

Josef G. Knoll-Wissenschaftspreisträger 1996

Josef G. Knoll-Science Award Winner 1996

**Joachim Wünn: „Entwicklung einer schädlingsresistenten Indicareis-Varietät“,
ETH Zürich, 1996**

Resümee

Problemstellung

Reis (*Oryza sativa*) zählt neben Weizen und Mais zu den wichtigsten Kulturpflanzen der Erde. Gegenwärtig werden weltweit auf rund 145 Millionen ha Land ca. 530 Millionen t Reis pro Jahr geerntet. 95% der Weltereisenernte wächst in Entwicklungsländern heran und basiert im wesentlichen auf Indica Reissorten, die nur in subtropischen und tropischen Klimagebieten angebaut werden können. Lediglich 3-4% der Weltereisenernte werden exportiert, der Rest wird in den produzierenden Ländern direkt konsumiert, wo Reis meist die wichtigste Kohlenhydratquelle darstellt und bis zu 77% der täglichen Gesamtkalorienaufnahme auf Reis zurückgeht.

In den letzten 30 Jahren ist die Weltereisproduktion um rund 75% gestiegen, wobei die Anbaufläche um lediglich 20% ausgedehnt wurde. Begonnen hat diese Ertragssteigerung mit den vom Internationalen Reiserforschungszentrum (IRRI) entwickelten Hochleistungssorten, darunter dem „Wunderreis“ IR 8, die in den 60-iger Jahren die Grüne Revolution ermöglichten. Die fortlaufende Verbesserung der IRRI-Zuchtlinien, der Einsatz neuer Bewässerungstechniken und die Anwendung neuer Dünge- und Schädlingsbekämpfungsmittel haben dazu beigetragen, daß die Reisproduktion mit dem Bevölkerungswachstum in den reisproduzierenden Ländern Schritt halten konnte.

Ein Blick in die Zukunft sieht jedoch weitaus schlechter aus. Berechnungen der FAO (Food and Agriculture Organisation der UN) prognostizieren für die Bevölkerung des semihumiden und humiden Asiens eine Zunahme in den kommenden 35 Jahren um mehr als 1 Milliarde Menschen oder 58%, was einem Mehrbedarf von 240 Millionen t Reis pro Jahr entspricht. Diese rund 800 Millionen t Reis müssen dabei noch unter weitaus schwierigeren Bedingungen produziert werden als gegenwärtig, da die zur Verfügung stehende Anbaufläche immer mehr abnimmt. Dies liegt hauptsächlich daran, daß die Bauern vermehrt gewinnbringendere Produkte anbauen (Gemüse, Früchte, Gewürze, Blumen, Ölsaaten) und sich das expandierende Asien wachsenden Verkehrs- und Siedlungsansprüchen gegenüber sieht.

Hinzu kommt die Forderung nach einer deutlichen Reduktion des Agrochemikalieneinsatzes (Düngemittel, Pestizide), denn eine übermäßige Anwendung dieser Mittel hat schon jetzt manche Böden ausgelaugt und zum Verlust wertvollen Ackerlandes geführt.

Die Ernährungssicherung in diesen Ländern stellt somit eine immense Herausforderung dar, die durch den Einsatz konventioneller Züchtungsmethoden alleine nicht bewältigt werden kann. So gehen jährlich mehr als 200 Millionen t Reis durch den Einfluß biotischer und abiotischer Streßfaktoren verloren. Verluste, die durch die klassische Resistenzzüchtung

bislang nicht verhindert werden konnten. Reiszüchter hoffen nun, daß durch den Einsatz der Gentechnik Ernteverluste, die durch Viren, Bakterien, Pilze und Insekten hervorgerufen werden, entscheidend eingeschränkt werden können.

Eine Möglichkeit, diese enormen Ertragsverluste zu reduzieren besteht in der Entwicklung einer schädlingsresistenten Reisvarietät. Von den rund 100 verschiedenen Insektenarten, die Reis befallen können, verursachen 20 ökonomische Schäden. Die Stem Borer (Lepidoptera) gehören dabei zu den schlimmsten Schädlingen. In Asien verursachen der Yellow Stem Borer, YSB, (*Scirpophaga incertulas*) und der Striped Stem Borer, SSB, (*Chilo suppressalis*) einen durchschnittlichen Schaden von 5-10% der jährlichen Reisernte, wobei auch schon von örtlich auftretenden Schadensmaxima von 60-95% berichtet wurde.

Die Schäden des Yellow Stem Borer werden nicht von der adulten Motte, sondern von den verschiedenen Larvenstadien hervorgerufen. Diese dringen an der Basis der Reispflanze in den Stengel ein und ernähren sich vom Gewebe im Stengel. Nach Vollendung des 5. Larvenstadiums findet die Verpuppung statt und wenige Tage später verläßt die adulte Motte den Stengel.

Die älteren Larvenstadien wachsen zu beachtlicher Größe heran und füllen den gesamten Stengelquerschnitt aus. Dies führt zur kompletten Unterbrechung der Wasser- und Nährstoffversorgung der Reispflanze. Als Folge davon können die Körner der sich entwickelnden Reispflanze nicht mit Nährstoffen gefüllt werden, die gesamte Rispe bleibt leer.

Forschungsfrage

Die Entwicklung einer Stem Borer-resistenten Reisvarietät mittels klassischer Züchtung scheiterte bislang an der Existenz geeigneter Resistenzgene im Genpool von Reis. Am Internationalen Reisforschungsinstitut (IRRI) auf den Philippinen wurden zwar schon mehr als 30.000 verschiedene Reisvarietäten auf eine solche Resistenz hin untersucht, doch konnte bislang keine zufriedenstellende Stem Borer-Resistenz gefunden werden.

Mit der Möglichkeit auch artfremde Gene auf höhere Pflanzen zu übertragen, kann die Gentechnik die klassische Pflanzenzüchtung in wichtigen Bereichen unterstützen. Die Entwicklung insektenresistenter Varietäten verschiedener agronomisch wichtiger Pflanzenarten gibt hierfür ein eindruckliches Beispiel. Bei Mais, Baumwolle und Kartoffel konnte beispielsweise durch die Übertragung eines sog. cry-Gens von dem Bodenbakterium *Bacillus thuringiensis* (Bt) eine Resistenz gegen wichtige Schädlinge erzielt werden. Die ersten Bt-resistenten Pflanzen wurden Anfang dieses Jahres in den USA auf den Markt gebracht.

Da Fütterungsversuche am IRRI gezeigt hatten, daß verschiedene Stem Borer-Larven mit best. Bt-Proteinen bekämpft werden können, ergab sich zu Beginn der hier vorgestellten Arbeit folgende Fragestellung:

- können die in anderen Systemen erfolgreich eingesetzten cry-Gene von *Bacillus thuringiensis* auch in Reis zur Expression gebracht werden?
- können solche Gene stabil auf eine der Hochleistungssorten des IRRI übertragen werden?

- können Bt-Reispflanzen den von Stem Borer-Larven verursachten Schaden verringern?

Zielsetzung

1. Etablierung eines effizienten Transformationssystems für Reis

Die überwiegende Mehrheit der weltweit kultivierten Reissorten gehört zur Spezies *Oryza sativa*. Diese wiederum unterteilt sich in die drei Untergruppen Indica, Japonica und Javanica. Die bei weitem wichtigste Bedeutung kommt dabei den Indicareis-Varietäten zu, die in tropischen und subtropischen Klimagebieten angebaut werden. Rund 80% der Weltreisproduktion basiert auf diesen Sorten. Um einen Beitrag zur Ernährungssicherung in Entwicklungsländern leisten zu können, genügt es daher nicht, mit irgendeinem bereitwillig reagierenden "Laborreis" zu arbeiten. Vielmehr ist es unabdingbar, mit den Zuchtlinien zu experimentieren, die die Grundlage für die Reiszüchtung in den betroffenen Ländern darstellen, den Indicareis-Sorten des IRRI. Mittlerweile ist dies, wenn auch nur in beschränktem Umfang, möglich. Verbesserungen, die die Transformationseffizienz steigern könnten, werden deshalb laufend versucht.

2. Identifizierung eines geeigneten Genkonstruktes

Bevor die eigentliche Transformation begonnen werden konnte, mußte zunächst ein für die Expression in Reis geeignetes Genkonstrukt gefunden werden. Verschiedene Arbeiten hatten gezeigt, daß nur der Einsatz eines synthetischen Bt-Gens, bei dem die Nukleotidsequenz für eine Expression in monokotylen Pflanzen optimiert wurde, Aussicht auf Erfolg verspricht.

3. Transfer des Bt-Gens auf eine IRRI-Hochleistungssorte

Nach experimenteller Abklärung der ersten beiden Punkte sollte das für geeignet befundene Genkonstrukt auf eine Hochleistungssorte des IRRI übertragen werden, um so eine Resistenz gegen Stem Borer zu erhalten.

4. Nicht-kommerzielle Verbreitung des entwickelten Bt-Saatguts

Ein sehr wichtiges Ziel dieser Arbeit stellt die nicht-kommerzielle Verbreitung des an der ETH Zürich entwickelten transgenen Reissaatguts dar. Dies soll durch die Zusammenarbeit von nicht-profitorientierten Institutionen (ETH, IRRI) und der kostenlosen zur Verfügungstellung des synthetischen cryIA(b)-Gens von Ciba-Geigy ermöglicht werden.

Methodisches Vorgehen

1. Etablierung eines effizienten Transformationssystems für Reis

Um ein möglichst effizientes Transformationssystem einsetzen zu können, wurden fünf verschiedene Methoden miteinander verglichen:

- Direkter Gentransfer in Protoplasten

- Partikelbeschuß von embryogenen Zellsuspensionen
- Partikelbeschuß von unreifen zygotischen Embryonen mittels Microtargeting
- Partikelbeschuß von unreifen zygotischen Embryonen mittels einer Particle Inflow Gun
- Agrobakterium vermittelter Gentransfer

2. Identifizierung eines geeigneten Genkonstruktes

Um ein für die Expression in Reis geeignetes Genkonstrukt zu finden, wurden zwei verschiedene Bt-Gene miteinander verglichen. Dazu wurden Reisprotoplasten mit diesen Genen transformiert und deren transiente Expressionsrate anhand eines Proteinnachweises (ELISA) und eines Insekten-Fütterungsversuches überprüft.

3. Transfer des Bt-Gens auf eine IRRI-Hochleistungssorte

Schließlich wurde das synthetische cryIA(b)-Gen zum Partikelbeschuß unreifer zygotischer Embryonen verschiedener IRRI-Hochleistungssorten eingesetzt. Hygromycin-resistente Pflanzen wurden mittels verschiedenen gängigen Untersuchungsmethoden (Southern Blot, Dot Blot, ELISA, Western Blot) und einem Insekten-Fütterungsversuch auf ihren transgenen Charakter hin untersucht. Bt-positives Saatgut der IRRI-Hochleistungssorte IR 58 wurde an das IRRI übergeben um es dort unter praxisnaheren Bedingungen zu testen, als dies im Labor der ETH Zürich möglich ist. Diese Tests blieben aber auf das Gewächshaus beschränkt, da bislang in Asien noch keine Genehmigung für einen Freilandversuch mit Bt-transgenen Pflanzen genehmigt wurde.

Empirische Grundlagen und Ergebnisse

Der Vergleich der verschiedenen Transformationssysteme fiel zu Gunsten des Partikelbeschusses unreifer zygotischer Embryonen aus, da hier auf die Etablierung einer Zellsuspensionskultur verzichtet werden kann. Die Etablierung einer solchen Suspension erfordert, besonders für Indicareis, große Erfahrung im Umgang mit Gewebekulturen, einen hohen Arbeitsaufwand und birgt außerdem ein erhöhtes Risiko der Produktion von Pflanzen mit abnormalem Phänotyp (Albinismus, Zwergwuchs, Sterilität).

Für den Partikelbeschuß kam überwiegend die Particle Inflow Gun (PIG) zum Einsatz, da hier bis zu 30 vorkultivierte zygotische Embryonen auf einmal beschossen werden konnten.

Da die transienten Protoplastentransformationen die Vermutung bestätigt hatten, daß sich das synthetische cryIA(b)-Gen für eine Expression in Reis eignet, wurde für den überwiegenden Teil der in dieser Arbeit vorgestellten stabilen Transformationversuche dieses Konstrukt eingesetzt. Dabei konnte die Indicareis-Zuchtlinie IR58 erfolgreich mit diesem Lepidopteren-spezifischen Bt-Gen transformiert werden. Eingehende Analysen der ersten drei Generationen zeigten,

- daß das cryIA(b)-Gen stabil in das Genom der Reisvarietät IR58 integriert wurde
- daß das Transgen an einem einzigen Locus des Reisgenoms integriert wurde

- daß das cryIA(b)-Gen in den transgenen Pflanzen exprimiert wird
- und daß das gebildete Protein die erwartete Größe von 65 kDa aufweist.

Die insektiziden Eigenschaften des von den transgenen Reispflanzen produzierten Bt-Proteins wurden anhand von Fütterungsstudien, die zunächst im Labor an der ETH Zürich durchgeführt wurden, nachgewiesen. Larven des Yellow Stem Borer und des Striped Stem Borer zeigten nach 2-4 Tagen eine Mortalitätsrate von bis zu 100%. Im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrollpflanzen wies das Gewebe der Bt-exprimierenden Pflanzen nur äußerst geringe Fraßschäden auf.

Saatgut dieser Stem Borer-resistenten IR58 Pflanzen wurde an das IRRI überführt, um weitere Fütterungsversuche unter möglichst praxisnahen Bedingungen durchführen zu können. Dabei hat sich gezeigt, daß sich der an isolierten Blattstücken beobachtete Effekt auch auf ganze Pflanzen übertragen läßt. Vier bis fünf Wochen nach Versuchsbeginn zeigte rund ein Drittel der Rispen von nicht-transgenen Kontrollpflanzen Stem Borer-typische Fraßschäden (whiteheads). Von den eingesetzten Larven wurde ebenfalls ein Drittel lebend gefunden, entweder in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien, als Puppe oder gar als adulte Motte. Demgegenüber konnten im Falle der untersuchten Bt-Pflanzen keine überlebende Larven und auch keine Stem Borer-typischen Schäden festgestellt werden. Dies weist auf einen effizienten Schutz dieser Pflanzen gegen Stem Borer hin. Weitere Versuche, bei denen zunächst kleinere Pflanzenpopulationen im Gewächshaus und später größere Populationen im Freiland untersucht werden sollen, sind in Zusammenarbeit mit IRRI geplant, um so einen Überblick über das Verhalten dieser Pflanzen unter Praxisbedingungen zu bekommen.

Ein deutlicher Fraßschutz konnte außerdem auch gegen zwei in Asien weitverbreitete Blattschädlinge nachgewiesen werden (*Cnaphalocrocis medinalis* und *Marasmia patnalis*).

Da das synthetische cryIA(b)-Gen auf eine Hochleistungszuchtlinie des Internationalen Reisforschungszentrums (IRRI) übertragen wurde, besteht nun erstmals die Möglichkeit, ein Resistenzmerkmal gegen Stem Borer und Leaffolder mittels konventioneller Züchtungsmethoden auf andere moderne Reisvarietäten zu übertragen. Dies könnte dazu beitragen, die Stem Borer bedingten Ertragsverluste deutlich zu verringern.

Nach Aufnahme des hier beschriebenen Materials in das Züchtungsprogramm von IRRI ist eine kostenlose Abgabe neu entwickelter, Stem Borer-resistenter Sorten an die nationalen Reisforschungsinstitute vorgesehen, die sie ihrerseits, wiederum unentgeltlich, an lokale Reiszüchter abgeben. Damit ist eine nicht-kommerzielle Verbreitung dieses agronomisch wichtigen Merkmals und der Erhalt der Sortenvielfalt sichergestellt. Um keine neuen Abhängigkeiten zu schaffen, gehen die neuen Sorten von den lokalen Reiszüchtern schließlich in das Eigentum der Reisbauern über, die davon dann ihr eigens Saatgut produzieren können.

Joachim Wünn: Genetic Transformation of Rice (*Oryza sativa* L.) with cry Genes from *Bacillus thuringiensis* to Confer Resistance to Lepidopterous Insect Pests, ETH, Zürich, 1996