

# Wie stabil sind fremde Gene in Forstbäumen?

Matthias Fladung, M. Raj Ahuja und Hans-J. Muhs (Großhansdorf)

In vielen wissenschaftlichen Disziplinen und wirtschaftlichen Sparten gehören gentechnische Methoden heute zum Standard. Auch der Bereich Land- und Forstwirtschaft ist davon nicht ausgenommen. Doch während gentechnisch veränderte Kulturpflanzen bereits in mehreren Ländern der Erde kommerziell angebaut werden, spielen transgene Bäume in der forstwirtschaftlichen Praxis bisher keine Rolle. Einer der Gründe dafür ist in der langen Lebensdauer der Bäume zu sehen: Viele der durch Genübertragung erzielten neuen Eigenschaften müssen hier über weite Zeiträume ausgeprägt bleiben, und Fehlschläge offenbaren sich möglicherweise erst nach Jahren oder Jahrzehnten. Voraussetzung für eine erfolgreiche Anwendung gentechnisch veränderter Sorten im Forst ist also ihre genetische Stabilität: Die fremden Gene müssen sich nicht nur in die Erbmasse der Pflanze einfügen, die in diesen Genen gespeicherte Information muß auch abgelesen und umgesetzt werden. Am Institut für Forstgenetik der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft wird der Frage, wie stabil sich fremde Gene in Bäumen ausprägen, anhand eines Modellversuchs mit Aspen (Zitterpappeln) und Hybrid-Aspen nachgegangen.

Für Forstpflanzen könnten verschiedene, durch Gentransfer übertragbare Eigenschaften von Interesse sein. In erster Linie wird man hierbei an Resistenzen gegen Schaderreger wie Pilze oder Insekten denken. Sie sind besonders bei schnellwachsenden Baumarten, die für die Biomasseproduktion verwendet werden, von Bedeutung. Eine Resistenz gegen breitwirksame Herbizide wie RoundUp® oder BASTA® könnte bei der Anzucht junger Bäume eine Alternative zur manuellen Kulturpflege darstellen. Weiterhin denkt man an eine Veränderung bestimmter Holzeigenschaften, beispielsweise um für die Zellstoffherstellung den Zellstoff leichter und ohne größere chemische Zusätze vom Lignin trennen zu können. Zusätzlich könnte für die Anzucht im Freiland und für den Handel von gentechnisch veränderten Bäumen eine männliche und weibliche Sterilität sinnvoll sein, um die Ausbreitung gentechnisch über-

tragener Gene via Pollen oder Samen zu vermeiden. Bevor aber gentechnisch veränderte Bäume in der

Praxis eingesetzt werden können, müssen zunächst einige grundsätzliche Aspekte untersucht werden. Das Verbleiben und Funktionieren der übertragenen Gene hat einen entscheidenden Stellenwert für die Beurteilung, wie sinnvoll und praktikabel gentechnische Veränderungen hier überhaupt sind. Bei ein- und zweijährigen Pflanzen gibt es bereits Beispiele von Instabilitäten, die aber durch die kurze Lebensdauer dieser Pflanzen von geringerer Bedeutung sind.

Besonders interessant ist die Frage, ob übertragene Gene, die in den gentechnisch veränderten Bäumen direkt nach der Übertragung aktiv sind, auch während der langen vegetativen Wachstumsphase aktiv bleiben. Eventuell verändern sich die induzierten Eigenschaften



**Abb. 1: Bildung eines Tumors nach Infektion eines Wildtyp-Agrobacterium-Stammes. (A) Zitterpappel (*Populus tremula*). (B) Kiefer (*Pinus sylvestris*)**

im Laufe der Entwicklung oder unter dem Einfluß der jahreszeitlichen Klimabedingungen. Eventuell werden die Gene auch ganz inaktiviert.

## VORAUSSETZUNGEN FÜR GENTRANSFER

Seit Ende der siebziger Jahre ist es möglich, Gene in andere Organismen zu übertragen. Dazu bedurfte es folgender Voraussetzungen:

1. Die Gene müssen in ihrer molekularen Struktur als DNS charakterisiert, isoliert und vermehrt werden können.



**Abb. 2: Regeneration von Pflanzen aus Blättern in Sterilkultur**

2. Eine Methode zur Übertragung von Genen in das Erbgut des Empfängers muß zur Verfügung stehen.
3. Die Zellen des Empfängerorganismus, die fremde Gene aufgenommen haben, müssen sich zu einem vollständigen Organismus entwickeln können.

## ÜBERTRAGUNG VON GENEN

Gene können im Labor auf verschiedene Weise übertragen werden. Die bekannteste Methode bei Pflanzen bedient sich eines im Bo-

den lebenden Bakteriums, das den Namen *Agrobacterium tumefaciens* trägt. Dieser Mikroorganismus stellt gewissermaßen ein natürliches Gentransfersystem dar.

*A. tumefaciens* ist seit langem dafür bekannt, bei Pflanzen knollenartige Verdickungen am Wurzelhals hervorzurufen (Abb. 1). Diese Verdickungen bilden sich dann aus, wenn bei einer Verletzung das pflanzliche Gewebe von dem Bakterium infiziert wird. Bei diesem Vorgang schleusen die Bakterien verschiedene Gene, die auf einem separaten, ringförmigen Stück DNS (einem sogenannten Plasmid) lie-

sie ihre pathogene Wirkung nicht mehr entfalten können. Stattdessen werden diesen Stämmen die zu übertragenden, gewünschten Gene eingepflanzt. Im Laborexperiment lagern sich die so modifizierten Bakterien an einzelne Pflanzenzellen an und „schmuggeln“ die fremden Gene in deren Zellkern hinein.

Die auf diese Weise transformierten Pflanzenzellen müssen nun allerdings wieder die gesamte Pflanze hervorbringen. Hier macht man sich die wichtige Eigenschaft vieler Pflanzen zunutze, aus Einzelzellen oder Zellverbänden den ganzen Organismus regenerieren zu können.

## TRANSFORMATIONSSYSTEM

Aspen (*Populus tremula* L.) und Hybridaspens (*P. tremula* x *P. tremuloides*) stellen ein gutes Modellsystem für den Gentransfer in Bäumen dar. Diese Pflanzen können relativ einfach in Gewebekultur genommen werden, eine wichtige Voraussetzung für gentechnische Experimente. Darüber hinaus sind sie einer gentechnischen Veränderung über das *Agrobacterium tumefaciens*-System leicht zugänglich. Für die hier verwendeten Aspen- bzw. Hybridaspens-Klone wurde an unserem Institut eine sehr effiziente Regenerations- und Transformationsmethode entwickelt: Zellverbände oder Pflanzenteile können unter Laborbedingungen auf einem speziellen Nährmedium zu neuen Pflänzchen heranwachsen (Abb. 2).

Wie kann nun der Experimentator feststellen, ob die Genübertragung erfolgreich verlaufen ist? Hier hilft ein elegantes Verfahren: In der Praxis wird bei der Transformation neben den Genen für die gewünschten neuen Eigenschaften gleichzeitig auch ein sogenanntes Markergen mit übertragen, das eine Selektion dieser Pflanzen erlaubt. Häufig wird dafür das Resistenzgen gegen das Antibiotikum Kanamycin verwendet. Transgene Zellverbände können



**Abb. 3: Eigenschaften rolC-transgener Aspen (links, mitte) im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzen (rechts): (A) geringer Wuchs. (B) hellgrüne Blattfarbe**

sich auf Kanamycin-haltigen Nährmedien weiterentwickeln, nicht transformierte Exemplare sterben ab. Bei Kanamycin handelt es sich um ein Antibiotikum, das in der Humanmedizin nur äußerst geringe Verwendung findet.

### AUSWAHL DER MODELLGENE

Für die von uns beabsichtigten Modellversuche waren Gene von Vorteil, deren Effekte phänotypisch sichtbar und leicht zu erkennen sind.

Veränderungen der transgenen Pflanzen hinsichtlich Wuchsform und Blattfarbe bieten sich hier beispielsweise an. Mit einem derartigen Testsystem stünde eine Möglichkeit zur Verfügung, die es erlaubt, ohne aufwendige Untersuchungen die Wirkung eines Fremdgens an der Pflanze direkt über einen längeren Zeitraum zu verfolgen.

Diese Kriterien haben in der Vergangenheit bereits gentechnisch veränderte Tabak- und Kartoffelpflanzen erfüllt, die das sogenannte rolC-Gen aus *Agrobacterium rhizogenes* enthielten. *A. rhizogenes* ist ein dem *A. tumefaciens* nahe verwandtes Bakterium und kommt wie dieses natürlicherweise im Boden vor. Pflanzen mit diesem Gen wiesen einen gestauchten Wuchs und eine hellere Blattfarbe auf. Dieses Genkonstrukt wurde nun auch für Transformationsexperimente mit Aspen verwendet.

### DAS rolC GEN

Allgemein können unter Verwendung verschiedener Kontrollelemente (Promotoren) unterschiedliche Ausprägungsgrade fremder Gene erreicht werden. Ein Promotor, der eine hohe Expression des rolC-Gens zulässt, führt zu starken morphologischen und physiologischen Veränderungen. Wie bereits bei den gentechnisch veränderten Tabak- und Kartoffelpflanzen, finden sich auch bei den transgenen Aspen als wichtigste Eigenschaften ein geringer Wuchs und eine hellgrüne Blattfarbe (Abb. 3). Umfangreiche Hormonmessungen in diesen Pflanzen haben zudem veränderte Konzentrationen einiger Hormone wie Cytokinine, Gibberellin und Abscisinsäure ergeben. Unter der Kontrolle eines anderen Promotors können rolC-transgene Kartoffel-, Tabak- und Aspenpflanzen aber einen fast normalen Wuchs aufweisen, während die Blätter weiterhin heller als die der Kontrollpflanzen sind.

Neben den verwendeten Promotoren entscheidet auch die Anzahl der übertragenen Genkopien über die Ausprägung der entsprechenden Eigenschaften.

Insgesamt konnten wir in unseren Experimenten mehr als 30 transgene Aspenklone herstellen, die verschiedene Promotoren und eine unterschiedliche Anzahl des rolC-Gens enthalten. Sie alle weisen eine geringere Größe mit kleineren, hellgrünen Blättern und verkürzten Internodienabständen auf. Gentechnisch veränderte Aspenpflanzen, die zwei oder drei Kopien von rolC tragen, zeigen erhebliche morphologische Unterschiede zu Pflanzen, die nur eine Kopie von rolC enthalten.



**Abb. 4: Revertierte Blätter einer rolC-transgenen Aspenpflanze**

### INSTABILITÄT TRITT AUF

Während des kontinuierlichen vegetativen Wachstums von rolC-tragenden Aspenpflanzen im Gewächshaus fanden sich erste Anzeichen für Instabilität. Die transgenen Aspen, die zwei oder drei Kopien der übertragenen Genkonstrukte trugen, zeigten während der Kultur



**Abb. 5: Chimäres Blatt. Das hellgrüne Blattgewebe repräsentiert den *rolC* transgenen Teil, das dunkelgrüne Gewebe den revertierten, nicht mehr *rolC* exprimierenden Teil des Blattes**

zeitweise Seitensprosse, die sich eindeutig von den *rolC*-charakteristischen Merkmalen unterschieden: Die Internodienabstände waren länger und die Blätter größer und von dunkelgrüner Farbe (Abb. 4). Auch in einigen Pflanzen mit nur einer Kopie von *rolC* wurden solche revertierten, dem Wildtyp gleichenden Sprosse beobachtet. Eine molekularbiologische Analyse zeigte in diesen Pflanzenteilen jedoch ein gleiches Muster von *rolC*. Das übertragene Genkonstrukt war also noch vorhanden, prägte sich aber nicht aus.

Zusätzlich wurden revertierte Sprosse gefunden, die chimäre Blätter aufwiesen: Hellgrünes Blattgewebe transgenen Ursprungs war neben dunkelgrünen Wildtyp-Sektoren innerhalb desselben Blattes zu finden

(Abb. 5). Eine molekularbiologische Analyse ergab in einigen Aspen wieder das gleiche Muster von *rolC* in beiden Teilen des Blattes (hell- und dunkelgrün). In anderen chimären Aspen wurde nur in den hellgrünen Blattbereichen das *rolC* Gen nachgewiesen.

Mögliche Ursachen für diese Instabilitäten können auf verschiedenen Ebenen der Realisation genetischer Information angesiedelt sein. So kann beispielsweise eine Mutation das übertragene Gen in seiner Funktion so beeinträchtigen, daß es im äußersten Fall seine Funktion vollständig verliert. Daneben können Veränderungen am Gen bzw. am Promotor, die als Methylierung bekannt geworden sind, ein Umschreiben der genetischen Information in

die Boten-RNS verhindern und damit zur Inaktivierung führen.

## SCHLUßFOLGERUNGEN

Unsere Untersuchungen an zwei- bis dreijährigen Aspen weisen darauf hin, daß selbst über einen relativ kurzen Zeitraum das Vorhandensein der fremden Gene im Erbgut von langlebigen Forstpflanzen nicht immer gewährleistet ist. Dieses Ergebnis konnte erzielt werden, weil wir mit dem *rolC*-Konstrukt solche Gene für unsere Modellversuche ausgewählt haben, die die äußere Gestalt der Bäume verändern, was relativ schnell erkennbar ist.

Doch nicht alle Einflüsse auf das Wachstum von Bäumen lassen sich im Gewächshaus testen. Weiterhin können bisher auch nur Aussagen über kürzere Zeiträume gemacht werden. Somit muß eine weitere Beobachtung der transgenen Bäume im Freiland erfolgen. Ein Freisetzungsversuch mit gentechnisch veränderten Aspen wurde im Mai 1996 vom Robert-Koch-Institut in Berlin als zuständige Behörde genehmigt und im darauffolgenden Juni begonnen. Nur so kann auch der jahreszeitliche Einfluß geprüft werden. Diese Modellversuche ermöglichen es, die Stabilität und Expressivität fremder Gene im Erbgut von langlebigen Forstpflanzen generell besser beurteilen zu können.

Sowohl für den Züchter als auch für die Forstwirtschaft insgesamt muß gewährleistet sein, daß sich die durch Genübertragung induzierten neuen Eigenschaften in Bäumen stabil und verlässlich ausprägen. Ansonsten wäre eine kommerzielle Forstwirtschaft mit transgenen Bäumen nicht sinnvoll. ■

*Dr. Matthias Fladung, Prof. Dr. M. Raj Ahuja und Dir. u. Prof. Dr. Hans-J. Muhs, Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Institut für Forstgenetik, Sieker Landstrasse 2, 22927 Großhansdorf*