

Freilandversuch transgener Kartoffellinien mit dem Resistenzkonstrukt Barnase/Barstar-Zweikomponentensystem

Thomas Lukow

MPI für terrestrische Mikrobiologie,
Karl-von-Frisch-Straße, 35043 Marburg¹

Zusammenfassung

In dem Verbundprojekt „Verbesserung der Pathogenresistenz von Kartoffeln durch gentechnische Erzeugung von kontrolliertem Zelltod an Infektionsstellen“ wurden im Rahmen der biologischen Sicherheitsforschung die Effekte transgener Barnase/Barstar-Kartoffelpflanzenlinien auf die Bakterien der Rhizosphäre, die Pilze der Rhizo- und Phyllosphäre sowie auf pflanzenpathogene Viren untersucht. Hierzu wurden in dem Zeitraum von 1996 bis 1999 sowohl Freiland- als auch Gewächshausversuche durchgeführt. Die transgenen Pflanzenlinien enthalten eine bakterielle Ribonuklease (Barnase) unter der Kontrolle des Pathogen-induzierbaren Promotors *gstI* aus Kartoffeln. Nach Infektion dieser Pflanzen mit *Phytophthora infestans* wird die weitere Ausbreitung des Pilzes verhindert. Um eine potentielle Hintergrundaktivität zu vermeiden, enthalten die transgenen Pflanzen zusätzlich einen Ribonuklease-Inhibitor (Barstar).

Abstract

Transgenic potato lines expressing the ribonuclease barnase from the soil bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* under control of the pathogen-inducible promoter *gstI* from potato inhibit fungal disease development (e. g. *Phytophthora infestans*). Field trials as well as greenhouse experiments were conducted with these plants in the frame of risk assessment studies between 1996 and 1999. Potential effects of the transgenic lines on bacteria, fungi, and viruses in the rhizo- and phyllosphere were investigated.

Einleitung

Zu den wichtigsten Schädlingen und Krankheitserregern der Kartoffel zählen u.a. Bakterien (z.B. *Erwinia carotovora*), Pilze (z.B. *Phytophthora infestans*²) und Viren (z.B. Potex- und Poty-Virusgruppe). Eine Kartoffelkrankheit mit verheerenden Auswirkungen ist die Kraut- und Knollenfäule. Bis heute beeinträchtigt trotz des hohen Einsatzes chemischer Pflanzenschutzmittel dieser Schädling besonders in feuchten Sommern den Ertrag sowie die Qualität der Kartoffeln erheblich. Die Züchtung resistenter Sorten stellt deshalb eine bedeutende Alternative zu den herkömmlichen Bekämpfungsmöglichkeiten dar.

¹ neue Adresse: s. Teilnehmerverzeichnis

² Phylogenetisch gehört *P. infestans* nicht in das Reich der Pilze, sondern ist ein pilzähnlicher Protist und gehört in die Klasse *Oomycetes*. Er wird jedoch in der Praxis meistens als Pilz bezeichnet.

Die transgenen Barnase/Barstar-Kartoffelpflanzenlinien enthalten das Barnase/Barstar-Zweikomponentensystem. Der eine Teil des Genkonstruktes besteht aus einem *barnase*-Gen, das hinter ein Promotorfragment des *gstI*-Gens (früher *prpI-1*) gekoppelt ist. Das *barnase*-Gen stammt aus dem Bodenbakterium *Bacillus amyloliquefaciens* und kodiert für eine bakterielle Ribonuklease. Das *gstI*-Gen stammt aus der Kartoffel und kodiert für eine Glutathion S-Transferase (Hahn und Strittmatter, 1994). Das *gstI*-Promotorfragment wird spezifisch aktiviert, wenn eine Pflanzenzelle von einem pathogenen oder symbiotischen Organismus infiziert wird. Allein durch abiotische Faktoren wird keine Reaktion ausgelöst (Strittmatter *et al.*, 1996). Die synthetisierte Ribonuklease zerstört nach Aktivierung die gesamte RNA in der infizierten Zelle. Der zweite Teil des Genkonstruktes besteht aus dem *barstar*-Gen, das hinter den konstitutiv aktiven *CaMV-35S*-Promotor gekoppelt ist. Auch das *barstar*-Gen stammt aus *B. amyloliquefaciens* und kodiert für einen Inhibitor der Barnase. In nicht-infizierten Pflanzenzellen reicht die geringe Barstar-Synthese aus, um die für die Zelle negativen Effekte einer gewissen Hintergrundaktivität des *barnase*-Gens zu kompensieren (Strittmatter *et al.*, 1995). Erst die Aktivierung des *gstI*-Promotorfragments führt zu einer Überproduktion des *barnase*-Gens, wodurch die infizierte Zelle zugrunde geht (hypersensitiver Zelltod). Bei einer Infektion mit *P. infestans* wird auf diese Weise die Sporulationsfähigkeit eingeschränkt, wodurch eine weitere Ausbreitung des Pilzes im Pflanzenbestand verhindert wird.

Beteiligte Arbeitsgruppen

Das Vorhaben war ein Verbundprojekt, an dem folgende Partner die aufgelisteten Fragestellungen untersucht haben:

- **Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (Köln)**
AG Rohde (Dr. A. Menßen, D. Becker und Prof. Dr. W. Rohde): Untersuchung der Barnase/Barstar-Expression und Resistenz gegen PLRV
AG Gieffers (Dr. W. Gieffers): Effekt auf die Pilze der Phyllosphäre
- **Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie (Marburg)**
AG Liesack (Dipl. Biol. T. Lukow und PD Dr. W. Liesack): Effekt auf die bakterielle Lebensgemeinschaft der Rhizosphäre
- **Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (Braunschweig)**
AG Weidemann (Dr. H.-L. Weidemann): Effekt auf Virusvarianten
- **SaKa-Ragis (Windeby)**
AG Buhr (Dr. K. Buhr): Effekt auf die Pilze der Rhizosphäre.

Ergebnisse

Im ersten Projektjahr (1996) wurde die Freilandfläche durch Unbekannte zerstört. In den folgenden Jahren wurde das Versuchsfeld von einem Wachdienst bewacht, wodurch eine wiederholte Zerstörung verhindert wurde. Im folgenden sind die Ergebnisse aller beteiligten Arbeitsgruppen kurz dargestellt.

AG Rohde

Im Freiland zeigten fast alle untersuchten Barnase/Barstar-Pflanzenlinien ein typisches Barnase-Expressionsmuster (Menßen *et al.*, 1999). Daraus kann jedoch auf dieser Ebene keine Aussage über den Infektionsgrad des *P. infestans*-Befalls gemacht werden. Im Gewächshaus zeigte im Gegensatz zu früheren Experimenten (Strittmatter *et al.*, 1995) keine der untersuchten Barnase/Barstar-Pflanzenlinien die typische Barnase-Expression. Sowohl im Freiland als auch im Gewächshaus exprimierten alle analysierten Barnase/Barstar-Pflanzenlinien das *barstar*-Gen konstitutiv. In Gewächshausversuchen mit dem Kartoffelvirus PLRV wurde keine Resistenz der transgenen Barnase/Barstar-Pflanzenlinien gegen das Virus beobachtet.

AG Gieffers

Einzelne transgene Barnase/Barstar-Pflanzenlinien zeigten im Freiland einen geringeren Befall mit *P. infestans* als die nicht-transgenen Kartoffelpflanzen (Gieffers *et al.*, 1999). Auch die Sporangienbildung war bei einzelnen Pflanzenlinien vermindert. Das Vorkommen von *Phytophthora*-Rassen folgte bei den nicht-transgenen Kartoffelpflanzen und den transgenen Barnase/Barstar-Pflanzenlinien einem sehr ähnlichen Muster. Die Menge von *Alternaria*-Konidien (*A. alternata* und *A. solani*) wurde bei den meisten Barnase/Barstar-Pflanzenlinien reduziert.

AG Liesack

Die T-RFLP-Methode (Liu *et al.*, 1997), eine molekulare „Fingerprinting“-Technik, wurde für die Untersuchungen der bakteriellen Rhizosphäre-Gemeinschaften evaluiert. Dabei zeigten sich räumliche Unterschiede in den bakteriellen Lebensgemeinschaften zwischen den Standorten der transgenen Barnase/Barstar- und der nicht-transgenen Kartoffelpflanzen sowohl vor der Bepflanzung als auch über die Vegetationsperiode (Lukow und Liesack, 1999). Die statistische Auswertung der Daten mit dem SPSS-Programm ergab, dass die meisten Differenzen in den Böden vor der Bepflanzung gefunden wurden. Während des Wachstums der Pflanzen kam es - wahrscheinlich durch den Rhizosphäre-Effekt - zu einer Angleichung der bakteriellen Lebensgemeinschaften zwischen den zwei Standorten. Das Potential der T-RFLP-Methode (der Detektion von strukturellen Unterschieden zwischen verschiedenen bakteriellen Lebensgemeinschaften) wurde in Modellversuchen und mit einer transgenen Kontrollpflanzenlinie (GUS) dokumentiert.

AG Weidemann

Es ließ sich bei keiner transgenen Barnase/Barstar-Pflanzenlinie trotz variabler Infektionsraten eine höhere Resistenz gegenüber dem Kartoffelvirus PVY ableiten (Weidemann, 1999). Der transgene Ansatz ist demnach nicht bei Virusinfektionen, zumindest nicht bei Infektionen mit PVY, wirksam. Die übrigen Infektionsabläufe zeigten auch weitgehende Übereinstimmungen zwischen nicht-transgenen Kartoffelpflanzen und transgenen Barnase/Barstar-Pflanzenlinien. In Einzelfällen lagen signifikante Differenzen vor, wie z. B. bei den Extinktionswerten (E 405). Diese Unterschiede reichten aber nicht aus, um daraus

schlüssig Selektionsvorteile für die verwendeten Virusisolate ableiten zu können. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass bei den transgenen Barnase/Barstar-Pflanzenlinien das Virus-Wirtspflanzenverhältnis im Vergleich zu dem der nicht-transgenen Kartoffelpflanzen nicht deutlich verändert ist. Nach diesen Ergebnissen gibt es deshalb keinen Anhaltspunkt, dass bei den transgenen Barnase/Barstar-Pflanzenlinien im Hinblick auf Selektionsvorteile für Kartoffelvirus Y-Varianten Risikofaktoren zu erwarten sind.

AG Buhr

Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieses Artikels lagen noch keine abschließenden Ergebnisse vor. In vorläufigen Ergebnissen zeigte sich kein signifikanter Einfluss der transgenen Barnase/Barstar-Pflanzenlinien auf ausgewählte Pilze der Rhizosphäre.

Schlussfolgerung

Aus den Ergebnissen der einzelnen Teilprojekte lassen sich - basierend auf dem Auflösungsvermögen der verwendeten Techniken - folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Die transgenen Barnase/Barstar-Pflanzenlinien exprimierten Barstar konstitutiv, die Barnase-Expression war induzierbar.
- Es fand keine Verschiebung der Rassenhäufigkeit von *Phytophthora infestans* statt.
- Einzelne transgene Barnase/Barstar-Pflanzenlinien zeigten eine nachweisbare Resistenzwirkung gegen *P. infestans*.
- Der Konidienbefall mit *Alternaria alternata* und *A. solani* war bei den meisten transgenen Barnase/Barstar-Pflanzenlinien reduziert.
- Die T-RFLP-Analyse wurde für Untersuchungen struktureller Veränderungen zwischen bakteriellen Lebensgemeinschaften evaluiert.
- Mit der T-RFLP-Methode konnte keine Verschiebung der bakteriellen Lebensgemeinschaft durch die transgenen Barnase/Barstar-Pflanzenlinien detektiert werden.
- Es wurden keine Veränderungen des Virus-Wirtspflanzen-Verhältnisses bei den transgenen Barnase/Barstar-Pflanzenlinien beobachtet.

Literatur

Gieffers, W.:

Verbesserung der Pathogenresistenz von Kartoffeln durch gentechnische Erzeugung von kontrolliertem Zelltod an Infektionsstellen: Untersuchungen zum Einfluss auf Populationen von Pilzen der Phyllosphäre. In: Schiemann, J. (Hrsg.): Biologische Sicherheit – Proceedings zum BMBF-Workshop, Braunschweig, 1998. Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen, Braunschweig, Jülich, BEO (Projekträger Biologie, Energie, Umwelt des BMBF), S. 21-28, 1999.

Hahn, K. Strittmatter, G.:

Pathogen-defence gene *prp1-1* from potato encodes an auxin-responsive glutathione S-transferase. Eur. J. Biochem. 226, 619-626, 1994.

Liu, W.-T., Marsh, T.L., Cheng, H., Forney, L.J.:

Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4516-4522, 1997.

Lukow, T., Liesack, W.:

Untersuchungen zur räumlichen Homogenität bakterieller Lebensgemeinschaften im Ackerboden bepflanzt mit transgenen Barnase/Barstar- und nicht-transgenen Kartoffeln. In: Schiemann, J. (Hrsg.): Biologische Sicherheit – Proceedings zum BMBF-Workshop, Braunschweig, 1998. Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen, Braunschweig, Jülich, BEO (Projektträger Biologie, Energie, Umwelt des BMBF), S. 15-20, 1999.

Menßen, A., Becker, D., Rohde, W.:

Verbesserung der Pathogenresistenz von Kartoffeln durch gentechnische Erzeugung von kontrolliertem Zelltod an Infektionsstellen. In: Schiemann, J. (Hrsg.): Biologische Sicherheit – Proceedings zum BMBF-Workshop, Braunschweig, 1998. Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen, Braunschweig, Jülich, BEO (Projektträger Biologie, Energie, Umwelt des BMBF), S. 1-14, 1999.

Strittmatter, G., Gheysen, G., Gianinazzi-Pearson, V., Hahn, K., Niebel, A., Rohde, W., Tacke, E.:

Infections with various types of organisms stimulate transcription from a short promoter fragment of the potato *gstI* gene. Molecular Plant-Microbe Interactions 9, 68-73, 1996.

Strittmatter, G., Janssens, J., Opsomer, C., Botterman, J.:

Inhibition of fungal disease development in plants by engineering controlled cell death. Bio/Technology 13, 1085-1089, 1995.

Weidemann, H.-L.:

Verbesserung der Pathogenresistenz von Kartoffeln durch gentechnische Erzeugung von kontrolliertem Zelltod an Infektionsstellen: Überprüfung von Virusvarianten auf Selektionsvorteile. In: Schiemann, J. (Hrsg.): Biologische Sicherheit – Proceedings zum BMBF-Workshop, Braunschweig, 1998. Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen, Braunschweig, Jülich, BEO (Projektträger Biologie, Energie, Umwelt des BMBF), S. 29-38, 1999.