

Erste Untersuchungen zum systemischen Transport von Silencing Signalen an Apfel

Henryk Flachowsky¹, Iris Szankowski², Hohua Li², Thilo Fischer³, Gerd Forkmann³, Dieter Treutter⁴, Conny Hättasch¹, Magda-Viola Hanke¹, Karl Stich⁵, Heidi Halbwirth⁵

¹ Institut für Obstzüchtung, Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Dresden

² Institut für Biologische Produktionssysteme, Fachgebiet Produktqualität - Obstbau, Universität Hannover

³ Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Department für Pflanzenwissenschaften, Lehrstuhl für Zierpflanzenbau und Gartenbauliche Pflanzenzüchtung, Freising

⁴ Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, Department für Pflanzenwissenschaften, Fachgebiet Obstbau – Physiologie der Obstgehölze

⁵ Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften, Technische Universität Wien

Das Stilllegen von Genen („Gene Silencing“) hat sich in den letzten Jahren zu einer der am häufigsten angewandten Techniken in der pflanzlichen Biotechnologie und Gentechnik entwickelt. Neben einer breiten Anwendung in der Grundlagenforschung gewinnt das auf RNA Interferenz (RNAi) basierende Verfahren auch an Bedeutung als gentechnische Methode in der Obstzüchtung. Von besonderem Interesse ist dabei die Möglichkeit des systemischen Transportes von kurzen, so genannten short interfering RNA's (siRNA's) aus transgenen Unterlagen ins Edelreis.

Die Existenz eines solchen Transportes wurde an Tabak bereits mehrfach beschrieben. Ob es einen solchen Transport auch in holzigen Pflanzen gibt, ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Aus diesem Grund beschäftigt sich das hier präsentierte Projekt mit ersten Untersuchungen zur Existenz eines systemisch induzierten Gene Silencing in Obstgehölzen. Dabei sollen in einem ersten Ansatz zwei Gene der Anthocyanbiosynthese des Apfels ausgeschaltet werden. Bei diesen Genen handelt es sich um die Anthocyanidinsynthase (ANS) sowie die UDP Glukose: 3-O-Glukosyltransferase (F3GT). Beide Gene spielen eine wesentliche Rolle bei der Rotfärbung von Apfelgeweben. Eine Blockierung dieser Gene müsste folglich in einem Abbruch der Anthocyanbiosynthese resultieren. Damit sollte es möglich sein, rotlaubige Apfelgenotypen zu entfärben. Diese Entfärbung wird dann für ein morphologisches Monitoring des systemisch vermittelten Silencing benutzt, indem nicht-transgene Reiser des rotlaubigen Genotyps TNR 31-35 der Apfelwildart *Malus sieversii* var. *sieversii* f. *niedzwetzkyana* auf transgene, Silencing-vermittelnde Apfelpflanzen veredelt werden.

Für das Ausschalten der beiden Gene wurden transgene Pflanzen hergestellt, die doppelsträngige RNA's mit Homologie zu jeweils einem Gen exprimieren. So

war es bislang möglich, transgene Linien der Sorten 'Pinova' und 'Holsteiner Cox' sowie des Genotypen TNR 31-35 zu erzeugen, die ein entsprechendes ANS- bzw. F3GT-Silencing Konstrukt integriert haben und stabil exprimieren. Vor allem bei den TNR 31-35 ANS-Silencing transgenen Pflanzen kam es dabei zu einer deutlichen Entfärbung des Laubes. Einzelne Pflanzen ausgewählter Linien wurden bewurzelt und ins Gewächshaus bzw. Saranzelt überführt. Dort erfolgten bereits Veredlungen mit nicht-transgenen Reisern von TNR 31-35. Erste Untersuchungen zur mRNA Expression der ANS an den nicht-transgenen Reisern mittels quantitativer Real-Time PCR deuten auf einen möglichen systemischen Transport des Gene Silencing hin. Momentan durchgeführte Analysen zur Enzymaktivität sowie eine umfangreiche Inhaltsstoffanalyse mittels HPLC sollen weiteren Aufschluss dazu geben. Eine abschließende Bewertung dieses Systems sollte in spätestens einem Jahr möglich sein.

In einem zweiten Ansatz soll ein Blührepressorgen des Apfels stillgelegt werden. Dieser Ansatz hat vor allem praktische Relevanz, da die lange juvenile Phase des Apfels einen der limitierenden Faktoren in der Obstzüchtung darstellt. Auch für diesen Ansatz wurden bereits Konstrukte hergestellt und für erste Transformationen benutzt.