

Untersuchungen zum Hormon- und Kohlenhydratmetabolismus in *rolC*-transgenen Aspenklonen (*Populus tremula* und *P. tremula* x *P. tremuloides*) und deren mögliche Auswirkungen auf phytopathologische Eigenschaften

Matthias Fladung¹, Werner Gieffers² und Hans-J. Muhs¹

¹ Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft,
Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung,
Sieker Landstr. 2, 22927 Großhansdorf

² Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung,
Carl-von-Linné-Weg 10, 50829 Köln

Zusammenfassung

Die Untersuchungen im Rahmen dieses Vorhabens dienen dem Studium möglicher stoffwechselrelevanter Veränderungen und deren Auswirkungen auf phytopathologische Eigenschaften bei *rolC*-transgenen Aspen (Zitterpappeln, Espen). Die Untersuchungen können auf bisher erhaltenen Ergebnissen an *rolC*-transgenen Kartoffeln und Aspen im Gewächshaus aufbauen. Um das Verhalten der gentechnisch veränderten Aspenklone unter natürlichen Umweltbedingungen zu testen, wurde 1996 ein Freisetzungsversuch mit gentechnisch veränderten Bäumen begonnen. Pflanzenmaterial aus diesem Freisetzungsversuch steht für die Untersuchungen zur Verfügung. Die folgenden zwei Fragen sollen in unseren Untersuchungen bearbeitet werden: Sind die phytopathologischen Eigenschaften bei transgenen Pflanzen verändert, und welche Konsequenzen können sich daraus bei entsprechend langlebigen transgenen Pflanzen ergeben? Können in *rolC*-transgenen Aspen Unterschiede im Hormon- und Kohlenhydratmetabolismus gefunden werden?

Abstract

The aim of our research is to study possible metabolic changes and their influence on phytopathogenic features in *rolC* transgenic aspen. The investigations are based on results of greenhouse-grown *rolC* transgenic potatoes and aspen trees. To study the behaviour of the transgenic aspen under natural environmental conditions a field trial with transgenic trees was initiated in 1996. From this field trial, material is available for the proposed research. The following two questions will be investigated: Do *rolC* transgenic aspen trees show changes in the status of phytopathogenic fungi? Do these aspen trees reveal changes in hormonal and carbohydrate metabolism?

Einleitung und Fragestellung

Bei Bäumen werden gentechnische Veränderungen bevorzugt zur Beeinflussung der Lignin- und Cellulose-Biosynthese vorgenommen. Hierfür liegen bereits Arbeiten für ver-

schiedene Baumarten vor, die bei Verwendung von antisense- oder in sense-wirkenden Genen eine Beeinflussung der Zusammensetzung des Lignins oder der relativen Gehalte Lignin zu Cellulose beinhalten (Baucher *et al.*, 1998; Boudet, 1998; Van Doorselaere *et al.*, 1993). Die veränderten Makromolekül- und Kohlenhydratgehalte und deren Auswirkungen auf phytopathologische Eigenschaften bei gentechnisch veränderten Bäumen sind noch nicht untersucht worden. Deshalb sollen in unseren Arbeiten stoffwechselrelevante Veränderungen in *rolC*-transgenen Aspen und deren mögliche Auswirkungen auf phytopathologische Eigenschaften untersucht werden.

Pflanzenmaterial

Für die genannten Untersuchungen steht ein im Jahr 1996 begonnener Freisetzungsversuch mit *rolC*-transgenen Aspen zur Verfügung, der als erster und bisher einziger Freisetzungsversuch mit transgenen Bäumen in Deutschland gilt. Für die übertragenen fremden Gene (Genkonstrukte) und das Empfängersystem mussten verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein. Erstens sollten die Gene in den transgenen Bäumen Veränderungen im Stoffwechsel hervorrufen, die phänotypisch sichtbar und physiologisch nachweisbar sind. Zweitens sollten die transgenen Bäume im Rahmen der Freisetzung ohne Risiko für Mensch und Umwelt sein.

Daher wurde das *rolC*-Gen aus dem Bakterium *Agrobacterium rhizogenes* gewählt, das als eines von vier Genen und nur in diesem Verbund an der Etablierung des „Hairy-Root-Syndroms“ (Wurzelhaarkrankheit) beteiligt ist (Spena *et al.*, 1987). Mit diesem Marker-gen wurde bereits an transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen gezeigt, dass erhebliche Veränderungen des Gehalts an Phytohormonen vorkommen (Schmülling *et al.*, 1993). Das konnte für transgene Aspen (Fladung *et al.*, 1996, 1997a) in eigenen Untersuchungen auch bestätigt werden (Fladung *et al.*, 1997b). Darüber hinaus wurde für die Funktion des *rolC*-Genprodukts eine Verbindung zu niedermolekularen Zuckern gezogen (Fladung und Gieffers, 1993; Fladung *et al.*, 1993) und speziell zum Transport von Saccharose bzw. dem Entladungsprozess von Saccharose aus dem Phloem in die umgebenden Zellen vermutet (Nielsson und Olsson, 1997).

Zwar konnten in Untersuchungen an *rolC*-transgenen Kartoffeln keine erhöhten Saccharose-Konzentrationen gefunden werden, doch wurden Veränderungen im Glucose-Gehalt gemessen (Fladung und Gieffers, 1993). Der Glucose-Gehalt scheint einen Einfluss auf phytopathologische Eigenschaften zu haben. Bei den Untersuchungen mit den vorhandenen *rolC*-transgenen Aspen können die Ergebnisse, die von *rolC*-transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen vorliegen, hilfreich sein.

Pilz/Pflanze-Assoziationen

Pilze stellen unter den Pflanzen diejenige Lebewesengruppe dar, die nicht zur Kohlenstoffassimilation befähigt ist und deswegen vorhandene Kohlenhydrate als „Nahrungsquelle“ verwerten muss. Wenn auch die meisten Arten lediglich von abgestorbener organischer Substanz leben, können viele Pilzarten diese ökologisch wichtige Abbautätigkeit bereits auf der noch lebenden grünen Pflanze beginnen. Diese Form der Abbautätigkeit,

aber auch der Parasitismus, bedingen eine Fülle pflanzlicher Krankheiten, die in vielen Fällen das Pflanzenwachstum sowie die Erzeugung von Pflanzeninhaltsstoffen reduzieren, deren Ertrag für die menschliche Ernährung oder die Gewinnung von Rohstoffen bedeutungsvoll ist.

In der Regel werden phytopathologische Analysen in Form von Befallsuntersuchungen hauptsächlich zur Ermittlung der Krankheitsresistenz eingesetzt. Darüber hinaus sind phytopathologische Analysen aber auch für andere Fragestellungen von Interesse. Der Nachweis eines Befalls und der Befallsstärke stellt beispielsweise ein geeignetes Kriterium dar, Interaktionen zwischen Wirt und Parasit zu beschreiben. Wenn Veränderungen bei der Erzeugung von Zellinhaltsstoffen auftreten oder physiologische oder genetische Merkmale verändert werden, können Veränderungen der Beziehungen zwischen Wirt und Parasit erwartet werden.

Notwendigkeit der Untersuchung phytopathologischer Zusammenhänge in der Begleitforschung bei Freisetzung transgener Bäume

Als langlebige Organismen müssen Bäume mit dem einmal vorhandenen Genbestand unter allen Bedingungen über Jahrzehnte erfolgreich bestehen. Sie sind im Freiland in der Regel wechselnden Witterungsbedingungen ausgesetzt, so dass gewährleistet sein muss, dass spezielle, gewünschte Merkmale, die mit gentechnischen Methoden auf Bäume übertragen wurden, über einen langen Zeitraum physiologisch stabil und ökologisch verträglich bleiben. Das beinhaltet insbesondere die Wechselwirkungen mit pathogenen Mikroorganismen wie Bakterien oder Pilzen. In unseren Untersuchungen sollen daher phytopathologische Zusammenhänge im Rahmen der Begleitforschung bei der Freisetzung transgener Bäume berücksichtigt werden. Die freigesetzten transgenen Pflanzen, die als Untersuchungsmaterial zur Verfügung stehen, sind seit zwei Jahren den natürlichen Witterungsbedingungen ausgesetzt, so dass sich unter diesen Bedingungen Wirt-Parasit Beziehungen einstellen können. Sie bilden daher ein ideales Untersuchungsmaterial für die zu bearbeitenden Fragestellungen.

Wie alle Pflanzen sind auch Bäume dem Einfluss phytopathogener Organismen zeitlebens ausgesetzt. Viele Untersuchungen sind angestellt worden, phytopathogene Pilze für Bäume zu identifizieren, zu beschreiben und zu klassifizieren. Im Zuge der Besiedlung der Phyllosphäre und Penetration des Blattinnern partizipiert der Pilz als heterotropher Organismus von löslichen Substanzen, die vom Wirtsgewebe produziert werden. Dabei handelt es sich in der Regel um niedermolekulare Kohlenhydrate (Mono- und Disaccharide). Eine Veränderung des Gehalts dieser Substanzen kann zur Beeinflussung der Fähigkeit des Pathogens führen, von der Blattoberfläche in das innere Gewebe des Blattes einzudringen. Dabei können niedermolekulare Verbindungen entweder als Nährstoff zur Verfügung stehen oder Signalwirkung ausüben. Aus diesem Grund eignen sich die niedermolekularen Kohlenhydrate für die Bearbeitung der Fragestellung.

Wenn sich Resistenzfaktoren der Wirtspflanze ändern, haben pflanzenpathogene Mikroorganismen größere Möglichkeiten zur Überwindung von Resistenzeigenschaften. Verände-

rungen in den phytopathologischen Eigenschaften der Bäume können daher besonders für standfeste, langlebige Kulturen, wie sie Bäume darstellen, eine Gefährdung darstellen. Pflanzenpathogene Mikroorganismen können zudem aufgrund ihrer kurzen Generationszyklen und hohen genetischen Flexibilität vorhandene Resistenzen leicht aufbrechen. Daher muss bereits lange vor der praktischen Verwendung gentechnisch veränderter Bäume eine mögliche Veränderung ihrer phytopathologischen Eigenschaften untersucht werden.

Spektrum pathogener Blattfleckenerreger der Aspe

Die nachstehenden pathogenen Pilze parasitieren im Kronenbereich der Aspe und anderer Pappelarten. Ein Teil der Pathogene ist nur auf Blättern zu finden, einige Erreger parasitieren sowohl auf Blättern als auch auf Trieben und Zweigen, andere besiedeln nur Rinde und Zweige. Für die in diesem Antrag genannten durchzuführenden Arbeiten sollen Erreger bonitiert und z. T. im Labor inokuliert werden, die auf Blättern parasitieren. Als ein biotropher Erreger kommt auf der Aspe und anderen Pappelarten in der Regel am häufigsten der **Pappelblattrost** der Gattung *Melampsora* vor. Ein anderer Erreger, der **Pappelblattmehltau** (*Uncinula adunca* (Wallr.) Lév.), besiedelt außerdem auch Weiden. Von den Perthophyten ist die **Blattflecken- und Triebspitzenkrankheit der Aspe** (*Pollaccia radiosa* (Lib.) Bald. & Cif. - Anamorph; *Venturia macularis* (Fr.) E. Müller & Arx – Teleomorph) verbreitet. Die Krankheit ist an ihren Symptomen leicht erkennbar. Auf den Blättern erscheinen nekrotische dunkel umrandete Blattflecken, die Triebspitzen welken und krümmen sich nach unten. Triebe und Blätter verfärben sich dunkel und sterben ab. Auf krankem Gewebe entstehen olivbraune Sporenlager. Besonders jüngere Bäume zeigten die charakteristischen Befallssymptome.

Nach ersten Freilandbeobachtungen 1998 konnte sowohl der Pappelrost als auch die Triebspitzenkrankheit im Freiland häufig festgestellt werden. Insbesondere konnte Pappelrost auf transgenen Aspen im Freisetzungsversuch gefunden werden (Bentien, Fladung, unveröff.). Der **Grauschimmel** (*Botrytis cinerea* Pers.) ist kein spezifischer Schadpilz für Pappeln, kann aber allgemein unter befallsgünstigen Bedingungen Triebe und Blätter von Jungpflanzen bei Laub- und Nadelgehölzen befallen und schädigen. Andere noch zu nennende auf der Aspe parasitierende Pilze sind der **Marssonina-Blattfleckenpilz** (*Marssonina castagnei* Desm. und Mont. Magn.) sowie die **Goldfleckenkrankheit** (*Taphrina populina* Fr.).

Neben diesen Erregern, die vornehmlich das Blatt befallen, leiden Pappeln unter einer Reihe von Pathogenen, die die Rinde besiedeln und schädigen, wie *Hypoxylon mammatum* (Wahlenb.) Miller, *Neofabraea populi* Thompson, *Discosporium populeum* (Sacc.) Sutton - Anamorph mit dem Teleomorph *Dothichiza populea* Sacc. & Br. *Cryptodiaporthe populae* (Sacc.) Butin, *Chalaropsis populi* Veldemann und *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr. und *C. nivea* Sacc.

Phytopathologische Untersuchungen an transgenen Bäumen

Für phytopathogene Pilze, die an gentechnisch veränderten Bäumen parasitieren, liegen unseres Wissens bisher keine Untersuchungen vor, die die Beziehung zwischen Befall und

Gehalt an niedermolekularen Kohlenhydraten im befallenen Gewebe zum Inhalt haben. Es ist jedoch aus umfangreichen Experimenten mit *rolC*-transgenen Tabak- und Kartoffelpflanzen bekannt, dass es zu Veränderungen des Gehalts an niedermolekularen Kohlenhydraten kommen kann, die Einfluss auf die phytopathologischen Eigenschaften haben (Fladung und Gieffers, 1993).

Künstliche Inokulation von Blättern mit Sporen eines ausgewählten Pilzes

Die Blatt-Tests des Freilandmaterials im Labor umfassen Befallstests verschiedener Blattinsertionen zu verschiedenen Entwicklungsstadien und Zeitpunkten in der Vegetationsphase. Es ist geplant, diese Untersuchungen mit dem Erreger der Blattflecken- und Triebspitzenkrankheit der Aspe, *Pollaccia radiosa* (Lib.) Bald. & Cif. (Anamorph), durchzuführen. Der Pilz kann unter Laborbedingungen kultiviert werden und bildet auf Nährböden auch Sporen, die für die Infektion erforderlich sind. Von befallenen Aspenblättern wurden mehrere Isolate von *P. radiosa* gewonnen. Als weiterer Erreger soll der Grauschimmelpilz *Botrytis cinerea* Pers. als Pathogen Verwendung finden. Verschiedene Isolate dieses Pilzes sind verfügbar. Über Befallstests mit *B. cinerea* auf verschiedenen Kulturen liegen langjährige Laborerfahrungen im MPI Köln vor.

Biometrische Versuchsplanung

Die biometrische Versuchsplanung wurde erstellt und wird in enger Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Laidig und Herrn Dr. Meyer, Bundessortenamt Hannover, umgesetzt. Sie umfasst Art und Weise sowie Umfang der Befallserhebungen auf der Versuchsfläche und der Befallsprüfungen im Labor sowie die Kalkulation der Daten.

Schlussfolgerungen

Der Einsatz gentechnischer Methoden in der Forstpflanzenzüchtung ist seit Ende der 80er Jahre möglich. Seither werden Arbeiten in Europa und außerhalb Europas zur Verbesserung der Resistenz und der Holzqualität durchgeführt. Auch wenn gegenwärtig kein gentechnisch verändertes Pflanzenmaterial von Forstbaumarten in Deutschland und der Europäischen Gemeinschaft vermarktet wird, so ist abzusehen, dass dieses in den nächsten Jahren der Fall sein wird. Für den Verbraucher, insbesondere für den Waldbesitzer, stellt sich die Frage nach der Relevanz veränderter Inhaltsstoffe im Holz oder in anderen Organen (z.B. Blättern) von Bäumen hinsichtlich möglicher veränderter phytopathologischer Eigenschaften (Resistenzen) sowohl im Hinblick auf eine mögliche wirtschaftliche Verwendung als auch auf eine ökologische Konsequenz beim Anbau von gentechnisch veränderten Bäumen.

Literatur

Baucher, M., Monties, B., Van Montagu, M., Boerjan, W.:

Biosynthesis and Genetic Engineering of Lignin. Critical Review in Plant Sciences 17, 125-197, 1998.

Boudet, A.M.:

A new view of lignification. *Trends in Plant Sciences* 3, 67-71, 1998.

Fladung, M., Gieffers, W.:

Resistance reactions of leaves and tubers of *rolC* transgenic tetraploid potato to bacterial and fungal pathogens. Correlation with sugar, starch and chlorophyll content. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42, 123-132, 1993.

Fladung, M., Ballvora, A., Schmülling, T.:

Constitutive or light regulated expression of the *rolC* gene in transgenic potato plants has different effects on yield attributes and tuber carbohydrate composition. *Plant Molecular Biology* 23, 749-757, 1993.

Fladung, M., Muhs, H.-J., Ahuja, M.R.:

Morphological changes observed in transgenic *Populus* carrying the *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes*. *Silvae Genetica* 45, 349-354, 1996.

Fladung, M., Kumar, S., Ahuja, M.R.:

Genetic transformation of *Populus* genotypes with different chimeric gene constructs: Transformation efficiency and molecular analysis. *Transgenic Research* 6, 111-121, 1997a.

Fladung, M., Großmann, K., Ahuja, M.R.:

Alterations in hormonal and developmental characteristics in transgenic *Populus* conditioned by the *rolC* gene from *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Plant Physiol.* 150, 420-427, 1997b.

Nielsson, O., Olsson, O.:

Getting to the root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of hairy roots. *Physiol. Plantarum* 100, 463-473, 1997.

Schmülling, T., Fladung, M., Großmann, K., Schell, J.:

Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant J.* 3, 371-382, 1993.

Spena, A., Schmülling, T., Koncz, C., Schell, J.:

Independent and synergistic activity of *rol A*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants. *EMBO J.* 6, 3891-3899, 1987.

Van Doorselaere, J., Van der Mijnsbrugge, K., Baucher, M., Leple, J.C., Rhode, A., Van Montagu, M., Inze, D.:

Genetic engineering in forest trees. *Agro-Food-Industry-Hi-Tech*, November-Dezember, 15-19, 1993.