

„Transgene Gehölze – mit Sicherheit nutzbar?“

Francois Buscot & Tina Schäfer, Universität Leipzig/Helmholtz Zentrum für
Umweltforschung Leipzig Halle

Magda-Viola Hanke & Henryk Flachowsky, Julius Kühn-Institut,
Inst. für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Dresden-Pillnitz

Dietrich Ewald & Kristina Ulrich, J. H. von Thünen-Institut,
Inst. für Forstgenetik, Waldsiedersdorf

Birgit Ziegenhagen, Ronald Bialozyt, Marc Niggemann & Georg Rathmacher,
Universität Marburg

Überblick der Freisetzung transgener Bäume

USA		Pappel	177
		Kiefer	129
		Eukalyptus	56
Europa	F, GB, D, E, N, S, B	Pappel	20 (4)
	GB, NL, S, B, D	Apfel	10
	Fin	Waldbäume	5
	GB, E, P	Eukalyptus	4
	E, CZ, RO	Pflaume	4
	I	Kirsche	3
	I	Olive	2
	E	Orange	1
	I	Zitrone	1
	NL	Paradiesapfel	1

Nur 2 kommerzielle Anwendungen

- USA, Papaya mit Virus Resistenz
- China, Schwarzpappel mit Insektenresistenz

Untersuchte Merkmale

- Ligninmenge und -zusammensetzung
- Herbizidtoleranz
- Schädlingsabwehr
- Phytoextraktion von Schwermetallen
- Transformationsstabilität

Freisetzung transgener Bäume in Deutschland

Zitterpappel BFH, Großhansdorf, 1996 & 2000	35S-rolC-Genkonstrukt zur Änderung der hormonelle Balance <ul style="list-style-type: none">• Stabilität fremder Gene• Auswirkungen auf Mykorrhizapilze und Schaderreger• Horizontaler Gentransfer an Mykorrhizapilze
Pappel Universität Freiburg 2003 (2 Standorte)	Erhöhte γ -Glutamylcystein-Synthetase <ul style="list-style-type: none">• Extraktion von Schwermetallen• Stabilität fremder Gene• Auswirkung auf Mykorrhizapilze

- Vorsichtiger Umgang mit Freisetzungen (verhältnismäßig geringe Zahl)
- Fast ausschließlich für Forschungszwecke → **Sicherheit**

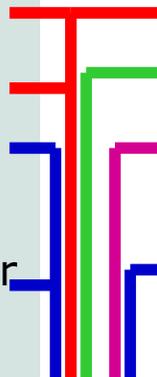
Transgene Gehölze – mit **Sicherheit** nutzbar?"

Sicherheit aus der Sicht der Züchtung

- Stabilität der Transformation
- Hohe Expressionsrate
- Keine negativen Wechselwirkungen mit anderen Genen
- Keine Hemmung positiver biotischer Interaktionen (Symbiosen)

Sicherheit aus der Sicht des Umweltschutzes

- Sterilität, keine Kreuzung
- Kein horizontaler Gentransfer
- Außer des neuen Merkmals, kein Einfluss auf die Genomexpression
- Kein Einfluss auf biotische Interaktionen (Parasiten/Symbiosen)



! Vor dem Hintergrund des langen Lebens von Gehölzen!

Silencing und Verhinderung von Auskreuzung bei Äpfeln

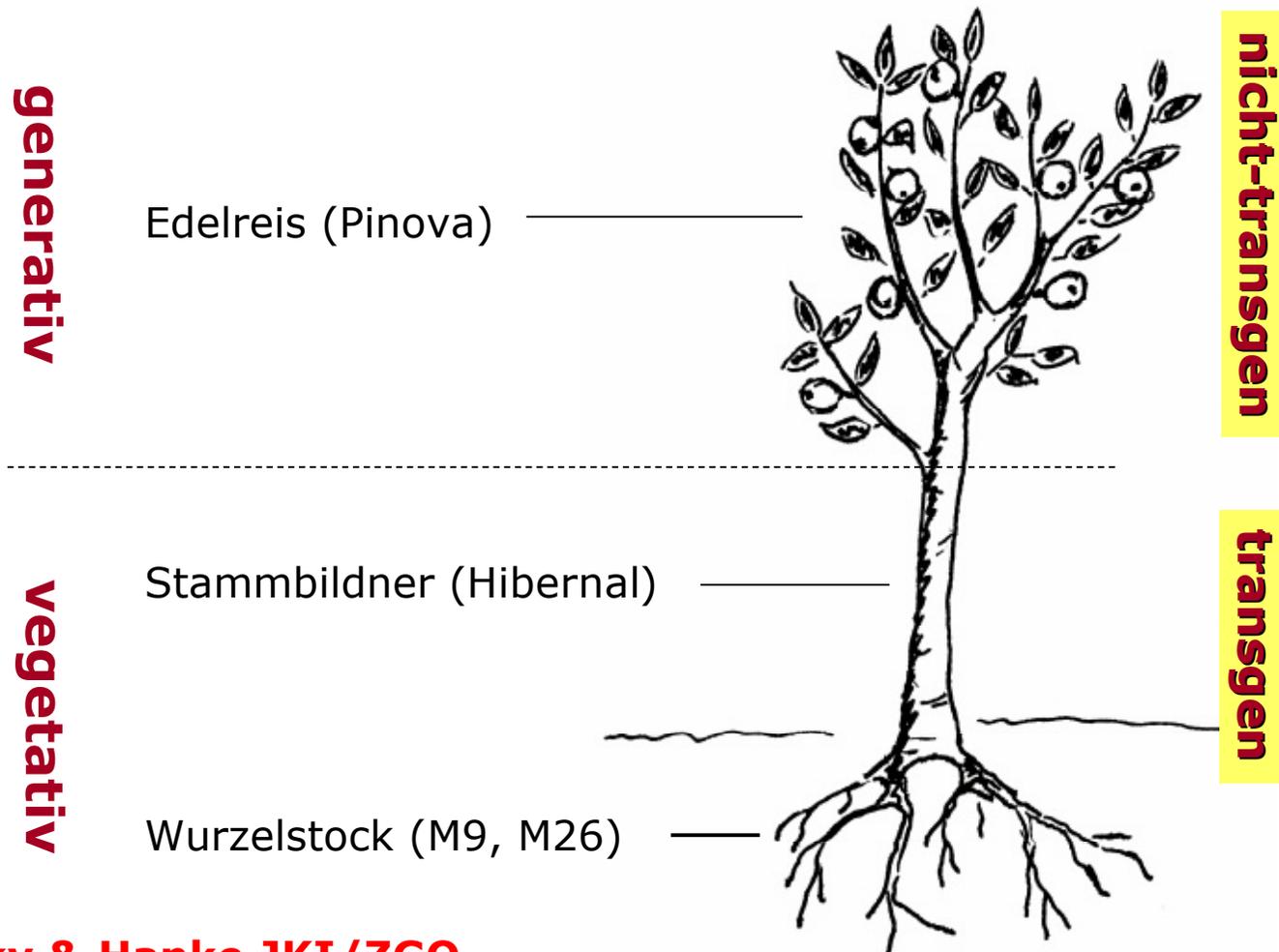
Gentransfer an endophytische Bakterien in Pappeln

Modellierung von Genfluss bei Pappeln in realen Landschaften

Kapazität zu Mykorrhiza-Bildung in transgenen Apfelbäumen

BMBF Biosicherheitsforschung Gehölzekonsortium

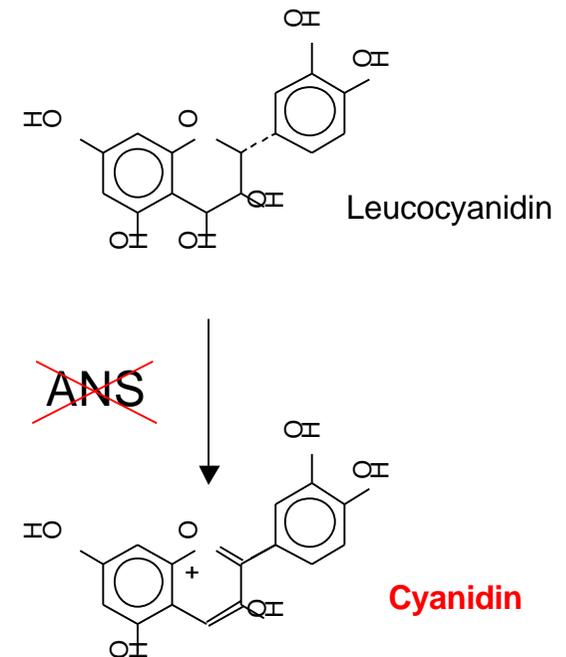
Model des systemischen Transports von siRNA's



Flachowsky & Hanke JKI/ZGO

Testsystem: Blockierung der Anthocyanbiosynthese

1. Erzeugung von Gv-Pflanzen mit reduzierter Expression der ANS
2. Durchführung von Mikro- und Gewächshausveredlungen mit einer rotlaubigen Apfelwildart
3. Überprüfung der Anthocyanidinsynthetase (ANS) Expression im gepfropften Edelreis



Flachowsky & Hanke JKI/ZGO

Erste Ergebnisse deuten auf die Existenz eines SAS hin

- Transgene Pflanzen des rotlaubigen Genotyps zeigen nach Stilllegen der ANS eine Entfärbung
- An in vitro-Veredlungen war der morphologische Effekt nur sehr schwach
- Daten zur Expression zeigen das die ANS im Reis abreguliert ist
- An Veredlungen von Gewächshauspflanzen waren deutliche Effekte zu beobachten
- Effekt ging im Laufe der Vegetationsperiode verloren, molekulare Daten zeigen auch hier eine Abregulierung der ANS

Flachowsky & Hanke JKI/ZGO

Möglicher horizontaler Gentransfer auf endophytische Bakterien in der Pappel

Dietrich Ewald, Kristina Ulrich
J. H. von Thünen-Institut, Inst. für Forstgenetik, Waldsiedersdorf

Problemstellung:

Ist während bzw. nach der Transformation ein horizontaler Gentransfer der binären Vektoren auf die endophytischen Bakterien möglich?

Projektziele/bisherige Ergebnisse:

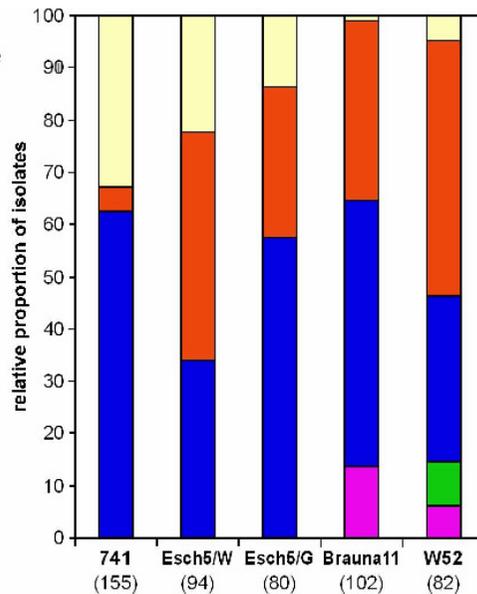
1. Charakterisierung der endophytischen Bakteriengemeinschaften in Freilandpappelklonen und in *in vitro*- Regenerationssystemen
2. Untersuchung des konjugativen Transfers binärer Vektoren auf die Endophytenflora (*in vitro*)
3. Prüfung des horizontalen Gentransfers auf endophytische Bakterien zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transformation
4. Untersuchungen zur Persistenz von rekombinanten Agrobakterien
5. Entwicklung von Methoden zur Erzeugung endophytenfreier *in vitro*- Kulturen der Pappel



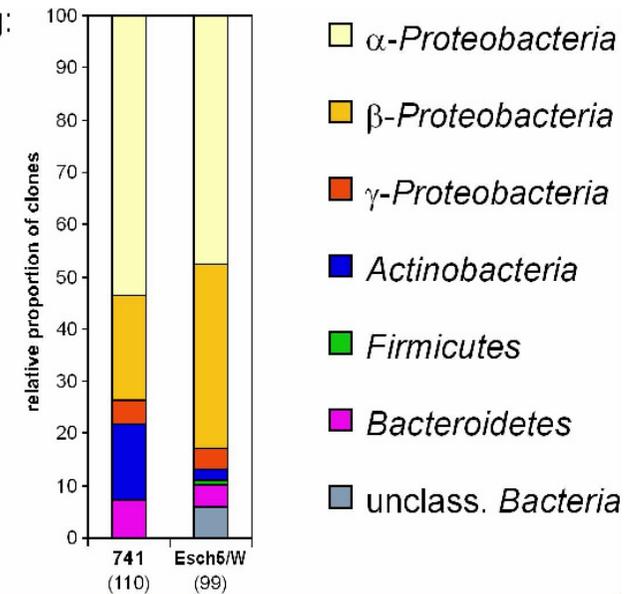
Möglicher horizontaler Gentransfer auf endophytische Bakterien in der Pappel

Endophytische Bakteriengemeinschaften in Freilandpappelklonen und *in vitro*-Kulturen

Kultivierbare
endophytische
Bakterien



Kulturunabhängig:
Klonierung der
16S rDNA

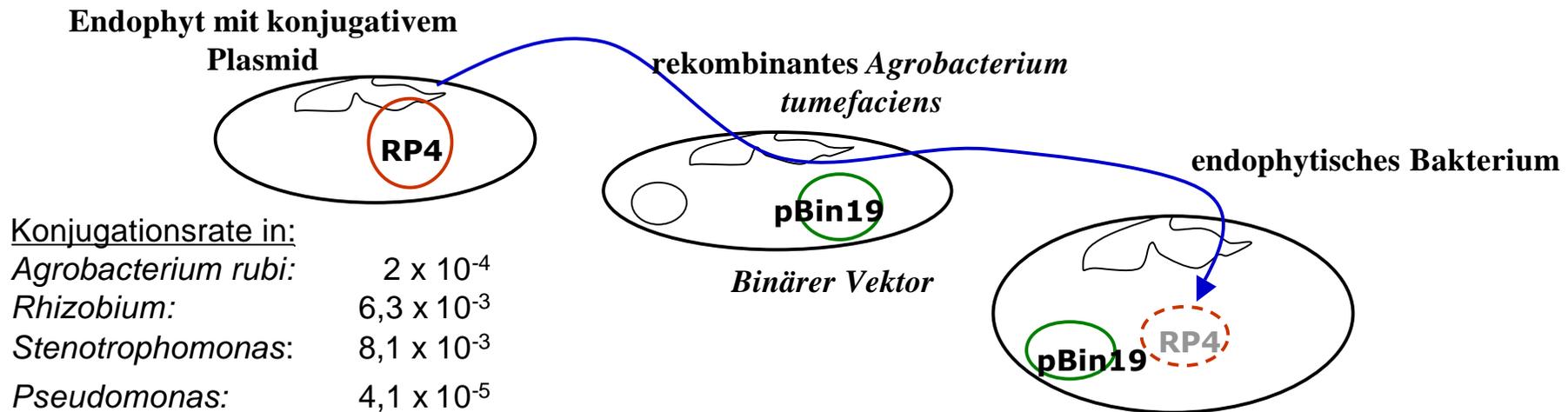


- große phylogenetische Diversität (55 Bakteriengattungen identifiziert)
- Abhängigkeit der Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften vom Pappelklon
- Hauptanteil: *Proteobacteria* (bes. *Alphaproteobacteria*) und *Actinobacteria*
- In *in vitro*-Kulturen dominierten *Paenibacillus*-Isolate (*Firmicutes*)

Möglicher horizontaler Gentransfer auf endophytische Bakterien in der Pappel

Ist eine Übertragung binärer Vektoren auf endophytische Bakterien *in vitro* möglich?

- Ein Transfer binärer Plasmide vermittelt durch die *vir*-Gene konnte nicht nachgewiesen werden.
- Mobilisierung binärer Vektoren in endophytische Bakterien über konjugative Plasmide:



Verringerung der Endophytenanzahl in *in vitro*-Kulturen:

(a) Sprossmeristeme:

2 Jahre nach Inkulturnahme frei von kultivierbaren Bakterien

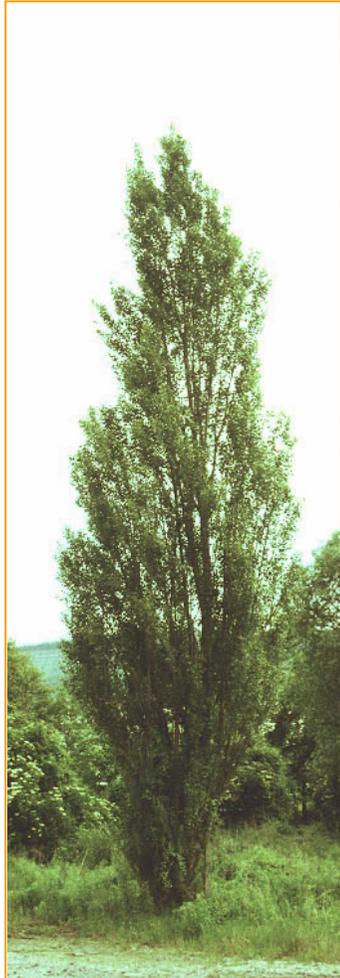


(b) Wurzelmeristeme:



Modellierung von Genfluss bei Pappel in einer realen Landschaft

Birgit Ziegenhagen, Ronald Bialozyt, Marc Niggemann, Georg Rathmacher



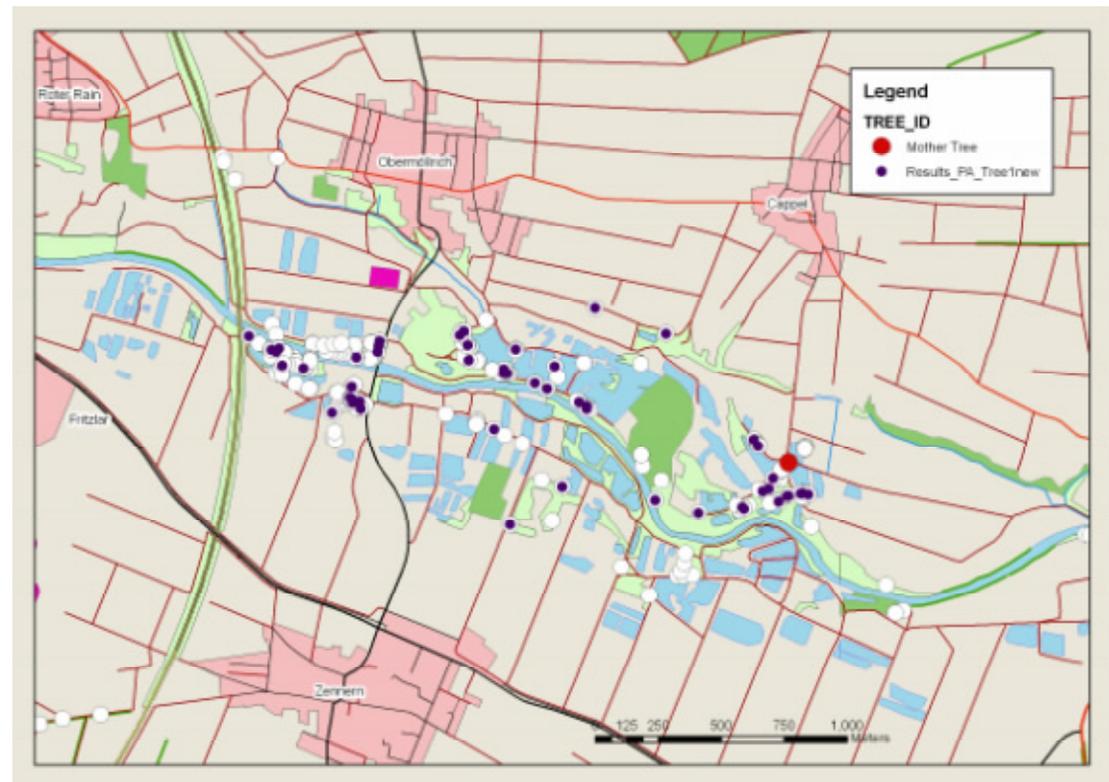
- Ziel: Einschätzung des Auskreuzungsrisikos transgener Pappeln unter Freilandbedingungen
- Idee: Als Testsystem: verwandte Pappelarten *P. nigra* & *P. × canadensis* (Schwarz- und Hybridpappel)
- Methoden:
 1. ökologische Untersuchungen zur Etablierung der Keimlinge
 2. genetische Untersuchungen zur Bestimmung der Introgressionsrate
 3. Modellierung des Genflusses an Hand der ökologischen und genetischen Datensätze
- Untersuchungsgebiet: Ederaue bei Fritzlar
 - natürlicher Standort der Schwarzpappel
 - ausreichend Hybridpappeln in der Umgebung vorhanden, um Introgression zu messen

Introgression bei der Pappel- genetische Analysen

Ergebnisse von Genotypisierung der Keimlinge und Vaterschaftsanalysen zeigen

- Introgression ist in alle Richtungen möglich (*P. x canadensis* ↔ *P. nigra*);
Jedoch abhängig von:

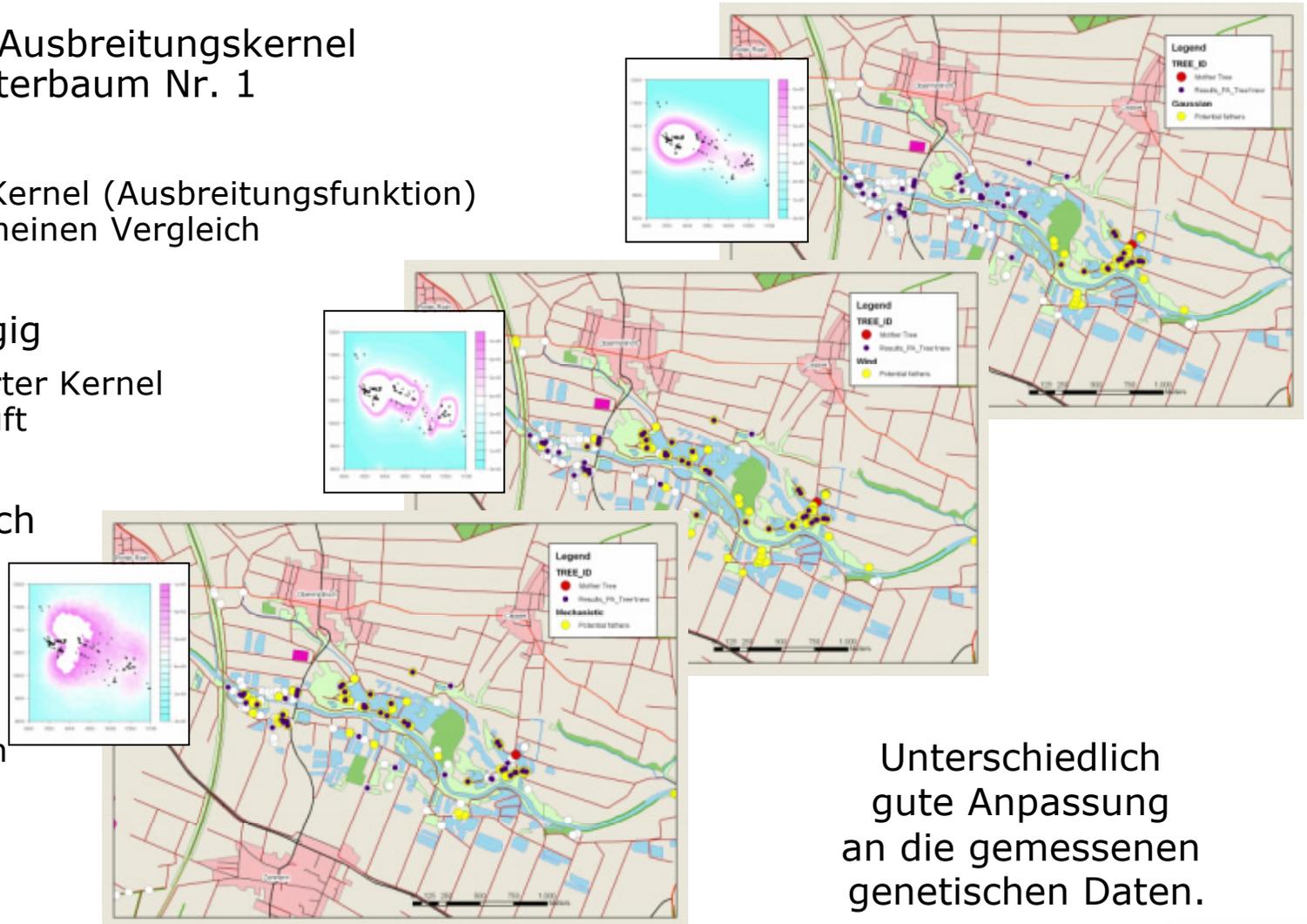
- Nachbarschaft der Mutterbäume (potentielle Väter)
 - Geografische Lage (Exponiertheit)
 - Blühphänologie
- Väter stehen bis zu 5 Kilometer entfernt vom Mutterbaum.
 - Es existieren bereits F2-Hybride in der Landschaft.



Introgression bei der Pappel- Modellierung des Pollenflugs

Ergebnisse der Ausbreitungskernel
für den Mutterbaum Nr. 1

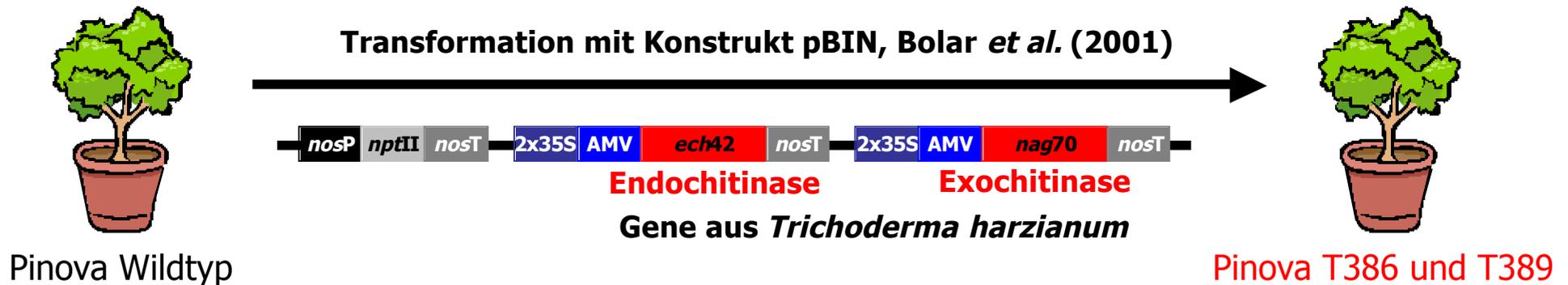
- Gaussian
 - Standard-Kernel (Ausbreitungsfunktion) zum allgemeinen Vergleich
- Windabhängig
 - Simplifizierter Kernel nach TA Luft
- Mechanistisch
 - Pollenverteilung nach einem meteorologischen Modell



Unterschiedlich
gute Anpassung
an die gemessenen
genetischen Daten.

Mykorrhizierung transgener Apfelbäume mit erhöhter Pilzresistenz (Tina Schäfer, François Buscot)

Resistenzenerhöhung der Apfelsorte Pinova gegen den Erreger des Apfelschorfs (*Venturia inaequalis*)



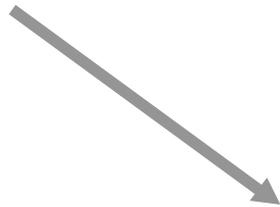
Hypothesen

Die Expression von pilzlichen Chitinasegenen in transgenen Apfelbäumen führt zu einer Veränderung der Mykorrhizierung.

Die Veredelung von transgenen Reisern auf den Wurzelstock M9 führt zu einer Veränderung der Mykorrhizierung.

Mykorrhizierung transgener Apfelbäume mit erhöhter Pilzresistenz (Tina Schäfer, François Buscot)

**Erfassung der Mykorrhiza-Diversität
im Freiland**
(Obstanbau und Streuobstwiese)



Gewächshausversuch (126 Pflanzen, 4 Monate)
Inokulation mit *Glomus intraradices* und *G. mosseae*

Auf eigener Wurzel:

Pinova
Pinova T386
Pinova T389
M9

Gepfropft:

Pinova / M9
Pinova T386 / M9
Pinova T389 / M9

Schlussfolgerungen

! Vor dem Hintergrund des langen Lebens von Gehölzen!

Sicherheit aus der Sicht der Züchtung

- ✓ • Stabilität der Transformation
- ✓ • Hohe Expressionsrate
- ✓ • Keine negativen Wechselwirkungen mit anderen Genen
- ✓ • Keine Hemmung positiver biotischer Interaktionen (Symbiosen)

Sicherheit aus der Sicht des Umweltschutzes

- ✓ • Sterilität, keine Kreuzung
- ✓ • Kein horizontaler Gentransfer
- ✓ • Außer des neuen Merkmals, kein Einfluss auf die Genomexpression
- ✓ • Kein Einfluss auf biotische Interaktionen (Parasiten/Symbiosen)

Thesen (für die Diskussion)

1. Es gibt weiterhin Forschungsbedarf
 - Fortsetzung aktueller Ansätze
 - Langzeitfreisetzungsprojekte werden benötigt (Dauerbeobachtungsplots)
2. Eine „sichere Anwendung“ ist denkbar im Fall von Intensivkulturen für
 - Standortsanierung
 - Obstproduktion
 - Non Food Produktion (Zellulose)wo Änderungen der normalen Genomfunktion oder der natürlichen biotischen Interaktionen kontrollierbar sind (z.B. durch Düngung, Pestizid-Behandlung usw.)
3. Eine „sichere Anwendung“ in der extensiven Forstwirtschaft scheint kritisch
 - sie beeinträchtigt die genetische Diversität
 - sie modifiziert biotische Interaktionen (Parasiten/Symbionten), die für das ökologische Gleichgewicht essenziell sind