

Nachweissignale auf einem PCR-Gel (links); quantitative PCR

Biotechnologische Verfahren der Pathodiagnose

Phytopathogene Schaderreger werden mit konventionellen Verfahren wie Plattenkulturen, Mikroskopie und Biotest nachgewiesen, aber auch mit immunologischen (z.B. ELISA) und molekularbiologischen Techniken (z.B. PCR). Letztere zeichnen sich durch hohe Empfindlichkeit und Spezifität sowie „Schnelligkeit“ aus.

- Der immunologische Nachweis basiert auf der Reaktion von Eiweißstoffen (Antigenen) eines Erregers mit spezifischen Antikörpern. Diese wird beim ELISA durch einen Farbumschlag deutlich.

- Molekularbiologische Techniken weisen die DNA eines Erregers nach. In der PCR werden DNA-Bereiche mit Hilfe spezifischer Startermoleküle (Primer) millionenfach kopiert und über Gelelektrophorese sichtbar gemacht (qualitativer Nachweis). So werden auch sehr geringe Mengen eines Pathogens erfasst. Bei der quantitative PCR wird eine Fluoreszenzstrahlung freigesetzt. Der Zeitpunkt, an dem diese einen bestimmten Schwellenwert überschreitet, korreliert mit der Ergerkonzentration (quantitativer Nachweis).

Mit diesen Methoden werden Pilz-, Bakterien- und Viruskrankheiten in landwirtschaftlichen und gärtnerischen Kulturen nachgewiesen. Beispiele: Bakterielle Schleim- und Ringfäule, Krautfäule sowie Viruskrankheiten bei Kartoffeln; Wurzelbärtigkeit der Zuckerrübe, Mosaik- und Verzweigungsviren bei Getreide, Feuerbrand bei Obstgehölzen, Viroide bei Kartoffeln und Hopfen.



Genetischer Fingerabdruck zur Entwicklung von Markern



Markergestützte Selektion einer Pilzresistenz bei Gerste

Genomanalyse in der Pflanzenzüchtung

Die Genomanalyse ist mit den Techniken des genetischen Fingerabdrucks eine unverzichtbare Methode der modernen Züchtungsforschung. Sie erlaubt den schnellen und sicheren Nachweis der Vererbung wertvoller Gene bereits in einem frühen Entwicklungsstadium der Pflanze.

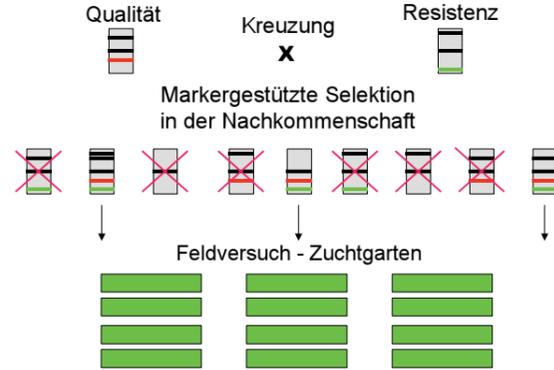
Die exakte Erfassung des zur Verfügung stehenden Genpools und die Beschreibung der genetisch bedingten Eigenschaften des Zuchtmaterials bezüglich Resistenz und Qualität, versetzt die Pflanzenzüchter in die Lage, gezielte Kreuzungen durchzuführen und die Vererbung relevanter Gene über Generationen hinweg verfolgen zu können. Insbesondere können mit Hilfe der Genomanalyse komplexe, auf mehreren Genen beruhende Zuchtmerkmale gezielt kombiniert und selektiert werden.

Vorteile der Genomanalyse:

- Eindeutige Erfassung genetischer Ressourcen
- Konsequente Auswahl geeigneter Kreuzungseltern
- Schnelle und sichere Selektion des Zuchtmaterials
- Gezielte Genkombination (Pyramidisierung)
- Umweltunabhängige und frühe Selektion
- Nachweis funktioneller Gene (Expressionsanalyse)
- Gleiche Markertechniken für alle Kulturarten

Impressum:
Herausgeber: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL),
Vöttinger Straße 38, 85354 Freising-Weihenstephan
Internet: <http://www.lfl.bayern.de>
Redaktion: Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung,
Am Gereuth 8, 85354 Freising, Tel. 08161/71-3637
E-Mail: Pflanzenbau@lfl.bayern.de

4. überarbeitete Auflage Juni / 2006
Druck: Druckhaus Kastner, 85283 Wolnzach
© LfL, alle Rechte vorbehalten



Schema einer „markergestützten Selektion“ in einer Kreuzungs-Nachkommenschaft

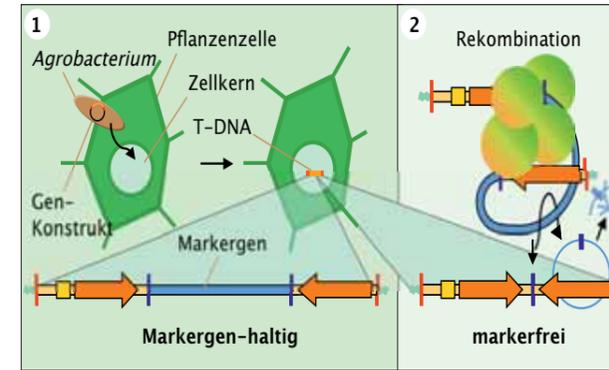
Die Eigenschaften unserer Kulturpflanzen werden durch das komplexe Zusammenspiel vieler Gene gesteuert. Jede Pflanze besitzt hierfür bis zu 40.000 Gene, die bei jeder Kreuzung neu kombiniert werden. Heute liegen für fast alle Kulturpflanzen molekulare Chromosomenkarten vor. Die Zuordnung von wertbestimmenden Eigenschaften wie Resistenz, Ertrag, Inhaltsstoffe, Verarbeitungsqualität usw. zu diesen molekulargenetischen Daten ist Inhalt der aktuellen Forschung.

Ziel ist es zunächst, DNA-Abschnitte (Marker) zu finden, die mit der relevanten Eigenschaft gekoppelt vererbt werden. Anschließend erfolgt die Lokalisierung der Marker in der Chromosomenkarte (Kartierung) und die Entwicklung einfacher Markertests (PCR-Analyse). Diese Schnelltests können frühzeitig am Sämling durchgeführt werden und liefern sichere Ergebnisse.

Die Weiterführung dieser Technik sind funktionelle Marker, die mit Gensequenzen bekannter Funktion identisch sind. Sie werden unter Einsatz der Expressionsanalyse entwickelt und ermöglichen die gezielte Selektion auch einzelner Allele eines Gens.

Die Genomanalyse ist ein entscheidendes Werkzeug, um den gesteigerten Anforderungen von Landwirtschaft und Verbrauchern sowie dem Umweltschutz durch gezielte Nutzung des genetischen Potenzials der Pflanzen gerecht zu werden.

An der LfL wird die Genomanalyse in Zucht- und Forschungsprogrammen bei Getreide, Hopfen und Kartoffeln eingesetzt: Beispiele sind die Erfassung und Integration neuer Resistenzquellen gegenüber Pilzen, Bakterien und Viren, Expressionsanalysen für Pilzresistenz und Brauqualität, Verbesserung von Brau-, Back- und Genussqualität sowie der Ertragsstabilität bei veränderten Umwelteinflüssen.

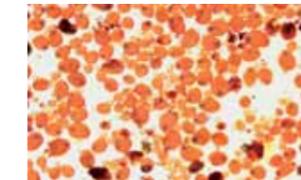
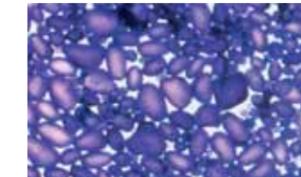


Markergen-gestützte Einführung von Merkmalen mittels *Agrobacterium tumefaciens* und gezielte Entfernung nicht benötigter Bereiche durch sequenzspezifische Rekombination

Gentransfer

Die moderne Pflanzenzüchtung kann mit den Techniken des Gentransfers zur Lösung klimatischer, wirtschaftlicher und ökologischer Herausforderungen einer nachhaltigen Landwirtschaft entscheidend beitragen. Spezielle Gene mit wertvollen Eigenschaften werden in Nutzpflanzen eingeführt. Solche Modifikationen sind bei einer gentechnisch veränderten Pflanze (GVP) vollständig nachvollziehbar. Integriertes Gen und Genort (beides zusammen bezeichnet man als Event) lassen sich mit Hilfe molekularer Marker und Sequenzanalyse exakt beschreiben und kontrollieren. GVP unterliegen weltweit und besonders in der EU strengen Gesetzen und Qualitätskontrollen. Daraus resultiert eine hohe Sicherheit für Mensch und Umwelt.

Es werden Genkonstrukte entwickelt, die eine minimale gentechnische Modifikation mit optimierten Sequenzelementen ermöglichen. Da oftmals nur in bestimmten Organen der GVP die neuen Eigenschaften erforderlich sind, werden gewebe-spezifische Steuerelemente (Promotoren) für eine bedarfs-gerechte Ausprägung der Gensequenzen eingebaut. Als natürliche Genfähre wird *Agrobacterium tumefaciens* zur Übertragung von Genen genutzt. Aus transgenen Pflanzenzellen werden in der Gewebekultur grüne Pflanzen regeneriert und mit molekulargenetischen Diagnoseverfahren in ihren Eigenschaften überprüft. An der LfL wird an der Entwicklung transgener Pflanzen bei Gerste, Hopfen und Kartoffel gearbeitet. Forschungsziele sind Krankheitsresistenz, die Anreicherung essentieller Aminosäuren und optimierte Stärkequalität.



Amylose-haltige Stärke (blau) und Stärke der Amylopektin-Kartoffel (rot)



Freisetzungversuch mit Amylopektin-Kartoffeln ohne Antibiotikum-Resistenzgen

Dabei werden verbesserte Transformationsverfahren zur Herstellung von GVP entwickelt. Ein wichtiges Ziel sind transgene Pflanzen ohne Markergene (z.B. Antibiotikum-Resistenzgen). Dazu werden molekulare Werkzeuge (Rekombinasen) eingesetzt, die gezielt solche unerwünschten DNA-Abschnitte (Markergene) nachträglich entfernen.

Zur Überprüfung der Sicherheit und Praxistauglichkeit von GVP müssen wissenschaftlich begleitete Anbauversuche durchgeführt werden. Dies wird durch das deutsche Gentechnikgesetz und EU-Rechtsvorschriften geregelt. Seit dem Jahr 1999 werden an der LfL Kartoffeln mit günstigen Stärkeeigenschaften im Feldanbau untersucht. Die neu entwickelte Amylopektin-Kartoffel ohne Antibiotikum-Resistenz wird seit 2004 auf Feldern der LfL geprüft.

Weltweit nimmt der Anbau von gentechnisch optimierten Pflanzen seit 1996 laufend zu. 2005 betrug die Ackerfläche mit GVP 90 Mio. ha, verteilt auf 21 Länder. Heute werden im großen Stil Soja, Mais, Baumwolle und Raps mit gentechnisch verbesserten Eigenschaften kommerziell genutzt.



Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft

Pflanzenzüchtung

Bio- und Gentechnologie





Von der Wildform zur heutigen Speisekartoffel

Pflanzenzüchtung

Die Pflanzenzüchtung ist das wichtigste Instrument, um Kulturpflanzen zu verbessern und sie den sich ändernden Bedürfnissen des Menschen anzupassen. Kulturpflanzen sind zunächst durch unbewusste, später durch bewusste Auslese aus Wildpflanzen entstanden. Gregor Mendel hat Ende des 19. Jahrhunderts die Gesetzmäßigkeiten der Vererbung erkannt und den Grundstein für eine wissenschaftliche Kreuzungszüchtung gelegt.

Noch heute ist die **Kombinationszüchtung** die vorherrschende Zuchtmethod. Sie ermöglicht über Kreuzungen unterschiedliche Merkmale von Pflanzen in deren Kreuzungsnachkommenschaft gezielt zu kombinieren und an die Folgegeneration zu vererben. Bis zur fertigen Sorte müssen zahlreiche Prüfungen auf Werteigenschaften durchgeführt werden. So dauert es heute, von der Kreuzung bis zur Sortenzulassung, etwa 12 –15 Jahre.

Die **Hybridzüchtung** ist eine Weiterentwicklung der Kombinationszüchtung. Ausgehend von zwei Inzuchtlinien, die selbst meist wenig ertragreich sind, entsteht bei ihrer Kreuzung Saatgut, aus dem sich hochertragreiche Pflanzen (Heterosiseffekt) entwickeln können.

Ziel der klassischen Züchtung ist die Entwicklung von Sorten mit

- Resistenzen gegenüber Krankheiten und Schädlingen,
- hoher Qualität,
- Ertragssicherheit und Ertragsleistung,
- guter regionaler Anbaueignung,

für eine umweltgerechte und nachhaltige Produktion von gesunden und qualitativ hochwertigen Nahrungsmitteln und Rohstoffen für die verarbeitende Industrie.



in vitro-Regeneration

Biotechnologie

Zur Unterstützung und Ergänzung der klassischen Zuchtmethoden werden biotechnologische Verfahren eingesetzt. Der Begriff Biotechnologie umfasst alle Arten der Zell- und Gewebekultur sowie gentechnologische Methoden.

Zell- und Gewebekultur

Die Zell- und Gewebekultur nutzt die Möglichkeiten, aus Einzelzellen oder Zellverbänden (Gewebe) vollständige Pflanzen unter sterilen Bedingungen im Glas (= in vitro) auf speziellen Nährmedien zu regenerieren.

Meristem-, Sprossspitzen- und Nodienkultur

Meristeme sind Gewebeabschnitte der äußersten Spross- und Wurzelspitzen sowie der Achselknospen (Nodien), in denen hohe Zellteilungsaktivität herrscht. Die Meristeme werden unter dem Mikroskop herauspräpariert und auf Nährmedium zu vollständigen Pflanzen regeneriert.

Bei der Sprossspitzen- und Nodienkultur werden in vitro, aus ca. 1 cm großen Gewebeteilen, ebenfalls vollständige Pflanzen entwickelt.

Einsatz der Meristem-, Sprossspitzen-, und Nodienkultur zur

- Virusfreimachung von wertvollem Zuchtmaterial
- Vermehrung genetisch identischer Pflanzen
- in vitro-Langzeitlagerung von Zuchtmaterial ohne Einfluss der Witterung.

Diese Methoden sind an der LfL bei Heil- und Gewürzpflanzen, Hopfen und Kartoffeln etabliert.



Antherenkultur bei Gerste

Antheren- und Mikrosporenkultur

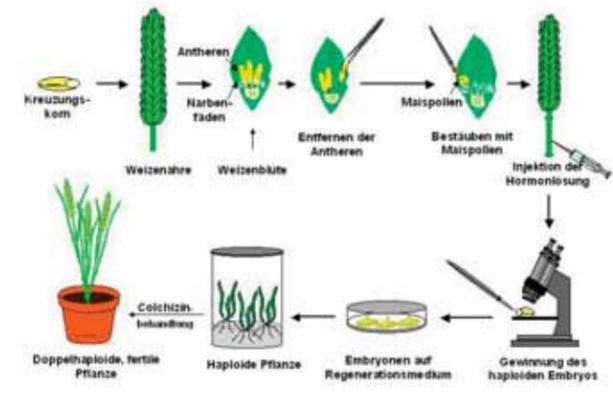
Die Staubbeutel (Antheren) einer Blüte enthalten Pollenkörner (Mikrosporen), die männlichen Geschlechtszellen. Diese besitzen im Vergleich zu diploiden vegetativen Zellen nur den halben (haploiden) Chromosomensatz. Entnimmt man einer Blüte die Antheren und kultiviert sie auf Nährmedium, so entwickeln sich aus den unreifen Pollenzellen Pflanzen mit halbem Chromosomensatz, die steril sind. Durch Behandlung der Pflanzen mit dem Gift der Herbstzeitlosen (Colchizin) gelingt es, die Chromosomen identisch zu verdoppeln. Es entstehen reinerbige, fortpflanzungsfähige (fertile) Pflanzen.

Bei Einsatz der Mikrosporenkultur werden aus Antheren isolierte Mikrosporen kultiviert und zu haploiden Pflanzen regeneriert.

Vorteile der Antheren- und Mikrosporenkultur:

- Schnelle Erzeugung von reinerbigen Pflanzen
- Sichere Selektion, da Genotyp = Phänotyp
- Verwendung der reinerbigen Pflanzen als Basiszuchtmaterial für Neuzüchtungen
- Verwendung der reinerbigen Pflanzen zur Genkartierung und Entwicklung von Gensonden
- Verkürzung der Züchtungszeit einer Sorte um 2 – 4 Jahre

Die Mikrosporenkultur wird an der LfL bei Gerste, die Antherenkultur bei Gerste und Weizen eingesetzt.



Embryokultur beim Weizen

Embryokultur

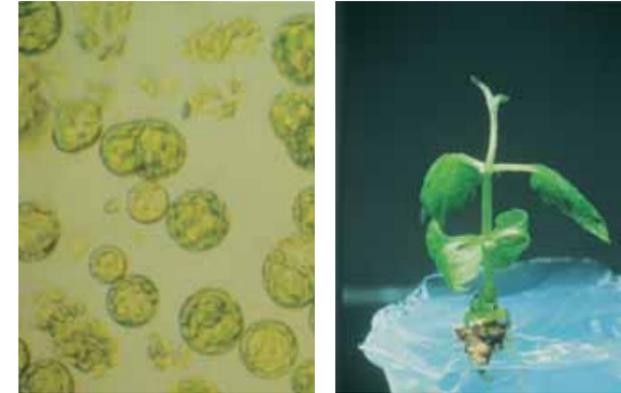
Durch die Bestäubung der Eizelle mit Pollen entsteht ein Embryo, der die Erbinformationen beider Eltern in sich vereinigt. Bei Kreuzung von weit entfernten verwandten Pflanzen (z.B. Weizen x Roggen = Triticale) stirbt der gebildete Embryo, aufgrund fehlenden Nährgewebes des Fruchtkörpers meist ab. Wird der Embryo zeitig aus dem Fruchtkörper entnommen, kann er in vitro mit Hilfe geeigneter Nährmedien zur vollständigen Pflanze regenerieren.

Die Embryokultur wird auch zur Erzeugung reinerbiger Pflanzen eingesetzt. Zur Erzeugung doppelhaploider Weizenlinien werden Eizellen des Weizens mit Maispollen bestäubt. Während der Entwicklung des Embryos werden die Maischromosomen eliminiert und der Embryo enthält nur noch die Chromosomen (halber Chromosomensatz) des Weizens. Die aus dem Embryo regenerierte Pflanze ist steril und wird erst durch Colchizinbehandlung (s. Antherenkultur) zur reinerbigen Pflanze, die dann fertil ist.

Vorteile der Embryokultur:

- Erstellung weiter Kreuzungen aus Wild- und Kulturformen zur von Resistenz- und Qualitätsgenen in Zuchtlinien
- Entwicklung neuer Kulturarten (z.B. Triticale)
- Erzeugung von reinerbigen Pflanzen

Die Embryokultur wird an der LfL zur Erzeugung reinerbiger Weizenpflanzen eingesetzt.



Protoplastenfusion bei Kartoffeln

Hopfenpflanze aus einem Protoplasten

Protoplastenfusion

Ein weiteres Verfahren der Kombinationszüchtung stellt die Protoplastenfusion dar. Protoplasten sind zellwandlose Einzelzellen. In der Regel werden sie aus Blättern mit zellwandabbauenden Enzymen isoliert. Für die Fusion werden Protoplasten von zwei verschiedenen Ausgangslinien isoliert und auf elektrischem Wege miteinander verschmolzen. Bei der Fusion werden die Chromosomensätze von zwei Zellen vereinigt. Das Ausgangsmaterial muss deshalb von Pflanzen mit halbem Chromosomensatz stammen, die über die Antherenkultur oder durch spezielle Kreuzungen entwickelt wurden.

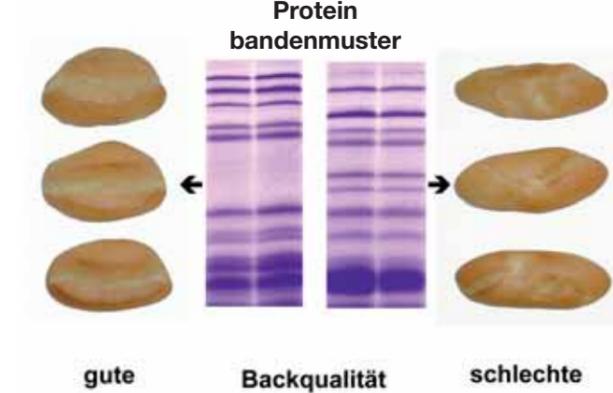
Vorteile der Protoplastenfusion:

- Gezielte Addition der Erbinformation zweier Pflanzen
- Gemeinsame Übertragung verschiedener Gene, die in Kombination ein Merkmal bestimmen
- Aufhebung von Kreuzungsbarrieren

Einsatz der Protoplastenkultur:

- Erschließung und Einbau neuer Gene (Wildarten)
- Erstellung von Basiszuchtmaterial und Sortenzüchtung
- Gezielte Resistenz- und Qualitätszüchtung

An der LfL wird die Protoplastenfusion seit 1990 bei Kartoffeln eingesetzt. Seit 1993 werden jährlich über 400 aus Fusionen entstandene Pflanzen im Feldanbau geprüft. Die Anmeldung der ersten Sorte erfolgte 1996 beim Bundessortenamt. Zudem konnten an der LfL die weltweit ersten Hopfenpflanzen aus Protoplasten regeneriert werden.



Proteinelektrophorese zur Bestimmung der Backqualität

Proteinelektrophorese

Speicherproteine sowie entwicklungs- und gewebespezifische Enzyme können als biochemische Marker dienen, da sie häufig mit wertvollen Pflanzeigenschaften gekoppelt sind. Die Auftrennung dieser Markerproteine entsprechend ihrer molekularen Größe im Elektrophorese-Gel ermöglicht die Selektion bei Zuchtlinien und die Unterscheidung von Genotypen.

Hierzu werden Speicherproteine und Enzyme aus Körnern oder Pflanzen extrahiert, auf ein Elektrophorese-Gel aufgetragen und im elektrischen Feld aufgetrennt. Die untersuchten Proteine ergeben ein spezifisches Bandenmuster, welches durch Anfärben sichtbar gemacht wird.

Vorteile biochemischer Marker:

- Analyse und Selektion des Materials unabhängig von Umwelteinflüssen
- Nachweis von Pflanzeigenschaften vor der Ernte möglich
- Selektion bereits in frühen Generationen (F2-Generation)
- Geringe Probenmenge bei hohem Probendurchsatz
- Schnelles und kostengünstiges Nachweisverfahren

Einsatzgebiete der Proteinelektrophorese sind die Qualitäts-, Resistenz- und Hybridzüchtung sowie die Nachprüfung von Art und Sorte in der Saatgutuntersuchung. An der LfL wird die Proteinelektrophorese schwerpunktmäßig in der Qualitätsweizenzüchtung sowie in der Saatgutforschung und Saatgutuntersuchung angewandt.