

Professor Dr. Kornelia Smalla
Julius Kühn-Institut
Messeweg 11-12
38104 Braunschweig

Forschungszentrum Jülich
Projektträger (PTJ)
z. Hd. Herrn Dr. P.-F. Langenbruch
52425 Jülich

Braunschweig, 28.05.2009

Abschlussbericht:

BMBF-Schwerpunkt: „Biologische Sicherheit gentechnisch veränderter Pflanzen“

Forschungsverbund:

Einfluss des Anbaus transgener Kartoffeln auf die Qualität von landwirtschaftlich genutzten Böden (Förderkennzeichen: 0313277)

Teilprojekt: Einfluss des Anbaus von transgenen Kartoffeln auf die funktionelle und strukturelle Diversität von Rhizosphären-, Endorrhiza- und Geocaulosphäre-assoziierten Bakterien und Pilzen, insbesondere auf deren antagonistisches Potential (Förderkennzeichen: 0313277B)

Antragsteller: Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (heutiges Julius Kühn-Institut Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen)

Laufzeit: 01.04.2005 – 31.03.2008 (kostenneutral verlängert bis 31.07.2008)

1. Bericht – Projektziele

1.1. Aufgabenstellung:

Mit dem Teilprojekt sollten mögliche Effekte des Anbaus von Zeaxanthin produzierenden transgenen Kartoffeln auf die strukturelle und funktionelle Diversität von Rhizosphären-, Endorrhiza- und Geocaulosphäre-assoziierten Bakterien und Pilzen, insbesondere auf deren antagonistisches Potential untersucht werden. An zwei Standorten sollten transgene Zeaxanthin produzierende Linien, die Ausgangslinie und vier weitere konventionelle Kartoffelsorten angebaut werden. Der experimentelle Ansatz zur Untersuchung möglicher Effekte auf die Bodenmikroflora umfasste kultivierungsabhängige und -unabhängige Methoden. Die Untersuchung der Funktionalität der Mikroflora, insbesondere des antagonistischen Potentials, stand im Vordergrund. Basierend auf der Hypothese, dass durch die Reduzierung der Zeaxanthin-Epoxydase neben der Zeaxanthin-Produktion weitere Stoffwechselforgänge sowie die Wurzelexsudation der Kartoffel beeinflusst werden, sollte untersucht werden, inwieweit dadurch die funktionelle und strukturelle Diversität der Rhizosphären-, Endorrhiza- und Geocaulosphäre bei Zeaxanthin-Kartoffeln im Vergleich zur transgenen Kontrolle und zur nichtveränderten Ausgangssorte verändert wird. Weiterhin sollte die Hypothese, dass Unterschiede zwischen der Ausgangssorte und der gentechnisch veränderten Linie nicht größer sind als übliche Sorteneffekte, getestet werden. Es sollte eine Kombination aus etablierten methodischen Ansätzen (Screening antagonistischer Isolate, DGGE von 16S bzw. 18S rRNA-Genfragmenten) und neuen Monitoring-Methoden (Gene arrays) eingesetzt werden, die zum Teil deutlich empfindlicher als bislang genutzte Ansätze sind. Durch das geplante Versuchsdesign sollte es möglich werden, folgende Effekte und Einflussgrößen vergleichend zu analysieren:

- Effekte klassischer Sorten vs. Effekte transgener Linien
- Effekte unterschiedlicher transgener Linien mit dem gleichen Phänotyp
- Variabilität innerhalb einer Vegetationsperiode zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Pflanze
- Einfluss des Standortes.

Als Modell für die Beantwortung dieser Fragen dienten zwei transgene Kartoffellinien, die so verändert wurden, dass Zeaxanthin in den Knollen angereichert wird. Da gerade in Industrieländern ein Großteil der Bevölkerung bedingt durch falsche Ernährung an einer Unterversorgung mit Zeaxanthin leidet, was hier zu einer Zunahme an Altersblindheit geführt hat, sollten die beiden untersuchten Linien als „Designer Food“ Anwendung finden;

entsprechende Vorversuche waren zu Beginn des Projektes erfolgreich abgeschlossen worden.

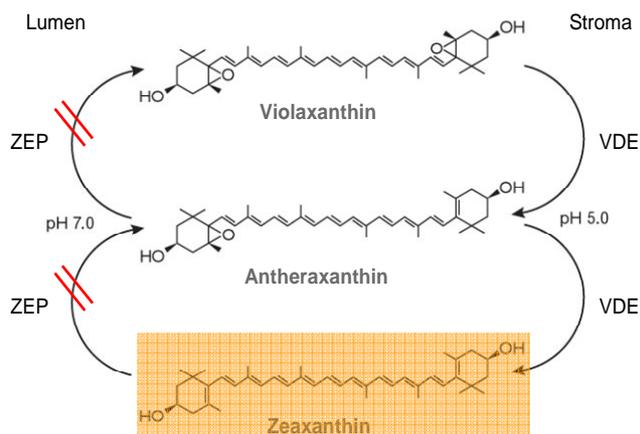
1.2. Die transgenen Kartoffellinien

Die gentechnische Veränderung der Zeaxanthin-Kartoffel beruht auf einer Übertragung des cDNA-Fragments der Zeaxanthin-Epoxydase. Die Expression findet unter Kontrolle des knollenspezifischen GBSS-Promotors und des Terminators des Nopalinsynthasegens aus *A. tumefaciens* statt. Das Genfragment wurde sowohl in sense- als auch antisense-Orientierung übertragen. Die resultierende Ko-Suppression (sense SR47) bzw. Antisense-RNA (antisense SR48) führt zu einer Verschiebung des Stoffwechselgleichgewichts der Carotinoide vom Violaxanthin zum Zeaxanthin in den Knollen (Abbildung 1). 'Northern Blot'-Analysen zeigten, dass es in den gentechnisch veränderten Kartoffelknollen zu einer deutlichen Reduktion der Zeaxanthin-Epoxydase kommt. Trotz des knollenspezifischen GBSS-Promotors wurde jedoch auch bereits in den Blättern eine mäßige Reduktion der Zeaxanthin-Epoxydase beobachtet. Da Violaxanthin für die Biosynthese von Abszinsäure, einem Phytohormon, das verschiedene physiologische Prozesse in der Pflanze steuert, benötigt wird, war eine Beeinflussung anderer Stoffwechselprozesse durch die gentechnische Veränderung zu Projektbeginn nicht auszuschließen (Freisetzungsantrag; Aktenzeichen 6786-01-0135).

1.3. Felddesign und Probenahmen

Im Rahmen des BMBF-Verbundprojekts wurde durch den Koordinator Dr. Michael Schlöter und Prof. Dr. G. Wenzel (Technische Universität München) die Durchführung der Feldversuche geplant und entsprechende Freisetzungsanträge für die beiden transgenen, Zeaxanthin-überproduzierenden Linien (SR47 und SR48) vorbereitet und gestellt. Ursprünglich waren Freisetzungen 2005, 2006 und 2007 an den Standorten in Roggenstein und Oberviehhausen geplant. Durch zeitliche Verzögerungen während der Antragsstellung fanden Freisetzungen von SR47 und SR48 in Roggenstein 2005 und 2007 sowie in Oberviehhausen 2006 und 2007 statt. Die Feldversuche wurden von J. Dennert in Roggenstein (Oberbayern) und X.F. Maidl in Oberviehhausen (Niederbayern) entsprechend der üblichen landwirtschaftlichen Praxis betreut.

Die zwei transgenen Linien sowie die Ausgangssorte ‚Baltica‘, die Sorten ‚Désirée‘, ‚Selma‘, ‚Ditta‘ (jeweils Speisekartoffeln) und ‚SIBU‘ (Industriestärkekartoffel) wurden entsprechend dem in Abbildung 2 dargestellten Felddesign in einer randomisierten Plot-Anlage mit sechs Wiederholungen pro Sorte/Linie angebaut und zu drei Zeitpunkten (EC30, EC60, EC90) während der Vegetationsperiode beprobt.



VDE, Violaxanthin-Deepoxidase; ZEP, Zeaxanthin-Epoxidase

Abbildung 1: Stoffwechselwege, die zur Bildung bzw. zum Abbau von Zeaxanthin in Kartoffeln führen

Die TU München hat bereits seit 1993 Freisetzungsversuche mit transgenen landwirtschaftlichen Kulturpflanzen für verschiedene Forschungseinrichtungen und Firmen (Fa. PLANTA GmbH, Fa. SakaRagis, Universität Göttingen, Universität Tübingen, GSF Neuherberg, BBA Braunschweig) durchgeführt. Dabei standen Untersuchungen mit transgenen Zuckerrüben und Kartoffeln im Mittelpunkt der Arbeiten, und so lagen umfangreiche Erfahrungen in der Durchführung von Versuchen mit landwirtschaftlichen Kulturpflanzen und insbesondere auch mit Freisetzungsversuchen von transgenen Pflanzen vor. Die Projektleiterin Frau Prof. Dr. Smalla sowie Frau Prof. Dr. Berg hatten durch verschiedene BMBF-, aber auch DFG-geförderte Projekte Erfahrungen mit der Analyse der bakteriellen und pilzlichen Gemeinschaften in der Rhizo- und der Geocaulosphäre. Im Rahmen dieses Verbundprojekts wurden die bakteriellen Gemeinschaften in der Arbeitsgruppe Smalla (Braunschweig) und die pilzlichen Gemeinschaften in der Arbeitsgruppe Berg (Graz, Österreich) untersucht. Für die Durchführung der Array-Untersuchungen war die Zusammenarbeit mit Prof. Dr. J. Zhou (Oklahoma, USA) und Prof. Dr. G. Anderson (Berkeley, USA) wesentlich.

1.4. Planung und Ablauf des Vorhabens:

Freilandversuch

Um die Frage zu beantworten, inwieweit sich standortspezifische Eigenschaften (Bodentyp, Witterung, Pflanzenschutz) auf die zu untersuchenden Parameter auswirken, wurden zwei Standorte ausgewählt: Im Jahr 2005 wurde für die Versuche ein bereits bestehender

Freisetzungsversuch auf dem Versuchsgut in Roggenstein (Landkreis Fürstenfeldbruck) genutzt. Auf einer Versuchsfläche von 5.400 m² wurden hier ca. 1.500 transgene Knollen von zwei verschiedenen Linien (SR47 und SR48) sowie die nicht-transgene Ausgangssorte ‚Baltica‘ und die Vergleichssorten ‚SIBU‘, ‚Désirée‘, ‚Ditta‘ und ‚Selma‘ angebaut. Im Versuchsjahr 2006 sollte ein zweiter Freisetzungsstandort in Oberviehhausen (Landkreis Deggendorf) verfügbar sein. Somit sollte 2007 die Freisetzung parallel an zwei Standorten erfolgen. Für die Durchführung der Versuche wurde eine Versuchsanlage mit randomisiertem Blockdesign an beiden Standorten gewählt (Abbildung 2).

Probenahmen erfolgten an beiden Standorten (Roggenstein und Oberviehhausen) in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Kartoffeln zu drei Terminen in der Vegetationsperiode (im ersten Projektjahr nur Roggenstein):

- PN1: ca. Ende Mai/Juni (Makrostadium 1, Blattentwicklung, keine Knollenbildung)
- PN2: im Juli (Makrostadium 6, Blüte, ca. 30% der Knollenmasse)
- PN3: Ende September (Makrostadium 9, Absterben der Pflanze, Knollen schalenfest und voll ausgebildet).

Die Definition der Makrostadien erfolgte nach Hack et al. (1993).

Die Probennahmen erfolgten jeweils getrennt nach Blöcken, so dass jeweils maximal sechs echte Replikate analysiert werden konnten. Aus jedem Block wurde eine Sammelprobe von jeweils 3-5 Pflanzen genommen (abhängig vom Entwicklungsstadium; PN1: 5 Pflanzen, PN2+3: 3 Pflanzen). Für die Analyse der mikrobiellen Gemeinschaften in der Rhizosphäre wurden die Pflanzen mit einer Grabegabel vorsichtig aus dem Boden entfernt, geschüttelt, um lose anhaftenden Boden abzutrennen. Die vollständigen Wurzeln von 3-5 Pflanzen wurden zerschnitten und gemischt. Ein Teil wurde sofort vor Ort in flüssigem Stickstoff und Trockeneis eingefroren. Für die kultivierungsabhängige und -unabhängige Analyse (AG Smalla und AG Berg) wurden 10 g Wurzel mit 30 ml sterilem Milli-Q Wasser in einem Stomacher-Beutel re-suspendiert und mit Hilfe eines Stomachers mechanisch die an den Wurzeln anhaftenden Mikroorganismen abgelöst. Der Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Ein Milliliter der ca. 100 ml Suspension wurde nach serieller Verdünnung im Doppel auf R2A-Medium und SNA ausgestrichen. Nach hochtouriger Zentrifugation der Mikroorganismen-Suspension wurde das Zellpellet gewonnen. Von diesem Mikroorganismen-Pellet wurden 0.5 g zur Extraktion der Gesamt-DNA mit Hilfe des BIO101 Kits genutzt. Die erhaltene „total community“ DNA wurde mit dem Gene Clean Kit gereinigt