



**MPIZ**

1996/2

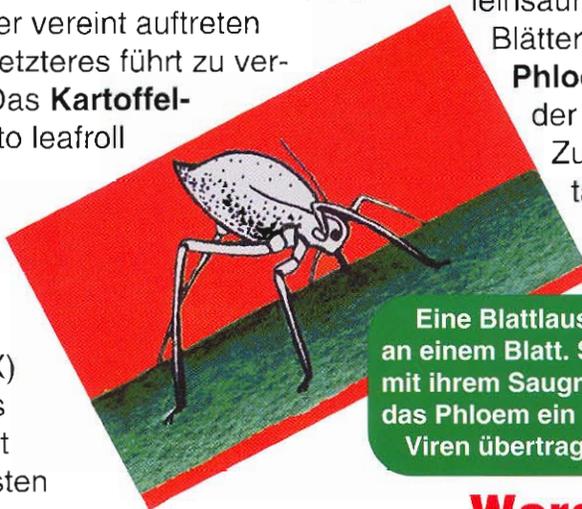
**aktuell**

# Die virusresistente Kartoffel

**Gentechnisch vermittelter Breitbandschutz vor den schädlichsten Viren der Kartoffel**

## Die Schaderreger

Nicht nur Mensch und Tier, sondern auch Pflanzen können von Viren befallen werden. Insgesamt beträgt der verursachte Verlust durch Viruserkrankheiten bei Kulturpflanzen weltweit ca. 2 Milliarden US Dollar, wobei die Einbußen allein bei der Kartoffel auf etwa 30 Millionen US Dollar geschätzt werden. Bei der Kartoffel sind verschiedene Viren bekannt, die entweder alleine oder vereint auftreten (**Mischinfektion**). Letzteres führt zu verstärkten Schäden. Das **Kartoffel-Blattrollvirus** (potato leafroll virus, PLRV), das **Kartoffelvirus Y** (potato virus Y, PVY) und das **Kartoffelvirus X** (potato virus X, PVX) verursachen die aus wirtschaftlicher Sicht gesehen gefährlichsten Viruserkrankungen (**Virosen**) der Kartoffel. Die Ertragsverluste sind beträchtlich: Virosen können zwischen 20 und 90 % der Ernte vernichten. Dabei stellen bestimmte Virusstämme eine besondere Gefahr dar. So verursacht zum Beispiel der NTN-Stamm des Kartoffelvirus Y hauptsächlich Symptome an den Kartoffelknollen. Sind etwa 20% der angepflanzten Kartoffeln davon betroffen, kann der Landwirt die gesamte Ernte nicht mehr verkaufen und erleidet daher hohe finanzielle Einbußen.



Eine Blattlaus saugt an einem Blatt. Sie dringt mit ihrem Saugrüssel in das Phloem ein und kann Viren übertragen.

## Wie werden die Viren übertragen?

Einzelne Stämme des PVY gelangen nur durch mechanische Verletzungen in die Pflanze. Meist sind jedoch Insekten wie die **Grüne Pfirsichblattlaus** die Übeltäter. Sie übertragen PLRV und PVY, deren Erbgut jeweils aus einer einzelsträngigen Ribonukleinsäure (**RNA**) besteht. Insekten stechen die Blätter an und saugen den Saft des **Phloems**. Das ist der Teil des Leitbündels, der die in der Photosynthese produzierten Zucker transportiert. Bei dieser Saugtätigkeit gelangt das Virus durch den Rüssel des Insekts ins Phloem und verteilt sich von dort aus über das System der Leitbahnen und von Zelle zu Zelle in der ganzen Wirtspflanze (**Primärinfektion**).

## Woran erkenne ich eine erkrankte Pflanze?

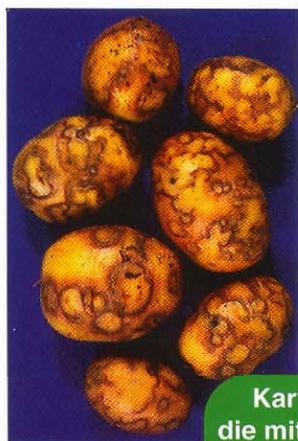
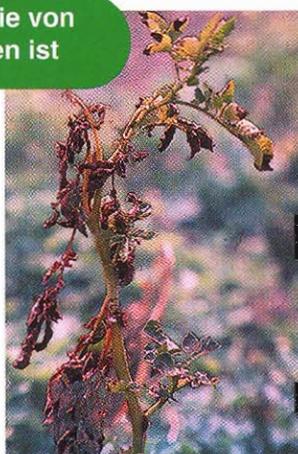
Die ersten erkennbaren Symptome gaben dem **Kartoffel-Blattrollvirus** seinen Namen. Bei einem Befall sind die Blätter infizierter Kartoffelpflanzen längs der Mittelrippe kahnförmig nach oben eingerollt, steif und spröde. Ist die Infektion erst einmal vorangeschritten, läßt sie sich häufig am äußeren Erscheinungsbild nicht mehr erkennen. Eine Infektion von Kartoffeln durch das **Kartoffelvirus Y** zeigt



Symptome des Blattrollvirus: Vergleich gesunder (rechts) mit infizierter Kartoffelpflanze (links)

andere Symptome, die vom jeweiligen Virusstamm und der infizierten Kartoffelsorte abhängig sind. Häufig jedoch kommt es zu wesentlich höheren Ertragseinbußen als bei einer Infektion mit dem Blattrollvirus. Der O-Stamm von PVY (PVY<sup>O</sup>) verursacht die **Strichelkrankheit**. Diese erkennt der Fachmann als sogenannte Tintenspritzer auf der unteren Blattseite. Die „Strichel“ wachsen später zu einer **Nekrose** heran: Die Zellen sterben örtlich begrenzt ab, bis schließlich die Blätter abfallen. Von besonderer Bedeutung ist der schon erwähnte NTN-Stamm (PVY<sup>NTN</sup>), der Nekrosen an der Knolle hervorruft.

Pflanze, die von PVY<sup>O</sup> befallen ist



Kartoffelknollen, die mit dem PVY<sup>NTN</sup>-Stamm infiziert sind

Das **Kartoffelvirus X** bewirkt eine Scheckung der Blätter, die wie ein Mosaik aussieht. Es kann ebenfalls durch mechanische Verletzungen, gelegentlich allerdings auch durch Bodenpilze übertragen werden. Ist eine Kartoffelpflanze gleichzeitig von diesem und zusätzlich von einem oder mehreren anderen Viren befallen, dann führt das zu besonders starken

Minderungen des Ertrags. Alle diese Viren, sowohl PLRV als auch PVY und PVX, überdauern in den Knollen. Pflanzte man diese Knollen wieder aus, dann zeigen die heranwachsenden Pflanzen ausgeprägte Schadbilder (**Sekundärinfektion**).

Für den Landwirt ist es daher sehr wichtig, Pflanzgut zu verwenden, das getestet und virusfrei ist. Zum Schutz vor Primärinfektionen durch Blattläuse spritzt er vorbeugend mit Insektenbekämpfungsmitteln.

Zwar sind bei der Kartoffel schon einige Gene identifiziert worden, die Resistenzen (Widerstandskräfte) gegen eine Reihe von Viruskrankheiten vermitteln, Resistenzgene gegen das Blattrollvirus sind aber noch nicht bekannt. Gelänge es, Sorten auf den Markt zu bringen, die resistent gegen diese Viren sind, könnten große Mengen an Spritzmitteln eingespart werden: ein Ziel, das ökologisch und wirtschaftlich sinnvoll ist.

Symptome an Pflanzen, die mit PVX befallen sind: Sie sind im Vergleich zu denen anderer Viren eher mild.



## Der gentechnische Ansatz

Zum Schutz der Kulturpflanzen vor Virusbefall entwickelten Wissenschaftler inzwischen gentechnische Strategien. Sie beruhen auf dem Konzept der "Pathogen-vermittelten Resistenz": Pflanzen, die bestimmte Gene eines Krankheitserregers ausprägen, können die Vermehrung dieses Schädling beeinträchtigen oder sogar verhindern. Mitarbeiter des MPIZ unter der Projektleitung von Dr. Eckhard Tacke testeten auf der Basis dieser Strategie einen gentechnischen Schutzmechanismus, der die Kartoffel durch eine einzige gentechnische Veränderung gegen die beiden wichtigsten Viren (PLRV, PVY) feil (**Breitbandresistenz**).

## Wie breitet sich das Virus in der Pflanze aus?

Wenn Insekten bei der Aufnahme der Zuckerlösung aus dem Phloem gleichzeitig Viren übertragen, so infizieren diese zunächst einzelne Zellen. Die Pflanze erkrankt jedoch nur, wenn sich das Virus vom ursprünglichen Infektionsort auf die gesamte Pflanze ausbreiten kann. Innerhalb der Pflanze wandert das Virus – wie oben erwähnt – durch das Phloem, aber auch durch die natürlichen Öffnungen (**Plasmodesmen**) von Zelle zu Zelle. An diesem Transportvorgang sind in der Regel Proteine des Virus (Transportproteine, TP) beteiligt. Wissenschaftler des MPIZ charakterisierten das Kartoffelblattrollvirus TP näher (für PVY ist dieses Transportprotein noch nicht zuverlässig identifiziert worden). Es besitzt zwei Bindungsstellen (Domänen), die jeweils eine spezifische Aufgabe übernehmen. Eine Domäne bewirkt, daß sich mehrere TP-Moleküle zu Komplexen zusammenlagern. Über die zweite Domäne binden die TP-Komplexe an den einzelsträngigen Nukleinsäurefaden, die RNA des Blattrollvirus. Dabei überführen sie die Nukleinsäure in einen langgestreckten Faden. In dieser linear gestreckten Form von Ribonukleinsäure/ Proteinkomplexen ist jetzt offensichtlich der Transport der viralen RNA in der Pflanze möglich.

Das Gen für das Transportprotein (TP-Gen) konnte aus dem PLRV-Genom isoliert werden. Das Protein veränderten unsere Wissenschaftler so, daß es eine Verlängerung an einem Ende (am aminoterminalen) aufweist. Das neue Protein bindet zwar an den Nuklein-

säurefaden und an weitere Transportproteine, aber ein Transport dieser entstehenden Komplexe von einer Zelle in die benachbarte Zelle findet nicht mehr statt.

Das auf diese Weise veränderte Gen wurde unter die Kontrolle von Steuerelementen des Blumenkohlmosaikvirus (35S-Promotor und -Terminator) gestellt und mit Hilfe des Vektors *Agrobacterium tumefaciens* (siehe *MPIZ aktuell* 1996/4) in Blattzellen von Kartoffelpflanzen der Sorte Désirée, die sehr anfällig für PLRV ist, eingebracht.

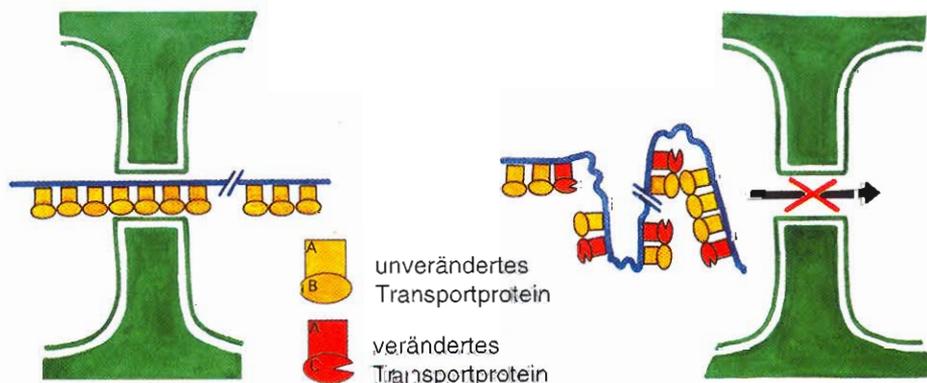
Infiziert PLRV diese gentechnisch veränderten Pflanzen, dann kann sich das Virus schlechter in den Pflanzen ausbreiten. Eine mögliche Erklärung ist: Die nun vom Virus kodierten intakten und die von der Pflanze gebildeten defekten Transportproteine bilden gemeinsam Mischkomplexe. Diese können die Virus-RNA nicht in die für den Transport von Zelle zu Zelle erforderliche Form bringen. Damit bleibt die Virusinfektion auf die infizierte Zelle beschränkt und die weitere Ausbreitung des Virus in der Pflanze ist behindert.

## Erste Versuche im Gewächshaus

Zunächst führten unsere Mitarbeiter Tests an Pflanzen im Gewächshaus durch. Dazu prüften sie die PLRV-anfällige Sorte Désirée und die aus dieser Sorte gewonnenen gentechnisch veränderten Linien auf ihre Widerstandsfähigkeit. Sie pflanzten mit PLRV infizierte Stengelteile auf gentechnisch veränderte Pflanzen und erzeugten so Primärinfektionen. Aus den Knollen zogen die Forscher neue Pflanzen heran und stellten die Konzentration

Das Transportprotein des PLRV bringt das Genom des Virus in eine Form, die es ihm ermöglicht, durch die natürlichen Öffnungen (Plasmodesmen) zwischen den Zellen zu wandern. Es enthält einen Teil (A), der an die Erbsubstanz bindet. Mit einem weiteren Teil (B) nimmt es Kontakt zu anderen gleichartigen Molekülen auf. Ist dieser Teil des Proteins verändert (C), dann kann es zwar nach diesem Modell noch an das Genom binden und Kontakt zu

anderen nicht veränderten Proteinen aufnehmen. Eine Bindung wie im linken Teil der Abbildung, die einen Transport des Virus von Zelle zu Zelle erlaubt, ist aber nicht mehr möglich. Somit kann sich das Virus nicht in der Pflanze ausbreiten und die Infektion bleibt auf einen kleinen Bereich der Pflanze beschränkt.



von Viren in den Blättern dieser neuen Pflanzen fest. Das Resultat: Im Durchschnitt enthielten die gentechnisch veränderten Pflanzen 2/3 weniger Viren als die Kontrollpflanzen. Im Gegensatz zu letzteren zeigten sie nur sehr schwach ausgeprägte Symptome der Krankheit.

## Der Versuch im Freiland

Im Jahre 1994 erfolgte auf dem Versuchsgelände des MPIZ in Köln der erste Freilandversuch, um die im Gewächshaus gewonnenen Ergebnisse unter Freilandbedingungen zu überprüfen. 300 gentechnisch veränderte Kartoffelpflanzen und 60 Kontrollpflanzen pflanzte unsere Mitarbeiter im Mai aus. Daneben wuchsen 180 unveränderte, aber mit PLRV infizierte Kartoffelpflanzen. Damit erhöhten die Wissenschaftler die Wahrscheinlichkeit, daß das Virus die zu untersuchenden Pflanzen auch infiziert. Anfang August vernichteten Gegner der Gentechnik den Versuch mit einem Herbizid. Trotzdem ernteten die Wissenschaftler noch Ende August Knollen, um den Gehalt an Virus in

Der Freilandversuch mit gentechnisch veränderten virusresistenten Kartoffelpflanzen im Juli 1994. Er wurde im darauf folgenden Monat August zerstört.



den daraus heranwachsenden Pflanzen festzustellen. Diese keimten aber in den folgenden Untersuchungen schlecht: Rückstände des Herbizides hatten sich in den Knollen angereichert. Eine Auswertung des Versuchs war nicht mehr möglich.

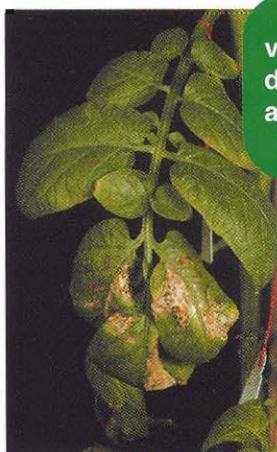
## Breitbandresistenz gegen Viruskrankheiten

In weiteren Forschungsarbeiten untersuchten unsere Mitarbeiter die Wirkung des Schutzmechanismus auf der Basis des gentechnisch veränderten PLRV-Transportproteins gegen andere wichtige Kartoffelviren wie PVY und PVX. Da das PLRV-Transportprotein in Laborexperimenten unspezifisch an einzelsträngige Nucleinsäure bindet, erschien es durchaus denkbar, daß dieses in den gentechnisch veränderten Pflanzen auch die Ausbreitung anderer einzelsträngiger RNA-Viren blockiert. Versuche im Gewächshaus bestätigten dies



schließlich: Die gentechnisch veränderten Pflanzen zeigten sich auch gegen das PVX und das PVY widerstandsfähig: Sie wiesen eine **Breitbandresistenz** gegen Virusinfektionen auf. Sofern Freilandex-

Die Blätter der nicht gentechnisch veränderten, aber mit Virus infizierten Kontrollpflanzen sind fast vollständig abgestorben.



Bei den gentechnisch veränderten Pflanzen bleibt das abgestorbene Gewebe auf den Bereich der Infektionsstelle begrenzt.

perimente zu ähnlich positiven Ergebnissen wie bei den Gewächshausversuchen führen, könnte der gentechnisch induzierte Schutzmechanismus neue Perspektiven bei der Züchtung virusresistenter Kartoffelsorten eröffnen und in Zukunft zur Einsparung synthetischer Spritzmittel führen.

**Text:** W. Schuchert, W. Rohde, E. Peerenboom

**Layout & Satz:** E. Peerenboom

**Bildnachweis:** H.-L. Weidemann, F. Furkert, M. Kalda, Ciba Geigy

**Druck:** Druckerei Reintjes Kleve

**Herausgeber:** MPI für Züchtungsforschung

Carl-von-Linné-Weg 10, D-50829 Köln

Nachbestellung von MPIZ aktuell gegen eine

Schutzgebühr von 0,50 DM pro Exemplar zuzüglich Porto ab 10 Exemplare schriftlich oder telefonisch unter Tel.: 0221 5062 501, Fax: 0221 5062 513

MPIZ aktuell ist ebenfalls über Internet abrufbar unter <http://www.mpiz-koeln.mpg.de/~rsaedler/>

MPIZaktuell/MPIZaktuell.html

© 1996 W. Schuchert, E. Peerenboom und MPI für Züchtungsforschung