positive Nachweise geführt werden. Dabei wurden zum einen Auskreuzungen in Ruderalbestände nachgewiesen, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu den transgenen Feldern (Ab-

stand 10-20m) standen und zudem zeitgleich mit den transgenen Pflanzen blühten. In Samenanalysen dieser Pflanzen wurden Auskreuzungsraten von 0,39% und 0,1% gefunden. Bei dem zweiten Standort wurden im Abstand von 40 m und 100 m transgene Sequenzen in Ruderalraps nachgewiesen. Die Parzellen mit transgenen Pflanzen waren an diesem Standort zwischen 3 und 15 ha groß. Auskreuzungen in Ruderalraps in größerem Abstand (150, 200, 1000m) um die verschiedenen Felder konnten nicht nachgewiesen werden (NORRIS & SWEET, 2002). Verglichen mit diesen Ergebnissen erscheint der Nachweis von Auskreuzungen in Ruderal- bzw. Ausfallraps in 700 m Abstand zu dem transgenen Feld in Sickte relativ hoch, zumal das Versuchsfeld in dieser Studie nur 0,4 ha groß war. Andererseits konnte FELDMANN (2000) ebenfalls Auskreuzungen in einer Ruderalrapspflanze feststellen, die in 400 m Entfernung zu einem nur 0,12 ha großen transgenem Feld stand, dass zudem noch mit einer Mantelsaat umgeben war.

Blattuntersuchungen von potenziellen Kreuzungspartnern in den beiden nachfolgenden Jahren ergaben in Sickte keine Funde von Hybriden, was darauf hindeutet, dass sich keine transgenen Pflanzen etablieren konnten. Gleiches wurde auch bei NORRIS & SWEET (2002) und FELDMANN (2000) beschrieben. Auskreuzungen in andere potenzielle Kreuzungspartner außer Ruderalraps konnten in der Umgebung von Sickte nicht nachgewiesen werden, obwohl Auskreuzungen in natürlich vorkommende *B. rapa*-Populationen beschrieben wurden (NORRIS & SWEET, 2002; DAVENPORT *et al.*, 2000; WILKINSON *et al.*, 2000).

Die Untersuchungen am Standort Sickte und den Referenz-BD-Flächen haben erneut gezeigt, dass in der Umgebung von landwirtschaftlichen Flächen, an denen Raps typischer Weise in der Fruchtfolge angebaut wird, potenzielle Kreuzungspartner von Raps zwar in veränderten Häufigkeiten, aber dennoch an jedem Standort vorkommen und dass es unter Freilandbedingungen zur Auskreuzung transgener Eigenschaften kommen kann. Dabei wird die Auskreuzungsfrequenz sowohl in andere kultivierte Bestände als auch in Ruderalraps oder natürlich vorkommende Kreuzungspartner von zahlreichen Faktoren beeinflusst und ist somit nur schwer vorhersagbar. Daher sollte die Beobachtung dieser Effekte ein elementarer Bestandteil im Monitoring von transgenem Raps sein.

Die im Rahmen des Projektes entwickelte Strategie der Untersuchungen zum Vorkommen von Transgensequenzen im Kreuzblütlerbestand hat sich als geeignet für eine routinemäßige Durchführung erwiesen. Die gewählte Untersuchungsfläche innerhalb eines Radius von 1 km um die entsprechenden Feldmittelpunkte für ein GVO-Monitoring erwies sich als gut praktikabel und stellt einen ausreichenden Kompromiss zwischen Arbeits- und damit Kostenaufwand und dem Ausbreitungspotential von Raps dar. Untersuchungen zur Windverbreitung von Rapspollen ergaben zwar Entfernungen von bis zu 4 km (ZÜGHART & BRECKLING, 2003). Kartierungen in einer entsprechend großen Umgebungsfläche sind jedoch zu aufwendig, als dass sie für ein Routinemonitoring vorgeschlagen werden könnten, zumal die Einrichtung von ausgewählten Dauertransekten - wie in der Einleitung erläutert - nicht praktikabel ist. Wiederholte Kartierungen in der Umgebung von 1 km um die Flächen ermöglichen die Beobachtung von Veränderungen in den Bestandsentwicklungen von Kreuzungspartnern in en-

gerer räumlicher Nähe zu den transgenen Feldern, wo die Wahrscheinlichkeit einer Beeinflussung am größten erscheint.

Für die Kartierungen von potenziellen Kreuzungspartnern wurden pro Jahr 3 Begehungen (Mai, Juli, September) durchgeführt, so dass der jährliche Bestand detailliert dokumentiert werden konnte. Die Erhebungen zeigen eine deutliche Fluktuation der Bestände innerhalb des Jahresverlaufs, bedingt durch die Biologie der entsprechenden Arten und der Unbeständigkeit der Standorte. In den beiden Untersuchungsgebieten Sickte und BDF012-L, die über 3 Jahre kartiert wurden, zeigte sich zudem eine hohe Fluktuation der Bestände zwischen den verschiedenen Jahren, wie es auch schon mehrfach beschrieben wurde (u.a. FELDMANN, 2000; NORRIS & SWEET, 2002). Eine Empfehlung bzgl. der Häufigkeit von Wiederholungsintervallen bei der Kartierung der Kreuzungspartner innerhalb eines Jahres oder auch größerer Zeitabstände ist daher schwer vorzunehmen. Eine jährliche Durchführung von zwei bis drei Begehungen bei einer ausreichend großen Anzahl von Feldern wird aufgrund des hohen Aufwandes bei Routineuntersuchungen nicht durchführbar sein. Denkbar wäre eine nur einmalige Begehung bei einer jährlichen (evtl. auch seltener) Wiederholung. Dabei würden aber erhebliche Anteile der jährlichen Bestände nicht erfaßt werden können, und somit die Vergleichbarkeit zu späteren Wiederholungsinventuren stark eingeschränkt werden. Daher wird vorgeschlagen, mindestens zwei Begehungen pro Jahr (z.B. Ende Mai und Anfang August) durchzuführen, und diese in größerem zeitlichen Abstand, z.B. alle drei Jahre zu wiederholen. Dies gewährleistet zum einen eine ausreichend detaillierte Erhebung der Bestände, sowie die Erfassung transgener Pflanzen innerhalb eines Jahres und zum anderen im Hinblick auf lange Zeiträume (10 bis 30 Jahre und länger) eine ausreichende Anzahl an Wiederholungsaufnahmen, um langfristige Bestandsveränderungen erfassen zu können. Kurzfristige Bestandsveränderungen werden ohnehin aufgrund der hohen Variabilität in den entsprechenden natürlich vorkommenden Beständen wahrscheinlich nicht oder nur sehr begrenzt aufzuzeigen sein. Es wird vorgeschlagen, bei einem dreijährigen Wiederholungsrythmus diesen an den Aufnahmerhythmus der Vegetationsuntersuchungen der Kernflächen im BDF-Programm anzugliedern.

Zusätzlich wird vorgeschlagen, zur Erfassung von Bestandsveränderungen der potenziellen Kreuzungspartner in Niedersachsen die Erhebungen des niedersächsischen Pflanzenarten-erfassungsprogramms zu berücksichtigen. In diesem Programm werden seit 1983 hauptsächlich von ehrenamtlichen Mitarbeitern Kartierungen mit standardisierten Meldebögen durchgeführt. In steigendem Umfang werden darüber hinaus auch hauptamtlich erhobene Daten verwendet. Seit 1996 wird ein Minutenfeldmonitoring durchgeführt, bei dem auf dem Meldebogen „Erfassungen der Gefäßpflanzen eines Gebietes“ (GLG) alle Pflanzen kartiert werden. Es werden Minutenfelder bzw. Viertelquadranten aufgesucht, in denen die Teilflächen wie Acker, Säume etc. fortlaufend mit Kleinbuchstaben markiert und in einer Karte eingezeichnet werden. Die Arten der Roten Liste werden zusätzlich quantitativ erfasst. Es ist somit nachvollziehbar, in welchen Bereichen der kartierten Flächen die Pflanzen vorkamen. Eine Durchführung der GLG-Kartierung ist für ganz Niedersachsen geplant (WICKE in ZÜGHART & BRECKLING, 2003). Trotz der Problematik, dass für alle nicht bedrohten Arten keine

quantitativen Bestimmungen erhoben werden, die Wiederholungsintervalle z.Z. unklar sind und bei zukünftigen Wiederholungsinventuren aufgrund der ehrenamtlichen Durchführung die Reproduzierbarkeit u.U. eingeschränkt sein kann, können diese Erhebungen als Trendanalysen bzw. als zusätzliche Informationsquelle über Veränderungen innerhalb längerer Zeiträume genutzt werden. Die bisherigen Erhebungen ergaben, dass es von *Brassica adpressa*, *Brassica carinata* und *Brassica fruticulosa* keine Vorkommen in Niedersachsen gibt. Von *B. juncea* gab es keine Nachweise seit 1950 mehr und *B. oleracea* kommt in Niedersachsen nicht als Wildpflanze vor (GARVE, persönliche Mitteilung). Das Vorkommen der anderen potenziellen Raps-Kreuzungspartner in Niedersachsen ist in Anhang A, Karte 44 und 45 dargestellt und bietet eine Übersicht über deren derzeitige Verbreitung.

Zur Untersuchung auf Auskreuzungsereignisse hat sich die Entnahme von Blattmaterial (je ein Blatt pro Pflanze, max. 100 Pflanzen pro Population) und deren molekularbiologische Analyse in Form von Sammelproben (max. 100 Blattproben, getrennt nach Pflanzenart und Untersuchungsgebiet), durch die der Arbeits- und Kostenaufwand drastisch reduziert werden konnte, in der Praxis bewährt und kann für Untersuchungen im Rahmen eines GVP-Monitorings empfohlen werden.

Im Rahmen dieser Studie konnten auch seltene Auskreuzungsereignisse mit der eingesetzten Methoden-Kombination aus Blatt- und Samenuntersuchungen detektiert werden, wenngleich für die Routinedurchführungen die Analyse des Blattmaterials als ausreichend einzustufen ist.

Obwohl Auskreuzungsereignisse am Standort Sickte nur bei der Analyse von Samenmaterial nachgewiesen werden konnten, wird dieses Vorgehen im Rahmen eines Monitoring bzgl. der Auswirkungen auf nicht kultivierte Kreuzungspartner nicht empfohlen. Es konnten sich hier offensichtlich keine transgenen Hybridpflanzen etablieren, die in den nachfolgenden Jahren anhand von Blattuntersuchungen hätten nachgewiesen werden können (s. auch NORRIS & SWEET, 2002). Für eine ökologisch ausgerichtete Langzeituntersuchung ist jedoch gerade die Etablierung von transgenen Hybriden relevant, über die im Gegensatz zu Blattanalysen anhand von Samenanalysen keine Aussagen erzielt werden kann. Zudem ist die Entnahme von reifem Samenmaterial in nicht kultivierten Beständen zeitaufwendiger und für jeden Fund nur innerhalb eines kurzen zeitlichen Rahmens durchzuführen, da sich die Analyse von unreifem Samenmaterial für Routineuntersuchungen als nicht geeignet erwiesen hat. Im Unterschied zur einfachen Durchführbarkeit der Analysen beim Blattmaterial musste hierzu im Vorfeld das Schotengewebe von den Samen getrennt werden. Dieser Umstand, wie auch schon die umständlichere Probenahme bei Samen generell, lassen diese Methodik für ein Routinemonitoring als zu aufwendig erscheinen.

Grundsätzlich hat sich zwar gezeigt, dass der Keimungstest gut geeignet ist, um eine Vorauswahl auf das Vorhandensein des Transgens bei größeren Samenmaterial-Mengen zu treffen, ohne bei der gesamten Anzahl die kostenintensiveren molekulargenetischen Analysen der einzelnen Samen durchführen zu müssen. Diese können sich auf die wenigen ausgewählten Keimlinge eines Testes beschränken. Eine noch schnellere und kostengünstigere

Analysemethode stellt allerdings die DNA-Extraktion aus Tausendkornaliquots dar. Das Mahlen der entsprechenden Samenmengen mit anschließender molekulargenetischer Untersuchung anhand des Saatgutkonzeptes des LAG erwies sich bei der Anwendung im Labor als deutlich praktikabler, zumal sich hierbei im Gegensatz zum Keimungstest keine Begrenzung auf den Nachweis von Herbizidresistenzen ergeben. Verfahren zur Quantifizierung der transgenen Anteile in Samen mittels Real-time PCR werden zur Zeit im Unterausschuß Methodenentwicklung des LAG entwickelt.

Sollten im Rahmen eines GVP-Monitorings auch Auskreuzungsereignisse in kultivierte Rapsbestände untersucht werden, wie sie z.B. für die Einhaltung von Schwellenwerten im Ökolandbau oder in konventionellen Beständen bzgl. der Kennzeichnungspflicht relevant sind, wird vorgeschlagen, die Untersuchungen des Erntematerials entsprechend dem Konzept zur Untersuchung von Saatgut des Unterausschuß „Methodenentwicklung“ des LAG für eine einheitliche länderübergreifende Überwachung durchzuführen.

4.2 Parameter Boden

4.2.1 Nachweis transgener Sequenzen im Boden

DNA gelangt unter anderem durch Abbauprozesse der Pflanzen, teilweise schon während der Wachstumsphase, aber insbesondere nach dem Absterben der Pflanzen in den Boden. Ebenso wird die DNA transgener Pflanzen durch die kontinuierlichen Zellverluste beim Wurzelwachstum im Boden freigesetzt (ERNST *et al.*, 1998).

Um die Persistenz und eine mögliche Anreicherung der transgenen DNA im Boden erfassen zu können, sind geeignete Methoden für die Isolierung von Nukleinsäuren aus Bodenproben zur routinemäßigen Durchführung im Rahmen eines Langzeitmonitorings erforderlich. Die im Verlauf des Pilotprojektes erarbeitete und getestete Extraktionsmethode anhand des MOBIO-Kit (UltraClean™ Soil DNA Isolation, Fa. Mo Bio Laboratories) hat sich für dieses Einsatzgebiet als geeignet erwiesen. Die aus dem Boden isolierte Gesamtheit der Nukleinsäuren enthält sowohl mikrobielle als auch freie Pflanzen-DNA in ausreichender Quantität und Qualität und ist damit für die verschiedenen nachfolgenden Untersuchungen wie der Bestimmung des Gehaltes an transgener DNA und Fingerprintanalysen zur Darstellung mikrobieller Gemeinschaften nutzbar. Grundsätzlich sind für diese Analysen auch andere kommerzielle Kits einsetzbar, so z.B. für Fingerprintanalysen das BIO 101-Kit (FastDNA™ Spin Kit for Soil, Fa. BIO 101; diese Studie und SMALLA & ULRICH, mündlich). Bezüglich der Quantität der extrahierten DNA aus Boden fanden MARTIN-LAURENT *et al.* (2001) bei diesem Kit zudem höhere Extraktionsraten als bei Verwendung des MOBIO-Kit. In der vorliegenden Studie erwies sich das BIO 101 Kit für Real-time PCR-Nachweisanalysen jedoch nicht geeignet, da keine dem MOBIO-Kit vergleichbare Nachweisempfindlichkeit erreicht werden konnte. Dies ist vermutlich durch einen höheren Gehalt an PCR-Hemmstoffen bedingt, was eine Quantifizierung verhindert. Auch eine nachfolgende Aufreinigung führte nicht zu einer Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit, vermutlich bedingt durch die zu hohen Quantitätsverluste. So fanden LLOYD-JONES & HUNTER (2001) Verlusten von 80% nach

Aufreinigung mit dem Genclean-Spin Kit, und somit vergleichbar hohe Raten zu der vorliegenden Studie.

Für Untersuchungen im Rahmen des Monitorings, bei dem DNA-Extrakte aus Bodenproben bezüglich verschiedener Fragestellungen untersucht werden, bietet sich aus Kosten- und Effizienzgründen die Verwendung eines für beide Fragestellungen geeigneten Kits an. Grundsätzlich sei darauf hingewiesen, dass bei Verwendung von kommerziellen Kits in der Routine regelmäßig eine gleichbleibende Qualitätsüberprüfung unbedingt empfohlen wird und zudem die Eignung des gewählten Kits an möglichst allen im Rahmen eines Monitorings zu überwachenden Böden ggf. im Vergleich zu anderen Extraktionsverfahren überprüft werden sollte, da diese stark vom jeweiligen Bodentyp abhängt (ZHOU *et al.*, 1996; KRESK & WELLINGTON, 1999; LLOYD-JONES & HUNTER, 2001). Im Rahmen der vorliegenden Studie erfolgte die Testung der Kits nur an einem Teil der möglichen Referenzflächen.

Es ist bekannt, dass Nukleinsäuren an Bodenpartikel adhären, wobei die Effektivität der Bindung abhängig von Parametern wie pH-Wert, Korngröße sowie Ton- und Sandgehalt des Bodens ist. Ein hoher Tongehalt oder alternativ ein hoher Sandgehalt in Kombination mit niedrigem pH-Wert begünstigen hierbei eine starke Adhäsion der Nukleinsäuren an die Bodenpartikel (LORENZ & WACKERNAGEL, 1987; PAGET & SIMONET, 1994). Dies steht auch in Einklang mit Ergebnissen des NLFb im Rahmen des BDF-Programms, wonach die mikrobielle Biomasse mit zunehmendem Sandgehalt abnimmt (HÖPER & KLEEFISCH, 2001). Ebenso fand VOGEL (2002) quantitative Unterschiede in der Reextraktion von künstlich zugesetzter DNA je nach Bodentyp anhand von quantitativen PCR Analysen, was im Rahmen der vorliegenden Studie anhand von qualitativen und Real-time PCR-Analysen bestätigt werden konnte. Die Stärke der DNA-Adhäsion an die Mineralkomponenten des Bodens hat damit auch Einfluss auf die Nachweisempfindlichkeit für die untersuchten Transgensequenzen, da Schwankungen in der Nachweisempfindlichkeit mit dem Bodentyp korrelierten.

An Bodenproben des Freisetzungsortes Sickte betrug die Nachweisempfindlichkeit von re-isolierter transgener DNA aus HR-Raps mittels qualitativer PCR 65-100 pg DNA/PCR. Damit lag die Nachweisempfindlichkeit re-isolierter DNA aus Boden zwar erwartungsgemäß niedriger als bei Versuchen mit aus Pflanzenmaterial isolierter DNA, jedoch nur geringfügig. Dort zeigte sich im Rahmen des Ringversuches eine sichere Nachweisbarkeit beim Einsatz von 40 - 100pg DNA in die PCR. Aus der statistischen Prüfung geht hervor, dass ein sicherer Nachweis mit Doppelbestimmungen bei 40pg (entspricht 30 Kopien des Transgens) aus Pflanzenmaterial isolierter DNA zu erwarten ist.

Im Rahmen des Pilotprojektes wurden weiterhin die Nachweisempfindlichkeiten für andere transgene Konstrukte aus verschiedenen Kulturpflanzen mittels qualitativer PCR bestimmt. Die Wahl der Primersysteme für die einzelnen Konstrukte erfolgte dabei nach den Vorschlägen des Unterausschuss Methodenentwicklung des LAG. Bis auf den Nachweis der Linie MON 810 (Bt-Mais) konnte die Eignung der anderen Nachweissysteme (Glyphosat- und Glufosinatresistenz bei Raps, Mais und Zuckerrüben, männliche Sterilität bei Raps sowie stärkemodifizierte Kartoffeln) gezeigt werden. Dabei zeigte sich erwartungsgemäß je nach verwendetem Primerpaar eine unterschiedliche Nachweisempfindlichkeit.

Wird auch die Reisolierung der Boden-DNA durch die Adhärenz teilweise erschwert, so erfüllt diese unter natürlichen Bedingungen eine Schutzfunktion gegenüber dem Abbau durch Nukleasen und spielt daher für die Persistenz der DNA im Boden eine wichtige Rolle (PAGET & SIMONET, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit von der Beschaffenheit der Erntereste und Bedingungen für deren Degradierung intakte DNA z.T. über längere Zeiträume erhalten bleibt (SANDERMANN *et al.*, 1997; HANKELN *et al.*, 1998). Das pat-Gen von transgenem Raps war über 4 Wochen nach Unterpflügung des gehäckselten Materials nachweisbar, das pat-Gen aus Mais sogar bis zu 7 Monate (ERNST *et al.*, 1998). Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte im Anschluss an den Freisetzungsversuch in Sickte aus den Bodenproben des transgenen Raps-Feldes die gentechnische Veränderung bis 6 Wochen nach dem Häckseln der Pflanzen mit qualitativen PCR-Analysen und bis 10 Wochen mittels Real-time PCR nachgewiesen werden. Dies entspricht 5 bzw. 9 Wochen nach dem Untergraben der Pflanzenreste. Im Anschluss an diesen Zeitraum war die Detektion der transgenen Sequenz nicht mehr möglich, obwohl noch seneszenten Pflanzenmaterial auf dem Feld sichtbar war. Eine Überprüfung auf die gentechnische Veränderung in 6 Wochen alten Pflanzenresten anhand von qualitativen PCR-Analysen ergab jedoch ebenfalls negative Ergebnisse, so dass davon ausgegangen werden kann, dass keine amplifizierbare DNA in den Pflanzenresten mehr vorlag. Dies steht in Einklang mit Ergebnissen von Ernst (ERNST *et al.*, 1998), der einen über 90%igen Abbau der untersuchten Gene in Blättern und Stängeln innerhalb von etwa 6 Wochen feststellte.

Diese Tatsache könnte auch eine mögliche Erklärung für den fehlenden Nachweis des pat-Gens auf dem transgenen Maisfeld in Sickte sein, da hier die Pflanzen erst im Dezember geerntet und untergegraben wurden, als das Pflanzenmaterial vermutlich bereits abgestorben war und so bereits keine intakte DNA mehr in den Boden eingebracht wurde.

In Dahnsdorf dagegen erfolgte die Ernte nach der üblichen landwirtschaftlichen Praxis. Raps wird erst dann geerntet, wenn die Schoten (bzw. die Samen) voll ausgereift sind, also dann, wenn die Pflanzenteile bereits getrocknet und abgestorben sind. Der Raps wird gemäht und „gedroschen“, das abgestorbene Stroh verbleibt auf dem Feld. Auch bei der Maisernte gelangt vorwiegend abgestorbenes Pflanzenmaterial in den Boden, da nach der Ernte nur die Wurzeln auf dem Feld verbleiben. Obwohl anhand von qualitativen PCR-Analysen kein Nachweis der transgenen Sequenzen in den Raps- und Mais-Parzellen erfolgen konnte, wurden im Jahr 2002 mittels Real-time PCR transgene Sequenzen bis zu 12 Wochen nach der Ernte auf den Raps- und Maisparzellen nachgewiesen (Probennahmen zu späteren Zeitpunkten erfolgten nicht mehr). Auf den anderen Parzellen, auf denen der Anbau transgener Mais- oder Rapspflanzen länger als ein Jahr zurückliegt, war das Transgen nicht mehr nachweisbar. Dabei ist als mögliche Ursache die Bodenzusammensetzung am Standort Dahnsdorf zu berücksichtigen, die eventuell aufgrund des höheren Sandgehaltes die DNA-Isolierung und damit den Transgen-Nachweis erschwert (Tab. 23). Möglicherweise ist dies auch ein Grund dafür, dass auch bei der mehrjährigen Nutzung des Standortes zur Aussaat transgener Pflanzen im Fruchtfolgewechsel über insgesamt 7 Jahre eine mögliche Anreicherung des transgenen Materials im Boden unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar war.

Erwartungsgemäß konnten anhand von qualitativen PCR-Analysen in den Kartoffelparzellen keine transgenen Sequenzen nachgewiesen werden, da bei Kartoffeln die Ernte der Knollen entsprechend der landwirtschaftlichen Praxis erst dann stattfand, als das überirdische Kraut verwelkt war und zudem alle Pflanzenteile abgeerntet wurden, so dass kaum intakte Pflanzenreste in den Boden gelangten.

Anhand der Untersuchungen an den Raps-Freisetzungstandorten und den Versuchen mit künstlich zugesetzter DNA zu Bodenproben wurde deutlich, dass Real-time PCR-Analysen eine höhere Nachweisempfindlichkeit besitzen, die auch dann noch positive Ergebnisse lieferten, wenn die Bedingungen für das rein qualitative PCR-Verfahren bereits nicht mehr optimal sind. Anhand von qualitativen Analysen konnte nur auf der Freisetzungsfäche in Sickinge das Transgen nachgewiesen werden. Dies ist vermutlich dadurch zu erklären, dass hier im Gegensatz zu Dahnsdorf die Pflanzen noch vor dem Schotenansatz geerntet wurden, so dass entgegen der landwirtschaftlichen Praxis auf diese Weise eine größere Menge frisches Pflanzenmaterial in den Boden eingearbeitet worden ist, das dort in der Folge den natürlichen Abbauprozessen unterlag.

Aufgrund dieser Befunde wird im Rahmen eines Langzeitmonitorings empfohlen, Real-time PCR-Untersuchungen zum Nachweis des Verbleibs und zur möglichen Anreicherung transgener DNA im Boden durchzuführen, so weit dies unter methodischen Aspekten möglich ist. Neben der höheren Empfindlichkeit bietet diese Methode zudem prinzipiell die Möglichkeit der Quantifizierung des Gehaltes an transgener DNA, so dass das Wiederholungsintervall innerhalb eines Jahres auf eine Untersuchung beschränkt werden kann. Hierzu besteht allerdings für viele der gängigen Primersequenzen noch Entwicklungsbedarf (quantitative Verfahren zum Nachweis der Glufosinat- und Glyphosatresistenz sowie von Bt-Mais werden zurzeit entwickelt, u.a. im Unterausschuß Methodenentwicklung des LAG).

Die im Rahmen der Studie erarbeitete Methode zum Screening von Proben auf das Vorhandensein einer Transgen-Sequenz im Boden wurde über die Dauer des Vorhabens überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass sie zur einfachen und routinemäßigen Durchführung im Rahmen eines Langzeitmonitorings geeignet ist. Daher wird empfohlen, die Bodenprobenahme analog zum BDF-Programm durchzuführen (Sammelmischproben aus 4 homogen eingerichteten Kernflächen pro Feld), und die Real-time PCR-Analysen – nach entsprechender Etablierung- einmal pro Jahr durchzuführen. Die Analysen sollten unter dem Gesichtspunkt einer möglichen langfristigen Anreicherung transgener Sequenzen alle 3 Jahre auf Feldern mit transgenen Kulturpflanzen in der Fruchtfolge wiederholt werden. Auf Referenzflächen können u.U. auch größere Wiederholungsintervalle gewählt werden. Das Screening auf den Referenzflächen sollte auf die derzeit gängigen transgenen Konstrukte erfolgen; auf den transgenen Feldern sollte dagegen schwerpunktmäßig auf die Konstrukte der angebauten transgenen Kulturpflanzen gescreent werden.

Zum jetzigen Zeitpunkt, ohne dauerhaften, großflächigen Anbau transgener Pflanzen, fiel der Transgennachweis zwar überwiegend negativ aus. Bei steigendem Vorkommen transgenem Material im Boden, wie es in der Landwirtschaft/Umwelt in Zukunft zu erwarten ist, kann

jedoch durch diese Vorgehensweise mit hoher Sensitivität und Spezifität eine mögliche Persistenz und Anreicherung von transgener DNA im Boden angezeigt werden.

4.2.2 Mikrobiologische Untersuchungen

Mikrobielle Biomasse/Basalatmung/metabolischer Quotient

Die im BDF-Programm durchgeführten mikrobiologischen Untersuchungen wurden vergleichend auf der Freisetzungsfläche Sickte durchgeführt (s. Tab. 27). Obwohl die Messwerte für die Basalatmung und die mikrobielle Biomasse in den einzelnen Untersuchungsjahren in Sickte verhältnismäßig stark schwanken, finden sich diese Schwankungen im metabolischen Quotienten nur begrenzt wieder. Das Verhältnis der einzelnen Parameter zueinander blieb in den Jahren 2001 und 2002 etwa gleich, nur 2003 stieg der metabolische Quotient an. Der metabolische Quotient steht für die Effizienz der Substratnutzung durch Mikroorganismen (JÖRGENSEN, 1995) und kann als Indikator für Bodenbelastungen wie z.B. auch Herbizidbehandlungen (HARDEN *et al.*, 1993, BECKER *et al.*, 2001) herangezogen werden. Je höher der metabolische Quotient ausfällt, desto stärker ist das Maß der Belastung einzuschätzen. Die berechneten Werte für das Versuchsfeld in Sickte zeigen, dass hier der physiologische Zustand der Mikroorganismen in den Jahren 2001 (vor der Herbizidapplikation) und 2002 (ein Jahr nach der Applikation) gleichbleibend und eine erhöhte Bodenbelastung durch den Anbau transgener Pflanzen im Jahr 2000/2001 und die damit einhergehende Komplementärherbizidapplikation auf den Kernflächen II und III nicht anzunehmen ist. Es ist davon auszugehen, dass die erhöhten Werte 2003 nicht auf den Anbau der transgenen Pflanzen zurückzuführen sind, sondern im Rahmen der natürlichen Schwankungen zu sehen sind. So zeigen auch BD-Felder, bei denen Raps in der Fruchtfolge angebaut wird, im selben Zeitraum ähnlich große, oder noch größere Schwankungen (z.B. BDF039-L, 050-L, 058-L, Tab. 34). Möglicherweise kurzfristig auftretende Veränderungen der mikrobiologischen Kenngrößen durch die Komplementärherbizidapplikation wurden im Rahmen dieser Studie nicht untersucht.

Anhand der in den 3 Jahren unterschiedlich ausgefallenen Messreihen wird auch deutlich, dass tatsächlich etablierte Veränderungen in den einzelnen Messbereichen erst durch die Langzeitbeobachtung der verschiedenen Parameter aufgenommen werden können, da annuelle Schwankungen durch eine längere Beobachtungszeit geringer gewichtet werden können. Aus diesem Grund werden auch die Untersuchungen im BDF-Programm jährlich wiederholt (KLEEFISCH & KUES, 1997).

Tabelle 34: Metabolischer Quotient [$\text{mg CO}_2\text{-C g}^{-1} \text{Cm}^2 \text{h}^{-1}$] von BD-Flächen, in denen Raps in der Fruchtfolge angebaut wird im Vergleich zu Sickte. Hervorgehoben sind die Werte von BD-Feldern, bei denen zum Probenahmezeitpunkt Raps kultiviert wurde. *: Anbau HR-Raps (Quelle: NLfB, unveröffentlicht).

BDF-L	2001	2002	2003
008	0,86	0,71	0,83
010	1,2	1,55	1,16
012	0,88	0,89	0,99
013	0,92	0,78	0,95
014	1,22	1,32	2,19
025	2,06	1,87	1,87
039	1,49	1,79	1,72
046	0,64	0,7	0,96
050	1,75	1,68	2,22
058	0,68	1,13	0,86
065	0,89	0,92	0,99
Sickte	0,76*	0,75	0,91

Unterschiede in der absoluten Größe der Kennwerte in Sickte im Vergleich zu den BDF-Referenzflächen in dieser Studie (Tab. 28) im Zeitraum 2001 bis 2003 ergeben sich neben den annualen Schwankungen auch dadurch, dass die untersuchten mikrobiologischen Kennwerte eng mit physikalischen und chemischen Bodeneigenschaften korreliert sind (HÖPER & KLEEFISCH, 2001). Im Rahmen des Pilotprojektes wurden, neben dem Kriterium des Winterrapsanbaus, bewusst auch Böden unterschiedlicher Zusammensetzung gewählt, um andere Methoden (DNA-Extraktion, Fingerprinttechniken) an möglichst verschiedenen Bodentypen erproben zu können. Die Größe der Schwankungsbreite ist anhand der im BDF-Programm erhobenen Daten abzulesen, beispielhaft ist dies an den BD-Feldern, auf denen zum Zeitpunkt der Bodenprobennahme Raps angebaut wurde, gezeigt (Tab. 35). Die mikrobielle Biomasse beträgt im Mittel $333 \text{ mg Cm}^2 \text{kg}^{-1}$ Boden (Schwankungsbreite $93\text{-}859 \text{ mg Cm}^2 \text{kg}^{-1}$ Boden), die Basalatmung $0,33 \text{ mg CO}_2\text{-C kg}^{-1} \text{Boden h}^{-1}$ (Schwankungsbreite $0,13\text{-}0,85 \text{ mg CO}_2\text{-C kg}^{-1} \text{Boden h}^{-1}$) und der metabolische Quotient beträgt im Mittel $1,13 \text{ mg CO}_2\text{-C g}^{-1} \text{Cm}^2 \text{h}^{-1}$ (Schwankungsbreite von $0,68\text{-}2,01 \text{ mg CO}_2\text{-C g}^{-1} \text{Cm}^2 \text{h}^{-1}$). Die während des Anbaus von HR-Raps in Sickte ermittelten Werte liegen innerhalb dieser Schwankungsbreite.

Tabelle 35: Bodenbiologische Parameter von BD-Feldern, auf denen zum Probenahmezeitpunkt Raps kultiviert wurde im Vergleich zur Freisetzungsfläche Sickte (Quelle: NfB, unveröffentlicht). ¹: Anbau Raps/Zottelwicke. ²: Anbau HR-Raps. *:s. Anhang C, Tab. 2.

BDF	mikrobielle Biomasse	Basalatmung	metabol. Quotient	Jahr	Bodenart*	Bodentyp
010-L	139,8	0,16	1,16	2003	Sl2/Sl4	Pseudogley Podsol
065-L	856,19	0,85	0,99	2003	Tu4/Tu3/Kstc	Mittlere Braunerde-Redzina
008-L	507,93	0,36	0,71	2002	Tu	Pelosol
013-L	388,65	0,31	0,78	2002	Lsu/Tstc	Braunerde
046-L	340,63	0,24	0,7	2002	Tu3/mSgs	Gley-Pseudogley
058-L	194,85	0,13	0,68	2001	Ut3/Sl3	Pseudogley-Braunerde
012-L	299,55	0,27	0,88	2001	Ut	Pseudovergleyter Auenboden
014-L	154,25	0,22	1,41	2000	Ut	Schluffige Seemarsch
055-L	93,05	0,15	1,56	2000	FSms	Podsoliger, vergleyter Tiefumbruchboden
008-L	490,1	0,43	0,88	1999	Tu	Pelosol
013-L	388,78	0,32	0,84	1999	Lsu/Tstc	Braunerde
065-L	712,35	0,60	0,83	1999	Tu4/Tu3/Kstc	Mittlere Braunerde-Redzina
046-L	300,1	0,22	0,73	1998	Tu3/mSgs	Gley-Pseudogley
025-L	161,13	0,24	1,52	1998	FSms/fS	Gley-Podsol
039-L	106,88	0,21	2,01	1996	MSfs	Podsol-Braunerde
008-L	406,95	0,35	0,88	1995	Tu	Pelosol
012-L	427,1	0,57	1,34	1995	Ut	Pseudovergleyter Auenboden
050 ¹ -L	99,14	0,17	1,76	1995	FSms=Sl	Pseudogley-Braunerde
014-L	237,88	0,35	1,51	1992	Ut	Schluffige Seemarsch
012-L	364	0,49	1,34	1992	Ut	Pseudovergleiter Auenboden
Mittelwert	333,5	0,33	1,13			
Sickte²	309,45	0,24	0,76	2001		

Die Auswertungen der Daten im Rahmen des Bodendauerbeobachtungsprogramms zeigen weiterhin, dass zwischen den Werten einzelner Kernflächen innerhalb einer BD-Fläche Schwankungen in den mikrobiellen Kennwerten unter 15% auftreten (HÖPER & KLEEFISCH, 2001), da die Flächen hier nach der größtmöglichen Bodenhomogenität eingerichtet werden. Die Kernflächen in Sickte wurden dagegen ohne vorherige Bodenkartierungen eingerichtet.

Dementsprechend zeigen die Messwerte für die Versuchsfläche in Sickte kein vollständig einheitliches Bild, da bei den Messergebnissen zwischen den einzelnen Kernflächen Variationen bis 18% auftraten. Insbesondere die Werte der Kernfläche II lagen mehrfach oberhalb des Durchschnittes. Dies belegt die Notwendigkeit einer vorherigen, umfangreichen Bodenkartierung, wie sie im BDF-Programm durchgeführt wird.

Fingerprint-Analysen

Bei der Erhebung der mikrobiellen Biomasse und der Basalatmung werden Summenparameter aufgenommen, die Rückschlüsse auf die Bodenfunktion bzw. Beeinflussungen der Bodenfunktion bzw. der Aktivität der ihr zugrundeliegenden Mikroorganismen zulassen. Allerdings kann anhand dieser Methoden nur bedingt auf Veränderungen einzelner Mitglieder der mikrobiellen Gemeinschaft geschlossen werden. Daher wurden zusätzlich zu diesen Analysen DGGE-Untersuchungen durchgeführt, anhand derer die Diversität der mikrobiellen Gemeinschaften bzw. deren Veränderungen dargestellt werden können (MUYZER & SMALLA, 1998). In dieser Studie wurden sowohl universelle Primer für die Darstellung der dominanten Sequenzen der bakteriellen Gemeinschaft gewählt (FELSKE *et al.*, 1996, ENGELEN ET AL., 1998) als auch spezifische Primer für phylogenetische Gruppen wie high-GC Bakterien. Dies diente der Überprüfung, inwiefern eine Vorauswahl einzelner taxonomischer Bakteriengruppen oder auch Pilze, deren Beeinflussungen durch eine BASTA-Applikation möglich erscheint (MALKOMES, 1988; MEYER & WOLTERS, 1998), bei der Amplifizierung eine aussagekräftige Auswertung der DGGE-Gele erleichtern könnte.

Obwohl durch DGGE Analysen, ebenso wie mit anderen Fingerprintmethoden wie SSCP oder T-RFLP, charakteristische Bandenmuster der mikrobiellen Gemeinschaften erhalten werden können, ist bei der Interpretation zu berücksichtigen, dass die Muster an sich eine mit Fehlern behaftete Darstellung der mikrobiellen Gemeinschaft des entsprechenden Habitates ist. Neben der Selektivität des Extraktionsverfahrens sind auch Verschiebungen durch die für diese Analysen notwendige Amplifikation der Nukleinsäuren in der PCR, Besonderheiten der Zielsequenzen wie Sequenzheterogenitäten der rDNA (MUYZER & SMALLA, 1998; WINTZINGERODE *et al.*, 1997) und Limitierungen des Auflösungsvermögens der Fingerprinttechniken (WIELAND, 2000) zu berücksichtigen, die Auswirkungen auf die Musterbildung haben. Trotz dieser Limitierungen kann davon ausgegangen werden, dass durch die DGGE die dominanten Sequenzen in einer mikrobiellen Gemeinschaft reflektiert werden können (FERRIS ET AL., 1997; MUYZER & SMALLA, 1998) und zudem bei einem Vergleich von Mustern unterschiedlich starke Veränderungen in den Bandenmustern auch auf unterschiedlich starke Beeinflussungen der Gemeinschaft hindeuten (EICHNER *et al.*, 1999, ENGELEN *et al.*, 1998, OVRAS *et al.*, 1997). Die aussagekräftige Anwendung von Fingerprinttechniken wurde schon mehrfach im Rahmen der freisetzungsbegleitenden Sicherheitsforschung demonstriert (HEUER *et al.*, 2002; LUKOW *et al.*, 2000; MIETHLING *et al.*, 2000; SCHMALENBERGER *et al.*, 2002; GYAMFI *et al.* 2002; DUNFIELD *et al.* 2003). Dies konnte auch in dieser Studie bestätigt werden. Mit der angewandten Methode zur DNA-Extraktion und Amplifizierung der 16S- bzw. 18S- rDNA konnte aus allen untersuchten Bodenproben DNA in ausreichender Quantität und

Qualität extrahiert und amplifiziert werden. Das gewählte Extraktionsverfahren ermöglicht eine schnelle und relativ kostengünstige Analyse der Bodenproben.

Die resultierenden Bandenmuster unabhängiger Wiederholungen aus einer Bodenprobe zeigten eine hohe Reproduzierbarkeit. Der Vergleich der Bandenmuster aus den vier Kernflächen je Feld ergab bei den BD-Flächen ebenfalls eine sehr hohe Ähnlichkeit. Die Proben des ersten Untersuchungsjahres aus den vier Dauerbeobachtungstransekten in Sickte ergaben dagegen größere Unterschiede in den Bakterienpopulationen zwischen den einzelnen Kernflächen zu einem Probenahmezeitpunkt. Besonders bei Kernfläche II traten im Jahr 2001 und 2002 Schwierigkeiten bei der Analyse der mikrobiellen Gemeinschaft auf. Dieses Resultat steht in Einklang mit den Messergebnissen für die mikrobielle Biomasse, die Basalatmung und den metabolischen Quotienten, die bei dieser Kernfläche ebenfalls mehrfach abweichend von den Werten der anderen Flächen sind. Dies belegt die Notwendigkeit einer vorherigen, umfangreichen Bodenkartierung, wie sie im BDF-Programm durchgeführt wird bzw. die Eignung der Einrichtung von Dauertransekten und der Probenahmestrategie im BDF-Programm auch für mikrobielle Fingerprintanalysen.

Die genannte Abweichung in der Probenstruktur in Sickte erschwert die Interpretation der Populationsmuster (Abb. 19) vor und nach Einsatz des Komplementärherbizids, was durch die Behandlung im April 2001 mit dem Komplementärherbizid (LIBERTY-LINK™) von zwei der vier Kernflächen (II und III) untersucht werden sollte. Trotzdem lassen sich nach Amplifikation mit universellen 16S rDNA Primern bei den Kernflächen II und III 8 Wochen nach der Applikation (Juni 2001) leichte Verschiebungen im Bandenmuster erkennen, die auf eine vorübergehende Änderung in der Populationszusammensetzung nach Herbizideinsatz hindeuten. Diese Veränderungen waren jedoch nur kurzfristig nachweisbar, 17 Wochen nach Applikation (August 2001) konnten keine Veränderungen im Bandenmuster mehr aufgezeigt werden. Übereinstimmend hierzu fanden GYAMFI *et al.* (2002) anhand von DGGE-Analysen nur kurzfristige Beeinflussungen der mikrobiellen Gemeinschaften durch Herbizidapplikationen in der Rhizosphäre von Rapspflanzen. Beeinflussungen konnten sowohl nach der Applikationen von konventionellen Herbiziden (Butisan S) als auch des Komplementärherbizides LIBERTY-LINK™ bei HR-Raps aufgezeigt werden. Verglichen mit den Veränderungen der bakteriellen Rhizosphärengemeinschaften bedingt durch das Pflanzenwachstum waren diese Beeinflussungen allerdings deutlich geringer (GYAMFI *et al.*, 2002). Der im Rahmen der vorliegenden Studie durchgeführte Vergleich zwischen der Beeinflussung der bakteriellen Bodengemeinschaften durch die Komplementärherbizidapplikation und der zeitlichen Variation ergab ebenfalls, dass jahreszeitliche Schwankungen zu stärkeren Variationen der Gemeinschaft führen.

Da die Bandenmuster der Gesamtpopulationen komplex und Verschiebungen daher teilweise nur schwer zu erkennen sind, wurde zusätzlich versucht, eine Vorauswahl für einzelne Bakteriengruppen zu treffen. Die DGGE-Muster sollten auf diese Weise weniger vielfältig sein, so dass das Hervortreten oder Fehlen einzelner Banden leichter zu erkennen ist. Die Analyse von Bodenproben verschiedener Standorte ergab, dass tatsächlich einzelne Banden

innerhalb des Musters klarer hervortreten, wenn hauptsächlich eine Organismengruppe (hier Actinomyceten bzw. high-GC-Organismen und Pilze) betrachtet wird. Bei der Analyse pilzlicher Gemeinschaften war die Diversität der Muster zwischen den einzelnen Kernflächen sowohl der BD-Flächen als auch den Freisetzungsfächen Sickte und Dahnsdorf jedoch so hoch, dass Abweichungen, die durch externe Faktoren hervorgerufen werden, nur bedingt zugeordnet werden können. Dieses Ergebnis wurde bei der Untersuchung weiterer Bodenproben im Rahmen anderer Studie bestätigt (NEUBER, nicht gezeigt und OROS-SICHLER *et al.*, 2003). Durch die hohe Variabilität der Pilzgemeinschaften innerhalb der unabhängigen Wiederholungen wird die Detektion möglicher Beeinflussungen stark reduziert, was die Eignung dieser Methode für ein Monitoring begrenzt.

Dagegen war die Vergleichbarkeit der high-GC Muster zwischen den Kernflächen in den BD-Flächen deutlich besser. Am Standort Sickte variierten die Muster zwischen den Kernflächen (besonders II und III) jedoch so stark, dass keine Beeinflussung durch eine Herbizidapplikation feststellbar war. Dies ist vermutlich ebenfalls durch die abweichende Struktur in der Kernfläche II zu erklären.

Obwohl die Vergleichbarkeit der DGGE Muster bei Verwendung gruppenspezifischer Primer aufgrund der geringeren Komplexität prinzipiell verbessert werden kann, ist zu berücksichtigen, dass das Beobachtungsfenster auf einzelne Gruppen reduziert wird, was die Detektionsmöglichkeit von Beeinflussungen innerhalb der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft einschränkt. Wenn andererseits eine bestimmte Organismengruppe besonders stark beeinflusst wird, sind diese durch die Verwendung entsprechender gruppenspezifischer Primer durchaus deutlicher aufzuzeigen, wie z.B. die Beeinflussung von α -Proteobakterien nach einer Freisetzung von Rhizobien (WIELAND, 2000). Nach dem heutigen Stand des Wissens sind jedoch Mikroorganismengruppen mit Indikatoreigenschaften für Bodenbeeinflussungen nicht bekannt. Zudem ist die Analysenerweiterung durch die Voramplifikation aufwendiger und zeitintensiver, als die Betrachtung der gesamten bakteriellen Gemeinschaft. Für eine routinemäßige Durchführung im Rahmen eines Langzeitmonitorings scheint diese Vorgehensweise daher wenig empfehlenswert.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die DGGE gut geeignet ist, um einzelne Proben direkt zu vergleichen und spezielle Effekte auf die bakterielle Gemeinschaft zu beobachten. Jahreszeitliche Schwankungen können durch Gegenüberstellung von Proben eines Standortes zu verschiedenen Zeitpunkten erkannt werden. Ebenso können nutzungsspezifische Einflüsse wie die Applikation von Komplementärherbizid auf Teilbereichen eines Feldes in direktem Vergleich mit unbehandelten Flächen aufgezeigt werden, sowie die Dauer der Beeinflussung als auch ihre relative Stärke im Vergleich zu anderen Faktoren wie der natürlichen Variabilität ermittelt werden. Die Methode bietet darüber hinaus die Möglichkeit einer Identifizierung einzelner Bakteriengruppen, wenn anschließend eine weiterführende Analytik angewendet wird (über Sequenzierung einzelner aus dem DGGE-Gel ausgeschnittener Banden oder Anwendung taxonspezifischer Primer). Das Potential dieser Methode für Untersuchungen im Rahmen von freisetzungsbegleitenden Sicherheitsforschungen oder auch bei spezifischen Fragestellungen, die sich während eines Langzeitmonitorings ergeben, ist daher sehr hoch.

Der Einsatz der DGGE in dieser Studie hat allerdings gezeigt, dass dieses Verfahren für einen Einsatz bei Routineuntersuchungen –wie sie für ein GVP-Monitoring notwendig wären – grundsätzlich nicht geeignet ist. Die Auswertung über den Rahmen eines Geles hinaus wird durch die technische Reproduzierbarkeit der DGGE-Gele eingeschränkt, der Vergleich zweier Gele ist nur bedingt aussagekräftig. Das unterschiedliche Laufverhalten der Amplifikate ist abhängig vom chemischen Gradienten aus denaturierenden Substanzen innerhalb des Polyacrylamidgels, der bei jedem Gel technisch bedingt variiert. Dies kann auch nicht durch den Einsatz von (externen) Markern ausgeglichen werden, so dass bei der DGGE-Anwendung nur Proben innerhalb eines Gels verglichen werden sollten. Aufgrund der Variabilität der Muster sollten für die Analyse von Ähnlichkeitsmatrices mindestens 4 (unabhängige) Parallelproben pro Probe untersucht werden (SMALLA *et al.*, in Vorbereitung), wodurch ein Vergleich anhand von Clusteranalysen nur zwischen 4 Feldern möglich ist. Die genannte Problematik tritt besonders stark bei der DGGE hervor, betrifft aber auch die anderen, auf Polyacrylamidgelelektrophoresen basierenden Fingerprintverfahren wie TGGE (WIELAND, 2000) und vermutlich auch SSCP-Analysen.

Eine deutlich bessere Vergleichbarkeit ist dagegen bei kapillarelektrophoretischen Trennsystemen, wie z.B. der T-RFLP gegeben, bei denen zudem zusätzlich interne Marker bei jeder Probe verwendet werden können. Die Anwendung der T-RFLP bei der Analyse mikrobieller Bodengemeinschaften im Rahmen anderer Studien ergab eine sehr gute Reproduzierbarkeit der einzelnen Läufe (NEUBER, nicht gezeigt; BECKER & ULRICH, mündlich (Teilvorhaben Brandenburg); LUKOW *et al.*, 2000; LUEDERS & FRIEDRICH, 2003), so dass hier eine Limitierung bezüglich der Anzahl der zu vergleichenden Proben nicht auftritt. Laborübergreifend und für eine routinemäßige Anwendung scheint daher möglicherweise die größtenteils automatisierte Methodik der T-RFLP besser geeignet zu sein, wenn auch die Anwendung der DGGE für spezielle Fragestellungen zweckmäßiger erscheint. Für einen Einsatz von T-RFLP Analysen in Routineuntersuchungen besteht jedoch noch Forschungsbedarf, z.B. hinsichtlich der Vergleichbarkeit von Proben aus verschiedenen Jahren, der Wahl eines geeigneten Probenahmezeitpunktes im Jahresverlauf und des Probenahmeintervalles.

Bevor die Eignung der T-RFLP-Analysen für Routineanwendungen nicht geklärt ist, wird vorgeschlagen, im Rahmen eines GVP-Monitorings die mikrobiellen Kenngrößen Basalatmung und mikrobielle Biomasse zu erheben, deren Anwendungen sich bei Routineuntersuchungen bewährt hat. Im Rahmen des BDF-Programms konnte gezeigt werden, dass die Variation der Werte zwischen den 4 Kernflächen einer BDF sehr gering ist, und zudem nicht höher ist, als bei den physikalischen und chemischen Bodeneigenschaften. Der Anspruch einer möglichst hohen Homogenität zwischen den Teilflächen einer BDF ist für ein Gros der Standorte erfüllt worden. Die zeitliche Variation, d.h. die Streuung zwischen den jährlich einmalig im Frühjahr erfolgenden Probenahmen, liegt nur unwesentlich höher (HÖPER & KLEEFISCH, 2001). Damit ist sowohl die Auswahl des Probenahmetermins als auch die Routine von Probenahme, Probenaufbereitung und Messung genügend standardisiert, um Zeitreihen zu erstellen.

Zur Etablierung sollten parallel zu diesen Untersuchungen im Rahmen eines GVP-Monitorings T-RFLP Analysen durchgeführt werden. Anhand dieser Untersuchungen könnte dann

die Empfindlichkeit der verschiedenen Methoden besser bewertet werden. Der Umfang der bisher durchgeführten Vergleiche ist für eine abschließende Bewertung noch zu gering. Allerdings weisen die bisherigen Ergebnisse darauf hin, dass die bereits etablierten Methoden im BDF-Programm nur geringfügig unempfindlicher als die Fingerprintanalysen wie DGGE und T-RFLP sind (HÖPER & NEUBER, unveröffentlicht). Zudem konnten signifikante Korrelationen zwischen der T-RFLP-Analyse und der mikrobiellen Biomasse aufgezeigt werden (HÖPER & NEUBER, unveröffentlicht). Dies deutet darauf hin, dass T-RFLP Analysen - ähnlich wie die mikrobiologischen Parameter - mit dem Ton- und Sandgehalt der Böden korreliert sind, d.h. bei Böden mit ähnlichen Ton- und Sandgehalten sind ähnliche T-RFLP-Muster zu erwarten. Die Signifikanz dieser Korrelationen bei T-RFLP Analysen sollte jedoch noch anhand eines größeren Stichprobenumfangs verifiziert werden. Die Auswertung aller bisher im BDF-Programm untersuchten Böden zeigt eine hohe Korrelation zwischen den mikrobiologischen und den physiko-chemischen Parametern. So korreliert die mikrobielle Biomasse sehr stark mit dem Sandgehalt (stellvertretend für die Korngrößenzusammensetzung), gefolgt vom Gesamt-Stickstoffgehalt (stellvertretend für den Humusgehalt und Humusqualität) und pH-Wert der Böden (HÖPER & KLEEFISCH, 2001). Böden mit ähnlichen Sand-, - Gesamtstickstoffgehalt und pH-Wert weisen demnach eine vergleichbare mikrobielle Biomasse auf (HÖPER & KLEEFISCH, 2001). Diese Korrelationen sollten bei der Auswahl von Referenzflächen bzgl. mikrobiologischer Bodenuntersuchungen berücksichtigt werden, um eine Vergleichbarkeit zwischen (räumlich getrennten) Feldern mit transgenen und konventionellen Kulturpflanzen zu ermöglichen.

4.3 Ausblick: Nutzung der BD-Flächen für ein Langzeitmonitoring von GVP

Nach den derzeitigen Erkenntnissen ist das niedersächsische Bodendauerbeobachtungsprogramm als Plattform für ein erweitertes Langzeitmonitoring gentechnisch veränderter Pflanzen überwiegend positiv zu bewerten. Neben der BDF-Konzeption sind die dort routinemäßig eingesetzten Methoden zur Bodendauerbeobachtung, im Wesentlichen die vegetationskundlichen Untersuchungen sowie die mikrobiologischen, bodenphysikalischen und -chemischen Parameter auch für ein Monitoring von GVP nutzbar.

Das bestehende Programm wäre jedoch in Zukunft um Meßgrößen wie beispielsweise den Nachweis transgener DNA, floristische Erhebungen und Vegetationsaufnahmen, deren Wiederholungsintervalle auf den Anbau der entsprechenden Kulturpflanzenarten zeitlich abgestimmt sind (inklusive Kreuzungspartner-Kartierung) sowie ggf. die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften zu erweitern. Ein Vorschlag für ein Rapsmonitoring unter Anbindung an das BDF-Programm wird im Anhang D unterbreitet.

Zusammenfassend bietet die Nutzung des BDF-Programms im Rahmen eines GVP-Monitoring folgende Vor- und Nachteile:

Vorteile:

- Die Datenerhebung des Beobachtungsprogramms wird in für das Monitoring relevanten Medienbereichen (Boden, Biota, z.T. Luft und Gewässer) durchgeführt
- Schwerpunkt ist das Agrarökosystem, wo die Wahrscheinlichkeit einer Beeinflussung am größten ist
- Die Untersuchungsflächen liegen in geographischen Räumen, die für ein Monitoring von Bedeutung sind (repräsentative Flächen für naturräumliche und nutzungsspezifische Begebenheiten in Niedersachsen, Auswahl nach den Kriterien Bodentyp und Bodenbelastung / Nutzungstyp)
- ausreichend großer Stichprobenumfang an Flächen (insgesamt 90 Flächen, davon 70 landwirtschaftlich genutzt und ca. 10 mit Raps im Fruchtfolgewechsel. Dies entspricht ca. 3 Referenzflächen mit Rapsanbau pro Jahr)
- Flächen sind eingerichtet und inventarisiert („Infrastruktur“ vorhanden)
- Eine langfristige Nutzung des Umweltbeobachtungsprogramms und der Untersuchungsgebiete ist gewährleistet
- Das Programm besteht seit mehr als 10 Jahren. Zeitdatenreihen für viele Parameter sind vorhanden, auf die Datensätze kann nachträglich zurückgegriffen werden (Bestimmung des Ist-Wertes)
- Es werden Fragestellungen bearbeitet bzw. Parameter erhoben, die für das Monitoring relevant sind. Zudem werden die Erhebungen in für ein Monitoring relevanten Intervallen durchgeführt.

Bei allen Flächen erfolgte eine Grundinventur

- Boden: chemische, physikalische und mikrobiol. Analysen
- Vegetationsaufnahmen: Deckungsgrad, Artenbestand, Artenzusammensetzung
- Archivierung von Bodenproben

sowie die regelmäßige Untersuchung verschiedenster Parameter:

- Fortlaufende Bodenprobenahme (mikrobiol. Analysen jährlich)
- Fortlaufende Vegetationsaufnahmen
- Fortlaufende Protokollierung der Landbewirtschaftung
- Wiederholungsuntersuchungen der Grundinventur (max. 10 J.)
- Zusätzlich: Intensivmeßflächen

- Eine Erweiterung der Untersuchungsmethoden für gentechnisch spezifische Fragestellungen ist prinzipiell möglich
- Eine Anbindung der Probenahme für das Screening von Umweltmedien (z.B. Boden) ist möglich
- Die Grundstrukturen (Auswahl der Flächen, Einrichtung der Flächen in Kernflächen und Umgebungsgebiete, Organisation und Durchführung der Analysen) sind gut nutzbar

- Die erhobenen Daten sind hinsichtlich der Fragestellungen im GVP-Monitoring auswertbar (Datenzugang, Zusammenführung, Auswertbarkeit) und liefern relevante Informationsgrundlagen für das Monitoring
- Eine bundesweit weitgehend einheitliche Durchführbarkeit des Programms ist angestrebt

Nachteile:

Aspekte, die vor bzw. bei einer Nutzung der BDF-L im Rahmen eines GVP-Monitorings noch geklärt bzw. berücksichtigt werden müssen, werden in folgenden Bereichen gesehen:

- Das Programm müsste um einige gentechnik-spezifische Aspekte erweitert werden, z.B. Kartierung und molekulare Analyse von Kreuzungspartnern, Verbleib transgener DNA im Boden
- Eine bessere Abstimmung des Aufnahmeintervalls auf die als Referenz dienenden Kulturpflanzen im Fruchtfolgewechsel ist wünschenswert
- Es werden derzeit keine faunistischen Erhebungen in Niedersachsen durchgeführt. In einigen Bundesländern (BW, BY, BB, HH, MV, NRW SA, SH) werden im Rahmen der BDF-Programme bodenzoologische Untersuchungen durchgeführt. Diese Erhebungen wären für eine Eignung im GVP-Monitoring zu überprüfen, ggf. auf weitere Bundesländer zu übertragen und zu erweitern (z.B. um die Bestimmung der mono- und oligophagen Arten der Ackerbegleitflora).
- Die Nutzung der BD-Flächen als Referenzflächen muss geklärt werden: Derzeit werden auf keiner der BD-Flächen transgene Kulturpflanzen angebaut, somit müssten bei einem baldigen Beginn eines GVP-Monitorings Felder mit transgenen Kulturen in der Fruchtfolge analog zu dem BDF-L Flächen neu eingerichtet und anhand einer Grundinventur charakterisiert werden. Zudem sollten aufgrund der Variabilität der biologischen Parameter erste Wiederholungsaufnahmen vorliegen, bzw. Vegetationsaufnahmen, die sich aufeinander folgende Jahre erstrecken, abgeschlossen sein.
Grundsätzlich ist die Bewirtschaftungsweise den Landwirten im BDF-Programm freigestellt, sofern keine Nutzungsänderung erfolgt. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass bei einem großflächigem GVP Anbau auch von den Landwirten im BDF-Programm transgene Pflanzen angebaut werden. Der GVP-Anbau auf BD-Flächen, die sehr gut charakterisiert sind und von denen große Zeitdatensätze vorliegen, würde einerseits einen optimalen Vergleich vor und nach Anbau transgener Pflanzen auf demselben Feld unter den selben Standortbedingungen ermöglichen. Zudem spiegelte sich dadurch, dass den Landwirten keine Vorgaben über den GVP-Anbau bzw. Nicht-GVP-Anbau gemacht werden, die Situation in Niedersachsen wider, deren Erfassung ein Ziel im Umweltbeobachtungsprogramm BDF ist. Andererseits gehen dadurch Referenzflächen verloren. Daher ist bei einer Einbeziehung der BD-Flächen in ein Monitoring zu gewährleisten, dass Flächen mit und ohne Anbau transgener Pflanzen in jeweils ausreichender Anzahl auch langfristig zur Verfügung stehen.
- Die BDF-L können nach dem derzeitigen Aufbau nur als externe Referenzflächen dienen, im Gegensatz zu internen Referenzflächen, bei denen ein direkt benachbarter Anbau transgener und isogener bzw. nichttransgener Linien erfolgt. Aufgrund der identischen

standörtlichen Gegebenheiten und somit besseren Vergleichbarkeit der Umgebungsparameter ist bei vielen Parametern eine Zuordnung von möglichen Effekten auf gentechnisch spezifische Ursachen bei internen Referenzflächen einfacher und erfolgversprechender. Bei externen Referenzflächen ist dagegen die Erhebung und Einbeziehung von weiteren Hintergrundparametern nötig, die den eigentlichen Zielparameter beeinflussen (beispielsweise die Bestimmung des Artenpotentials bei vegetationskundlichen Untersuchungen oder die Berücksichtigung der Korrelationen von bodenchemischen Parametern und mikrobieller Biomasse), um dadurch eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Andererseits ist die Anlage und Bewirtschaftung von internen Referenzflächen eher künstlich (Versuchsanbau) und entspricht nicht der üblichen landwirtschaftlichen Praxis. Zudem wurde in der in Großbritannien durchgeführten Farm-Scale Evaluation Studie festgestellt, dass die Landwirte in der Praxis beim GVP-Anbau teilweise abweichende landwirtschaftliche Maßnahmen durchführten (z.B. höhere Herbizidapplikationsmengen), als von den Betreibern/Herbizidanbietern vorgeschlagen (JOHNSON, 2003 mündlich). Daher bietet sich die Anlage von internen Referenzflächen zwar bei freisetzungsbegleitenden Fragestellungen und ggf. im fallspezifischen Monitoring an. Bei der allgemeinen überwachenden Beobachtung sollte jedoch auch die gängige landwirtschaftliche Praxis berücksichtigt werden.

5. Zusammenfassung / Summary

Die neue Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG regelt in den Ländern der EU die Freisetzung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) in die Umwelt im Rahmen des versuchsweisen und des kommerziellen Anbaus. Auf Grundlage dieser Richtlinie muss ein Beobachtungsplan erarbeitet werden, anhand dessen schädliche Auswirkungen oder unerwartete Effekte gentechnisch veränderter Organismen auf die menschliche Gesundheit oder die Umwelt nach Inverkehrbringung ermittelt werden sollen. Vor diesem Hintergrund fördert das Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit in Zusammenarbeit mit den Bundesländern Modellprojekte zum Monitoring gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP). Ziel ist die Entwicklung von Monitoringkonzepten und –methoden sowie deren praktische Erprobung.

Das Niedersächsische Pilotprojekt befasst sich mit der Verbreitung und Anreicherung transgener Materials in der Umwelt am Beispiel von herbizidresistentem Winterraps (HR-Raps). Ein wesentliches Ziel des über 3 Jahre laufenden Projektes war es, standardisierte Routinemethoden zu entwickeln, um Transgensequenzen in der Umwelt (Flora/Vegetation und Boden) nachzuweisen und mögliche Auswirkungen des GVP-Anbaus auf die Flora und Vegetation zu untersuchen. Außerdem wurden Verfahren etabliert, um potenzielle Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft bei einem Anbau und bedingt durch den Einsatz des Komplementärherbizids im Boden zu erkennen. Die Untersuchungen wurden anhand eines einjährigen HR-Raps Freisetzungsversuches (2000/ 2001 in Sickte bei Braunschweig) mit zweijährigen Nachuntersuchungen sowie auf Referenzflächen durchgeführt. An weiteren Freisetzungsstandorten wurden die entwickelten Methoden zum Nachweis transgener DNA im Boden validiert. Im Rahmen des Pilotprojektes wurden Vorschläge für Untersuchungsmethoden erarbeitet und ein Konzept zur Probenahme, sowie Anzahl und Zeitpunkt der Beprobungen entwickelt und auf Praktikabilität getestet.

Um darüber hinaus die Einbindung eines GVP-Monitorings in bestehende Umweltbeobachtungsprogramme zu prüfen, wurde das Bodendauerbeobachtungsprogramm (BDF) Niedersachsens ausgewählt. Die floristischen, vegetationskundlichen und bodenmikrobiologischen Untersuchungen wurden methodisch eng an dieses etablierte Programm angelehnt und bedarfsgerecht um transgenspezifische Aspekte erweitert. Dazu gehörten u.a. molekulare Methoden wie DNA-Extraktion und -Reinigung aus Bodenproben mittels kommerzieller Kits, PCR-Analysen zum Nachweis transgener Sequenzen und DNA-Fingerprint-Analysen mittels DGGE.

Zudem wurden Flächen aus dem niedersächsischen Bodendauerbeobachtungsprogramm, auf denen konventioneller Raps angebaut wird, als Referenzflächen herangezogen. Im niedersächsischen BDF-Programm, das seit mehr als 10 Jahren besteht, sind 90 Dauerbeobachtungsflächen nach Nutzungs- und Bodentyp eingerichtet, davon 70 landwirtschaftlich genutzte. Auf etwa 10 Flächen wird davon in der Fruchtfolge Raps angebaut. Die derzeit im BDF-Programm routinemäßig durchgeführten Untersuchungen bieten deutliche Synergien für ein GVP-Monitoring. So werden beispielsweise im Rahmen einer Grundinventur auf den 1

ha großen Beobachtungsflächen (1 ha-BDF) des Programms verschiedene bodenchemische und bodenphysikalische Parameter erfasst und die Untersuchungen alle 7 - 10 Jahre wiederholt. Die vegetationskundlichen Untersuchungen umfassen die Erstellung einer Gesamtartenliste auf den 1-ha Flächen, eine floristische Inventarisierung mit Notierung der Biotopstrukturen der Umgebung (500 m Umkreis, Wiederholungen alle 7 – 10 Jahre), sowie alle 3 – 5 Jahre die Aufnahme der Vegetation (mit Deckungsgrad) innerhalb von 4 Kernflächen á 50 qm, die in der 1 ha-BDF nach bodenkundlicher Homogenität eingemessen sind. Jährlich werden zudem auf diesen Flächen mikrobiologische Summenparameter (Basalatmung, mikrobielle Biomasse, metabolischer Quotient) untersucht. Daneben werden eine Vielzahl weiterer Parameter erhoben, die notwendige Hintergrundinformationen liefern (z.B. klimatische Erhebungen, Grundwasseranalytik und das Führen von Schlagkarteien). Weitere Vorteile sind die langfristige vertragliche Sicherung der Flächen, sowie die Archivierung der Bodenproben und das Vorliegen von Bearbeitungsdaten seit Untersuchungsbeginn.

In Anlehnung an das Untersuchungsprogramm des BDF wurden auf den als Referenzflächen gewählten BD-Flächen und der analog eingerichteten Freisetzungsfläche (0,4 ha Größe) Vegetationsuntersuchungen durchgeführt. Die Auswertungen erfolgte unter Einbeziehung der im BDF-Programm erhobenen Daten, anhand derer die Situation der Ackerbegleitflora in Niedersachsen dargestellt werden kann. Die Untersuchungen im Rahmen des Pilotprojektes beinhalteten die Aufnahme von Gesamtartenbeständen auf den Flächen (1-ha BDF bzw. der Freisetzungsfläche), wobei das Aufkommen von Ackerbegleitarten in allen Untersuchungsjahren erwartungsgemäß als sehr gering eingestuft wurde. Die Wiederholung der Erfassungen in drei aufeinander folgenden Jahren hat jedoch zu einer wesentlichen Vervollständigung der ackerbezogenen Artenlisten geführt. Weiterhin wurden Vegetationsaufnahmen in den Kernflächen analog zum BDF-Programm durchgeführt. Anhand dieser Aufnahmen wurde geprüft, inwieweit mögliche Beeinflussungen der Ackerflora, z.B. durch den veränderten Herbizideinsatz, detektiert werden können. Beeinflussungen durch eine einmalig erfolgte Komplementärherbizidapplikation konnten nicht nachgewiesen werden. Die umfassenden Datengrundlagen, die durch die Erhebungen im Rahmen des BDF-Programms bereits vorliegen, ermöglichen jedoch prinzipiell eine Detektion von Veränderungen in der Begleitflora innerhalb der Äcker. Abweichend zu den im BDF-Programm durchgeführten floristischen Erhebungen in der Umgebung der Felder wurde im Pilotprojekt nur der Artenbestand der Gesamtäcker erfasst. Diese Erfassung diente zur Bestimmung des Artenpotentials eines Ackers, also welche Arten prinzipiell auf den dann mit einer bestimmten Kulturart bestellten Parzellen vorkommen können. Gerade wenn Referenzflächen nicht direkt an ein transgenes Feld angrenzen, und somit nicht die selben standörtlichen biotischen und abiotischen Gegebenheiten aufweisen, stellt die Potenzialbestimmung eine wichtige Hintergrundinformation dar, um die Zusammensetzung der Ackerbegleitflora in den Kernflächen und den 1 ha-Flächen sowie deren Veränderungen über die Zeit in Relation zur Umgebung interpretieren zu können.

Um eine mögliche Beeinflussung von potenziellen Raps-Kreuzungspartnern zu erfassen, wurden in Erweiterung des BDF-Programms im Umkreis von 1 km um die Flächen Kartie-

rungen von potenziellen Zielarten/ Kreuzungspartnern (qualitativ und quantitativ) durchgeführt. Zudem wurde die Auskreuzung in verwandte Wildarten untersucht. An allen Untersuchungsstandorten wurden spontane Vorkommen von *Brassica napus* (Raps) und *Sinapis arvensis* (Acker-Senf) in umfangreichen Mengen festgestellt. Ansonsten traten *Diploaxis muralis* (Mauer-Doppelsame), *Raphanus sativum* (Ölrettich), *Raphanus raphanistrum* (Hederrich), *Brassica rapa* (Rübsen) und *Sinapis alba* (weißer Senf) in weniger bedeutendem Umfang auf.

Die kartierten Pflanzen wurden durch Entnahme von Blatt- und Samenmaterial beprobt und anschließend molekularbiologisch oder mittels eines Keimungstests auf das Vorhandensein des Transgens untersucht. Die dabei entwickelte Strategie zur standortscharfen Erfassung mit Schätzung der Populationsgröße sowie zur Probenahme und Laboruntersuchung der Blattproben erwies sich als routinemäßig gut durchführbar. Dagegen erwies sich die Methodik der Samenanalyse zwar als sensitiv, sie stellte sich jedoch, insbesondere im Hinblick auf die Probenahme, als zu aufwändig heraus.

Wie erwartet waren vor Anbau von GVP mit Hilfe der Kreuzblütlerkartierungen und molekularen Analysen keine transgenen Individuen in den Kreuzblütlerbeständen nachweisbar.

Nach der Blüte des transgenen Rapses konnten im selben Jahr an 2 Fundorten im Abstand von 400 und 700 m von der Freisetzungsfäche das Transgen in ruderalen Rapsamen nachgewiesen werden. Die Auskreuzungsrate lag bei 0,07% in 400 m und 0,03% in 700 m Entfernung. Diese Rapspflanzen wurden an Ackerrändern gefunden, auf denen im Jahr zuvor jeweils konventioneller Raps kultiviert wurde, dementsprechend handelt es sich bei diesen Funden vermutlich um Ausfallraps. Desweiteren konnten Auskreuzungen im Erntegut eines benachbarten Rapsfeldes in ca. 300 m Abstand nachgewiesen werden. Die Auskreuzungsrate lag unter 0,1%. Auskreuzungen in wildverwandte Kreuzungspartner von Raps wurden nicht gefunden.

Um mögliche Auswirkungen des Anbaus von transgenem HR-Raps auf die mikrobiellen Gemeinschaften im Boden zu untersuchen, wurden ergänzend zu den mikrobiologischen Untersuchungen im BDF-Programm (Bestimmung der Basalatmung und mikrobieller Biomasse) PCR-Fingerprintverfahren, schwerpunktmäßig die DGGE, etabliert und an unterschiedlichen Bodentypen erprobt. Die hierzu entwickelte DNA-Extraktionsmethode und PCR-Amplifizierung ließ sich an allen bisher getesteten Bodentypen erfolgreich anwenden.

Die Analysen zeigten jahreszeitliche Schwankungen in den mikrobiellen Gemeinschaften sowie Variationen je nach Bodentyp. Nach dem Einsatz des Komplementärherbizids auf Teilflächen der HR-Raps Freisetzungsfäche ließen sich vorübergehende Verschiebungen in der Struktur der bakteriellen Gemeinschaft erfassen. Im Vergleich zur jahreszeitlichen Variabilität waren diese Verschiebungen jedoch gering. Obwohl das Potential von DGGE-Analysen für spezifische Fragestellungen bzgl. der Beeinflussung mikrobieller Gemeinschaften sehr hoch ist, zeigten sich im Verlauf des Projektes jedoch grundsätzliche methodische Unzulänglichkeiten, die dem Einsatz der DGGE für Routineuntersuchungen entgegenstehen. Gleichzeitig wurde dabei deutlich, dass unabhängig von der Untersuchungsmethode die Homogenität der einzelnen Standortproben eine Voraussetzung zur Analyse der mikrobieller Gemeinschaften

ist. Diese Anforderung erfüllen die BD-Flächen sowie die in diesem Programm durchgeführten Probenahmen in geeignetem Maß.

Eine weitere Fragestellung des Projektes befasst sich mit der Stabilität von Transgensequenzen in Bodenproben. Hierzu wurde eine Methode zur DNA-Extraktion aus Bodenproben etabliert sowie die PCR-Amplifizierung von verschiedenen Konstrukten aus unterschiedlichen Kulturpflanzenarten auf ihre Empfindlichkeit überprüft. Die Methoden wurden erfolgreich an verschiedenen Bodentypen erprobt und sind routinemäßig einsetzbar. Dabei zeigte sich eine höhere Nachweisempfindlichkeit transgener Sequenzen in Bodenproben bei Verwendung von Real-time PCR Analysen im Vergleich zu qualitativen PCR-Analysen.

Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnten auf den Referenzflächen des BDF-Programms sowie auf der Freisetzungsfläche Sickte vor Anbau der transgenen HR-Rapspflanzen erwartungsgemäß keine Transgensequenzen im Boden nachgewiesen werden.

Nach der Freisetzung transgener Rapspflanzen gelang der Nachweis des Transgens aus Bodenproben bis 10 Wochen nach Untergraben des Pflanzenmaterials. An einem langjährig genutzten Versuchsstandort in Dahnsdorf (Land Brandenburg) konnte zwar keine Anreicherung des Transgens im Boden nachgewiesen werden, dennoch war der Nachweis des pat-Gens im Boden 12 Wochen nach Ernte transgener Mais- und Rapspflanzen noch möglich. Durch diese Untersuchungen wurde gezeigt, dass die angewendete Untersuchungsstrategie zur einfachen und routinemäßigen Durchführung geeignet und die Nachweisempfindlichkeit für die HR-Resistenz bei großflächigem Anbau der transgenen Pflanzen ausreichend ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Erprobung der entwickelten Methoden im Freiland gezeigt hat, dass das erarbeitete Untersuchungskonzept bei der Durchführung eines Monitoringprogramms praktikabel ist.

Bei der Entwicklung eines Monitoringkonzeptes für gentechnisch veränderte Kulturpflanzen ist es aus Effizienz- und Kostengründen unbedingt geboten, auf etablierte Untersuchungsprogramme zurückzugreifen und diese entsprechend zu erweitern. Nach den derzeitigen Erkenntnissen ist hierbei die Nutzung des niedersächsischen Bodendauerbeobachtungsprogramms als Ausgangspunkt für ein erweitertes Langzeitmonitoring gentechnisch veränderter Pflanzen überwiegend positiv zu bewerten.

Neben der BDF-Konzeption sind die dort routinemäßig eingesetzten Methoden zur Bodendauerbeobachtung, die die vegetationskundlichen Untersuchungen sowie die Erhebung mikrobiologischer, -bodenphysikalischer und -chemischer Parameter beinhalten, auch für ein Monitoring von GVP nutzbar. Zudem werden im Rahmen des BDF-Programms eine Vielzahl weiterer Parameter untersucht, die als Hintergrundinformationen wichtige Interpretationshilfen bieten. Die Erhebungen werden im Hinblick auf ein GVP-Monitoring größtenteils in relevanten Intervallen wiederholt. Zudem ist die routinemäßige Auswertung der im BDF erhobenen Daten für ein GVP-Monitoring nutzbar. Das bestehende Programm wäre jedoch in Zukunft um Messgrößen wie beispielsweise den Nachweis transgener DNA in der Umwelt sowie Vegetationsaufnahmen, die auf den Anbau der entsprechenden Kulturpflanzenarten abgestimmt sind (inklusive Kreuzungspartner-Kartierung), zu erweitern.

Summary

The new Directive 2001/18/EC regulates the release of genetically modified organisms (GMOs) both experimentally and commercially into the environment in the states of the European Union. On basis of this Directive monitoring plans have to be established to determine harmful or unexpected effects of genetically modified organisms on the human health or the environment after their release. Therefore in Germany the Federal Environmental Agency promotes in cooperation with the federal states pilot-projects for the monitoring of genetically modified plants (GMP). The goal is the development of monitoring-concepts and methods and their practical testing. The pilot project of Lower Saxony deals with the spreading and enrichment of transgenic material in the environment using the example of herbicide-resistant oil seed rape (hr-rape).

A substantial target of this project running over a period of three years was to develop standardized routine methods in order to detect transgenic sequences in the environment (vegetation and soil) and to examine possible effects of the GMO-cultivation for the vegetation. Additional methods were developed in order to assess potential changes in the microbial soil-community, potentially caused by the application of complementary herbicide (in this study Liberty Link TM). The investigations were conducted on the basis of a one-year field release study of hr-rape (2000/ 2001 in Sickte near Braunschweig) with a two-year follow-up examination compared to reference fields. At further field release sites the developed methods were validated for a detection of transgenic DNA in soil. In the context of the pilot-project proposals were compiled and tested concerning research methods and sampling-concepts like number and time of sampling. The long-term soil observation program (BDF) Lower Saxony was chosen to evaluate an integration of a GMO monitoring into existing environmental monitoring projects. Therefore the vegetation analysis and soil-microbiological investigations were leaned methodically closely against this established program and extended meeting the specific demands of transgenic aspects. This included among other things molecular methods such as DNA extraction and purification from soil samples by means of commercial kits, PCR-analysis for the detection of transgenic sequences and DNA-fingerprint analysis by means of DGGE.

Fields from the soil long-term observation program in Lower Saxony, on which conventional rape is cultivated, were used as reference areas. In this BDF program, which exists for more than 10 years, 90 target areas differing by soil- and usage-type are available, of those 70 are agriculturally used. On approximately 10 areas rape is cultivated in the crop rotation. The routinely performed investigations by the BDF-program offer clear synergies for a GMO-monitoring. So for example in the context of a basic inventory on the 1 hectare large monitoring areas (1 ha-BDF) different soil-chemical and soil-physical parameters are gathered and the investigations are repeated every 7 - 10 years. The vegetation analysis cover the compilation of a total species list on the 1-ha areas, a floral inventory with quotation of the biotope structures of the environment (500 m periphery, repetitions every 7 to 10 years), as well as every 3 to 5 years a survey of the vegetation (including covering degrees) within four core areas (each 50 square meter), which are chosen in the 1 ha-BDF according to soil-

homogeneity. On these areas the microbiological sum parameters (basal respiration, microbial biomass, metabolic quotient) are also being determined every year. Alongside a multiplicity of further parameters are assessed which provide necessary background information (e.g. climatic data, groundwater analytics and a log of impact card indices). Further advantages are the long-term contractual protection of these areas, as well as the archiving of the soil samples and available data since the beginning of the investigation. Following the guidelines of the BDF-program, in this pilot study the vegetation investigations were conducted on the reference BDF-fields and the similarly created field release site of hr-rape (0.4 hectares). The analysis included the data raised in the BDF program; on their basis the situation of the flora belonging to the agricultural area in use in Lower Saxony can be represented. The investigations in the context of the pilot-project contained a catalogue of all species found in the BDF-areas (1-ha BDF) or the field release site, whereby the number of detected species was being expected as very limited. The repetition of these investigations in three subsequent years however lead to a substantial completion of the field-referred type lists. Further vegetation indexes in the core areas were performed similar to the BDF program. On the basis of these indexes it was examined to what extent possible influences on the flora, e.g. by the altered herbicide application, are detectable. Influences by a one-time application of the complementary herbicide could not be determined. The broad available data, which are already present through the collection in the context of the BDF program, however allow a detection of changes in the flora within the fields as a matter of principle. Deviating from the floral indices in the surroundings of the fields, as determined in the BDF program, in the pilot project only the species list of the complete field was acquired. This index served for the determination of the potential species of a field, thus which species in principle grow on plots with a certain type of culture. Especially if reference areas don't directly border to a transgenic field and thus don't meet the same local biotic and abiotic conditions, it is important to know the potential for a modification to judge changes over time relative to their surrounding. In extension of the BDF program a mapping of potential oil seed rape cross breeders was performed in the periphery by 1 km around (qualitatively and quantitatively) to assess a possible influence of rape related species. In addition the outcrossing in related wild-species was investigated. At all investigated locations *Brassica napus* and *Sinapis arvensis* were found in extensive quantities. Otherwise *Diptotaxis muralis*, *Raphanus sativus*, *Raphanus raphanistrum*, *Brassica rapa* and *Sinapis alba* were found to a fewer extent.

The mapped plants were sampled by withdrawal of leaf and seed material and molecular-biologically examined or by means of a germinating test analysed for the presence of the transgenic DNA. The strategy for the vegetation mapping as well as for the sampling and laboratory test of the leaves samples, developed thereby, proved as routinely applicable. The methodology of the seed analysis proved as sensitive but, in particular regarding the sampling procedure, as too laborious. As expected no transgenic individuals were provable in the potential cross breeders in the surrounding of the fields before cultivation of GMPs by means of mapping cruciferous plants and molecular analysis. After the bloom of the transgenic rape in the same year the transgene could be detected in oil seed rape seeds at 2 discovery sites in the distance of 400 and 700 m to the field release site. The outcrossing rate was about

0.07% in 400 m and 0.03% in 700 m distance. These plants were found at the field surroundings, on which in the year before conventional rape was cultivated, therefore it seems to be caused by volunteer rape. Furthermore in the harvested crop of a neighbouring cultivated rape field in approx. 300 m distance cross breeders could be proven. The rate of outcrossing was below 0.1%. Outcrossing events into wild-related crossing partners of rape were not found.

In order to examine possible effects of the cultivation of transgenic hr-rape on the microbial communities in soil, in addition to the microbiological investigations in the BDF program (determination of the basal respiration and microbial biomass) PCR fingerprinting and emphasis-ing DGGE were established and tested with different soil types. The developed method for DNA extraction and PCR amplification was successfully applied for all tested soil types. The analysis showed seasonal fluctuations in the microbial communities as well as variations depending upon the type of soil. After the application of the complementary herbicide on partial areas of the hr-rape field release site temporary shifts in the structure of the bacterial community were determined. However in comparison to the seasonal variability these shifts were small. Although the potential of DGGE analysis is very high for specific questions concerning the influence on microbial communities, in the process of the project methodical deficiencies showed up, which oppose the application of the DGGE for routine investigations. At the same time it became clear that independent of the applied method the homogeneity of the individual sample-location is a prerequisite for the analysis of microbial communities. This request is met on the BDF areas as well as performed in this program.

A further question of the project deals with the stability of transgenic sequences in soil samples. For this purpose a method was established for DNA extraction from soil samples and a PCR amplification-method of different constructs from different cultivated plant species was examined for sensitivity. The methods were tested successfully with different soil types and are applicable on a routine basis. A higher sensitivity of real-time PCR in comparison to qualitative PCR analysis was detected. As expected no transgenic sequences in the soil were found on the reference areas of the BDF program as well as on the filed release site in Sickte before cultivation of the transgenic hr-rape. After the release of transgenic plants the detection of the transgenic DNA from soil samples succeeded until 10 weeks after the crop was ploughed under the ground. At a long time used test-place in Dahnsdorf (state Brandenburg) no enrichment of the transgenic DNA in soil could be proven, yet the proof of the pat-gene in the soil was still possible 12 weeks after harvest of transgenic corn and hr-rape plants. It was shown by these experiments that the applied investigation strategy is suitable for a simple and routine-application and the sensitivity is sufficient for a detection of the herbicide resistance in an extensive cultivation of transgenic plants.

It can be summarized that the developed investigation concept is practicable for a post market monitoring program. For the development of a monitoring concept for genetically modified plants it is absolutely necessary to use and extend established monitoring programs to increase efficiency and to keep the associated costs at a minimum. From the present point of view the use of the soil long-term observation program in Lower Saxony is to be positively evaluated as a starting point for an extended long-term monitoring of genetically modified

plants. Apart from the BDF concept, the routinely applied methods in the program like the long-term soil observation, the vegetation analysis as well as the collection of microbiological, soil-physical and chemical parameters, are also useful for a monitoring of GMOs. A multitude of further parameters are examined, which offer important interpretation assistance as a background information. In regard to a GMO monitoring these analysis are repeated in relevant intervals. The routinely applied evaluation of the BDF data is also applicable for a GMO monitoring. In the future the existing program would however have to be expanded to include measurements as for example the detection of transgenic DNA in the environment as well as vegetation surveys, which depends more on the used crop and its potential cross breeders.

6. Literatur

ADOLPHI, K. (1995): Neophytische Kultur- und Anbaupflanzen als Kulturflüchtlinge des Rheinlandes. - *Nardus* 2: 272

AMANN, R.L., W. LUDWIG, K.H. SCHLEIFER. (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. - *Microbiol. Rev.* 59: 143-169

EUROPÄISCHES PARLAMENT & RAT DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN. (2001): Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 12. März 2001 über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates. - *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, Reihe L* 106/1

EUROPÄISCHES PARLAMENT & RAT DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN. (2002): Entscheidung des Rates vom 3. Oktober 2002 über Leitlinien zur Ergänzung des Anhangs VII der Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlaments und des Rates über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates. - *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, Reihe L* 280/27

ANDERSON, T.H., K.H. DOMSCH. (1990): Anwendung ökophysiologischer Parameter zur Charakterisierung mikrobieller Biomassen im Boden. - *Verh. Ges. Ökologie.* 19(2): 324-329

ARAMUGANATHAN, K., E.D. EARLE (1991): Nuclear DNA content of some important plant species. - *Plant Mol. Bio. Reporter* 9: 208-218

BECKER, R., A. ULRICH, C. HEDTKE, B. HONERMEIER. (2001): Einfluss des Anbaus von transgenem herbizidresistentem Raps auf das Agrar-Ökosystem. - *Bundesgesundheitsblatt* 44: 159-167

BODENSCHUTZ IN NIEDERSACHSEN. (2003): Arbeitsbericht 2003/Planungen 2004. NLFb (unvöf. Manuskript), Stand November 2003.

DAVENPORT *et al.*, (2000): Quantifying gene movement from oilseed rape to its wild relatives using remote sensing. - *Int. J. Remote Sensing*, 21(18): 3567-3573

DIERSCHKE, H. (1994): Pflanzensoziologie: Grundlagen und Methoden. - Stuttgart. 683 S.

DUNFIELD, K. E., J.J. GERMIDA. (2001): Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*. - *FEMS Microbiology Ecology* 38: 1-9

- DUNFIELD, K.E., J.J. GERMIDA. (2003): Seasonal Changes in the Rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). - *Applied and Environmental Microbiology* 12: 7310-7318
- EASTHAM, K., J. SWEET. (2002): Genetically modified organisms (GMOs): The significance of gene flow through pollen transfer. - EEA Environmental issue report 28: 1-75
- ECKELKAMP, C, MAYER, M. WEBER, B. (1997): BASTA-resistenter Raps. Vertikaler und horizontaler Gentransfer unter besonderer Berücksichtigung des Standortes Wölfersheim-Melbach. - Werkstattreihe Öko-Institut Freiburg 100: 113 S.
- EHLERS, B., E. STRAUCH, M. GOLTZ, D. KUBSCH, H. WAGNER, H. MAIDHOF, J. BENDIEK, B. APPEL, H.-J. BUHK. 1997. Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais mittels PCR. - *Bundesgesundheitsblatt* 4/97: 118-121
- EICHNER, C.A., R.W. ERB, K.N. TIMMIS, I. WAGNER-DÖBLER. (1999): Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. - *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 102-109
- ELLENBERG, H., H.E. WEBER, R. DÜLL, V. WIRTH, W. WERNER, D. PAULIßEN. (1991): Zeigerwerte von Pflanzen in Mitteleuropa. - *Scripta Geobotanica* 18, 248 S.
- ENGELEN, B., K. MEINKEN, F. v.WINTZINGERODE, H. HEUER, H.P. MALKOMES UND H. BACKHAUS. (1998): Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. - *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2814-2821
- ERNST, D., H. ROSENBROCK, A. HARTMANN, G. KIRCHHOF, S. BAUER, W. LUDWIG, K.H. SCHLEIFER, H. SANDERMANN, G. FISCHBECK. (1998): Sicherheitsforschung zu Freisetzungsversuchen in Roggenstein (Bayern). - *Bundesgesundheitsblatt* 12: 523-530
- FELDMANN, S. (2000): Begleitforschung zur Freisetzung herbizidresistenter, transgener Rapspflanzen 1995-1999. Ein Beitrag zur Biologischen Sicherheitsforschung. - *Schriftenreihe Nachhaltiges Niedersachsen - Dauerhaft umweltgerechte Entwicklung* 13, 56 S.
- FELDMANN, S. D., BRANDES, S., PFEILSTETTER, E., MATZK, A., SCHIEMANN, J. (1998): Begleituntersuchungen des Landes Niedersachsen zur Freisetzung transgener, herbizid-resistenter Rapspflanzen. - *Bundesgesundheitsblatt* 12: 536-542
- FELSKE, A., B. ENGELEN, U. NÜBEL, H. BACKHAUS. (1996): Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. - *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4162-4167
- FERRIS, M.J., S.C. NOLD, N.P. REVSBECH, D.M. WARD. (1997): Population structure and physiological changes within a hot spring microbial mat community following disturbance. - *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1367-1374

- FÖRSTER, K., SCHUSTER, C., BELTER, A., DIEPENBROCK, W. (1998): Agrarökologische Auswirkungen des Anbaus von transgenem herbizidtolerantem Raps (*Brassica napus* L.). - Bundesgesundheitsblatt 12: 547-552
- GARVE, E. (1993): Rote Liste der gefährdeten Farn- und Blütenpflanzen in Niedersachsen und Bremen, 4. Fassung vom 1. 1. 1993. - Inf. Naturschutz Niedersachsen. 13(1): 1-37
- GARVE, E., D. LETSCHERT. (1991): Liste der wildwachsenden Farn- und Blütenpflanzen Niedersachsens. - Naturschutz Landschaftspflege Niedersachsen. 24: 1-152
- GEBHARD, F., K. SMALLA. (1998): Transformation of *Acinetobacter* sp. Strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. - Appl. Environ. Microbiology 64: 1550-1554
- GERDEMANN-KNÖRCK, M., M. TEGEDER. (1997): Kompendium der für Freisetzungen relevanten Pflanzen, hier: Brassicaceae, *Beta vulgaris*, *Linum usitatissimum*. - UBA Texte 38/97, Berlin, 221 S.
- GOMES, N.C.M., HEUER, H., SCHÖNEFELD, J., COSTA, R., MENDONCA-HAGLER, L., SMALLA, K. (2001): Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. - Plant Soil 232: 167-180
- GRIFFITHS, B.S., K. RITZ, L.A. GLOVER. (1996): Broad-scale approaches to the determination of soil microbial community structure: application of the community DNA hybridisation technique. - Microbial Ecology 31: 269-280
- GYAMFI, S., U. PFEIFER, M. STIERSCHNEIDER, A. SESSITSCH. (2002): Effects of transgenic glufosinate-tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rhizosphere. - FEMS Microbiology Ecology 41: 181-190
- HAEUPLER, H., E. GARVE. (1983): Programm zur Erfassung von Pflanzenarten in Niedersachsen. Aufruf zu einer weiterführenden Erhebung artenbezogener Daten für den Naturschutz. - Gött. Flor. Rundbr. 17:63-99
- HAEUPLER, H., P. SCHÖNFELDER. (1988): Atlas der Farn- und Blütenpflanzen der Bundesrepublik Deutschland. - Stuttgart. 768 S.
- HAEUPLER, H., G. LOOS, A. SARAZIN, B. SURKUS. (2004): Geobotanische Untersuchungen zum Vergleich von gentechnisch verändertem und konventionellem Raps. Methoden und Ergebnisse einer ersten Studienphase für ein Konzept zu einem Langzeitmonitoring gentechnisch veränderter Pflanzen. - Floristische Rundbriefe Beiheft 7: 3-17
- HANKELN, T., FELDMANN, R.C., SCHMIDT, E.R. (1998): Untersuchungen zum Gentransfer und zur Freisetzung von DNA aus transgenen Pflanzen in Feldversuchen. - Bundesgesundheitsblatt 12: 542-547

- HARDEN, T., JÖRGENSEN, R.G., MEYER, B. V. WOLTERS. (1993): Soil microbial biomass estimated by fumigation-extraction and substrate induced respiration in two pesticide treated soils. - *Soil Biol. Biochem.* 25: 679-683
- HEINEMEIER, O., H. INSAM, E.A. KAISER, G. WALENSIK. (1989): Soil microbial biomass and respiration measurements: An automated technique based on infra-red gas analysis. - *Plant Soil* 116: 191-195.
- HEUER, H., KRSEK, M., BAKER, P. SMALLA, K., WELLINGTON, E. (1997): Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. - *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3233-3241
- HEUER, H., R. M. KROPPENSTEDT, J. LOTTMANN, G. BERG, K. SMALLA. (2002): Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere communities are negligible relative to natural factors. - *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1325-1335
- HOMMEL, B., B. PALLUTT. (2000): Bewertung der Herbizidresistenz für den integrierten Pflanzenschutz im System einer 4-feldrigen Fruchtfolge mit Glufosinat-resistentem Raps und Mais. - *Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderheft 17*: 411-420.
- HÖPER, H., B. KLEEFISCH. (2001): Untersuchungen bodenbiologischer Parameter im Rahmen der Boden-Dauerbeobachtung in Niedersachsen. - *Arbeitshefte Boden 4, NLFb Hannover*, 94 S.
- JÖRGENSEN, R. G. (1995): Die quantitative Bestimmung der mikrobiellen Biomasse in Böden mit der Chloroform-Fumigations-Extraktions-Methode. - *Gött. Bodenkd. Ber.* 104: 1-229
- KAULE, G. (1991): *Arten- und Biotopschutz*. - Stuttgart, 519 S.
- KLEEFISCH B., J. KUES. (1997): *Das Bodendauerbeobachtungsprogramm von Niedersachsen*. - *Arbeitshefte Boden 2, NLFb Hannover*, 122 S.
- KRESK, M., E.M.H. WELLINGTON. (1999): Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. - *J. Microbiol. Methods* 39: 1-16
- LABES, G., G. DANNENBERG, R. SIMON. (1999): Abschätzung der Einwirkungen gentechnisch veränderter Kulturpflanzen auf den Boden, vor allem auf die organische Bodensubstanz als Träger der Lebensraumfunktion. - *UBA - Texte 34/ 99*, 217 S.
- LÄNDERAUSSCHUSS GENTECHNIK (1998): „PCR-Nachweis der 35S/pat - Genkassette in transgenen Kulturpflanzen“, validierte Standardarbeitsanweisung des Unterausschusses "Methodenentwicklung";
<http://www.hamburg.de/Behoerden/Umweltbehoerde/gen/oeffentlich/index1.htm>

LÄNDERAUSSCHUSS GENTECHNIK (2002): „PCR-Nachweis der pSSUAra / bar - Genkassette in transgenen Kulturpflanzen“. Validierte Standardarbeitsanweisung des Unterausschusses "Methodenentwicklung";

<http://www.hamburg.de/Behoerden/Umweltbehoerde/gen/oeffentlich/index1.htm>

LÄNDERAUSSCHUSS GENTECHNIK (2002): „PCR-Nachweis der pFMV/CTP2/EPSPS-Genkassette in transgenen Kulturpflanzen“. Validierte Standardarbeitsanweisung des Unterausschusses "Methodenentwicklung";

<http://www.hamburg.de/Behoerden/Umweltbehoerde/gen/oeffentlich/index1.htm>

LÄNDERAUSSCHUSS GENTECHNIK. „Konzept zur Untersuchung von Saatgut auf Anteile von gentechnisch veränderten Linien des Unterausschusses“. Methodenentwicklung des LAG für eine einheitliche länderübergreifende Überwachung. (Druck in Vorbereitung)

LIESACK, W., P.H. JANSEN, F.A. RAINEY, N.L. WARD-RAINEY, E. STACKEBRANDT. (1997): Microbial diversity in soil: the need of a combined approach using molecular and cultivation techniques. - p. 375-439. In: J.D. van Elsas, J. T. Trevors and E.M.H. Wellington (ed), Modern soil microbiology. Marcel Dekker, New York.

LINDERS, H.W., U. MEYER-SPETHMANN. (2001): Bodendauerbeobachtung in Niedersachsen. Auswertung vegetationskundlicher Erhebungen der Aufbauphase 1992-2000. - Ecoplan (unveröff.)

LLOYD-JONES, G., D.W.F. HUNTER. (2001): Comparison of rapid CNA extraction methods applied to contrasting New Zealand soils. - Soil Biol. Biochemistry 33: 2053-2059

LORENZ, G., W. WACKERNAGEL. (1987): Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. - Appl. Environ. Microbiology 53: 2948-2952

LUEDERS, T., M.W. FRIEDRICH. (2003): Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and mcrA genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. - Appl. Environ. Microbiology 69: 320-326

LUKOW, T., P.F. DUNFIELD, W. LIESACK. (2000): Use of T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. - FEMS Microbiology Ecology 32: 241-247

MALKOMES, H.-P. (1988): Einfluß von Glufosinat-Ammonium (Basta) und Glyphosat (Roundup) auf Bodenmikroorganismen und deren Aktivität. - Z. Pflanzenkrankh. Pflsch. Sonderheft 11: 277-286

- MANASSE, R. , P. KAREIVA. (1991): Quantifying the spread of recombinant genes and organisms. - p. 215-231 In: L. Ginzburgh (Ed.): Assessing ecological risks of biotechnology, Butterworth-Heinemann, Boston.
- MARTIN-LAURENT, F., L. PHILIPPOT, S. HALLET, R. CHAUSSOD, J.C. GERMON, G. SOULAS, G. CARTOUX. (2001): DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. - *Appl. Environ. Microbiology* 67: 2354-2359
- MCCARTNEY, H. A., M. E. LACEY. (1991): Wind dispersal of pollen from crops of oilseed rape (*Brassica napus* L.). - *J. Aerosol. Sci.* 22 : 467-477.
- MENZEL, G., MATHES, K. (1999): Risikobewertung und Monitoring der Umwelteffekte gentechnisch veränderter Nutzpflanzen. - *Z. Ökologie Naturschutz* 8: 157-162
- MENZEL, G., B. BRECKLING, J. FILSER. (2003): Monitoring der Umweltwirkungen transgener Kulturpflanzen in Bremen und im Bremer Umland. Erfassung der Ausbreitungs- und Auskreuzungsdynamik von Raps (*Brassica napus* L.) Forschungsbericht (unveröff.)
- MEYER, H., V. WOLTERS. (1998): Ökologische Auswirkungen des Einsatzes von Totalherbiziden in herbizidresistenten transgenen Kulturen. - *Verh. Ges. Ökologie* 28: 337-344
- MIETHLING, R., G. WIELAND, H. BACKHAUS, C.C. TEBBE. (2000): Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. - *Microbial Ecology* 41: 43-56
- MUYZER, G., K. SMALLA. (1998): Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis in microbial ecology. - *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141
- NEEMANN, G. R. SCHERWAß. (1999): Materialien für ein Konzept zum Monitoring von Umweltwirkungen gentechnisch veränderter Pflanzen. - UBA-Texte 52/99, Berlin, 245 S.
- NIELSEN, K.M., A.M. BONES, K. SMALLA, J.D. VAN ELSAS. (1998): Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria-a rare event? - *FEMS Microbiology Reviews* 22:79-103
- NORRIS, C., J. SWEET. (2002): Monitoring large scale releases of genetically modified crops (EPS 1/5/84), incorporating report on project EPG 1/5/30: monitoring releases of genetically modified crop plants. www.defra.gov.uk/environment/gm/research/pdf/epg_1-5-84_print.pdf
- OBERDORFER, E. (1990): Pflanzensoziologische Exkursionsflora. - Stuttgart, 1050 S.
- OROS-SICHLER, M., M. KÖNIG, K. MICHAELSEN, K. SMALLA. (2003): Polyphasic analysis of bulk and rhizosphere soil fungal communities. Poster. International symposium - structure and function of soil microbiota. Marburg. Germany

- ØVREÅS, L., L. FORNEY, F.L. DAAE, V. TORSVIK. (1997): Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified gene fragments coding for 16S rRNA. - *Appl. Environ. Microbiology* 63: 3367-3373
- PAGET E., SIMONET, P. (1994): On the track of natural transformation in soil. - *FEMS microbiology Exology* 15: 109-118
- PALLUTT, B., B. HOMMEL (1998): Konzept und erste Ergebnisse zur Bewertung von Glufosinat tolerantem Raps und Mais im Rahmen einer 4-feldrigen Fruchtfolge. - *Z. Pflanzenkrankheiten Pflanzenschutz, Sonderheft* 16: 427-433.
- PELLMANN, H., REIßER, W., SCHLEGE, M., THEOPHILOU, S. (1998): Begleitforschung zu Freisetzung gentechnisch veränderter Pflanzen in Sachsen. - *Bundesgesundheitsblatt* 12: 552-559
- PFEILSTETTER, E., MATZK, A., FELDMANN, S.D., SCHIEMANN, J. (2000): Rapid and efficient screening of phosphinothricin tolerant rapeseed with novel germination test. - *Eutrophica* 113: 119 - 124.
- POTT, R. (1992): *Die Pflanzengesellschaften Deutschlands*. - Stuttgart, 427 S.
- PREISING; E., VAHLE; H.-C., BRANDES, D., HOFMEISTER, H., TÜXEN J., WEBER, H. E. (1995): *Die Pflanzengesellschaften Niedersachsens - Bestandsentwicklung, Gefährdung und Schutzprobleme. Einjährige ruderaler Pionier-, Tritt- und Ackerwildkrautgesellschaften*. - *Naturschutz Landschaftspfl. Niedersachsen* 20(6): 1-92.
- RIEGER, M.A., M. LAMOND, C. PRSTON, S.B. POWLES, R.T. ROUSH. (2002): Pollen-mediated movement of herbicide resistance between commercial canola fields. - *Science* 296: 2386-2388
- SANDERMANN, H., H. ROSENBRÖCK, D. ERNST. (1997): Horizontaler Gentransfer bei Herbizid-resistenz? Der Einfluß von Genstabilität und Selektionsdruck. - S. 209-220. In: Brandt, P.: *Zukunft der Gentechnik*, Basel, Birkhäuser Verlag, 290. S..
- SANGUINETTI, C.J., E.D. NETO, J.G. SIMPSON. (1994): Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. - *BioTechniques* 17: 914-921
- SCHEFFLER, J.A., P.J. DALE. (1994): Opportunities for gene transfer from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) to related species. - *Transgenic Research* 3: 263-278
- SCHEFFLER, J.A., PARKINSON, R., DALE, P.J. (1993): Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). - *Transgenic Research* 2: 356-364

- SCHMALENBERGER, A., C. C. TEBBE. (2002): Bacterial community composition in the rhizosphere of a transgenic, herbicide-resistant maize (*Zea mays*) and comparison to its non-transgenic cultivar. - *FEMS Microbiology Ecology* 40: 29-37
- SEBALD O., S. SEYBOLD, G. PHILIPPI. (1993): Die Farn- und Blütenpflanzen Baden- Württembergs. Bd. 2. Hypericaceae bis Primulaceae. - Stuttgart, 451 S.
- SICILIANO, S.D., J.J. GERMIDA. (1999): Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. - *Appl. Environ. Microbiology* 29: 263-272
- SMALLA, K. (1995): Horizontal gene transfer from transgenic plants into plant associated microorganisms and soil microorganisms. S. 29-34. In: BATS (ed.): Safety of transgenic crops. Environmental and agricultural considerations. Proceedings Basel Forum on Biosafety, Basel.
- SMALLA, K., F. GEBHARD, H. HEUER. (2000): Antibiotika-Resistenzgene als Marker in gentechnisch veränderten Pflanzen- Gefahr durch horizontalen Gentransfer? *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 52(3): 62-68
- SMIT, E., P. LEEFLANG, B. GLANDORF, J.D. VAN ELSAS, K. WERNARS. (1999): Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. - *Appl. Environ. Microbiology*. 65: 2614-2621.
- STACKEBRANDT. E., M. GOODFELLOW. (1991) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. - Wiley, Chichester, 329 S.
- TABERLET, P., L. GIELLY, G. PAUTOU, J. BOUVET (1991): Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. - *Plant. Mol. Biol.* 17: 1105-1109
- ZEKI, S. (Ed., 2003): *The Farm Scale Evaluations of spring-sown genetically modified crops*. - *Phil. Trans. Royal Soc. Ser. B*: 358(1439):1775-1913
- TIMMONS, A.M., O'BRIEN, E.T., CHARTERS, Y.M., DUBBLES, S.J., WILKINSON, M.J. (1995): Assessing the risks of wind pollination from fields of genetically modified *Brassica napus* ssp. *oleifera*. - *Euphytica* 85: 417-423
- TREU, R., J. EMBERLIN (2000): Pollen dispersal in the crops maize, oil seed rape, potatoes, sugar beet and wheat. www.soilassociation.org
- VAINIO, E.J.I., J. HANTULA. (2000): Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. - *Mycol. Res.* 104:927-936.

- VOGEL, G. (2002): Entwicklung analytischer Verfahren für den Nachweis von Mikroorganismen in der Umwelt als Folge einer unbeabsichtigten Freisetzung. BUWAL, Schweiz, (unveröff.).
- WINTZINGERODE, F. von, U.B GÖBEL, E. STACKEBRANDT. (1997): Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. - FEMS Microbiology Reviews 21: 213-229
- WACKERNAGER, W., M. LORENZ. (1994): DNA-Entlassung aus Bakterien, DNA-Überdauerung und genetische Transformation im natürlichen Lebensraum. - S. 9-34 In: Forschungszentrum Jülich GMBH (Hrsg.): Biologische Sicherheit 3
- WARWICK, S.I., H.J. BECKIE, M.J. SIMARD, A. LEGERE, H. NAIR, G. SEGUIN-SWARTZ. Environmental and agronomic consequences of herbicide-resistant (HR) canola in Canada ESF Conference Proceedings CABI Publisher. (im Druck)
- WIELAND G., R. NEUMANN, H. BACKHAUS. (2001): Variation of microbial communities in soil, rhizosphere and rhizoplane in response to crop species, soil type and crop development. - Appl. Environ. Microbiology 67: 5849-5854
- WIELAND, G. (2000): Beobachtung der Zusammensetzung von Mikrobenpopulationen und ihren natürlichen und induzierten Veränderungen durch Trennung und Darstellung ribosomaler Nukleinsäuresequenzen. Dissertation, Univ. Braunschweig, 130 S.
<http://opus.tu-bs.de/opus/volltexte/2000/145/pdf/ediss.pdf>
- WILKINSON *et al.* (2003): Hybridisation between *Brassica napus* and *B. rapa* on a national scale in the united kingdom. - Science 302: 457-459
- WILKINSON, M. J., I.J. DAVENPORT, Y.M. CHARTERS, A.E. JONES, J. ALLAINGUILLAUME, H.T. BUTLER, D.C. MASON, A.F. RAYBOULD. (2000): A direct regional scale estimate of transgene movement from genetically modified oilseed rape to its wild progenitors. - Molecular Ecology 9: 983-991
- WIßKIRCHEN, R., H. HAEUPLER. (1998): Standardliste der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands. - Stuttgart, 765 S.
- ZHOU, J., M.A. BRUNS, J.M. TIEDJE. (1996): DNA recovery from soils of diverse composition. - Appl. Environ. Microbiology 62: 316-322
- ZUCCARO, A., B. SCHULZ, J.I. MITCHELL. (2003): Molecular detection of ascomycetes associated with *fucus serrotus*. - Mycol. Rev. 107. 12: 1451-1466
- ZÜGHART, W., B. BRECKLING. (2003): Konzeptionelle Entwicklung eines Monitoring von Umweltwirkungen transgener Kulturpflanzen. - UBA-Texte 50/03, Berlin, 162 S.

Danksagung

Die Durchführung des Projektes wurde durch die Unterstützung der im folgenden genannten Kollegen und Institutionen ermöglicht. Ihnen gilt unser besonderer Dank.

So erfolgte die Bereitstellung und landwirtschaftliche Bearbeitung der Freisetzungsfläche in Sickinge durch die Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Braunschweig. Unser Dank hierfür gilt Dr. Schiemann und Dr. Garve sowie den Mitarbeitern des Versuchsfeldes der BBA. Das transgene Saatgut stellte Herr Dr. Harms von der Firma Aventis CropScience zur Verfügung. Die Beprobung des langjährig genutzten Freisetzungstandortes in Dahnsdorf (Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft) wurde durch Herrn Dr. Hommel ermöglicht. Dr. Zacharias und Frau Gisela Wicke lieferten wertvolle Diskussionsbeiträge zu den vegetationskundlichen Untersuchungen im BDF-Programm. Die Einbeziehung und die Erprobung der Nutzung des niedersächsischen BDF-Programms wurde durch die enge und konstruktive Zusammenarbeit mit dem NLFB ermöglicht.

Für die tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit möchten wir uns ganz besonders bei Dennis Blume, Petra Eggersgluß-Röbbeln und Gina Kirchner (Niedersächsisches Landesamt für Ökologie) bedanken.

Anhang

Hinweis: Aus technischen Gründen werden in der Schriftenreihe des Bundesamtes für Naturschutz (BfN) in der Regel keine farbigen Abbildungen abgedruckt. Die farbigen Karten können in der Digitalversion dieses Skriptenbandes auf der Internetseite des BfN angesehen werden (www.bfn.de).

Anhang A (Karten 1-46, farbig, nur in der Digitalversion enthalten!)

- Fundorte der potenziellen Raps-Kreuzungspartner in den im Pilotprojekt beprobten Untersuchungsgebieten
- Ausgewählte Basisdaten des niedersächsischen BDF-Programms (Zeitraum 1992-2000) mit Bezug zu vegetationskundlichen Parametern
- Ausgewählte Darstellungen der vegetationskundlichen Erhebungen der Aufbauphase des niedersächsischen BDF-Programms
- Vorkommen potenzieller Rapskreuzungspartner in Niedersachsen (Quelle: GLP, Pflanzenartenerfassungsprogramm in Niedersachsen, NLÖ, Stand: 2002, unveröffentlicht)

Anhang B

- Artenlisten der Äcker
- Listen der in den Untersuchungsgebieten festgestellten und beprobten Brassicaceae

Anhang C

- Vegetationsaufnahmen im BDF-Programm
- Bodentypen der BD-Flächen im BDF-Programm

Anhang D

- Vorschlag für ein Monitoring für Raps mit Herbizidresistenz

Anhang B

Artenlisten der Äcker

Tab. 1: Liste der auf den Äckern festgestellten Gefäßpflanzenarten

Listen der in den Untersuchungsgebieten festgestellten und beprobten Brassicaceae

Tab. 2: Übersicht über die als Kreuzungspartner des Raps relevanten Brassicaceae im UG Sickte in 2001

Tab. 3: Übersicht über die als Kreuzungspartner des Raps relevanten Brassicaceae im UG Sickte in 2002

Tab. 4: Übersicht über die als Kreuzungspartner des Raps relevanten Brassicaceae im UG Sickte in 2002

Tab. 5: Übersicht über die als Kreuzungspartner des Raps relevanten Brassicaceae im UG BDF012-L in 2001

Tab. 6: Übersicht über die als Kreuzungspartner des Raps relevanten Brassicaceae im UG BDF012-L in 2002

Tab. 7: Übersicht über die als Kreuzungspartner des Raps relevanten Brassicaceae im UG BDF012-L in 2003

Tab. 8: Übersicht über die als Kreuzungspartner des Raps relevanten Brassicaceae im UG BDF058-L (2001)

Tab. 9: Übersicht über die als Kreuzungspartner des Rapses relevanten Brassicaceae im UG BDF008-L (2002)

Tab. 10: Übersicht über die als Kreuzungspartner des Raps relevanten Brassicaceae im UG BDF010-L (2003)

Anhang B

Tab. 1: Liste der auf den Äckern festgestellten Gefäßpflanzenarten (aFF = Acker der Freisetzungsfäche, aBDF = Acker der Bodendauerbeobachtungsfächen; x = Funde in 2001; y = Funde in 2002; z = Funde in 2003)

erfasste Arten	dt. Name	untersuchte Äcker			
		aFF	aBDF012-L	aBDF008-L	aBDF010-L
<i>Acer pseudoplatanus</i> *	Berg-Ahorn	x		y	
<i>Alliaria petiolata</i> *	Knoblauchsrauke			y	
<i>Alopecurus myosuroides</i>	Acker-Fuchsschwanz	x y z	x y	y	
<i>Alopecurus pratensis</i> *	Wiesen-Fuchsschwanz	y z	y z		
<i>Amaranthus retroflexus</i>	Zurückgebogener Amaranth	x			
<i>Anagallis arvensis</i>	Acker-Gauchheil	x z			
<i>Anthriscus sylvestris</i> *	Wiesen-Kerbel	y	y z		z
<i>Apera spica-venti</i>	Gewöhnlicher Windhalm		x z		z
<i>Arctium tomentosum</i> *	Filzige Klette	y z			
<i>Arrhenatherum elatius</i> *	Glatthafer	y z	y z	y	z
<i>Artemisia vulgaris</i> *	Gewöhnlicher Beifuß	x y	x		
<i>Atriplex patula</i>	Spreizende Melde	x z	x	y	
<i>Atriplex prostrata</i>	Spieß-Melde		z		
<i>Bidens tripartita</i>	Dreitelliger Zweizahn	x			
<i>Brassica napus</i>	Raps	y	z		
<i>Bromus hordeaceus ssp. hord.</i> *	Weiche Trespe				z
<i>Bromus sterilis</i>	Taube Trespe	x y z	x z y	y	z
<i>Calystegia sepium</i> *	Zaun-Winde	z			
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Gewöhnliches Hirtentäschel	x y z	x y	y	z
<i>Carduus crispus</i> jv. *	Krause Distel (Jungpflanze)	x			
<i>Centaurea cyanus</i>	Kornblume				z
<i>Chaerophyllum bulbosum</i> *	Knolliger Kälberkropf			y	
<i>Chenopodium album</i>	Weißer Gänsefuß	x z			z
<i>Cirsium arvense</i>	Acker-Kratzdistel	x y z	x y z	y	z
<i>Cirsium vulgare</i> *	Gewöhnliche Kratzdistel	y	z	y	
<i>Convolvulus arvensis</i>	Acker-Winde	x y z	z	y	
<i>Conyza canadensis</i>	Kanadisches Berufkraut	x			
<i>Coronopus squamatus</i>	Gewöhnlicher Krähenfuß			y	
<i>Dactylis glomerata</i> *	Knäuelgras	y z	z	y	z
<i>Descurainia sophia</i>	Sophienrauke				z
<i>Elymus repens</i>	Gewöhnliche Quecke	x y z	x y z	y	z
<i>Epilobium hirsutum</i> *	Zottiges Weidenröschen	y			
<i>Epilobium spec.</i> *	Weidenröschen	y		y	
<i>Epilobium tetragonum</i> *	Vierkantiges Weidenröschen	x			
<i>Equisetum arvense</i>	Acker-Schachtelhalm	x y z	x y z	y	
<i>Erysimum cheiranthoides</i>	Acker-Schöterich	x	x		
<i>Euphorbia exigua</i>	Kleine Wolfsmilch	x			
<i>Euphorbia helioscopia</i>	Sonnenwend-Wolfsmilch	z		y	
<i>Festuca pratensis</i> *	Wiesen-Schwingel	z			
<i>Festuca rubra</i> *	Rot-Schwingel			y	z
<i>Fumaria officinalis</i>	Gewöhnlicher Erdrauch	x y z	x z	y	
<i>Galeopsis tetrahit</i> agg.	Artengruppe Gewöhl. Hohlzahn		y		z
<i>Galium aparine</i>	Kletten-Labkraut	x y z	x y z	y	z
<i>Geranium dissectum</i>	Schlitzblättriger Storchschnabel			y	
<i>Geranium molle</i>	Weicher Storchschnabel				z
<i>Glechoma hederacea</i> *	Gundermann	y z	y	y	z
<i>Glyceria fluitans</i> agg.*	Artengr. Flutender Schwaden	x			
<i>Heracleum sphondylium</i> *	Wiesen-Bärenklau	y z	y z		

* Arten, die nicht zur charakteristischen Ackerbegleitflora gezählt werden.

erfasste Arten	dt. Name	Untersuchte Äcker			
		aFF	aBDF012-L	aBDF008-L	aBDF010-L
<i>Holcus lanatus</i> *	Wolliges Honiggras				z
<i>Hordeum sativum</i>	Saat-Gerste	x		y	
<i>Hyoscyamus niger</i>	Schwarzes Bilsenkraut	x			
<i>Lactuca serriola</i> *	Kompaß-Lattich	x y		y	
<i>Lamium amplexicaule</i>	Stengelumfassende Taubnessel	y		y	
<i>Lamium purpureum</i>	Purpurrote Taubnessel	x y	x y z	y	
<i>Lapsana communis</i>	Rainkohl	x y z	x y z	y	z
<i>Lolium perenne</i> *	Englisches Raygras		x		
<i>Lycopersicon esculentum</i> *	Tomate		z		
<i>Matricaria discoidea</i>	Strahlenlose Kamille	x	x		z
<i>Matricaria recutita</i>	Echte Kamille	x y z	x y z	y	z
<i>Myosotis arvensis</i>	Acker-Vergißmeinnicht	x y z	x z	y	z
<i>Papaver dubium</i>	Saat-Mohn	x			
<i>Papaver rhoeas</i>	Klatsch-Mohn	x y z			
<i>Pastinaca sativa</i> *	Pastinak	y	y		
<i>Phacelia tanacetifolia</i>	Büschelschön			y	
<i>Phragmites australis</i> *	Schilf	x			
<i>Plantago major</i>	Großer Wegerich		x y		
<i>Poa annua</i>	Einjähriges Rispengras	y	x y z	y	
<i>Poa palustris</i> *	Sumpf-Rispengras				z
<i>Poa pratensis</i> *	Wiesen-Rispengras		z		
<i>Poa trivialis</i>	Gewöhnliches Rispengras	x y z	x y z	y	z
<i>Polygonum amphibium</i> *	Wasser-Knöterich	z	yz		z
<i>Polygonum aviculare</i> agg.	Artengruppe Vogel-Knöterich	x z y	x y z	y	z
<i>Polygonum convolvulus</i>	Winden-Knöterich	x y z	x	y	z
<i>Polygonum lapathifolium</i>	Ampfer-Knöterich				z
<i>Polygonum persicaria</i>	Floh-Knöterich				z
<i>Potentilla reptans</i> *	Kriechendes Fingerkraut		y		
<i>Quercus robur</i> *	Stiel-Eiche		z		
<i>Ranunculus acris</i> *	Scharfer Hahnenfuß				z
<i>Ranunculus ficaria</i> *	Scharbockskraut	z	y		
<i>Ranunculus repens</i>	Kriechender Hahnenfuß				z
<i>Rubus caesius</i> *	Kratzbeere		z		
<i>Rumex acetosa</i> *	Großer Sauerampfer				z
<i>Rumex crispus</i> *	Krauser Ampfer	y			z
<i>Rumex obtusifolius</i> *	Stumpfbältriger Ampfer				z
<i>Salix spec. jv.</i> *	Weide		z		
<i>Sambucus nigra</i> *	Schwarzer Holunder				z
<i>Senecio vernalis</i>	Frühlings-Greiskraut			y	z
<i>Senecio vulgaris</i>	Gewöhnliches Greiskraut	y		y	z
<i>Sinapis arvensis</i>	Acker-Senf	x y z		y	
<i>Sisymbrium officinale</i>	Weg-Rauke	x	x z	y	
<i>Sonchus asper</i>	Rauhe Gänsedistel	x			
<i>Sonchus oleraceus</i>	Kohl-Gänsedistel	x			
<i>Stellaria graminea</i> *	Gras-Sternmiere				z
<i>Stellaria media</i>	Vogelmiere	y	y	y	z
<i>Tanacetum vulgare</i> *	Rainfarn				z
<i>Taraxacum officinale</i> agg.	Artengr. Gewöhl. Löwenzahn	y z			
<i>Thlaspi arvense</i>	Acker-Hellerkraut	x y z	x y z	y	
<i>Trifolium pratense</i> *	Rot-Klee			y	z
<i>Tripleurospermum perforatum</i>	Geruchlose Kamille	x y z	x y	y	z
<i>Triticum aestivum</i>	Saat-Weizen	z	x	y	
<i>Tussilago farfara</i>	Hufplattich	x y z			
<i>Urtica dioica</i> *	Große Brennessel	x y z			z
<i>Urtica urens</i>	Kleine Brennessel	x			

Anhang B

erfasste Arten	dt. Name	untersuchte Äcker			
		aFF	aBDF012-L	aBDF008-L	aBDF010-L
<i>Valeriana officinalis</i> agg.*	Artengruppe Echter Baldrian	y			z
<i>Veronica arvensis</i>	Feld-Ehrenpreis	x y	x		
<i>Veronica hederifolia</i> ssp. <i>hed.</i>	Efeublättriger Ehrenpreis	x y z	x y z	y	
<i>Veronica persica</i>	Persischer Ehrenpreis	x y z	x y z	y	
<i>Veronica polita</i>	Glänzender Ehrenpreis	x y			
<i>Vicia hirsuta</i>	Rauhhaarige Wicke				z
<i>Vicia sativa</i> agg.	Artengruppe Saat-Wicke	x y			z
<i>Vicia tetrasperma</i>	Viersamige Wicke				z
<i>Viola arvensis</i>	Acker-Stiefmütterchen	x y z	x y z	y	z
Anzahl der erfassten Arten		76	52	46	48

Anhang B

Listen der in den Untersuchungsgebieten festgestellten und beprobten Brassicaceae

Tab. 2: Übersicht über die als Kreuzungspartner des Raps relevanten Brassicaceae im UG Sickte in 2001 (s. Karte 1, Anhang A)

Fundort- Art ²	Lebensraum	1. Begehung ¹		2. Begehung ¹		3. Begehung ¹		gesamt	
		Ind. zahl	beprob ³	Ind. zahl	beprob	Ind. zahl	beprob	Ind. zahl	beprob
1 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	1	1					1	1
2 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	14	1	ca. 500	88			ca. 500	89
3 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	13	9	30	29			43	38
4 - BN	Ackerrand	ca. 300	85	17	17			ca. 300	102
5 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	ca. 120	42					ca. 120	42
6 - BN	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)			22	22			22	22
6 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	12	1	2	2			14	3
7 - SA	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	1	---					1	---
8 - SB	Acker (Grünbrache) ⁴	ca. 50000	--/100FS ⁵					ca. 50000	--/100FS
8 - SA	Acker (Grünbrache)	ca. 100	25	10	10			ca. 100	35
9 - BN	Acker (Gerste)	ca. 1500	98	17	17			ca. 1500	115
10 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	5	0					5	---
11 - BN	Gartenfläche	2	2			ca. 50	ca. 50	2	2
12 - BN	Gartenfläche			1	1			1	1
13 - BN	Gartenfläche			1	1			1	1
14 - BN	Gartenfläche			1	1			1	1
15 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	7	---					7	---
16 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	11	---					11	---
17 - SA	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	1	---					1	---
18 - BN	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	2	1					2	1
18 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	28	6	5	5			33	11
19 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	2	---					2	---
20 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	16	15	8	8			24	23
21 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	2	---					2	---
22 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	ca. 100	---	ca. 300	---			ca. 500	---
23 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	36	7	92	82			128	89
24 - BN	Ackerrand	ca. 70	6/70FS ⁵	32	32			ca. 100	38/ 70 FS
25 - BN	Ackerrand	ca. 60	20/60FS ⁵	16	16			ca. 80	36/ 60 FS
26 - BR	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	ca. 70	---					ca. 70	---
27 - SA	Acker (Brache)	ca. 650	85					650	85
27 - BN	Acker (Brache)			ca. 150	101			ca. 150	101
28 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	17	4	19	19			36	23
29 - SA	Ackerrand	40	---					40	---
30 - SA	Sonstige	40	8	1	1			41	9
31 - BN	Ackerrand	31	31					31	31
32 - BN	Acker (Weizen)	4	2					4	2
33 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	1	1	1	1			2	2
34 - BN	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	4	4					4	4
35 - SA	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	5	2					5	2
36 - SA	Ackerrand	7	3					7	3
36 - BN	Ackerrand			1	1			1	1
37 - BN	Ackerrand	ca. 80	25					ca. 80	25
38 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	6	---					6	---
39 - SA	Ackerrand	1	---					1	---
40 - SA	Ackerrand	20	---					20	---
41 - BN	Ackerrand	12	---					12	---
42 - BR	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)			2	2			2	2
43 - SA	Ackerrand					1	1	1	1
44 - BN	Ackerrand					ca. 500	100	ca. 500	100
45 - SA	Ackerrand					1	1	1	1
46 - BN	Ackerrand					ca. 200	102	ca. 200	102
47 - SA	Ackerrand					2	2	2	2
48 - SA	Ackerrand					ca. 50	27	ca. 50	27
49 - SA	Ackerrand	85	---					85	---
50 - SA	Acker (Weizen)	1	---					1	---
51 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	1	---					1	---
52 - BN	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	1	---					1	---
53 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	1	---					1	---
54 - DM	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	11	---					11	---

¹ 1. Begehung: 09.05. bis 16.05.01; 2. Begehung: 02.07. bis 20.07.01; 3. Begehung: 04.09. bis 24.09.01

² BN = *Brassica napus*, BR = *Brassica rapa*, DM = *Diplotaxis muralis*, SB = *Sinapis alba*, SA = *Sinapis arvensis*

³ Im Laufe der ersten Begehung erfasste Pflanzen wurden erst zur zweiten Begehung beprobt, um neben der standardmäßig genommenen Blattprobe auch 5 reife Schoten für den Test auf das Transgen in der Tochtergeneration zu erhalten.

⁴ Als Haupt oder Zwischenfrüchte angebaute Brassicaceae wurden nur in diesem Ausnahmefall erfasst und beprobt.

⁵ Statt 5 Schoten pro Individuum wurden z. T. Sammelpflanzen von Fruchtständen (FS) genommen, um eine höhere Zahl von Samen (Tochterindividuen) zu erhalten

Anhang B

Tab. 3: Übersicht über die als Kreuzungspartner des Raps relevanten Brassicaceae im UG Sickte in 2002 (s. Karte 2, Anhang A)

Fundort- Art ⁷	Lebensraum	1. Begehung ⁶		2. Begehung ⁶		3. Begehung ⁶		gesamt	
		Ind. zahl	beprobt	Ind. zahl	beprobt	Ind. zahl	beprobt	Ind. zahl	beprobt
1 - BN	Ackerrand	ca. 200	111					ca. 200	111
2 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	4	4					4	4
3 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	2	2					2	2
3 - SA	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	3	3					3	3
4 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	1	1					1	1
5 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	3	3					3	3
6 - BN	Acker (Weizen)	1	1					1	1
7 - SA	Acker (Grünbrache)	ca. 1000	101					ca. 1000	101
8 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	22	---					22	
9 - BN	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	1	1					1	1
10 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	12	12					12	12
11 - BN	Ackerrand	1	1					1	1
12 - BN	Ackerrand	1	1					1	1
13 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	11	11					11	11
14 - SA	sonstige	ca. 400	107					ca. 400	107
14 - BN	sonstige	4	---					4	---
15 - SA	Ackerrand	3	3					3	3
16 - SA	Ackerrand	ca. 50	17					ca. 50	17
17 - SA	Ackerrand	1	1					1	1
18 - BN	Acker (Zuckerrüben)	ca. 30	16					ca. 30	16
19 - DM	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	ca. 120	53					ca. 120	53
20 - SA	Ackerrand			10	10			10	10
21 - SA	Ackerrand			4	4			4	4
22 - SA	Acker (Zuckerrüben)			8	8			8	8
23 - SA	Ackerrand			1	1			1	1
24 - SA	Ackerrand			3	3			3	3
25 - BN	Acker (Zuckerrüben)			3	3			3	3
26 - SA	Ackerrand			1	1			1	1
27 - BN	Acker (Zuckerrüben)			2	2			2	2
28 - SA	Acker (Zuckerrüben)			2	2			2	2
29 - SA	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)			14	13			14	13
30 - SA	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)			40	39			40	39
31 - SA	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)			8	8			8	8
32 - SA	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)			2	2			2	2
33 - SA	Ackerrand			1	1			1	1
34 - SA	Acker (Zuckerrüben)			1	1			1	1
35 - BN	Acker (Zuckerrüben)					1	1	1	1
36 - SA	Acker (Zuckerrüben)					3	3	3	3
37 - BN	Acker (Zuckerrüben)					1	1	1	1
38 - SA	Ackerrand					6	3	6	3
39 - SA	Acker (Zuckerrüben)					5	5	5	5

⁶ 1. Begehung: 24.05. bis 12.06.02; 2. Begehung: 30.07. bis 31.07.02; 3. Begehung: 13.09. bis 18.09.02

⁷ BN = *Brassica napus*, DM = *Diploptaxis muralis*, SA = *Sinapis arvensis*

Anhang B

Tab. 4: Übersicht über die als Kreuzungspartner des Raps relevanten Brassicaceae im UG Sickte in 2003 (s. Karte 3, Anhang A)

Fundort Art ⁹	Lebensraum	1. Begehung ⁸		2. Begehung ⁸		3. Begehung ⁸		gesamt	
		Ind. zahl	beprobt	Ind. zahl	beprobt	Ind. zahl	beprobt	Ind. zahl	beprobt
1 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	3	2					3	2
2 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	ca. 5000	---					ca. 5000	---
3 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	ca. 50	50					ca. 50	50
4 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	ca. 80	55					ca. 80	55
5 - SA	Acker (Grünbrache)	ca. 200	103					ca. 200	103
6 - BX	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	ca. 200	100					ca. 200	100
7 - SA	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	40	20					ca. 40	20
8 - BN	Acker (Weizen)	ca. 10000	---					ca. 10000	---
9 - BN	Acker (Weizen)	ca. 10000	---					ca. 10000	---
10 - BN	Ackerrand	4	4					4	4
11 - SA	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	1	1					1	1
12 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	ca. 300	102					ca. 300	102
13 - DM	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	15	---					15	---
14 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	2	---					2	---
15 - SA	Ruderalbiotop (Straßen-,	5	---					5	---
16 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	4	4					4	4
17 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	1	1					1	1
18 - SA	Acker (Zuckerrüben)	1	1					1	1
19 - BN	Ackerrand			1	1			1	1
20 - BN	Ackerrand			1	1			1	1
21 - SA	Ackerrand			1	1			1	1
22 - SA	Ackerrand			1	1			1	1
23 - BN	Ackerrand			1	1			1	1
24 - SA	Acker (Zuckerrüben)			8	7			8	7
25 - BN	Acker (Weizen)			1	1			1	1
26 - BN	Acker (Weizen)					ca. 1000	9	ca. 1000	9
27 - BN	Acker (Weizen)					ca. 2000	36	ca. 2000	36
28 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)					6	6	6	6
29 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)					5	5	5	5
30 - BN	Ackerrand					ca. 3000	0	ca. 3000	0

⁸ 1. Begehung: 19.05. bis 06.06.03; 2. Begehung: 23.07. bis 25.07.03; 3. Begehung: 08.09. bis 17.09.03

⁹ BN = *Brassica napus*, BX = *Brassica spec.*, DM = *Diplotaxis muralis*, SA = *Sinapis arvensis*,

Anhang B

Tab. 5: Übersicht über die als Kreuzungspartner des Raps relevanten Brassicaceae im UG BDF012-L in 2001 (s. Karte 8, Anhang A)

Fundort- Art ¹¹	Lebensraum	1. Begehung ¹⁰		2. Begehung ¹⁰		3. Begehung ¹⁰		gesamt	
		Ind. zahl	bepr. ¹²	Ind. zahl	beprobt	Ind. zahl	beprobt	Ind. zahl	beprobt
1 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)			1	1			1	1
2 - SA	Acker (Zuckerrüben)	6	---	ca. 500	103			ca. 500	103
3 - SA	Ackerrand			ca. 20	16			ca. 20	16
4 - SA	Ackerrand			4	4			4	4
5 - SA	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	1	---					1	---
6 - SA	Ackerrand	1	1	ca. 200	84			ca. 200	84
7 - RS	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)			1	1			1	1
8 - BN	Ackerrand			6	5			6	5
8 - SB	Ackerrand			1	1			1	1
9 - SA	Ackerrand	1	---					1	---
10 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	1	---					1	---
11 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	4	---					4	---
12 - SA	Ackerrand	1	---					1	---
13 - BN	Ackerrand	1	---					1	---
14 - BN	Grünland	10	---					10	---
15 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	1	---					1	---
16 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	1	---					1	---
17 - RR	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	1	---					1	---
17 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	3	---					3	---
18 - SA	Ackerrand	1	---					1	---
19 - BN	Acker (Zuckerrüben)					ca. 4000	99	ca. 4000	99
19 - SA	Acker (Zuckerrüben)					1	1	1	1
20 - BN	Acker (Zuckerrüben)					3	3	3	3
20 - SA	Acker (Zuckerrüben)					1	1	1	1

Tab. 6: Übersicht über die als Kreuzungspartner des Rapses relevanten Brassicaceae im UG BDF012-L in 2002 (s. Karte 9, Anhang A)

Fundort- Art ¹⁴	Lebensraum	1. Begehung ¹³		2. Begehung ¹³		3. Begehung ¹³		gesamt	
		Ind. zahl	bepr. ¹⁵	Ind. zahl	beprobt	Ind. zahl	beprobt	Ind. zahl	beprobt
1 - SA	Acker (Zuckerrüben)			4	---	1	---	5	---
(2 - BN) ¹⁶	Acker (Brache)			ca. 100000	---			ca. 100000	---
3 - BN	Acker (Zuckerrüben)					250	---	250	---
3 - SA	Acker (Zuckerrüben)					3	---	3	---
(4 - BN) ¹⁶	Acker (Raps, abgeerntet)					ca. 25000	---	ca. 25000	---
5 - SA	Acker (Zuckerrüben)					12	---	12	---
5 - BN	Acker (Zuckerrüben)					29	---	29	---

¹⁰ 1. Begehung: 08.05. bis 17.05.01; 2. Begehung: 16.07. bis 23.07.01; 3. Begehung: 11.09. bis 13.09.01

¹¹ BN = *Brassica napus*, RR = *Raphanus raphanistrum*, RS = *Raphanus sativus*, SA = *Sinapis arvensis*, SB = *Sinapis alba*

¹² Im Laufe der ersten Begehung erfasste Pflanzen wurden erst zur zweiten Begehung beprobt. Es wurden bei allen drei Begehungen ausschließlich Blattproben (ein Blatt pro Individuum) genommen.

¹³ 1. Begehung: 22.05. bis 24.05.02; 2. Begehung: 18.07. bis 26.07.02; 3. Begehung: 09.09. bis 12.09.02

¹⁴ BN = *Brassica napus*, SA = *Sinapis arvensis*

¹⁵ Im Untersuchungsgebiet BDF012-L wurden in 2002 keine Proben genommen

¹⁶ Vorkommen, die auf Ansaaten oder ausgefallene Körner einer Vorkultur zurückgehen. In Tab. 18 nicht berücksichtigt

Anhang B

Tab. 7: Übersicht über die als Kreuzungspartner des Raps relevanten Brassicaceae im UG BDF012-L in 2003 (s. Karte 10, Anhang A)

Fundort- Art ¹⁸	Lebensraum	1. Begehung ¹⁷		2. Begehung ¹⁷		3. Begehung ¹⁷		gesamt	
		Ind. zahl	bepr. ¹⁹	Ind. zahl	beprob	Ind. zahl	beprob	Ind. zahl	beprob
1 - BN	Ackerrand	ca. 500	---					ca. 500	---
2 - BN	Acker (Weizen)	38	---					38	---
3 - BN	Acker (Grünbrache)	ca. 5000	---					ca. 5000	---
4 - BN	Acker (Bohnen)	ca. 100	---					ca. 100	---
5 - SA	Acker (Zuckerrüben)	ca. 5000	---					ca. 5000	---
6 - SB	Acker (Zuckerrüben)	1	---	20	---			21	---
7 - SA	Ackerrand	ca. 2500	---					ca. 2500	---
8 - SA	Ackerrand	ca. 100	---					ca. 100	---
9 - BN	Acker (Weizen)	ca. 60	---					ca. 60	---
10 - SA	Ackerrand	4	---					4	---
11 - SA	Ackerrand	ca. 100	---					ca. 100	---
12 - BN	Ackerrand	ca. 10	---					ca. 10	---
13 - BN	Acker (Zuckerrüben)			ca. 5000	---			ca. 5000	---
14 - SA	Ackerrand			2	---			2	---
15 - BN	Ackerrand			12	---			12	---
16 - BN	Acker			2500	---			2500	---
17 - BN	Ackerrand			2	---			2	---
18 - SA	Ackerrand			ca. 3000	---			ca. 3000	---
19 - SA	sonstige			1	---			1	---
20 - BN	Ackerrand					ca. 100	---	ca. 100	---
21 - BN	Ackerrand					4	---	4	---
22 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)					1	---	1	---
23 - SA	Acker (Grünbrache)					ca. 10000	---	ca. 10000	---
24 - BN	Acker (Zuckerrüben)					ca. 10000	---	ca. 10000	---

Tab. 8: Übersicht über die als Kreuzungspartner des Raps relevanten Brassicaceae im UG BDF058-L in 2001 (s. Karte 14, Anhang A)

Fundort- Art ²¹	Lebensraum	1. Begehung ²⁰		2. Begehung ²⁰		3. Begehung ²⁰		gesamt	
		Ind. zahl	bepr. ²²	Ind. zahl	beprob	Ind. zahl	beprob	Ind. zahl	beprob
1 - SA	Grünland	1	---					1	---
2 - SA	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	1	---					1	---
3 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)	2	---					2	---
4 - SB	Acker (Weizen)	1	---					1	---
5 - BN	Acker (Gerste)	1	---					1	---
6 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	2	---					2	---
7 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	3	---					3	---
8 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	ca. 75	---					ca. 75	---
9 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	4	---					4	---
10 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	2	---					2	---
11 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	13	---					13	---
12 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	5	---					5	---
13 - BN	Acker (Zuckerrüben)					27	27	27	27
14 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	8	---	2	2			10	2
15 - BN	Ackerrand	21	21					21	21
16 - BN	Ackerrand			29	29			29	29
16 - SA	Ackerrand			7	7			7	7
17 - SA	Acker (Weizen)			1	1			1	1
18 - SB	Gartenfläche			4	4			4	4
19 - SB	Ackerrand			1	1			1	1
20 - BN	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)			39	37			39	37
21 - SA	Ackerrand			1	1			1	1
22 - SA	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)			1	1			1	1
22 - BN	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)			1	1			1	1
23 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	16	---	2	2			18	2

¹⁷ 1. Begehung: 26.05. bis 29.05.03; 2. Begehung: 23.07. bis 24.07.03; 3. Begehung: 10.09. bis 20.09.03

¹⁸ BN = *Brassica napus*, SA = *Sinapis arvensis*, SB = *Sinapis alba*

¹⁹ Im Untersuchungsgebiet BDF012-L wurden in 2003 keine Proben genommen

²⁰ 1. Begehung: 18.05. bis 15.06.01; 2. Begehung: 19.07. bis 26.07.01; 3. Begehung: 20.09 bis 26.09.01

²¹ BN = *Brassica napus*, SA = *Sinapis arvensis*, SB = *Sinapis alba*

²² Im Laufe der ersten Begehung erfasste Pflanzen wurden erst zur zweiten Begehung beprobt. Es wurden bei allen drei Begehungen ausschließlich Blattproben (ein Blatt pro Individuum) genommen.

Anhang B

Tab. 9: Übersicht über die als Kreuzungspartner des Rapses relevanten Brassicaceae im UG BDF008-L in 2002 (s. Karte 15, Anhang A)

Fundort- Art ²⁴	Lebensraum	1. Begehung ²³		2. Begehung ²³		3. Begehung ²³		gesamt	
		Ind. zahl	beprobt	Ind. zahl	beprobt	Ind. zahl	beprobt	Ind. zahl	beprobt
1 - BN	Acker (Brache)	ca. 200	135					ca. 200	135
1 - SA	Acker (Brache)	71	71					71	71
2 - BN	Acker (Weizen)	ca. 250	107					ca. 250	107
2 - SA	Acker (Weizen)	ca. 500	102					ca. 500	102
3 - SA	Ackerrand			1	1			1	1
4 - SA	Acker (Zuckerrüben)			3	3			3	3
5 - SA	Ackerrand			1	1			1	1
6 - SB	Ackerrand			1	1			1	1
7 - BX	Ackerrand					1	1	1	1
8 - BN	Acker (Zuckerrüben)					1	1	1	1
9 - BX	Acker (Zuckerrüben)					2	2	2	2
10 - BN	Acker (Zuckerrüben)					14	14	14	14
11 - RS	Acker (Zuckerrüben)					3	3	3	3
12 - BN	Acker (Zuckerrüben)					3	3	3	3
13 - BN	Acker (Zuckerrüben)					ca. 1000	97	ca. 1000	97

Tab. 10: Übersicht über die als Kreuzungspartner des Raps relevanten Brassicaceae im UG BDF010-L in 2003 (s. Karte 16, Anhang A)

Fundort- Art ²⁶	Lebensraum	1. Begehung ²⁵		2. Begehung ²⁵		3. Begehung ²⁵		gesamt	
		Ind. zahl	beprobt	Ind. zahl	beprobt	Ind. zahl	beprobt	Ind. zahl	beprobt
1 - RR	Ackerrand	ca. 50	8					ca. 50	8
2 - BN	Ackerrand	ca. 500	102					ca. 500	102
3 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)	1	1					1	1
4 - RR	Ackerrand	ca. 1000	100					ca. 1000	100
5 - BN	Acker (Weizen)	4	4	ca. 5000	102			ca. 5000	106
6 - RR	sonstige	1	1					1	1
7 - BN	Ackerrand	25	25					25	25
8 - BN	Acker (Weizen)			ca. 300	100			ca. 300	100
9 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)			1	1			1	1
10 - SA	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)			1	1			1	1
11 - BN	Ackerrand			7	7			7	7
12 - BN	Ackerrand			3	3			3	3
13 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)					ca. 200	ca. 100	ca. 200	ca. 100
14 - BN	Ruderalbiotop (Straßen-, Wegrand)					1	1	1	1
15 - BN	Acker (Mais)					1	1	1	1
16 - RR	Ruderalbiotop (Lager-, Brachfläche)					1	1	1	1

²³ 1. Begehung: 27.5. bis 31.5.02; 2. Begehung: 24.7. bis 26.7.02; 3. Begehung: 15.9. bis 16.9.02

²⁴ BN = *Brassica napus*, BX = *Brassica spec.*, RS = *Raphanus sativus*, SA = *Sinapis arvensis*, SB = *Sinapis alba*

²⁵ 1. Begehung: 30.05. bis 10.06.03; 2. Begehung: 28.07. bis 29.07.03; 3. Begehung: 16.09. bis 23.09.03

²⁶ BN = *Brassica napus*, RR = *Raphanus raphanistrum*, SA = *Sinapis arvensis*

Anhang C

Tab. 1. Vegetationsaufnahmen im BDF-Programm

Tab. 2: Bodentypen der BD-Flächen im BDF-Programm

Tab. 1: Darstellung der Vegetationsaufnahmen in den Kernflächen im Rahmen des BDF-Programmes, hier beispielhaft für Kernfläche 1 der BDF013-L. Bei der Aufnahme im Jahr 2002 wurden die Aufnahmen vorhergehende Kartierungen vergleichend mit berücksichtigt. Darüber hinaus werden Rote Liste Arten sowie die Zeigerarten und Spektren für Feuchte, Reaktion und Stickstoff detailliert dargestellt (nicht gezeigt). Quelle: Rumpf, U. Bodendauerbeobachtungsflächen (BDF) in Niedersachsen, Aufnahme von Flora und Vegetation, Ergebnisbericht 2002 Teilfläche V1 BDF013-L

vBDF-1, BDF013-L

Untersuchungsjahr	1996	1999	2002
Feldfrucht	Hafer	Raps	Raps
Deckung Kulturart (%)	85	80	95
Deckung Beikraut (%)	<1	13	4
Deckung Moose (%)		10	<1
Artenzahl	10	11	5
deutliche Zunahme:			
<i>Viola arvensis</i>	0.1+	1+	0.4m
weitgehend unverändert:			
<i>Myosotis arvensis</i>	0.1+	0.2m	0.1
<i>Galium aparine</i>	0.1	0.1r	0.1+
unbeständig:			
<i>Hordeum vulgare</i>		0.1+	0.1
<i>Matricaria recutita</i>		0.1	0.1r
<i>Polygonum aviculare</i> agg.	0.1r	0.1r	
<i>Brassica napus</i>	0.1+		
<i>Cirsium arvense</i>	0.1+		
<i>Poa annua</i>	0.1+		
<i>Stellaria media</i>	0.1+		
<i>Euphorbia helioscopia</i>	0.1r		
<i>Sonchus oleraceus</i>	0.1r		
<i>Veronica hederifolia</i> agg.		0.1	
<i>Apera spica-venti</i>		0.1+	
<i>Aphanes arvensis</i>		0.1+	
<i>Thlaspi arvense</i>		0.1r	
<i>Veronica arvensis</i>		0.1r	

Anhang C

Tab. 2: Bodenarten der BD-Flächen im BDF-Programm (Quelle: B. Kleefisch, NLFb)

Fms	Sandmudde
Fmt	Tonmudde
fS	Feinsand
fSffs	feinstsandiger Feinsand
fSms	mittelsandiger Feinsand
fSu2	schwach schluffiger Feinsand
fSu3	mittel schluffiger Feinsand
fSu4	stark schluffiger Feinsand
gSms	mittel sandiger Grobsand
Hh	Hochmoortorf
Hh,c3	Hochmoortorf mit Seggen-Radizellen
Hh,s3	Hochmoortorf, mittel sandig
Hhsa	Acutifolium-Torf
Hhsa,c3	Hochmoor-Acutifolium-Torf mit Seggen-Radizellen
Hhsa,e3,b3	Hochmoor-Acutifolium-Torf mit scheidigem Wollgras und Laubmoosen
Hhsa,i3	Hochmoor-Acutifolium-Torf mit Besenheide
Hhsu	Cuspidatum-Torf
Hhsu,e3,lb3,p3,sy3,b3	Hochmoor-Cuspidatum-Torf mit scheidigem Wollgras, Birkenholz, Schilf-Rhizomen, Bleich- und Laubmoosen
Hn	Niedermoortorf
Hn,t	toniger Niedermoortorf
Hnc	Seggen-Radizellen Torf
Hnc,p1	Seggen-Radizellen Torf, mit Schilf-Rhizome
Hnc,p2	Seggen-Radizellen Torf, mit Schilf-Rhizomen
Hnc,p3	Seggen-Radizellen Torf, mit Schilf-Rhizome
Hnc,p3,y	Seggen-Radizellen Torf, Schilf-Rhizome und Fieberkleefrüchten
Hnle	Erlenbruchwaldtorf
Hnp	Schilf-Rhizome Torf
Hnp,b3,lb3,c3,sy3	Niedermoor-Schilf-Rhizom-Torf mit Laubmoosen, Birkenholz, Seggen-Radizellen und Bleichmoosen
Ls3	mittel toniger Lehm
Ls4	stark lehmiger Sand
Lsu	schluffig-sandiger Lehm
Lt2	schwach toniger Lehm
Lt3	mittel toniger Lehm
Lts	tonig sandiger Lehm
mS	Mittelsand
mSfs	feinsandiger Mittelsand
SI2	schwach lehmiger Sand
SI3	mittel lehmiger Sand
SI4	stark lehmiger Sand
Slu	schluffig-lehmiger Sand
St2	schwach toniger Sand
Su2	schwach schluffiger Sand
Su3	mittel schluffiger Sand
Su4	stark schluffiger Sand

Tu2	schwach schluffiger Ton
Tu3	mittel schluffiger Ton
Tu4	stark schluffiger Ton
Ufs	fein sandiger Schluff
UI2	schwach lehmiger Schluff
UI3	mittel lehmiger Schluff
UI4	stark lehmiger Schluff
Us	sandiger Schluff
Ut2	schwach toniger Schluff
Ut3	mittel toniger Schluff
Ut4	stark toniger Schluff

Anhang D

Vorschlag für ein Monitoring für Raps mit Herbizidresistenz ¹

	Bodencharakterisierung	Auskreuzung	Überdauerung/ Verwilderung	Ackerbegleitflora und Ackerrandvegetation	Boden
Was	Bodenphysikalische und bodenchemische Parameter, Rückstandsanalysen von Herbiziden ²	Nachweis von Transgensequenzen in Raps und potentiellen Kreuzungspartnern von Raps	Transgener Raps, transgene Kreuzungspartner im Vgl. zu nicht transgenen Pflanzen	Veränderung der Artenzusammensetzung und Populationsdichte der Ackerbegleitflora	-Nachweis / Überdauerung der transgenen DNA im Boden -Beeinflussung der mikrobiellen Diversität/Aktivität
Wo	Auf ausgewählten Feldern ³ wie im BDF-Programm	Auf ausgewählten Feldern ³ (transgene Felder und Referenzflächen) bis in 1 km Umkreis	bis in 1 km Umkreis um transgene Felder ggf. auf dem Feld (Ausfall-, Durchwuchsraps);	Auf ausgewählten Feldern ³ (transgene Felder und Referenzflächen): -4 Kernflächen pro Feld -1ha-BDF -Gesamtacker -ggf. Dauertransekte im äußeren Ackerrand ⁷	Kernflächen der ausgewählten Felder ³ (transgene Felder und Referenzflächen)
Wann	Analog zum BDF-Programm	2 Kartierungen pro Jahr, Wiederholung alle 3 Jahre, im selben Rhythmus wie die Kernflächenkartierungen im BDF-Programm (= Fruchtfolge)	s. Auskreuzung	-Kernflächen: alle 3 Jahre ⁸ , jedoch auf Rapsanbau abgestimmt. -1 ha-BDF: alle 3 bis 6 Jahre, auf Rapsanbau abgestimmt -Gesamtacker: 10 jährige Wiederholung ⁹	-Nachweis transgener Sequenzen alle 3 Jahre ¹¹ -jährlich mikrobiologische Untersuchungen wie im BDF-Programm
Wie	Charakterisierung analog zum BDF-Programm (Standarduntersuchungsprogramm auf BDF-L)	-Kartierung (quantitativ) der potenziellen Kreuzungspartner -Entnahme von Blattmaterial ⁴ und molekularbiologischer Nachweis von Transgensequenzen in den Sammelproben ⁵ ggf. Saatgutuntersuchungen bei benachbarten Feldern ⁶	s. Auskreuzung	-Kernflächen und 1 ha: analog BDF-Programm -Gesamtacker: analog 1 ha-Fläche, Aufnahme als Teilbereich der Umgebungsaufnahmen im BDF-Programm ¹⁰	-molekularbiologischer Nachweis des Transgens in Bodenproben ¹² -Mikrobiologischen Untersuchungen wie im BDF-Programm ¹³ und ggf. Fingerprintmethoden ¹⁴ (T-RFLP)

- ¹ ohne Berücksichtigung faunistischer Aspekte
- ² ggf. Erweiterung im BDF-Programm um weitere Komplementärherbizide
- ³ transgene Felder: Repräsentative Auswahl aus Anbaukataster, die analog zum BDF-Programm eingerichtet, untersucht und charakterisiert werden. Referenzflächen: Felder aus dem BDF-Programm, auf denen Raps angebaut wird, evtl. zusätzliche Felder, ausgewählt nach repräsentativen Gesichtspunkten (Lage, typ. Anbauform (Anbaugebiet) /Fruchtwechsel...)
- ⁴ 1 Blatt pro Kreuzungspartner, max. 100 Pflanzen pro Population
- ⁵ getrennt nach Art und Untersuchungsfläche
- ⁶ Konzept zur Untersuchung von Saatgut auf Anteile von gentechnisch veränderten Linien des Unterausschuß „Methodenentwicklung“ des LAG für eine einheitliche länderübergreifende Überwachung
- ⁷ s. Vorschlag in der Diskussion
- ⁸ analog zum BDF-Programm
- ⁹ um eine vollständige Artenliste zu erhalten, sollten die Untersuchungen in 2-3 aufeinanderfolgenden Jahren durchgeführt werden und alle 10 Jahre wiederholt werden
- ¹⁰ Unter Zuordnung der gefundenen Arten zu den Biotopstrukturen
- ¹¹ sollte Raps als einzige transgene Kulturart im Fruchtfolgewechsel angebaut werden, sollten die Untersuchungen im Jahr nach dem Rapsanbau durchgeführt werden. Auf den Referenzfeldern können größere Wiederholungsintervalle gewählt werden.
- ¹² Screening von gängigen Konstrukten auf den Referenzflächen bzw. Konstrukt nachweis der jeweiligen Transgene auf den transgenen Feldern anhand von quantitativen PCR-Analysen
- ¹³ mikrobielle Biomasse, Basalatmung, metabolischer Quotient
- ¹⁴ Zur Etablierung und Prüfung auf Einsatz in der Routine