

Hättasch, Conny, Flachowsky, Henryk; Hanke, Magda-Viola

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Dresden

Erste Ergebnisse zur Mobilität von *gusA*-spezifischen Silencing-Signalen in Apfelpflanzen

Preliminary Results about the mobility of *gusA*-specific silencing signals in apple plants

Zusammenfassung

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein mobiler, RNA-vermittelter Mechanismus zum Stilllegen von Genen (Silencing), der in vielen Eukaryonten einschließlich der Pflanzen vorhanden ist. Um eine systemische Ausbreitung des Silencing-Effekts erstmalig in Apfelpflanzen zu untersuchen, wurde mit Hilfe des binären Vektors pHELLSGATE8::*sigus* ein RNAi-Konstrukt in das Genom eines ‚Pinova‘-Sämlings übertragen, welches ein *gusA* „Hairpin“-RNA-Homolog (*sigus*) exprimiert. Anschließend wurden die gewonnenen *sigus*-transgenen Apfelpflanzen mit *gusA*-transgenen Pflanzen veredelt. Untersuchungen mittels Real-Time PCR und Gus-Färbung zeigten, dass die *gusA*-Expression in den *gusA*-transgenen Sprossen im Vergleich zu *gusA*-transgenen Pflanzen, die auf nicht-transgene Unterlagen veredelt waren, reduziert war.

Stichwörter: *Malus domestica*, Veredlung, Hairpin-RNA

Abstract

RNA interference is a mobile, RNA-guided, gene regulatory mechanism in many eukaryotes, including plants. Using the vector pHELLSGATE8::*sigus*, we transferred a RNAi construct based on a *gusA* hairpin RNA homolog (*sigus*) into the genome of a ‚Pinova‘ descendant, to evaluate the mobility of silencing for the first time on a woody plant like apple. Following, *gusA* transgenic apple shoots were grafted onto *sigus* transgenic rootstocks. Real-time PCR and GUS staining assays showed that the *gusA* expression in the *gusA* transgenic scion was clearly decreased compared to control shoots grafted onto non-transgenic shoots.

Keywords: *Malus domestica*, grafting, hairpin RNA

Einleitung

Apfelbäume werden in der Regel als Veredlung angebaut. Dabei wird die fruchttragende Apfelsorte als Edelreis auf eine wuchsbeeinflussende Unterlage gepfropft. Ein veredelter Apfelbaum besteht damit aus mehreren, genetisch unterschiedlichen Einheiten. Bei gentechnischen Arbeiten an Apfel wurden bisher die (fruchttragenden) Apfelsorten direkt transformiert. Durch die Verwendung von Genkonstrukten, die eine systemische Ausbreitung der Eigenschaft im gesamten Organismus gewährleistet, könnte man die gentechnische Modifikation auf die Unterlage beschränken. Dadurch könnten gentechnische Methoden zur Erzeugung nicht-transgener Apfelfrüchte verwendet und die Ausbreitung transgener Pollen und Samen im Freiland vermieden werden.

Die RNAi-Technologie bietet eine solche Möglichkeit. RNAi, auch bekannt als RNA-Silencing oder posttranskriptionelles Gensilencing, ist ein wichtiger Mechanismus in vielen Eukaryonten zur Regulierung von Entwicklungsprozessen, der Unterdrückung von Transposonaktivitäten sowie der Abwehr von fremdem Erbgut. RNAi basiert auf der Erkennung und dem Abbau von doppelsträngiger RNA (dsRNA) zu kurzen RNA-Molekülen (sRNA) durch DICER-ähnliche Proteine. Diese sRNAs werden entwunden und führen ARGONAUTE-ähnliche Proteine (AGO) zu komplementären mRNA-Sequenzen, welche anschließend abgebaut werden oder deren Translation gehemmt wird (Baulcombe, 2005). Der Silencing-Effekt ist nicht unmittelbar an den Ort seiner Entstehung gebunden. Er kann sich von Zelle zu Zelle und über lange Strecken ausbreiten. Der Transport des Silencing-Effekts kann dabei über die Plasmodemesmen und das Phloem erfolgen (Himber et al., 2003; Tournier et al., 2006). Um die systemische Ausbreitung des Silencings erstmalig an Holzgewächsen wie dem Apfel zu untersuchen, wurden transgene Apfelinien hergestellt, die entweder das Reporter-gen *gusA* oder ein *gusA* RNAi-Konstrukt (*sigus*) exprimieren. Diese Pflanzen wurden miteinander veredelt, um anschließend das Silencing des *gusA*-Transgens im *gusA*-transgenen Spross zu untersuchen.

Material und Methoden

Die Transformation eines Sämlings von *Malus domestica* Borkh. cv. ‚Pinova‘ (PinS) erfolgte mit *Agrobacterium tumefaciens* pHELLSGATE8::*sigus* wie bei Flachowsky et al. (2007) beschrieben. Desweiteren wurde die *gusA*-transgene Apfelinie T355 (Flachowsky et al. 2008) verwendet. Die Kultivierung, Vermehrung, Bewurzelung und die Überführung der Pflanzen ins Gewächshaus erfolgte wie bei

Flachowsky et al. (2007) beschrieben. Die genomische DNA wurde mittels CTAB-Methode aus den Blättern isoliert. Die Gesamt-RNA wurde mit dem Invisorb® Spin Plant RNA Mini Kit (Invitex) extrahiert. Im Anschluss wurde die RNA mit *DnaseI* behandelt und mit dem RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas) in cDNA umgeschrieben.

Die Integration und Transkription von *sigus* und *nptII* wurde mittels PCR bestimmt. Dabei wurden DNA oder cDNA als Template und die spezifischen Primer

- GusF 5'-GTTCTGCGACGCTCACACCGATACC-3' und
- HG3 5'-GGATCCTCTAGACCACTTGTAC-3' (*sigus*)
- sowie nptIIF 5'-GGTCTCCG-GCCGCTGGGTG-3' und
- nptIIR 5'-CGGCAGGAGCAAGGTGAGATGAC-3' (*nptII*) verwendet.

Für die histochemische Gus-Färbung wurde das Pflanzenmaterial komplett mit einer X-Gluc-Lösung bestehend aus 50 mM Natriumphosphat pH 7, 1 mM EDTA, 0,2% Triton X100, 0,05% SDS, 0,033% N-Lauryl-Sarcosine, 1 mM Kaliumferricyanid und 50 mg X-Gluc (MBI Fermentas) bedeckt und für 1 h vakuum-infiltriert. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Chlorophyll wurde mit Ethanol/Essigsäure (3:1) entfernt.

Die Real-Time PCR-Reaktion wurde in einem iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) unter Verwendung von iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 1:50 verdünnter cDNA und den Primern GusF und GusR (5'-TCACCGAAGTTCATGCCAGTC-CAG-3') durchgeführt. Das ermittelte Transkriptlevel wurde gegen das mRNA-Level von β -ACTIN (ActF 5'-GTGAGGCTCTATCCAACCATC-3', ActR 5'-GGAACACAAATTG-GGCAAGTAT-3') normalisiert.

Ergebnisse

Das *sigus*-Konstrukt von pHELLSGATE8::*gus* besteht aus einem sense- und einem antisense-orientierten, 444 bp-Fragment des Gens *gusA*. Diese Fragmente sind durch ein Intron voneinander getrennt. Nach der Transkription hybridisieren beide Fragmente und bilden eine dsRNA in Form einer Hairpin-Struktur aus. Die dsRNA wird von DCL erkannt und zu sRNAs abgebaut, welche dann den Silencing-Mechanismus aktivieren (Abbildung 1).

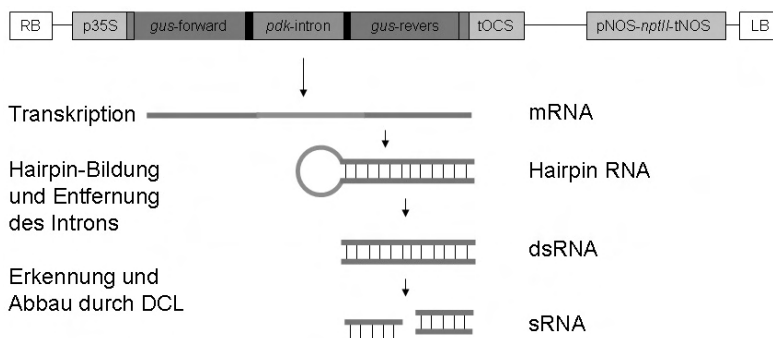


Abb. 1 Die T-DNA des Vektors pHELLSGATE8::*sigus* als Grundlage für die Synthese von *gusA*-spezifischen sRNAs.

Um zu testen, ob der Silencing-Effekt in Apfelpflanzen über Veredlungsstellen hinaus transportiert wird, wurden zunächst Apfelpflanzen hergestellt, die *gusA*-spezifische Silencing-Signale produzieren. Nach der Transformation mit dem Vektor pHELLSGATE8::*sigus* wurden 13 kanamycinresistente Apfellinien erhalten. Alle Pflanzen wiesen die Integration des RNAi-Konstruktes *sigus* und des Selektionsmarkergens *nptII* auf. Die Transkription von *sigus* und *nptII* wurde mittels RT-PCR bestätigt. Anschließend wurden *in vitro*-Sprosse der *gusA*-transgenen Linie T355 (oben) mit *in vitro*-Sprossen der *sigus*-transgenen Linien (Unterlage) veredelt. Als Kontrolle wurden T355-Sprosse auf nicht-transgene PinS-Unterlagen veredelt. Die Real-Time PCR-Analysen zeigten, dass die *gusA*-Expression in zufällig geernteten Blättern der veredelten *gusA*-transgenen Sprosse im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert war (Abbildung 2C). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass mobile Silencing-Signale über die Veredlungsstelle in den oberen Pflanzenteil gelangten und dort ein Silencing des *gusA*-Transgens auslösten.

Um zu testen, in welchem Maß sich die Expressionshemmung von *gusA* auf den Phänotyp der Veredlungen auswirkt, wurden mit den *in vitro*-Veredlungen Gus-Färbungen durchgeführt. Die Blätter der Kontrollpflanzen waren komplett blau gefärbt, während die Unterlagen wie erwartet weiß blieben (Abbildung 2A). Dagegen waren die Blätter der *gusA*-transgenen Sprosse, die mit *sigus*-transgenen Unterlagen veredelt waren, nur teilweise blau gefärbt und wiesen weiße Flächen auf (Abbildung 2B). Diese weißen Flächen sind offensichtlich eine Folge des Silencings der *gusA*-Expression. Dabei trat der Silencing-Effekt sowohl in jungen als auch älteren Blättern auf.

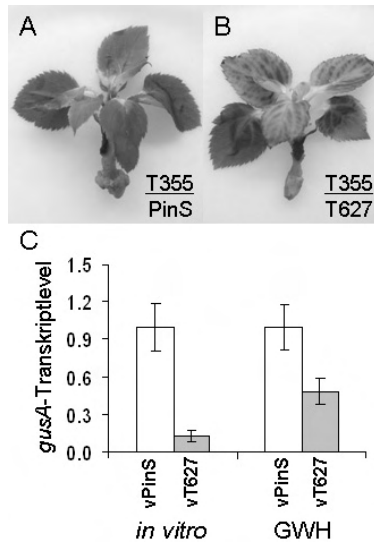


Abb. 2 Expressionshemmung des *gusA*-Transgens durch Veredlung mit *sigus*-transgenen Linien am Beispiel der Linie T627. (A) Die Kontrolle besitzt PinS (untransformiert) als Unterlage und weist keinen Silencing-Effekt auf. (B) Die *sigus*-transgene Linie T627 als Unterlage bewirkt eine Reduktion der Blaufärbung im *gusA*-transgenen Spross T355. (C) Unter *in vitro*- und Gewächshausbedingungen (GWH) kommt es bei den Veredlungen mit T627 im Vergleich zur Kontrolle vPinS zur Reduktion des *gusA*-mRNA-Gehaltes.

Um zu untersuchen, ob der Silencing-Effekt auch in verholzten Apfelpflanzen mobil ist, wurden die transgenen Linien ins Gewächshaus überführt. Dort wurden einjährige Pflanzen der *sigus*- und *gusA*-transgenen Pflanzen miteinander veredelt. Nach fünf Monaten wurde die *gusA*-Expression in den Blättern der *gusA*-transgenen Reiser mittels Real-Time PCR untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die *gusA*-Expression in Veredlungen mit *sigus*-transgenen Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls reduziert war. Somit ist davon auszugehen, dass auch in verholzten Pflanzen ein Transport des Silencing-Effekts erfolgt.

Diskussion

Nach der Veredlung von *sigus*-transgenen Apfelpflanzen mit *gusA*-transgenen Apfelpflanzen wurde eine Reduktion der *gusA*-Expression auf RNA- (Real Time-PCR) und Proteinebene (Gus-Färbung) festgestellt. Bereits bei Gilissen et al. (2005) konnte gezeigt werden, dass Apfelpflanzen über einen Silencing-Mechanismus verfügen. Dabei wurden Apfelpflanzen mit einem *Mal d 1*-spezifischen RNAi-Konstrukt transformiert. In anschließenden Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Expression des Gens *Mal d 1* reduziert ist und Apfelpflanzen somit über einen Silencing-Mechanismus verfügen, der durch RNAi-Konstrukte induziert werden kann. Bei RNAi-Konstrukten hybridisieren die komplementären Sequenzabschnitte und bilden dadurch eine Hairpin-Struktur. Nach dem Entfernen des Introns entsteht eine dsRNA, die durch DCL zu sRNAs abgebaut wird (Mitter et al., 2006). Diese sRNAs bewirken einen Silencing-Effekt, indem sie im Komplex mit AGO an homologe Sequenzen binden und die Expression dieser Zielsequenzen hemmen (Baulcombe, 2005). Durch die Verwendung eines *gusA*-spezifischen RNAi-Konstruktes ist davon auszugehen, dass *gusA*-homologe sRNAs entstehen, die den Silencing-Mechanismus aktivieren können.

Um den Silencing-Effekt auslösen zu können, müssen diese sRNAs in den oberen Pflanzenteil der Veredlungen (Linie T355) transportiert werden. Der Phänotyp der T355-Pflanzen die auf T627-Pflanzen veredelt waren (Abbildung 2B) lässt vermuten, dass die Ausbreitung der Silencing-Signale von der Unterlage über das Phloem in die Blättern und von dort in die Blattspreite erfolgt. Untersuchungen zur Mobilität und dem Transport von Silencing-Signalen sind für Apfel noch nicht beschrieben. Jedoch konnte in Veredlungsexperimenten mit transgenen Tabakpflanzen die Übertragung eines Silencing-Effektes nachgewiesen werden. Dabei wurden *gusA*- bzw. *gfp*-transgene Tabakpflanzen, die ein spontanes Silencing aufwiesen, mit normalen *gusA/gfp*-transgenen Pflanzen veredelt. Anschließend wurde ein spezifisches Silencing der Transgene in den normalen, transgenen Linien beobachtet (Palauqui et al., 1997; Tournier et al., 2006). Dabei erfolgte die Ausbreitung des Silencing-Effektes mit dem Phloemstrom (Tournier et al., 2006). Da wir in unseren Experimenten einen ähnlichen Effekt beobachtet haben, ist anzunehmen, dass bei Apfelpflanzen *gusA*-spezifische Silencing-Signale in Form der sRNAs über Veredlungsstellen hinaus transportiert werden und den Silencing-Mechanismus unabhängig vom Ort ihrer Synthese aktivieren können. Im Anschluss muss nun getestet werden, ob mit RNAi-Konstrukten auch die Expression apfeleigener Gene kontrolliert werden kann. Damit könnten durch RNAi-transgene Unterlagen Merkmale in nicht-transgenen Früchten gezielt beeinflusst werden. Die Expression der Transgene bliebe ausschließlich auf die Unterlage beschränkt.

Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) und durch das EU-Forschungsprojekt ISAFRUIT (Contract no. FP6-FOOD-CT-2006-016279) gefördert.

Literatur

- Baulcombe, D. 2005. RNA silencing. *TRENDS in Biochem. Science* 30(6):290-293.
- Flachowsky, H., Peil, A., Sopanen, T., Elo, A. and Hanke, V. 2007. Overexpression of *BpMADS4* from silver birch (*Betula pendula* Roth.) induces early-flowering in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Plant Breed* 126:137-145.
- Flachowsky, H., Riedel, M., Reim, S. and Hanke, M.-V. 2008. Evaluation of the uniformity and stability of T-DNA integration and gene expression in transgenic apple plants. *Electronic J Biotech.* 11:1-13.
- Gilissen, L.J.W.J., Bolhaar, S.T.H.P., Matos, C.I., Rouwendal, G.J.A., Boone, M.J., Krens, F.A., Zuidmeer, L., van Leeuwen, A., Akkerdaas, J., Hoffmann-Sommergruber, K., Knulst, A.C., Bosch, D., van de Weg, W.E. and van Ree, R. 2005. Silencing the major apple allergen Mal d1 by using the RNA interference approach. *J Allergy Clin Immunol* 115:364-369.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C. and Voinnet, O. 2003. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J* 22:4523-4533.
- Mitter, N., Mitchell, R. and Dietzgen, R.G. 2006. Fate of hairpin transcripts components during RNA silencing and its suppression in transgenic virus-resistant tobacco. *J Biotechnol* 126:115-122.
- Palauqui, J.-C., Elmayan, T., Pollien, J.-M. and Vaucheret, H. 1997. Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J* 16:4738-4745.
- Tournier, B., Tabler, M. and Kalantidis, K. 2006. Phloem flow strongly influences the systemic spread of silencing in GFP *Nicotiana benthamiana* plants. *Plant J* 47:383-394.

Kontakt: Magda-Viola Hanke, Tel. 0351-2616240

Engel, Josefine; Weinzierl, Karina; Klocke, Evelyn

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI), Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen und Obst, Quedlinburg

Pelargonium Suspensionskultur - Charakterisierung und Möglichkeiten der Verwendung

Pelargonium suspension culture - Characterization and prospects for utilization

Zusammenfassung

Es konnten Suspensionskulturen der *Pelargonium* Genotypen 503, 519, 301 und 609 aus Kalluskulturen etabliert werden. Für die Isolierung stabiler Protoplasten aus den Zellsuspensionen wurde ein Protokoll entwickelt. Die erhaltenen Protoplasten wurden sowohl für den Test von Fluoreszenzfarbstoffen als auch für