

Mit sterilen Pappeln die Auskreuzung in forstliche Ökosysteme verhindern

Matthias Fladung, Hans Hönicka (Großhansdorf)

Weltweit wurden bisher fast 200 Freisetzungsversuche mit gentechnisch veränderten (transgenen) Bäumen durchgeführt. Die eingeführten Gene vermitteln neue Eigenschaften wie beispielsweise veränderte Holz- und Faserqualität oder Resistenzen gegen Schädlinge und Pflanzenkrankheiten. Allerdings haben Gehölze eine Besonderheit, die für die Risikobewertung gentechnischer Eingriffe von großer Bedeutung ist: Sie weisen eine extrem lange Lebensdauer auf. Zudem sind die Ausbreitungsgewohnheiten bei Gehölzen vielfältig und noch kaum erforscht. Im Rahmen der Sicherheitsbewertung gentechnisch veränderter Gehölze ist eine mögliche Ausbreitung der fremden Gene über die Auskreuzung von Pollen und die Verbreitung von Samen zu berücksichtigen. Um sicherzustellen, dass sich die fremden Gene nicht in natürlichen Waldbaumpopulationen verbreiten, werden am Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft (BFH) Sterilitätskonzepte für Gehölze entwickelt.



Holz als ein nachwachsender Rohstoff steht für viele Anwendungen als Schnitt- und Industrieholz zur Verfügung. Bei einer angenommenen Steigerung des jährlichen Holzbedarfs um etwa 1,7% ist damit zu rechnen, dass der Holzbedarf innerhalb der nächsten 15 Jahre um 25% auf etwa 2,5 Billionen m³ steigen wird. Eine der großen Herausforderungen unserer Zeit besteht darin, einerseits die zunehmende Abholzung der Primärwälder („Urwälder“) zu stoppen und andererseits dem zunehmenden Holzbedarf Rechnung zu tragen. Die Wissenschaft versucht zudem, die höheren Qualitätsansprüche (Reduzierung des Lignins, Verlängerung der Cellulosefaser) zu erfüllen und nutzt dazu auch biotechnologische und gentechnische Methoden, da herkömmliche Züchtungsmethoden nur sehr langsam oder gar nicht zum Ziel führen.

Gentechnik bei Bäumen

Für Pappeln existieren bereits seit 1987 Methoden, fremde Gene in das Erbgut

(Genom) zu überführen. Zunächst wurden Resistenzgene gegen Antibiotika übertragen, wodurch es möglich war, den Erfolg einer Übertragung von Genkonstrukten bereits im Labor zu überprüfen. Dann fand die Gentechnik auch für grundlegende wissenschaftliche Fragestellungen Anwendung. Da mittlerweile verschiedene für Bäume relevante Gene verfügbar sind, werden zunehmend transgene Bäume produziert, die eine ökologische und/oder wirtschaftliche Relevanz haben. Die Verwendbarkeit dieser transgenen Bäume wird zur Zeit noch hauptsächlich von Wissenschaftlern im Labor bzw. in kleineren Freilandversuchen getestet, doch wird damit zu rechnen sein, dass mittel- bis langfristige transgene Bäume auch im großen Stil im Freiland getestet werden, wie es bereits derzeit mit *B.t.*-transgenen Pappeln in China passiert.

Bäume könnten beispielsweise gentechnisch so verändert werden, dass sie schneller wachsen und somit im Bereich der erneuerbaren Energien eine herausragende Bedeutung als Energieträger erlangen. Auch könnte der Ligningehalt im Holz ge-

senkt werden, so dass der für die Papierherstellung benötigte Zellstoff umweltfreundlicher aus Holz von transgenen Bäumen als aus bisher verfügbaren Hölzern gewonnen wird. Andere gentechnische Ansätze verfolgen das Ziel, entweder den Gehalt an Cellulose im Holz oder die Länge der Cellulosefaser selbst zu modifizieren. Verlängerte Cellulosefasern sind für die Bildung von höherwertigem Zellstoff im Zuge der Papierherstellung wirtschaftlich äußerst interessant.

Schließlich können bei Problemen wie Bodenversalzung, Trockenheit, oder Insekten Schäden – vor allem in Ländern mit aridem Klima oder einer sehr geringen Waldfläche – biotechnologische und gentechnische Methoden Verwendung finden, da hier die herkömmliche Züchtung oftmals keine Alternativen bietet.

Das Risiko der dauerhaften Ausbreitung

Mit der zunehmenden Bedeutung gentechnisch veränderter Forstpflanzen in der



Forschungslandschaft verschiedener Länder steigt die Wahrscheinlichkeit, dass diese weltweit verwendet werden, zum Beispiel in Plantagenkulturen. Eine unbeabsichtigte Vermehrung und Ausbreitung transgener Bäume wäre dann nicht mehr ausgeschlossen. Auch wenn zunächst einmal eine Ausbreitung transgener Gehölze per se kein Risiko darstellt, nehmen diese jedoch als langlebige Organismen eine besondere Stellung in der Risikobewertung gentechnischer Eingriffe ein. Selbst die vergleichsweise kurzlebige Pappel erreicht immerhin

ein Alter von 100 und mehr Jahren. Eine Ausbreitung transgener Bäume könnte also über lange Zeiträume nachwirken.

Für heimische Waldöko- und Landschaftssysteme muss eine freie Kreuzbarkeit zwischen gentechnisch veränderten und nicht gentechnisch veränderten Bäumen angenommen werden. Daher ist eine Einkreuzung der gentechnisch übertragenen Gene (Transgene) in den Genpool der entsprechenden Arten zu erwarten („vertikaler Genfluss“), sofern nicht Maßnahmen entwickelt werden, die dieser freien Kreuzbarkeit entgegenwirken (Abb. 1). Zudem können sich Pollen und Samen von Bäumen unter Umständen sehr weit ausbreiten. Wenn der Pollen je nach Wetterlage in hohe Luft-

schichten gerät, trägt der Wind ihn auch schon mal hundert Kilometer weit. Da bisher keine konventionellen Ansätze zur Erzeugung und Einkreuzung natürlicher Sterilität in Bäumen vorliegen, ist die Etablierung einer gentechnisch basierten männlichen und/oder weiblichen Sterilität eine mögliche Strategie, um den vertikalen Genfluss zu verhindern.

Ob allerdings solche Konzepte erfolgreich sind hängt entscheidend davon ab, wie stabil die fremden Gene sind, da Bäume erst nach einer Reihe von Jahren blühen. Bislang ist die Frage noch nicht zufriedenstellend beantwortet, ob gentechnisch übertragene Gene, die in den transgenen Bäumen direkt nach der Übertragung aktiv sind, auch noch nach zwanzig oder dreißig Jahren funktionieren.

Frühe Blüte bei Pappeln

Sicherheitsstudien bei transgenen Forstpflanzen leiden unter den langen Generationszeiten. Um die gentechnisch induzierte Sterilität innerhalb eines überschaubaren Zeitrahmens von zwei bis drei Jahren analysieren zu können ist es wünschenswert, die vegetative Phase der Pappeln erheblich zu verkürzen. Daher ist die Förderung der Blühinduktion bei transgenen Pappeln im Rahmen der Untersuchungen zur Sterilität sehr wichtig. Am BFH-Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Großhansdorf, wird neben physiologischen Ansätzen für die Erzeugung frühblühender Pappellinien

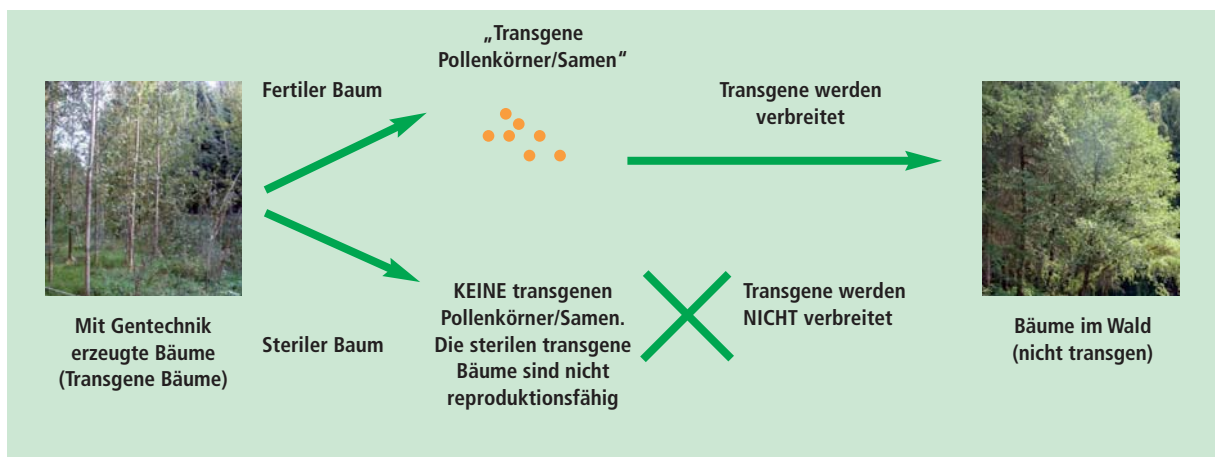


Abb. 1: Verhinderung der Ausbreitung von Transgenen durch Erzeugung einer Sterilität bei transgenen Bäumen.



Abb. 2: Transgene Pappeln mit BpMADS4-Gen im Gewächshaus, die ihre Blättern während der Herbst-Winterperiode nicht vollständig abgeworfen haben (links). Rechts zum Vergleich Pappeln ohne BpMADS4.

auch ein gentechnischer Ansatz mit Hilfe von Genen getestet, die bereits in anderen Pflanzen eine frühe Blüte bewirkt haben.

Bisher sind alle Versuche fehlgeschlagen, ein- bis dreijährige Pappeln mittels physiologischer Ansätze (Applikation von Wachstumshemmern, Demethylierungs-Agenzien und Hormonen) zur Blütenbildung anzuregen. Dagegen konnten unter anderen auch an der BFH frühblühende Pappellinien auf gentechnischem Weg erzeugt werden, die entweder bereits einige Monate nach der gentechnischen Veränderung oder als dreijährige Pflanzen Blüten bildeten. Verschiedene Genkonstrukte wurden für die Transformation von Pappeln verwendet.

Das Gen BpMADS4 aus der Birke wurde zum ersten Mal in Pappeln überführt. In transgenen Birken hat dieses Gen eine beschleunigte Blühfähigkeit bewirkt. Die ersten BpMADS4-transgenen Pappeln wurden Anfang 2002 erzeugt, ins Gewächshaus überführt und molekulargenetisch untersucht. Einige Exemplare werden seit Mitte 2002 in Klimakammern kultiviert. Eine blühfördernde Wirkung dieses Genkonstrukts ist in transgenen Pappeln allerdings bisher nicht gefunden worden. Während der Kultur im Gewächshaus wurde jedoch beobachtet, dass die BpMADS4-transgenen Pappellinien über die Winter-

monate ihre Blätter nicht vollständig abwerfen (Abb. 2).

Die Expression der beiden aus *Arabidopsis thaliana* stammenden Gene Leafy und FT hat bisher in verschiedenen Pflanzenarten sehr effektiv die Blühfähigkeit gefördert. Frühe Blütenbildung ist für beide Gene bereits in der in-vitro-Kultur im ersten Jahr beobachtet worden (Abb. 3). Für FT-transgene Pappeln liegen aber noch keine weiteren Ergebnisse vor, da sie erst spät mit in die Untersuchungen aufgenommen wurden. Die frühblühenden Leafy-transgenen Pappellinien sind unter Gewächshausbedingungen fertil (Abb. 4A). Die Leafy- und FT-induzierte Verkürzung

des Jugendstadiums sowie die Aufrechterhaltung der Fruchtbarkeit werden jedoch stark vom Genotyp der verwendeten Pappellinie beeinflusst.

Erzeugung doppeltransgener Pappeln

Für die Induktion der Sterilität in weiblichen und männlichen Pappeln wurden zwei Gene gewählt, die bereits erfolgreich in krautigen Pflanzen getestet wurden: Das Barnase-Gen aus *Bacillus amyloliquefaciens* und das Stilbensynthase-Gen aus *Vitis vinifera*. Das Barnase-Gen kodiert ein für die Zelle giftiges Enzym. Nur wenige Moleküle dieses Enzyms reichen aus, um eine Pflanzenzelle abzutöten. Das Stilbensynthase-Gen ist verantwortlich für die Bildung des sekundären Pflanzenstoffs Resveratrol. Nach Übertragung der Stilbensynthase in verschiedene Pflanzenspezies wurde in den transgenen Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegen Pilzbefall festgestellt, wobei als „Nebenerscheinung“ auch eine männliche Sterilität festgestellt wurde.

Beide Gene werden von gewebespezifischen Steuerelementen (Promotoren) reguliert um sicherzustellen, dass die gewebespezifischen Enzyme nur in bestimmten Blütenorganen gebildet werden: in weiblichen Blüten nur in der Narbe bzw. in männlichen Blüten dort, wo die Pollenbildung stattfindet, in den Pollensäcken.

Die verschiedenen zur Sterilität führenden Konstrukte wurden in männliche und weibliche Leafy- und FT-basierte frühblüh-

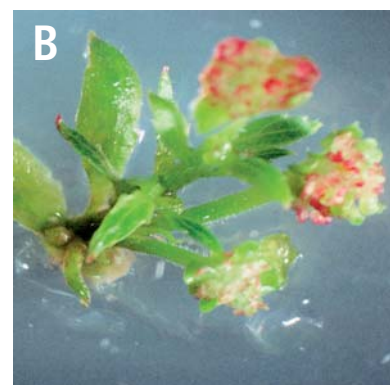
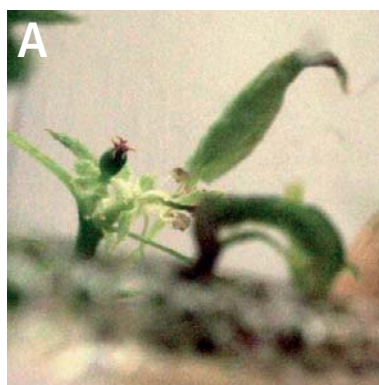
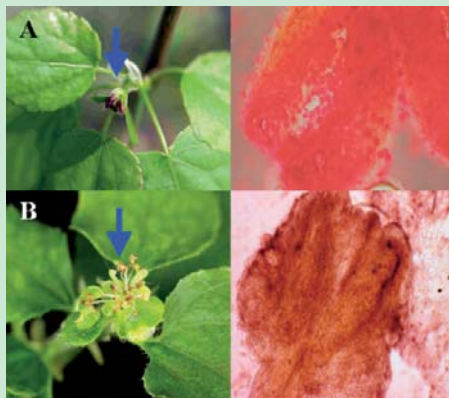


Abb. 3: Weibliche Einzelblüte bei einer frühblühenden Leafy-transgenen (A) und männliche Blüten bei einer frühblühenden FT-transgenen Pappellinie (B) unter in-vitro-Bedingungen.

Abb. 4: Erzeugung von frühblühenden und frühblühend-sterilen Linien von Pappeln (*Populus tremula*, Linie T89) durch genetische Transformation. (A) Blüte (links) und Staubbeutel (rechts; MIT Pollenkörnern) in frühblühender Pappel OHNE Sterilitäts-gen. (B) Blüte (links) und Staubbeutel (rechts; OHNE Pollenkörner) in frühblühender Pappel MIT Sterilitäts-gen. Pfeile zeigen Blüten



hende Pappellinien überführt. Insgesamt wurden eine große Anzahl transgener Linien, die verschiedene Kombinationen von Frühblüh- und Sterilitätskonstrukte be-

inhalten, erzeugt. Doppeltransgene Linien – also Linien, die sowohl steril sind als auch früh blühen – wurden molekularbiologisch untersucht und in vitro, in der Klimakammer sowie im Gewächshaus kultiviert.

Von den weiblichen doppeltransgenen Linien hat bisher noch keine der transgenen Pflanzen Blüten gebildet, so dass Untersuchungen zur Fertilität dieser Pflanzen noch ausstehen. Bei den männlichen doppeltransgenen Pappeln blühte eine Reihe von Linien, so dass bei ihnen untersucht werden konnte, ob die Blüten steril waren.

Untersuchungen zur Sterilität

Einige dieser männlichen, doppeltransgen frühblühend-sterilen Linien haben bereits während der in-vitro-Kultur Blüten ausgebildet. Die Aktivität der Sterilitäts-gene in diesen Blüten wurde mit Hilfe der RT-PCR Methode untersucht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Stilbensynthase-Gen bei frühblühend-sterilen Pflanzen aktiv ist. Korrespondierende Untersuchungen an ins Gewächshaus überführten frühblühend-sterilen Pflanzen ergaben, dass im Vergleich zu Kontrollpflanzen (Abb. 4A) kein Pollen gebildet wird (Abb. 4B).

Die Individualentwicklung der frühblühend-sterilen Pflanzen ist allerdings im Vergleich zu nicht-transgenen Pflanzen sehr langsam. Darüber hinaus erwies es sich als sehr schwierig, die Pappeln der frühblühend-sterilen Linien zu bewurzeln. Das könnte möglicherweise an einer man-

gelhaften Gewebespezifität der aus anderen Pflanzenarten isolierten Promotoren liegen, sodass das Stilbensynthase-Gen auch in anderen Pflanzenteilen exprimiert wird. Zurzeit wird geprüft, wie hoch die Gewebespezifität der verwendeten Promotoren in Pappeln tatsächlich ist, da hierzu bisher noch keine Daten vorliegen.

Zurzeit sind hauptsächlich in-vitro-Pflanzen verfügbar, die aber für die Untersuchungen zur Transgen-Aktivität nur begrenzt geeignet sind.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen der beschriebenen Arbeiten ist es gelungen, durch die Induktion einer frühen Blüte Untersuchungen zur Sterilität von transgenen Pappeln in einem zeitlich überschaubaren Rahmen von ein bis zwei Jahren durchzuführen. Allerdings hat sich gezeigt, dass Ergebnisse zur Blühförderung, die in anderen Pflanzenarten gewonnen wurden, nicht per se auf Pappeln übertragbar sind. Daher ist die Suche nach Alternativen zur Induktion einer frühen Blütenbildung sinnvoll.

Zurzeit werden FT-transgene Pappellinien, die mit den verschiedenen Sterilitäts-genkombinationen transformiert wurden, untersucht. Diese doppeltransgenen Pappeln erleichtern durch die Ausbildung ganzer Kätzchen die geplanten Untersuchungen zur Sterilität. Schließlich bildet eine stabile Sterilität die Voraussetzung, um später auch Bäume mit anderen Genkombinationen – beispielsweise solchen, die zu verbesserten Qualitätseigenschaften führen – freisetzen zu können, ohne das Risiko einer unkontrollierten Ausbreitung eingehen zu müssen.



PD Dr. Matthias Fladung,
Dr. Hans Hönicka,
Bundesforschungsanstalt
für Forst- und Holzwirtschaft,
Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung,
Sieker Landstr. 2, 22927 Großhansdorf.
E-Mail: m.fladung@holz.uni-hamburg.de

Weitere Informationen zur Freisetzung transgener Bäume finden Sie im Internet unter <http://www.biosicherheit.de/gehoelze/>.