

# Transgene Kartoffeln im Freilandversuch: Hält die Resistenz?

Jörg Schubert (Aschersleben)

**M**itte der 1980er Jahre schien die Grüne Gentechnik für manche das Allheilmittel für die in der Landwirtschaft bestehenden Probleme zu sein. Allzu enthusiastische Träume zerschlugen sich jedoch schnell. Zum einen ließen sich viele Vorstellungen nicht so einfach wie erhofft realisieren, zum anderen kamen Bedenken auf hinsichtlich möglicher ökologischer Risiken und verstärkter Abhängigkeit der Landwirte von Großkonzernen. Allerdings eröffnen gentechnische Verfahren auch Möglichkeiten, die der klassischen Pflanzenzüchtung bislang verwehrt bleiben. So fand die gentechnische Verbesserung der Resistenz von Kulturpflanzen gegen Viren schnell Aufmerksamkeit, da erste Ergebnisse vielversprechend waren. Besonders interessant war die Verbesserung der Resistenz von Kulturen, bei denen Virusprobleme bestanden, die sich weder über Züchtung, noch durch Einsatz von Pflanzenschutzmitteln zur Bekämpfung der Virusüberträger lösen ließen. Dies ist zum Beispiel bei Kartoffeln der Fall. Unsere Forschungsarbeiten zielten darauf ab zu testen, wie stabil eine gentechnisch vermittelte Virusresistenz bei Kartoffeln unter Freilandbedingungen ist und welche ökologischen Risiken sie bergen könnte.

Pflanzenzüchtung ist ein langwieriger und sehr kostenintensiver Prozess, denn die verschiedensten Eigenschaften sind in einem Endprodukt – der Sorte – zu vereinen. Dabei ist die Resistenzzüchtung besonders aufwändig, da es eine Vielzahl von Krankheiten gibt. Erschwerend kommt hierbei hinzu, dass Resistenzen in der Regel nicht stabil sind, sie also immer wieder „erneuert“ werden müssen. Besonders anspruchsvoll ist die Züchtung von Kulturarten, die mehr als den doppelten (diploiden) Chromosomensatz aufweisen, wie zum Beispiel bei einigen Getreiden (Hafer – hexaploid), Obst (Hauspflaume – tetraploid) und auch unserer Kartoffel (tetraploid).

Wie schwierig eine zielgerichtete Züchtung gerade bei der Kartoffel ist, zeigt der Umstand, dass bestimmte Produzenten für die Herstellung von Pommes frites noch immer Knollen der fast 100 Jahre al-

ten, extrem krankheitsanfälligen amerikanischen Sorte Russet Burbank nutzen. Um diese Sorte weniger empfindlich gegen Virusbefall zu machen, gab es schon frühzeitig den Versuch, auf gentechnischem Wege eine Resistenz gegen das Virus in die genannte Kartoffelsorte einzulagern. Durch die Veränderung wäre nur das gewünschte Merkmal hinzugefügt worden, ohne (theoretisch) den genetischen Hintergrund und damit die bewährten Qualitätseigenschaften der Sorte zu verändern. Die Arbeiten mündeten in der in den USA zugelassenen Sorte NewLeaf<sup>TM</sup>Y. Allerdings konnte sie sich auf dem Markt nicht etablieren, da sie von den Verbrauchern nicht angenommen wurde.

Es gibt bislang nur drei weitere Kulturen mit gentechnisch vermittelter Virusresistenz, die ebenfalls in den USA zugelassen sind und auch im kommerziellen Maßstab angebaut werden: Papaya, Zucchini

und Kürbis. Bei diesen Kulturen ließ sich durch konventionelle Züchtung keine stabile Virusresistenz einlagern.

## Charakteristika der transgenen Kartoffelpflanzen

Kartoffeln können von zahlreichen Viren befallen werden. Das weltweit wichtigste ist das *Potato virus Y* (PVY, Abb. 1). Daher zielten unsere Bemühungen an der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen (BAZ) darauf ab, eine Resistenz gegen dieses Virus zu erreichen.

Die gentechnisch veränderten (transgenen) Pflanzen entwickelten wir Ende der 1990er Jahre. Zu diesem Zeitpunkt wurde allgemein das Prinzip der „pathogen derived resistance“ (PDR) favorisiert: Durch die ständige Expression eines vira-



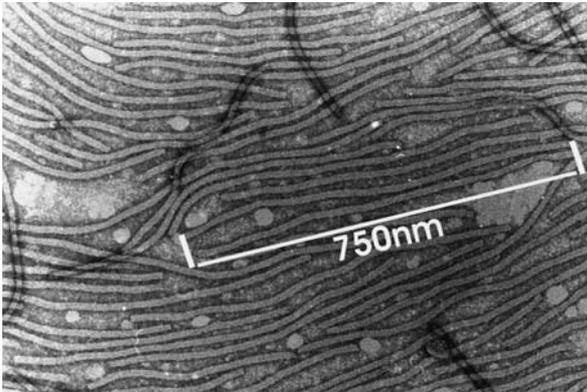


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Partikeln des PVY nach Anreicherung über Dichtegradientenzentrifugation.

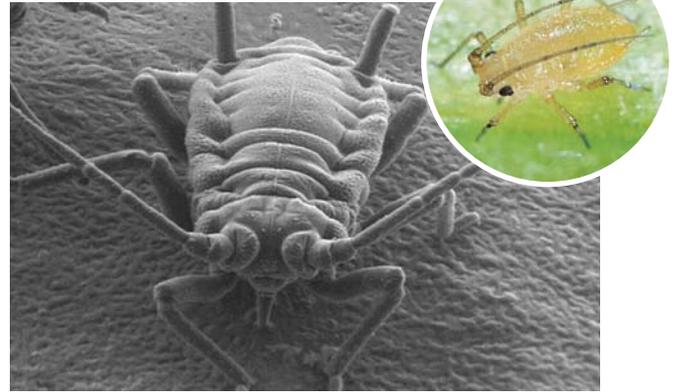


Abb. 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer am Pflanzengewebe saugenden Grünen Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae*).

len Gens in der Pflanze werden diese vor einer Infektion mit dem natürlich vorkommenden Virus geschützt. Man könnte – übertragen auf die Verhältnisse beim Menschen – von einer Art „Schutzimpfung“ sprechen. Zunächst nutzten verschiedene Arbeitsgruppen die Gene für das Hüllprotein (CP-Gen), spätere auch weitere. Wir verwendeten ebenfalls das CP-Gen sowie das Gen des Virus, das für seine Vermehrung im Wirt verantwortlich ist (NlB-Gen), allerdings in einer verkürzten Version. Neben den Virussequenzen expremierten die Pflanzen auch das in der Öffentlichkeit viel diskutierte Kanamycin-Resistenzgen, das erforderlich war, um transgene von nicht-transgenen Pflanzen zu unterscheiden. Transformiert wurden Kartoffelsorten, die für das PVY hochanfällig waren.

Enttäuschend war, dass nur etwa zwei Prozent der erzeugten transgenen Pflanzen virusresistent waren. Bei ihnen ließen sich verschiedene Typen der Resistenz nachweisen – sie reichten von völliger Abwehr des Virus (extreme Resistenz) bis hin zur Blockierung seiner Ausbreitung. Einige Klone wiesen auch eine Kreuzresistenz gegen das dem PVY verwandte *Potato virus A* (PVA) auf. Nach Tests im Gewächshaus überprüften wir, wie sich die Pflanzen im Freiland verhalten: Hält die Resistenz dort stand und welche biologischen Risiken könnten bestehen?

Eine ungewollte Ausbreitung der Fremdgene in Ökosystemen war in unseren Versuchen nicht zu befürchten, da die Kartoffel in Mitteleuropa keinen natürlichen Kreuzungspartner hat. Ihre Samen überleben selbst milde Winter nicht, Knol-

len nur sehr selten. Biologische Risiken, die analysiert werden sollten, sahen wir unter anderem darin, dass die transgene Resistenz

- die Besiedlung der Pflanzen durch Blattläuse (Vermehrungsrate und Artenspektrum) verändern,
- das Auftreten anderer Kartoffelviren beeinflussen, sowie
- das Spektrum der Isolate des PVY verändern könnte.

### Die Stabilität der transgenen Resistenz

Hinsichtlich der Stabilität der gentechnisch vermittelten Resistenz erfüllten sich unsere Erwartungen nicht. In den meisten der vier Versuchsjahre wiesen alle Klone Befall mit dem PVY auf. Zwar war dieser wesentlich geringer als bei den Kontrollen, aber ökonomisch sinnvoll wäre nur eine völlige Befallsfreiheit gewesen. Einige der Ergebnisse sind in der Tabelle 1 gezeigt. Primärer Be-

fall heißt, dass die Pflanzen bereits im Feld Befall aufwiesen, sekundärer, dass die aus den gelagerten Knollen aufwachsenden Pflanzen infiziert waren. Die Vermutung liegt nahe, dass Resistenzen vom Typ PDR nicht stabil sind. Inzwischen weiß man, dass Viren verschiedene Mechanismen entwickelt haben, um die Resistenz von Pflanzen auszuschalten. Da durch das Transgen natürliche Resistenzmechanismen in den Pflanzen aktiviert werden, ist es verständlich, dass sie vom Virus, der sich an natürliche Gegebenheiten anpassen muss, umgangen werden können.

### Untersuchung der biologischen Risiken

#### Blattläuse auf transgenen Pflanzen

Die meisten Kartoffel-Viren werden durch Vektoren übertragen, zum Beispiel Blattläuse. Eine der wichtigsten Überträger ist die Grüne Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae*, Abb. 2).

**Tab. 1: Anteil PVY-infizierter Kartoffelpflanzen (in %) nach natürlichem Befall im Freiland für zwei Anbaujahre. Getestet mit DAS-ELISA. Pflanzen mit doppeltem E405-Wert der Gesund-Kontrolle galten als infiziert.**

Anbaujahr	2001		2002	
	Primär	Sekundär	Primär	Sekundär
DH59CP39	73	38	29	27
DH59CP41	98	31	51	20
DH59CP102	90	13	7	7
DH59NlB146	82	27	50	0
DH59NlB156	98	7	4	4
Kontrolle	93	100	38	100

**Tab. 2: Anteil mit einzelnen Viren befallener Pflanzen (in %) nach Anbau im Freiland (Werte für 2000/2001/2002)**

Virus Linie	PVA	PLRV	PVS
Linda Nlb58	0/11/18 #	15/0/7	82/80/60 +
DH59 CP41	0/7/0 #	77/12/16 +	5/5/7 #
DH59 Nlb146	0/2/0 #	0/4/4 #	0/4/2 #
DH59 Nlb156	0/0/9 #	2/0/18 #	0/7/16 #
Kontrolle	0/73/62	11/29/7	49/44/64

Im Vergleich zur Kontrolle: + erhöhter/# reduzierter Virusbefall

Blattläuse sind sensitive biologische Indikatoren für Veränderungen in Pflanzen. Treten zum Beispiel durch eine gentechnische Veränderung vermehrt Proteine in den Pflanzen auf, insbesondere auch in den sonst an Eiweißen armen Leitbahnen (diese werden von den Blattläusen „angezupft“), so verbessert sich das Nahrungsangebot für die Blattläuse und die Population vermehrt sich verstärkt. Andererseits könnte durch die Transformation der Stoffwechsel der Pflanzen auch so beeinflusst werden, dass toxische Stress-Substanzen gebildet werden, die die Blattlaus-Vermehrung reduzieren.

Unsere Versuchsergebnisse waren recht widersprüchlich. In einem Jahr fanden sich auf den transgenen Pflanzen mehr Blattläuse als auf den nicht-transgenen Kontrollen, in einem anderen weniger bzw. gleich viele. Die beobachteten natürlichen Schwankungen unterstreichen, dass man über eine mögliche Beeinflussung von Blattlauspopulationen nicht schon auf der Grundlage kurzfristiger Versuche urteilen kann. Als Beispiel sind in Abbildung 5 die Werte für das Jahr 2003 angeführt. Insgesamt wurde die konnte man keine Beeinflussung der Zahl der die Pflanzen besiedelnden Blattläuse, ihrer Vermehrungsrate sowie des Artenspektrums beobachten. In dieser Beziehung ließ sich also kein ökologisches Risiko erkennen.

#### Auftreten anderer Kartoffelviren

Kartoffeln werden von einer Vielzahl Viren befallen. Geprüft werden sollte, ob sich das Auftreten der wichtigsten Viren bei

den transgenen Pflanzen ändert. Die Tabelle 2 enthält eine Auswahl der gewonnenen Daten. Man erkennt, dass der Befall in Abhängigkeit von der transgenen Linie für einige Viren erhöht ist, für anderen hingegen reduziert. Das bedeutet, dass immer auch die Veränderung der Resistenz gegen andere Kartoffel-Viren zu testen ist. So wird vermieden, dass es bei einem großflächigen kommerziellen Anbau transgener Sorten mit unerwartet hoher Anfälligkeit für einzelne Nicht-Zielviren zu deren epidemischer Ausbreitung kommt.



Abb. 3: Durch den aggressiven Stamm PVYNTN verursachte Knollennekrosen.



Abb. 4: Die in der Bildmitte zu erkennenden Pflanzen sind nach Befall mit einem aggressiven Stamm des PVY abgestorben.

#### Spektrum der PVY-Isolate

Das PVY weist in Deutschland zwei Grundvarianten auf, die Stämme O und N, die sich in der Sequenz ihres Genoms deutlich unterscheiden. In den letzten Jahren trat eine Durchmischung der Genome beider Stämme auf. Das Ergebnis waren neue, wesentlich aggressivere Stämme, die auf den Knollen anfälliger Sorten Nekrosen induzieren bzw. die Pflanzen zum Absterben bringen können (Abb. 3 und 4).

Wir konnten nachweisen, dass die Stämme, die die transgene Resistenz überwunden hatten, meist zu einem der neuen, aggressiven Typen gehörten (Wilga-Typ). Eine solche Verschiebung des Stammspektrums in Richtung erhöhte Virulenz entspricht damit genau dem Mechanismus, wie er auch bei Nutzung konventioneller Resistenzen zu beobachten ist. Ein ökologisches Risiko kann daraus nicht abgeleitet werden.

#### Entstehung neuer PVY-Stämme?

Die in der transgenen Pflanze gebildete virale RNA liegt in großen Mengen und in allen Zellen vor, so dass im Falle einer Infektion die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Rekombinanten erhöht ist. Folge könnte das Auftreten ganz neuer Virusstämme sein. Generell ist eine Rekombi-

nation ein seltenes Ereignis. Wie findet man nun diese Nadel im Heuhaufen? Wir setzten dafür eine Technik ein, die DGGE genannt wird (denaturing gradient gel electrophoresis). Mit ihrer Hilfe kann man die verschiedenen Sequenzvarianten voneinander trennen und danach gezielt analysieren (Abb. 6).

Als Tendenz zeigte sich, dass besonders in den transgenen Pflanzen eine Vielzahl von Rekombinanten auftrat, in der Regel jedoch solche zwischen den RNAs verschiedener Virusstämme (Kartoffeln werden häufig von verschiedenen Stämmen des PVY befallen). Nur bei einem von vielen hundert analysierten Sequenzabschnitten konnte eine Rekombination zwischen der RNA eines eingedrungenen Virus mit der transgenen nachgewiesen werden. Besonders interessant waren Varianten, die eine Verdoppelung bestimmter Genomabschnitte erfahren hatten.

Sehr wichtig war es nun zu klären, ob die resistenzbrechenden Stämme das Ergebnis außergewöhnlicher Rekombinationen waren und ob sie in der Lage sind, natürliche Resistenzen zu durchbrechen. Mit anderen Worten: Wie hoch ist die ökologische Relevanz der Rekombination? Dazu wurde von drei Isolaten die Struktur des gesamten Genoms aufgeklärt. Zwei der Isolate erwiesen sich als ungewöhnliche Sequenzvarianten. Nur eines von diesen beiden konnten wir bisher in der gegebenen Struktur noch einmal in Deutschland nachweisen. Beiden Isolaten war gemeinsam, dass sie an die transgene, resistente Kartoffel adaptiert waren und sie die Eintrittspforte für andere Isolate schafften (mit ihnen eine Art Symbiose eingingen). Auf anfälligen Pflanzen wurden sie von

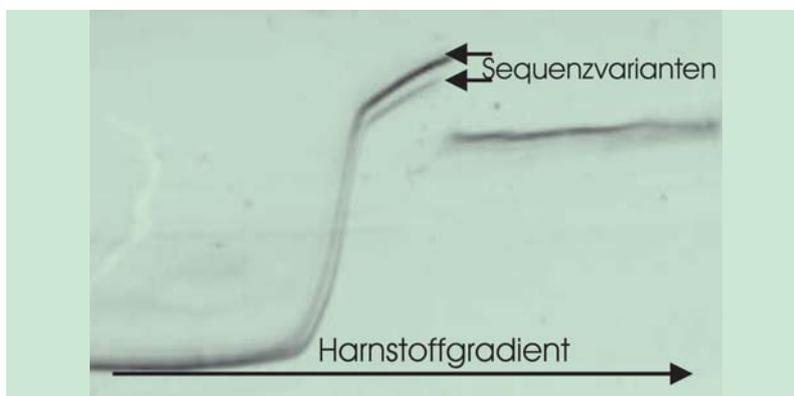


Abb. 6: Beispiel der Auftrennung von Sequenzvarianten des PVY durch DGGE. Die Pfeile kennzeichnen die zwei nachgewiesenen Sequenzvarianten.

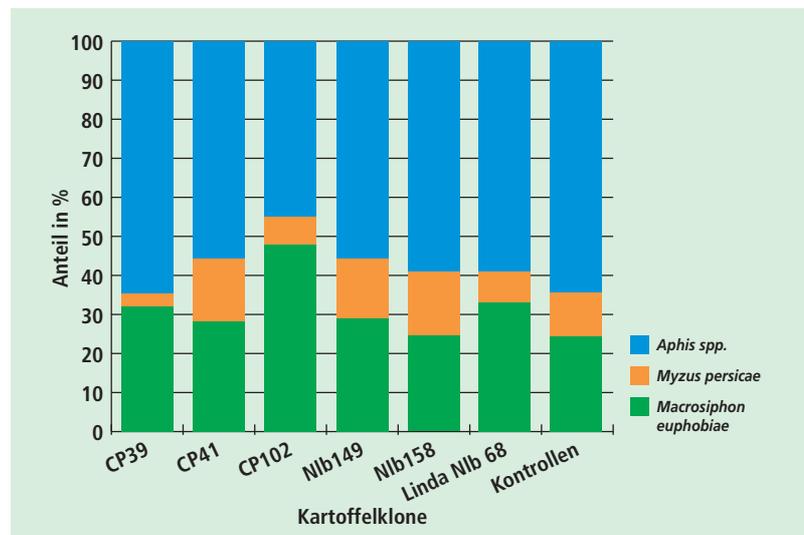


Abb. 5: Prozentualer Anteil verschiedener Blattlausarten am Gesamtaufkommen auf transgenen Kartoffelklonen im Jahr 2003.

gewöhnlichen Isolaten sehr schnell verdrängt – ihre erhöhte Virulenz wurde also mit verminderter Fitness erkauft. Dennoch könnte es möglich sein, dass diese Rekombinanten natürliche Resistenzen gegen das PVY, wie sie aus Wildarten bekannt sind, überwinden können. Ob dies so ist, können wir noch nicht beantworten.

## Aussichten

Seitdem wir unsere transgenen Pflanzen hergestellt haben, sind fast 10 Jahre vergangen und die Entwicklung ging natürlich weiter. Heute werden abgewandelte Verfahren der PDR genutzt. Sie basieren auf einer wesentlich effektiveren Aktivierung pflanzeigener Abwehrmechanismen. Es wird auch daran gearbeitet, die vi-

ralen Mechanismen der Ausschaltung der pflanzeigenen Abwehrmechanismen zu inaktivieren. Die Nutzung synthetischer Antikörper, die durch die Pflanzen gebildet werden, scheint ebenfalls ein Erfolg versprechender Weg zu sein, um zu einer dauerhafteren Resistenz zu kommen. Freilandversuche müssen aber auch hier zeigen, wie stabil solche Resistenzen sind und welche Risiken sie bergen könnten.

Zwar konnte nie nachgewiesen werden, dass von den als Selektionsmarkern genutzten Antibiotikaresistenz-Genen ein ökologisches Risiko ausgeht, trotzdem gibt es inzwischen zahlreiche Alternativen, die vom Auskreuzen der Gene über deren Inaktivierung bis hin zur Markergen-freien Transformation reichen. Auch an der BAZ sind Varianten entwickelt worden, bei denen man auf Markergene verzichten kann.

Gegenwärtig laufen gemeinsam mit einem Partner Untersuchungen, ob transgene Eigenschaften im Allgemeinen zu einer Erhöhung der Rekombinationsrate beim PVY führen können, denn das könnte ein erhebliches ökologisches Risiko darstellen.



Dr. Jörg Schubert, Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für Resistenzforschung und Pathodiagnostik, Theodor-Roemer-Weg 4, 06449 Aschersleben. E-Mail: [j.schubert@bafz.de](mailto:j.schubert@bafz.de)