

# Gentechnik mit Pflanzen

Von Peter Eckes, Günter Donn und Friedrich Wengenmayer\*

Professor Heinz Harnisch zum 60. Geburtstag gewidmet

Isolierung und Charakterisierung pflanzlicher Gene bereiten heute keine grundsätzlichen Schwierigkeiten mehr. Die Erkenntnisse über Struktur und Funktion der bisher sequenzierten Gene ermöglichen es bereits, die Genregulation in Pflanzen wenigstens in großen Zügen zu verstehen. In Verbindung mit den in letzter Zeit entwickelten Methoden des Gentransfers in pflanzliche Zellen ergibt sich der für die Anwendung wichtigste Aspekt: die gentechnische Gewinnung von Pflanzen mit neuen Eigenschaften. Da die zu übertragenden Gene aus beliebigen Pflanzen, ja sogar aus beliebigen Organismen stammen können, werden hier völlig neue Möglichkeiten für die Pflanzenzüchtung eröffnet.

## 1. Einleitung

Vor zehn Jahren gelang die Isolierung des ersten Struktur-Gens eines pflanzlichen Enzyms<sup>[1]</sup>. Seitdem hat sich auf dem Gebiet der pflanzlichen Molekularbiologie eine Entwicklung angebahnt, die Ergebnisse und Möglichkeiten für die praktische Anwendung erkennen lässt, die lange nicht vorstellbar waren.

Damals wurde das auf der DNA von Chloroplasten lokalisierte Gen der großen Untereinheit des Enzyms isoliert, das in Pflanzen für die Bindung von CO<sub>2</sub> aus der Luft verantwortlich ist (Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase, auch Rubisco genannt). Heute ist beispielsweise bei Tabak sogar schon die gesamte DNA der Chloroplasten sequenziert<sup>[2]</sup> – dies sind immerhin 155 844 Basenpaare. Inzwischen stehen Methoden zur stabilen Übertragung fremder Gene auf Pflanzen zur Verfügung; in zahlreichen Laboratorien konnten bereits „transgene Pflanzen“ erhalten werden. In den USA wurden kürzlich die ersten Freilandversuche mit gentechnisch veränderten Pflanzen genehmigt.

Das zunehmende Interesse an der Biochemie und Molekularbiologie der Pflanzen zeigt sich auch an der zunehmenden Anzahl von Publikationen auf diesem Gebiet. Auch die Industrie hat begonnen, entsprechende Arbeitsgruppen aufzubauen, allerdings noch vorwiegend in den angelsächsischen Ländern und in Japan (Tabelle 1).

Tabelle 1. Biotechnologie in der Landwirtschaft; Anzahl der auf diesem Gebiet tätigen Firmen (aus [3]).

Land	Anzahl
Italien	1
Bundesrepublik Deutschland	2
Frankreich	5
Japan	12
Großbritannien	15
USA	73

Die beeindruckenden Erfolge der letzten Zeit und das wachsende Interesse an der Biochemie und Molekularbiologie der Pflanzen lassen sich auf mehrere Faktoren zu-

rückführen. Einer der wichtigsten ist dabei das wissenschaftliche Interesse an der Genstruktur und Genregulation von Pflanzen. Gegenüber dem Wissensstand bei Prokaryonten oder tierischen Zellen ist hier noch ein erheblicher Nachholbedarf vorhanden.

Ein weiterer Grund für das große Interesse an der Molekularbiologie der Pflanzen ist die enge Beziehung zwischen den erarbeiteten Grundlagen und den Anwendungsmöglichkeiten in der landwirtschaftlichen Praxis. Prinzipiell können Gene, die für die Ausprägung einer wichtigen Eigenschaft zuständig sind, aus einer beliebigen Pflanze oder einem beliebigen anderen Organismus isoliert und in Kulturpflanzen eingebaut werden. Damit werden Eigenschaften übertragbar, die bisher den klassischen Methoden der Pflanzenzüchtung nicht zugänglich waren. So könnten beispielsweise Resistenz-Gene aus exotischen Pflanzen isoliert und auf heimische Kulturen übertragen werden. Bisher ließen sich naturgemäß nur Gene und damit Eigenschaften übertragen, die bereits in den Elternpflanzen vorhanden waren. Diese Grenzen werden nun mit Hilfe der Gentechnik durchbrochen.

Ein weiterer Grund für die Beschäftigung zahlreicher Wissenschaftler mit der Molekularbiologie der Pflanzen ist in der Aussicht zu suchen, auf diesem Weg einen wichtigen Beitrag zur Lösung des Welthungerproblems leisten zu können. Die Weltbevölkerung wird nach neuesten Berechnungen des Statistischen Amtes der USA bis zum Jahre 2000 von jetzt rund 4.9 auf 6.2 Milliarden Menschen anwachsen.

Die beeindruckende Zunahme der Nahrungsmittelproduktion der letzten Jahrzehnte beruht im wesentlichen auf folgenden Faktoren:

- Einführung neuer, ertragreicher Sorten;
- Einsatz von Düng- und Pflanzenschutzmitteln;
- zunehmende Mechanisierung in der Landwirtschaft.

Auch zukünftig werden sich die Erträge steigern lassen – allerdings nicht exponentiell, wie die Weltbevölkerung wächst. Die gegenwärtigen hohen landwirtschaftlichen Überschüsse in der EG und in den USA stellen keine Lösung für die 80% der Weltbevölkerung dar, die im Jahre 2000 außerhalb Europas, Nordamerikas und der Sowjetunion leben werden. Gerade für die tropischen und subtropi-

[\*] Dr. F. Wengenmayer, Dr. P. Eckes, Dr. G. Donn  
Hoechst Aktiengesellschaft  
Postfach 8003 20, D-6230 Frankfurt am Main 80

ischen Länder könnten Pflanzen mit gentechnisch erzeugter Resistenz gegen Schädlinge, Krankheiten oder Stresßbedingungen große Bedeutung erlangen.

Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß im Laboratorium gewonnene, gentechnisch veränderte Pflanzen auch noch in Zuchtprogramme aufgenommen und geprüft werden müssen. Dieser Prozeß wird mehrere Jahre beanspruchen, so daß solche Pflanzen dem Landwirt erst ab Mitte der neunziger Jahre in ausreichender Menge zur Verfügung stehen werden. Daher ist bei der Bewertung der Möglichkeiten der Gentechnik für die Landwirtschaft nicht vom jetzigen Nahrungsmittelbedarf auszugehen, sondern vom voraussichtlichen Bedarf im Jahre 2000. Selbstverständlich kann das Problem des Hungers in der Welt nicht allein durch die Gentechnik gelöst werden; sie könnte jedoch in Form von ertragreichen und resistenten Pflanzen die „technischen Voraussetzungen“ für eine ausreichende Nahrungsmittelversorgung bereitstellen.

## 2. Pflanzen-Zellbiologie

Die Zellbiologie schafft mit der Entwicklung von Verfahren zur Regeneration von Pflanzen aus einzelnen Zellen und zur Übertragung von Genen auf pflanzliche Zellen die

Grundlagen für die Anwendung der Gentechnik. Vielfach können bestimmte Zuchtziele sowohl durch gentechnische Methoden als auch durch zellbiologische Selektionsverfahren erreicht werden. In diesem Abschnitt werden daher auch einige Aspekte der Zellbiologie betrachtet, die für die Gewinnung von Pflanzen mit neuen Eigenschaften oder für die Anwendung der Gentechnik von Bedeutung sind. Die Techniken der Pflanzenzellkultur sind bereits im letzten Jahrzehnt in den Blickpunkt des Interesses gerückt und in Übersichten und Monographien beschrieben worden<sup>[4-7]</sup>.

### 2.1. Vegetative Pflanzenvermehrung

Pflanzen zeichnen sich durch ein großes Regenerationsvermögen aus. Werden Pflanzensprosse oder Sproßsegmente unter geeigneten Bedingungen (hohe Luftfeuchtigkeit und Abwesenheit von Pathogenen) kultiviert, so bewurzeln diese Sproßteile. Diese aus der gärtnerischen Praxis bekannte vegetative Vermehrungsweise läßt sich auf synthetischen Nährmedien unter sterilen Bedingungen besonders effizient gestalten. Die Nährmedien enthalten im einfachsten Falle die zur pflanzlichen Ernährung notwendigen Salze und Spurenelemente in einer ausgewogenen Mischung, dazu einige Vitamine und Saccharose<sup>[8]</sup>.

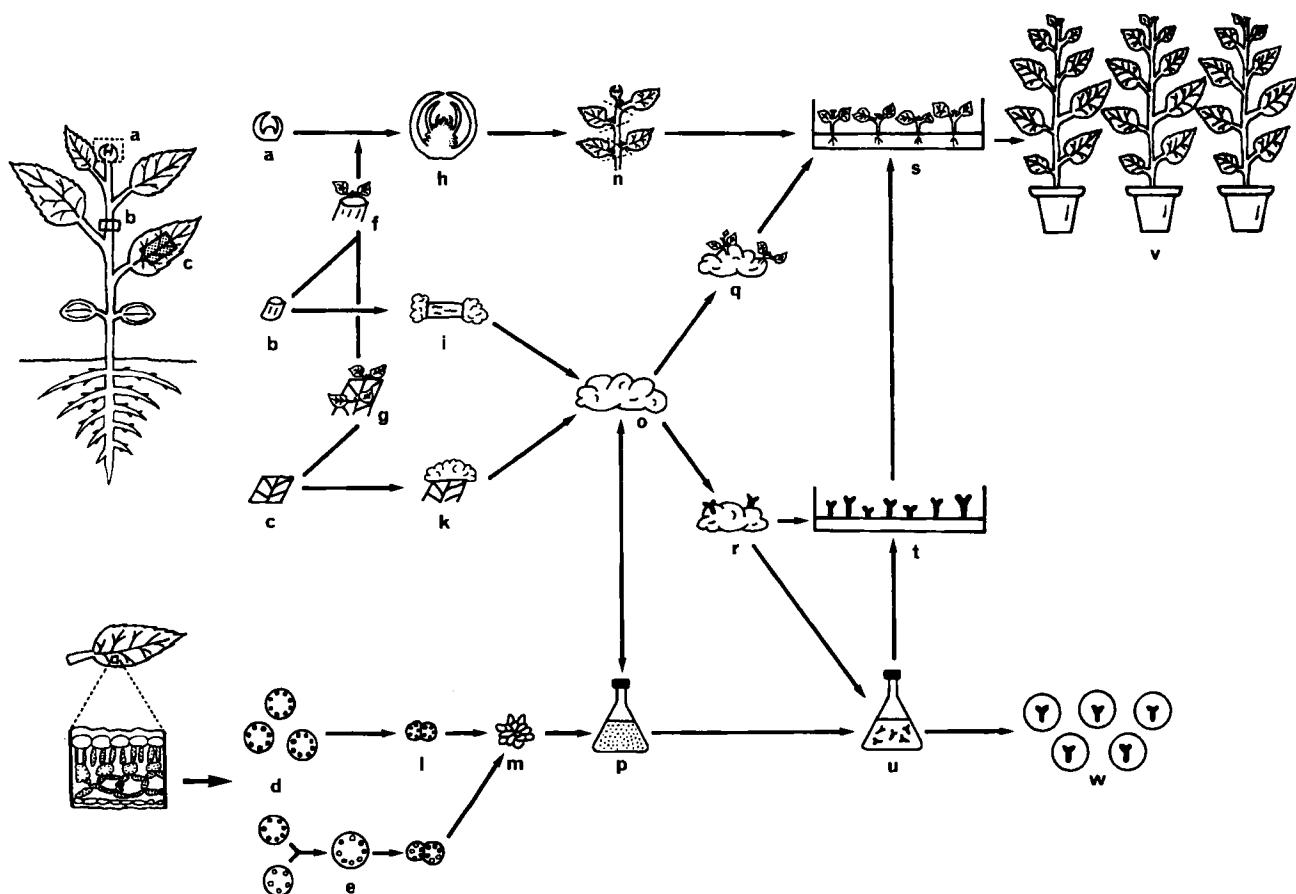


Abb. 1. Zellkulturtechniken zur Mutantenselektion und Erzeugung transgener Pflanzen. Sproßmeristeme (a), Stielstücke (b), Blattstücke (c) und Mesophyllprotoplasten (d) sind Explantate, die zur Etablierung von Zellkulturen und auch für Gentransfer-Techniken verwendet werden. Protoplastenfusion führt zu Hybridprotoplasten (e). Die Pflanzenregeneration kann entweder direkt über die Ausdifferenzierung von Sprossen an den Explantaten (f-h) stattfinden oder an Calluskulturen (i, k, o) induziert werden, entweder über Sproßbildung (q) oder über die Bildung somatischer Embryonen (r). Protoplasten regenerieren eine Zellwand; durch Zellteilungen (l) entwickeln sich Mikrocalli (m), die als Suspensionskulturen (p) weiterkultiviert werden können und in denen die Bildung somatischer Embryonen induziert werden kann (u). Mikrocalli wachsen auf Agar-Medien zu Callus (o) heran, der wie oben geschildert zur Differenzierung gelangt. Durch Zugabe von Pathogentoxinen, Antibiotika oder Herbiziden können vorzugsweise in den Stadien f-p Mutanten oder Transformanten *in vitro* selektiert werden. Sproßkulturen (n), sproßbildende Calli (q) und Embryokulturen werden zur Vermehrung von Genotypen verwendet (s, v). Somatiche Embryonen lassen sich zu artifiziellem Saatgut aufarbeiten (w).

In einem phytohormonfreien Medium wachsen Sproßknospen oder Sproßmeristeme zu vollständigen Pflanzen heran. Enthält das Kulturmedium allerdings Phytohormone, so hängt die Reaktion der Explantate vom Verhältnis der Auxin- zur Cytokinin-Konzentration im Medium ab<sup>[9]</sup>. Sind beide Phytohormone in ausreichender Konzentration vorhanden, bildet sich typischerweise an den Wundrändern des Explantats ein undifferenziertes Gewebe, welches als Callus bezeichnet wird. Dabei ist es gleichgültig, ob das Explantat ein Blattfragment, ein Stengelstück oder eine Wurzel ist. Wird ein solcher Primärcallus in regelmäßigen Abständen auf frisches Medium transferiert, kann er unbegrenzt lange vermehrt werden.

Überwiegt Cytokinin im Medium, begünstigt ein solches Medium die Bildung von Sproßknospen, sowohl an Primär explantaten als auch an bereits gebildeten Calli. Allerdings hängt die Fähigkeit zur Sproßdifferenzierung stark vom Genotyp ab. Bei einigen Pflanzenarten, beispielsweise bei Tabak, gelingt die Sproßregeneration und damit die Pflanzenregeneration praktisch mit jedem Explantat und selbst mit Callus, der bereits jahrzehntelang kultiviert wurde<sup>[10]</sup>. Bei anderen Pflanzenarten, so bei der Sojabohne, gelingt die Sproßregeneration aus etablierten Calluskulturen hingegen nicht.

Die Sproßregeneration ist für die Herstellung transgener Pflanzen nach den üblichen Methoden (Abschnitt 3) eine notwendige Voraussetzung. Alternative Wege zur Sproßregeneration sind in Abbildung 1 dargestellt. In vitro kultivierte Sprosse produzieren auf cytokininhaltigen Kulturmedien Adventivsprosse, so daß sich in kurzer Zeit aus einem Sproß Tausende von Individuen des gleichen Genotyps produzieren lassen. Bisher ist diese Art der vegetativen Vermehrung aufgrund des hohen manuellen Aufwandes nur bei wenigen Kulturen wirtschaftlich (Ornamentalpflanzen, Kartoffel<sup>[11]</sup>).

Bei einer Reihe von Nutzpflanzen, so auch bei Luzerne<sup>[12]</sup>, Sojabohne<sup>[13]</sup> und Raps<sup>[14]</sup>, kann in Zellkulturen die Bildung somatischer Embryonen induziert werden. Soma-

tische Embryonen entstehen im Gegensatz zu den zygotischen (sexuellen) Embryonen der Samen aus somatischen Zellen (Abb. 1 bis 3).

Somatische Embryonen lassen sich in beliebigen Mengen in synthetischen Medien kultivieren. Im Labormaßstab konnte bereits gezeigt werden, daß es möglich ist, somatische Embryonen zusammen mit einem Nährstoffvorrat einzukapseln, kurze Zeit zu lagern und dann zum Auskeimen zu bringen<sup>[15]</sup>. Solche biotechnisch erzeugbaren und in Polymerkapseln eingeschlossenen Pflanzenembryonen werden als „artifizielles Saatgut“ bezeichnet. Bei weiterer Vervollkommnung der Technik ist es denkbar, solches artifizielles Saatgut wie herkömmliches Saatgut auf das Feld auszubringen. Damit wäre eine leistungsfähige und wirtschaftliche Form der vegetativen Vermehrung von Elitegenotypen möglich.

## 2.2. Protoplasten

Protoplasten sind zellwandlose pflanzliche Einzelzellen, die durch Verdauung der Zellwände mit hydrolytischen Enzymen (Pectininasen, Hemicellulinasen und Cellulasen) aus Pflanzengewebe gewonnen werden können. Aus 1 g Blatt-

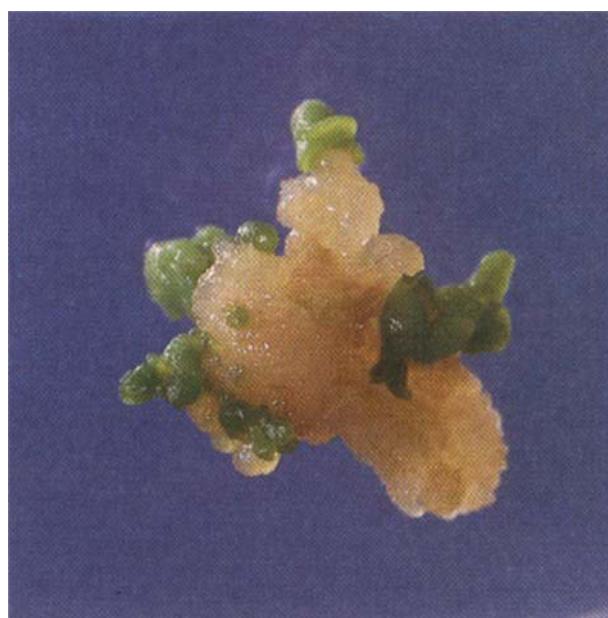


Abb. 2. Luzernecallus (weiß) mit beginnender Ausdifferenzierung von somatischen Embryonen (grün).

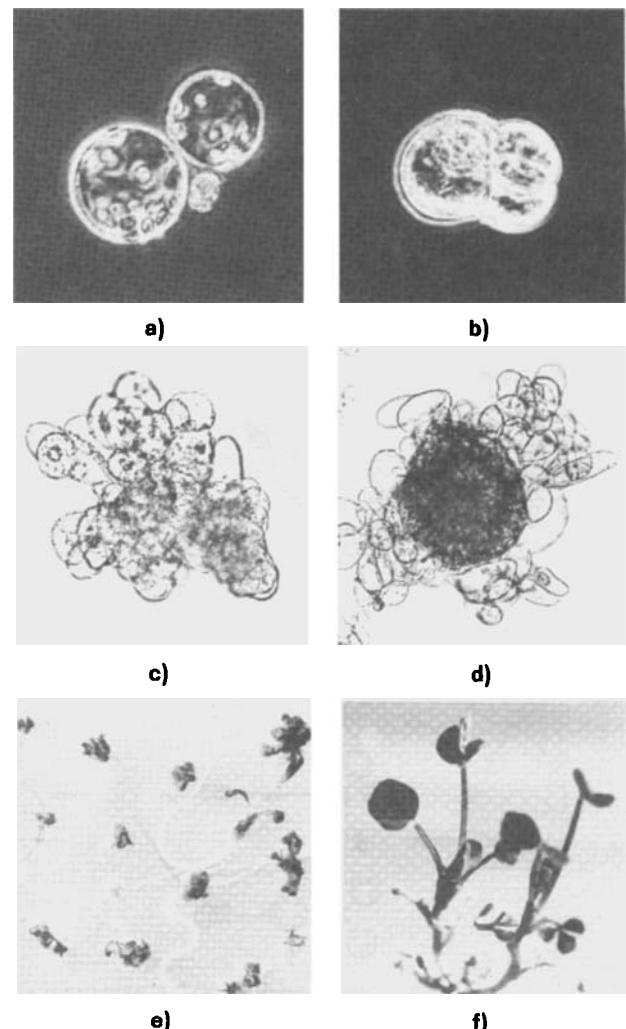


Abb. 3. Pflanzenregeneration aus Protoplasten der Luzerne (*Medicago sativa*). a) Frisch isolierte Protoplasten (Tag 1); b) Vier-Zellen-Stadium (Tag 4); c) Mikrocallus (Tag 11); d) beginnende Embryogenese (dichtgepckte Zellen im Zentrum des Mikrocallus) (Tag 14); e) Auskeimung der somatischen Embryonen (5. Woche); f) Regeneratpflanze (8. Woche nach Protoplastenisolierung).

gewebe können mehrere Millionen Mesophyllprotoplasten freigesetzt werden. 1971 ist es erstmals gelungen<sup>[16]</sup>, aus Mesophyllprotoplasten des Tabaks Pflanzen zu regenerieren. Inzwischen sind Regenerationsmethoden für eine Reihe von Nutzpflanzen ausgearbeitet worden, so für Raps<sup>[17]</sup>, Kartoffel<sup>[18]</sup>, Tomate<sup>[19]</sup>, Luzerne<sup>[20]</sup> und Reis<sup>[21]</sup>. Abbildung 3 zeigt die Entwicklung von Luzerneprotoplasten zur vollständigen Pflanze. Protoplasten sind besonders interessant, weil sie Makromoleküle wie DNA<sup>[22]</sup>, aber auch Zellorganellen<sup>[23]</sup> und Chromosomen<sup>[24]</sup> aufnehmen können. Aufbauend auf diesen schon länger zurückliegenden Beobachtungen wurde in den letzten Jahren ein Verfahren zum direkten DNA-Transfer in Protoplasten entwickelt (siehe Abschnitt 3).

### 2.2.1. Protoplastenfusion

Pflanzliche Protoplasten können unter verschiedenen Bedingungen fusionieren; dazu gehören die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und pH-Werte über 9.5<sup>[25]</sup> sowie die Anwesenheit von Polyethylenglycol<sup>[26]</sup> oder Dimethylsulfoxid<sup>[27]</sup>. Auch kurze elektrische Spannungsimpulse<sup>[28]</sup> wirken fusionsauslösend. Es ist möglich, Protoplasten beliebiger Pflanzen zu verschmelzen. Im allgemeinen sind die Fusionsprodukte aus Protoplasten unterschiedlicher Pflanzengattungen sehr schwer regenerierbar. Nur in wenigen Fällen ist bisher die Regeneration von Gattungszybriden möglich gewesen, die allerdings nicht fertil waren<sup>[29,30]</sup>. Ein bekanntes Beispiel ist die Tomatoffel. Diese somatische Hybride ist von großer theoretischer Bedeutung, zeigt sie doch, daß über Protoplastenfusionen Hybride erhalten werden können, die auf sexuellem Wege nicht zugänglich sind. Fertile Hybridpflanzen sind durch Verschmelzung der Protoplasten nahe verwandter Pflanzen erhältlich, auch wenn sich diese nicht sexuell kreuzen lassen<sup>[31]</sup>. Sind in den Genomen der beiden zu fusionierenden Protoplasten unterschiedliche selektierbare Marker-Gene vorhanden, können die somatischen Hybriden leicht in einem Selektionsmedium getrennt werden. In jüngster Zeit erlangt ein Verfahren der Protoplastenfusion stärkere Beachtung, dessen Prinzip bereits 1980 beschrieben wurde<sup>[32]</sup>. Donor-protoplasten, deren Genom durch starke Röntgenstrahlung fragmentiert wurde, werden mit unbestrahlten Empfängerprotoplasten fusioniert. In einigen Hybridprotoplasten werden dabei Fragmente des Donor-Genoms in das Acceptor-Genom integriert. Enthält das Donor-Genom Gene, deren Aktivität sich in der Ausprägung von Resistzenzen manifestiert, ist es möglich, diese Rekombinannten zu selektieren. Auf diesem Weg ist es gelungen, ein Chromosomenfragment aus Karotten, auf welchem ein Resistenz-Gen gegen das Antibioticum Methotrexat lokalisiert ist, in Tabakprotoplasten zu übertragen. Die aus den Hybridprotoplasten regenerierten Pflanzen ähneln Tabakpflanzen und weisen neben der übertragenen Methotrexatresistenz noch einige weitere Karotten-Gene in ihrem Genom auf<sup>[33]</sup>. Die Pflanzen sind fertil, d. h. sie produzieren Samen und vererben die Methotrexatresistenz ihren Nachkommen. Diese Methode der asymmetrischen Protoplastenfusion könnte ein Weg sein, auch mehrere oder gar unbekannte Gene über die Artgrenzen hinweg zu übertragen, ohne gentechnische Methoden anzuwenden.

### 2.3. Mutantenselektion in vitro

Durch Protoplastenisolation ist es möglich, bei vielen Pflanzenarten große Populationen homogener, diploider, totipotenter Zellen zu gewinnen und wieder zu Pflanzen zu regenerieren. Schon früh bei der Entwicklung der Protoplastentechnologie wurde versucht, Protoplastenpopulationen zur Mutantenselektion zu verwenden<sup>[34]</sup>. Immerhin können sich in einer Petrischale 1–5 Millionen Protoplasten und damit potentielle Pflanzen befinden. Gelingt es, in dieser Zellpopulation Mutationen auszulösen und die Mutanten anschließend zu selektieren, sollte es möglich sein, Pflanzen mit neuen Eigenschaften zu regenerieren.

Allerdings sind Protoplasten keine Vorbedingung für die Mutantenselektion; jede gut regenerierbare Pflanzenzellkultur eignet sich hierfür. Inzwischen gibt es Berichte, die eine erfolgreiche Selektion von Mutanten aus Pflanzenzellkulturen beschrieben, darunter pathogenresistente Pflanzen (Tabelle 2) und herbizidresistente Pflanzen (vgl. Tabelle 5). In erster Linie wurden auf diesem Weg Mutanten oder Varianten gefunden, die durch einen Selektionsdruck – Zugabe von Enzyminhibitoren, Pathogentoxinen oder Herbiziden zum Zellkulturmedium – bereits auf dem Zellniveau selektiert und isoliert werden konnten<sup>[50]</sup>. Auffällig ist, daß diese Varianten auch in Experimenten gefunden wurden, bei denen die Mutationsrate nicht durch chemische oder physikalische Mutagene erhöht wurde.

Tabelle 2. Regeneration pathogenresistenter Nutzpflanzen aus Zellkulturen (modifiziert nach [35]).

Kulturpflanze	Pathogen	Lit.
<i>a) nach in-vitro-Selektion auf Pathogentoxinresistenz</i>		
Tabak ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	<i>Pseudomonas tabaci</i> <i>Alternaria solani</i>	[34] [36]
Kartoffel ( <i>Solanum tuberosum</i> )	<i>Phytophthora infestans</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Erwinia carotovora</i>	[37] [38] [39]
Tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	<i>Fusarium oxysporum</i>	[40]
Raps ( <i>Brassica napus</i> )	<i>Phoma lingam</i>	[41]
Luzerne ( <i>Medicago sativa</i> )	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Verticillium alboatrum</i>	[42] [43]
Mais ( <i>Zea mays</i> )	<i>Helminthosporium maydis</i>	[44]
<i>b) an Regenerationspflanzen beobachtete Resistenzen ohne vorausgegangene in-vitro-Selektion</i>		
Kartoffel	<i>Alternaria solani</i> <i>Phytophthora infestans</i>	[45] [46]
	Kartoffel-y-Virus	[47]
	Kartoffel-Blattroll-Virus	[47]
Tabak	Tabak-Mosaik-Virus	[48]
Tomate	Tabak-Mosaik-Virus	[49]

### 2.3.1. Somaklonale Variation

Die beschriebene hohe Variabilität scheint durch den Prozeß der in-vitro-Kultur selbst ausgelöst zu werden, besonders dann, wenn die Zellkulturen längere Zeit als unendifferenzierte Zellen kultiviert werden. Unter solchen Bedingungen können Chromosomenmutationen besonders leicht akkumulieren<sup>[51]</sup>. Allerdings kann nur ein Teil der beobachteten Variabilität durch den Verlust einzelner

Chromosomen oder durch überzählige Chromosomen erklärt werden. Für diese durch die Zellkultur selbst ausgelöste Variabilität wurde der Ausdruck „somaklonale Variation“ geprägt<sup>[52]</sup>. Es liegt nahe, diese Variabilitätsquelle für Züchtungsprogramme zu nutzen<sup>[53]</sup>. Inzwischen gibt es zunehmend Hinweise, daß unter dem Stress der in-vitro-Kultur Mechanismen in Pflanzenzellen aktiviert werden, die zur Umorganisation des Genoms führen<sup>[54]</sup>. Beim Mais ist beispielsweise nachgewiesen worden, daß „springende Gene“ durch die in-vitro-Kultur aktiviert werden können<sup>[55]</sup>.

## 2.4. Bedeutung der Zellbiologie für die Gentechnologie

Der Beitrag der Pflanzen-Zellbiologie für die Gentechnologie besteht darin, kompetente, d.h. transformierte Pflanzenzellen bereitzustellen, DNA zu übertragen und aus den transformierten Zellen Pflanzen zu regenerieren. Bei wichtigen Kulturpflanzen wie Sojabohne, Baumwolle und den Getreidearten mit Ausnahme von Reis sind diese Voraussetzungen bisher noch nicht im nötigen Umfang gegeben. Die Zellkultursysteme solcher schwierig regenerierbaren Arten müssen somit weiter verbessert werden. Ideal wäre es, Protoplasten auch dieser Kulturpflanzen regenerieren zu können, da Protoplasten zur direkten Aufnahme und Integration von Fremd-DNA fähig sind.

Eine Hoffnung, daß Fortschritte auch bei den Getreidearten möglich sind, gibt die von drei Arbeitsgruppen kürzlich mitgeteilte erfolgreiche Regeneration von Reispflanzen aus Protoplasten<sup>[21]</sup>. Dieser Durchbruch gelang, nachdem embryogene Suspensionskulturen als Ausgangsmaterial zur Isolierung von Protoplasten verwendet wurden.

## 3. Transfer von DNA

### 3.1. Das *Agrobacterium-tumefaciens*-System

#### 3.1.1. Tumorbildung

Bis vor kurzem war es nicht möglich, fremde Gene in pflanzliche Zellen zu transferieren. DNA konnte zwar aus

Pflanzen isoliert und charakterisiert werden; die Funktionen bestimmter DNA-Sequenzen waren aber wegen der mangelnden Transfermöglichkeit nur schwer zu analysieren. Ein Ausweg aus diesem Dilemma ergab sich überraschenderweise bei Untersuchungen zur Entstehung pflanzlicher Tumoren, der Wurzelhalsgallen („crown galls“). Dies sind undifferenzierte Zellwucherungen, die nach Infektion einer Pflanze durch das gram-negative Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* entstehen (Abb. 4). Es stellte sich nämlich heraus, daß die Bildung der Tumoren durch Einschleusung bakterieller DNA in pflanzliche Zellen verursacht wird<sup>[56]</sup>.

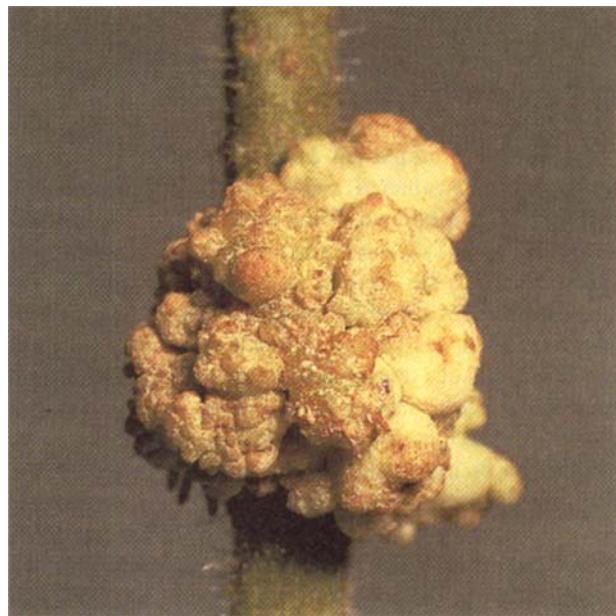


Abb. 4. Undifferenziert wachsendes Tumorgewebe (Wurzelhalsgalle) am Stengel einer Tomate nach Infektion der Wundstelle mit *Agrobacterium tumefaciens*.

*Agrobacterium tumefaciens* ist ein Bodenbakterium, das eine große Anzahl dikotyler Pflanzen wie Tabak, Tomate, Karotte und Kartoffel nach Verwundung infizieren kann<sup>[57]</sup>. An der Infektionsstelle setzt ein starkes undiffe-

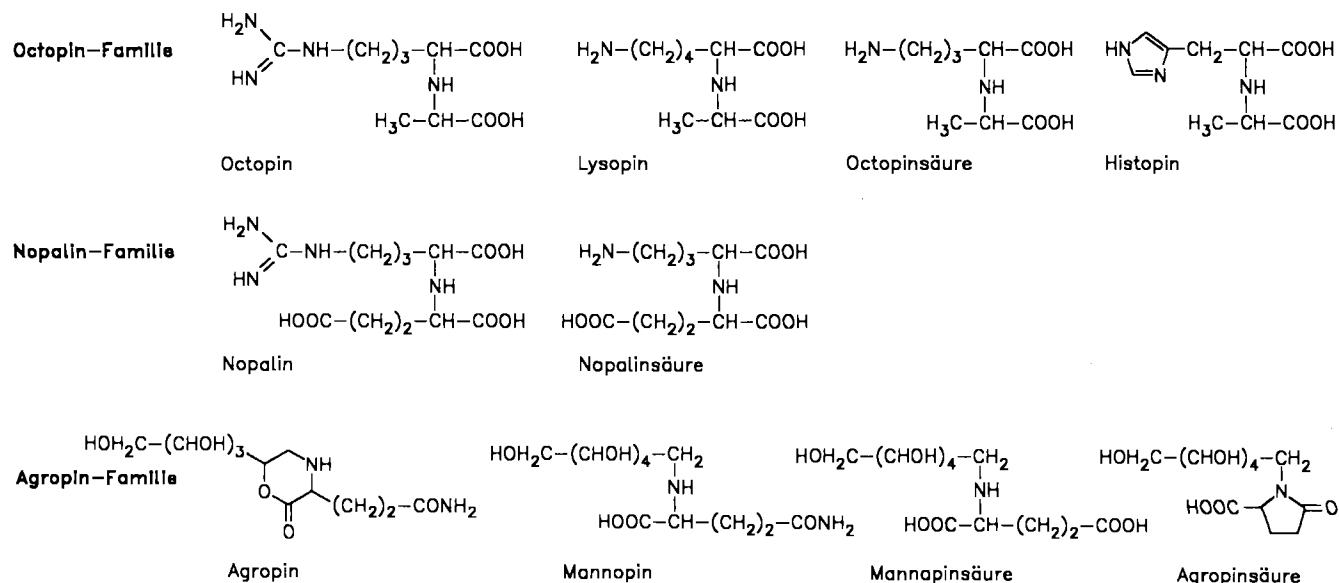


Abb. 5. Chemische Struktur der Opine (Daten aus [61]). Eine vierte Klasse, die Agrocinopine, sind phosphorylierte Zucker unbekannter Struktur.

renziertes Zellwachstum ein, das zu den oben genannten Gallentumoren führt. Die Tumoren können auch in Abwesenheit von Agrobakterien weiterwachsen<sup>[58]</sup>. Zwei Eigenschaften des Tumorgewebes sind besonders hervorzuheben: Der Tumor proliferiert ohne Zugabe von Pflanzenhormonen (Auxinen und Cytokininen) auf sterilen Nährmedien definierter Zusammensetzung, wohingegen diese Hormone für das Wachstum normalen Zellgewebes essentiell sind<sup>[58]</sup>. Außerdem synthetisiert der Tumor spezifische Metabolite, die in anderen Pflanzengeweben nicht vorkommen: die Opine<sup>[59]</sup>. Opine sind Aminosäure- oder Zuckerkörperderivate, die nur von Agrobakterien als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle genutzt werden können, für Pflanzen jedoch nicht verwertbar sind<sup>[59,60]</sup>. Die in Pflanzentumoren bisher gefundenen Opine werden in vier Klassen untergliedert: Nopaline, Octopine, Agropine und Agrocinopine (Abb. 5)<sup>[61]</sup>.

Ein Agrobakterienstamm kann, mit gewissen Abweichungen, nur Opine der Klasse verwerten, deren Synthese er in der Pflanze induziert. So kann ein Bakterium, das Nopaline induziert, kein Octopin metabolisieren<sup>[59]</sup>. Entsprechend den Opinen wurden auch die Agrobakterien in Klassen unterteilt; hierbei sind die Nopalins- und Octopinklassen am besten charakterisiert.

### 3.1.2. Das Ti-Plasmid als tumorinduzierendes Prinzip

Das hormonunabhängige Wachstum der Gallentumoren ohne Agrobakterien und die Opinbiosynthese führen zu

dem Schluß, daß das Agrobakterium ein „tumorinduzierendes Prinzip“ auf die Pflanze übertragen müsse<sup>[62]</sup>. Auf der Suche nach diesem Prinzip wurde entdeckt, daß infektiöse Bakterien ein ca. 200 Kilobasen (kb) großes Megaplasmid enthalten, das Ti-Plasmid (Ti = Tumor induzierend)<sup>[63]</sup>. Wurde das Plasmid aus *Agrobacterium tumefaciens* entfernt, verloren die Agrobakterien ihre Fähigkeit, Pflanzentumoren zu induzieren. Nach Wiedereinschleusen des Plasmids waren sie aber wieder dazu imstande. Das Plasmid wurde als das gesuchte „tumorinduzierende Prinzip“ identifiziert<sup>[64]</sup>. Auf diesem Ti-Plasmid fand man sowohl die Gene, die ein hormonunabhängiges Wachstum des Tumors bewirken, als auch die an der Opinbildung und -verwertung beteiligten Gene (Abb. 6)<sup>[60,65-68]</sup>.

Vom gesamten Ti-Plasmid wird nur ein relativ kleiner Bereich stabil in das Pflanzen-Genom integriert<sup>[70-72]</sup>. Der Transfer von DNA in Pflanzenzellen ist also ein natürlicher Prozeß, den *Agrobacterium tumefaciens* schon seit Urzeiten praktiziert. Der integrierte DNA-Bereich, die „T-DNA“, umfaßt ca. 20 kb. Auf der T-DNA sind sowohl die für die Opinbiosynthese als auch die für das Tumorwachstum maßgeblichen Gene lokalisiert<sup>[67,73]</sup>.

Die T-DNA-Bereiche der Octopin- und Nopalintabakterien haben neben auffälligen Gemeinsamkeiten auch mehrere signifikante Unterschiede. Während die Nopalint-T-DNA ein einzelnes, ca. 23 kb großes DNA-Fragment auf dem Ti-Plasmid ist und auch als solches übertragen wird, ist die Octopin-T-DNA in zwei benachbart liegende Bereiche von ca. 14 kb („left T-DNA“, TL) bzw. ca. 7 kb („right

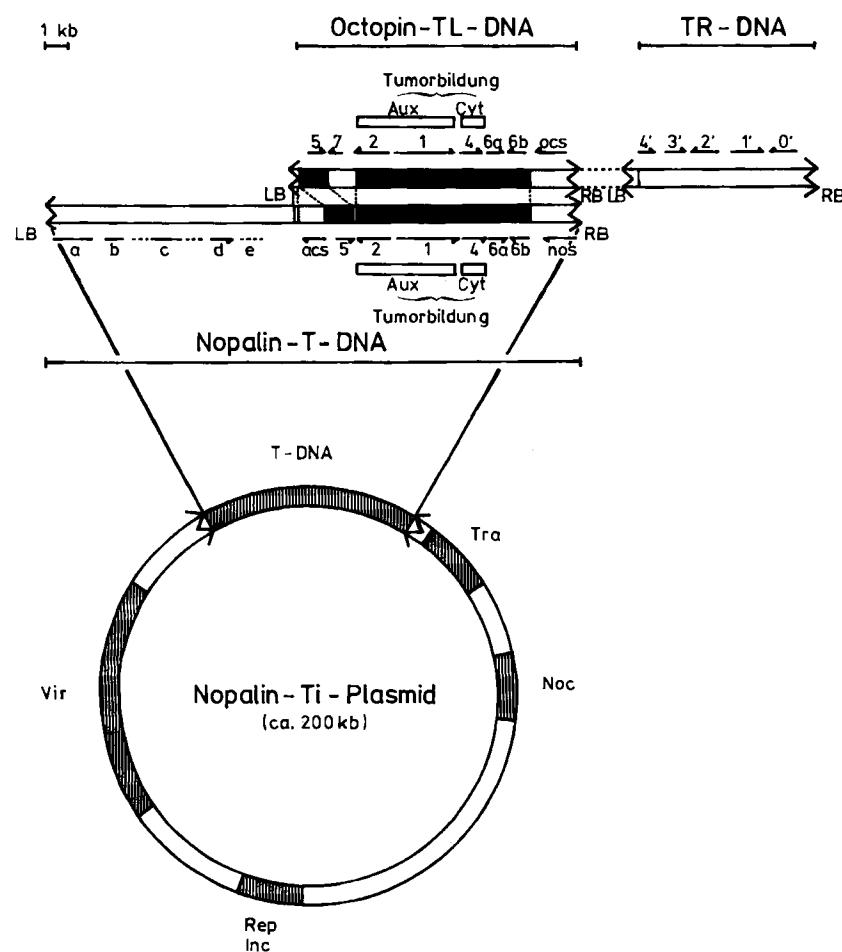


Abb. 6. Genetische Organisation eines Ti-Plasmids. Unterer Teil: Funktionell charakterisierte Bereiche eines Nopalint-Ti-Plasmids. Tra: Funktionen zum Transfer des Plasmids zwischen Bakterien; Noc: Nopalint-Katabolismus; Rep: Funktionen zur Replikation des Plasmids in Agrobakterien; Inc: Funktionen, die die Inkompatibilität von zwei verschiedenen Ti-Plasmiden in einer Agrobakterienzelle bewirken. Ein Nopalint- und ein Octopin-Ti-Plasmid können z. B. nie in der gleichen Zelle vorkommen; Vir: Virulenzbereich; T-DNA: in das Pflanzen-Genom integrierter DNA-Bereich. – Oberer Teil: Vergleich der T-DNA von Nopalint- und Octopin-Ti-Plasmiden. Polyadenylierte Transkripte sind mit Pfeilen bzw. Balken gekennzeichnet, je nachdem, ob die Transkriptionsrichtung bekannt ist oder nicht. Die Nomenklatur der Transkripte richtet sich nach [69]. Die in beiden T-DNA-Sequenzen homologen Bereiche sind geschwärzt. nos: Nopalint-Synthase-Gen; ocs: Octopin-Synthase-Gen; acs: Agrocinopin-Synthase-Gen; Aux: Gene der Auxinbiosynthese; Cyt: Gen der Cytokininsynthese; RB: Rechte Bordersequenz; LB: Linke Bordersequenz.

T-DNA“, TR) unterteilt<sup>[74, 75]</sup>. TL und TR werden unabhängig voneinander an verschiedenen Stellen des Pflanzen-Genoms integriert<sup>[75, 76]</sup>. TL-DNA und Nopalin-T-DNA enthalten einen sehr homologen, ca. 9 kb langen Nucleotidbereich, auf dem die Gene 5, 2, 1, 4, 6a und 6b lokalisiert sind<sup>[69]</sup> (Abb. 6). Die Funktion der bekannten Gene ist in Tabelle 3 zusammengefaßt. Zumindest drei dieser Gene (1, 2 und 4) sind für das Tumorwachstum infizierter Pflanzen zuständig. Da in Wildtyp-Agrobakterien alle drei Gene aktiv sind, werden sowohl Auxine als auch Cytokinine gebildet, was zu Tumoren mit völlig undifferenziertem Wachstum führt (vgl. Abb. 4). Agrobakterien mit inaktiviertem Gen 4 (viel Auxin, kein Cytosin) induzieren das Wurzelwachstum der Tumoren. Gen 4 verhindert somit die Ausdifferenzierung von Wurzeln („roi gene: root inhibition gene“). Durch Inaktivierung der Gene 1 und 2 (viel Cytosin, kein Auxin) wird die Sproßbildung induziert. Die Gene 1 und 2 verhindern also die Bildung von Sprossen („shi genes: shoot inhibition genes“)<sup>[83, 85]</sup>.

Tabelle 3. Funktionen der T-DNA-Gene. Die Funktionen der zusätzlich in Abb. 6 aufgeführten Gene sind noch unklar.

Gen	Funktion	Protein	Lit.
1	Auxinbiosynthese	Tryptophan-2-Monoxygenase	[77]
2	Auxinbiosynthese	Indolacetamid-Hydrolase	[78]
nos	Nopalinbiosynthese	Nopalin-Synthase	[79]
ocs	Octopinbiosynthese	Octopin-Synthase	[80]
4	Cytosinbiosynthese	Isopentenyl-Transferase	[81]
5	Tumorwachstum		[78]
6a	Opinsekretion		[82]
6b	Tumorwachstum		[83]
0'	Umwandlung von Mannopin in Agropin		[84]
1'	Mannopinbiosynthese		[84]
2'	Mannopinbiosynthese		[84]

T-DNA-Gene sind demnach für das Tumorwachstum verantwortlich. Für die eigentliche Pflanzeninfektion und für die Integration der T-DNA in das pflanzliche Genom sind sie aber nicht erforderlich<sup>[86]</sup>. Durch Deletionen von Bereichen des Ti-Plasmids wurde gezeigt, daß nur zwei Bereiche für die Infektion und Integration notwendig sind. Dies sind zum einen die Virulenzregion („Vir“) und zum anderen die Randregionen der T-DNA (die sogenannten „Borders“). Die Borders bestehen aus zwei je 25 Basenpaaren (Bp) langen, fast übereinstimmenden Nucleotidsequenzen<sup>[87, 88]</sup>, die bei allen T-DNA-Typen sehr stark konserviert sind (Abb. 7). Beliebige, bis zu 50 kb lange DNA-

Sequenzen, die zwischen diese Borders inseriert werden, können in das Pflanzen-Genom eingebaut werden<sup>[89]</sup>. Der Mechanismus dieses Integrationsprozesses ist noch nicht aufgeklärt. Man konnte allerdings zeigen, daß die T-DNA während einer Infektion aus dem Ti-Plasmid ausgeschnitten und über diese 25 Bp langen Randsequenzen zu instabilen Intermediärprodukten zirkularisiert wird<sup>[90]</sup>.

Die DNA der ca. 40 kb großen Virulenzregion wird selbst nicht in das Pflanzen-Genom integriert<sup>[75]</sup>. Die Virulenz-Gene bewirken aber die Infektiosität der Agrobakterien<sup>[91]</sup>. Die Vir-Region besteht aus mindestens sechs verschiedenen Komplementationsgruppen<sup>[91, 92]</sup>. Zur Bestimmung einer Komplementationsgruppe wurde eine Mutation, die Avirulenz hervorruft, in die Vir-Region eingeführt. Dann wurde versucht, die Virulenz dadurch wiederherzustellen, daß man eine zweite Vir-Region mit einer Mutation an anderer Stelle in das Bakterium einschleuste. Lagen beide Mutationen in derselben Komplementationsgruppe, blieben die Bakterien avirulent, lagen sie auf verschiedenen Gruppen, komplementierten die Gruppen einander, und das Bakterium wurde wieder virulent. Jede Komplementationsgruppe entspricht einer Transkriptions-einheit. Zwei dieser Transkripte werden konstitutiv exprimiert, die restlichen vier werden nur in Anwesenheit von Pflanzenzellen induziert<sup>[92]</sup>. Der Mechanismus der Virulenz-induktion ist ebenfalls noch nicht im Detail erforscht. Da Agrobakterien in der Natur nur verwundete Pflanzenzellen infizieren, wurde vermutet, daß von diesen Pflanzenzellen bestimmte Stoffe synthetisiert werden, auf die die Bakterien „reagieren“. Zwei dieser Verbindungen, Acetosyringon 1 und  $\alpha$ -Hydroxyacetosyringon 2, konnten bisher isoliert werden (Abb. 8). Diese phenolischen Verbindungen

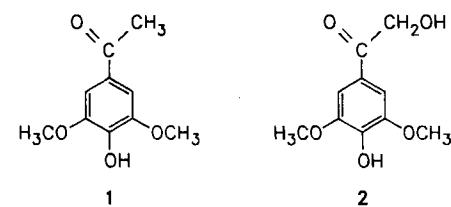


Abb. 8. Die beiden bisher identifizierten Verbindungen, die von verwundeten Pflanzenzellen synthetisiert werden und die Virulenzregion aktivieren: Acetosyringon 1 und  $\alpha$ -Hydroxyacetosyringon 2.

treten mit den Produkten der beiden konstitutiv exprimierten Virulenz-Gene in Wechselwirkung und regen so die Aktivität der vier anderen Vir-Loci an<sup>[93, 94]</sup>. Neben den Borders und der Vir-Region des Ti-Plasmids existieren in Agrobakterien noch mindestens zwei chromosomal Loci, die für die Anheftung der Bakterien an die Pflanzenzell-wände maßgeblich sind<sup>[95, 96]</sup>.

### 3.1.3. *Agrobacterium tumefaciens* als Genvektor

Die Kenntnis dieser fundamentalen Prozesse bei der Infektion von Pflanzenzellen durch *Agrobacterium tumefaciens* führte zur Etablierung von prinzipiell zwei Methoden, fremdes genetisches Material in eine Pflanze einzuschleusen: entweder mit „integrativen Vektoren“ oder mit „binären Vektoren“. Bei der Konstruktion der „integrativen Vektoren“ macht man sich zunutze, daß die tumorinduzierenden Gene nicht für die eigentliche Infektion nötig

GCTGG	TGGCAGGATATATTG	TG	GTGTAAC	AAATT	Nopalin LB
GTGTT	TGACAGGATATATTG	GC	GGGTAAAC	CTAAG	Nopalin RB
AGCGG	CGGCAGGATATATTG	AA	TTGTAAT	GGCTT	Octopin LB (TL-DNA)
CTGAC	TGGCAGGATATATAC	CG	TTGTAATT	TGAGC	Octopin RB (TL-DNA)

Abb. 7. Vergleich der stark konservierten Bordersequenzen von Nopalin- und Octopin-T-DNA-Bereichen. Homologe Sequenzabschnitte sind eingerahmt. RB: Rechte Bordersequenz; LB: Linke Bordersequenz.

sind, und daß beliebige DNA-Sequenzen, die zwischen die beiden Border-Sequenzen inseriert werden, auch in Pflanzen übertragen werden. Bei diesen integrativen Vektoren wurden z. B. die Tumor-Gene der T-DNA durch Sequenzen des *E. coli*-Klonierungsvektors pBR 322 ersetzt<sup>[86]</sup>. Fremde DNA, die in das Pflanzen-Genom integriert werden soll, wird einfach in *E. coli* in einem pBR-Vektor kloniert und dann durch homologe Rekombination über diese pBR-Sequenzen in das Ti-Plasmid inseriert (Abb. 9).

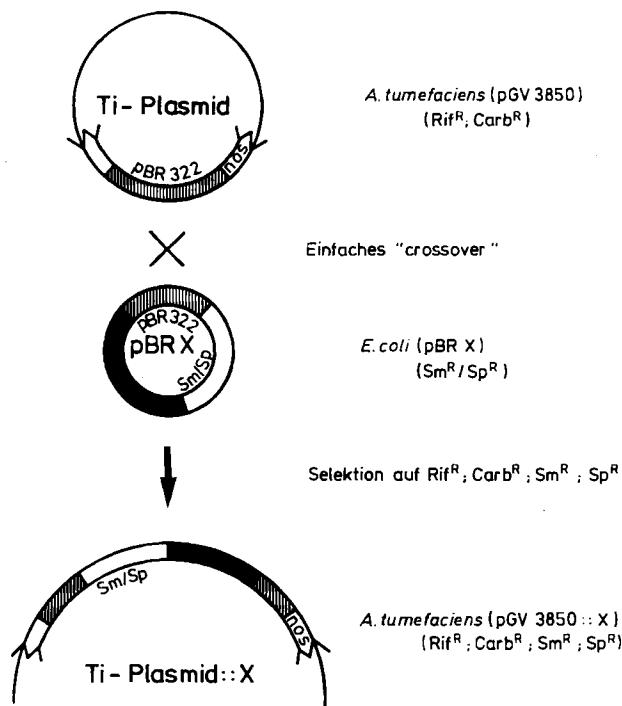


Abb. 9. Schemazeichnung der Einführung eines pBR-Vektors aus *E. coli* in ein modifiziertes Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens* (modifiziert nach [86]). Antibiotika: Carb = Carbenicillin; Rif = Rifampicin; Sm = Streptomycin; Sp = Spektinomycin.  $\blacksquare$  = pBR 322-Sequenzen;  $\blacksquare$  = transferiertes Fremd-Gen X;  $\leq$  = Border-Sequenzen.

Bei der Konstruktion der „binären Vektoren“ wird die Tatsache ausgenutzt, daß die Vir-Region und die „Borders“ auf zwei getrennten Plasmiden lokalisiert sein können, ohne daß die Infektiosität der Agrobakterien beeinflußt wird<sup>[97]</sup>. Demzufolge wurden die T-DNA-Borders auf ein Plasmid übertragen, das sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien repliziert werden kann. Diese Plasmide können sehr viel kleiner sein als das Ti-Plasmid (ca. 10–20 kb)<sup>[98]</sup>, und die einzelnen Klonierungsschritte können leicht in *E. coli* durchgeführt werden. Liegt die in Pflanzen zu transferierende DNA auf einem solchen Plasmid kloniert vor, wird dieses Plasmid in einen Agrobakterienstamm überführt, der schon ein Ti-Plasmid hat, das zwar noch eine Vir-Region, aber keine T-DNA mehr enthält. Agrobakterien mit diesen beiden Plasmiden sind ebenfalls imstande, die zwischen den Borders gelegene DNA stabil in das Pflanzen-Genom zu integrieren.

### 3.1.4. Methoden des Gentransfers mit *Agrobacterium tumefaciens*

Voraussetzung für einen DNA-Transfer von *Agrobacterium tumefaciens* in Pflanzen ist eine Infektion von Pflan-

zenzellen durch das Bakterium. Die Infektion von Pflanzengeweben mit *Agrobacterium tumefaciens* ist relativ einfach durchzuführen. Im einfachsten Falle werden Pflanzen mechanisch, z. B. mit einem Skalpell, verwundet, und auf die Wundstelle wird eine Agrobakteriensuspension appliziert.

Bessere Transformationseffizienzen werden durch Inkubation von Gewebeteilen mit Agrobakterien und anschließende Kultivation des Gewebes auf synthetischen Nährmedien erreicht. So werden bei der „leaf disc“-Methode kleine Blattstücke in eine Bakteriensuspension getaucht und danach weiterkultiviert<sup>[99]</sup>. Wird durch die Agrobakterien ein selektierbares Marker-Gen, z. B. das Resistenz-Gen gegen das pflanzentoxische Antibioticum Kanamycin, übertragen (siehe Abschnitte 3.3 und 4.1), lassen sich auf kanamycinhaltigen Nährmedien nur aus transformierten Zellen der Blattstücke neue Pflanzen regenerieren (Abb. 10).



a)



b)

Abb. 10. Gewinnung einer transgenen Pflanze durch Übertragung eines Resistenz-Gens gegen das pflanzentoxische Antibioticum Kanamycin. a) Blattstücke nach Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens*. Transformierte (rechts) und nichttransformierte Blattstücke (links) werden auf kanamycinhaltiges Nährmedium gelegt. Nur an den transformierten Blattstücken können sich Sprosse bilden. b) Aus einem Sproß regenerierte transgene Tabakpflanze (rechts) und nichttransformierte Tabakpflanze (links) auf kanamycinhaltigem Nährmedium. Nur die transformierte Pflanze überlebt.

Auch die als Cokultur bezeichnete Inkubation von Pflanzenprotoplasten mit Agrobakterien und anschließende Regeneration der behandelten Protoplasten zu Pflanzengewebe oder intakten Pflanzen führt zu guten Transformationsausbeuten<sup>[100]</sup>.

Den Vorteilen des Agrobakterien-Systems, z. B. einfache Transformationstechnik und gute Transformationsfrequenz, steht allerdings ein großer Nachteil gegenüber: der eingegrenzte Wirtsbereich des Agrobakteriums. Zwar sind sehr viele dikotyle und auch einige monokotyle Pflanzen der Familie der *Liliaceae*, z. B. *Asparagus officinalis* (Spargel)<sup>[101a]</sup> und *Chlorophytum capense* (Grünlilie)<sup>[101b]</sup>, suszeptibel für eine Infektion; bei den ökonomisch wichtigen Gramineen konnte aber mit Ausnahme von Mais<sup>[102]</sup> bisher keine Suszeptibilität für *Agrobacterium tumefaciens* nachgewiesen werden.

### 3.2. Direkte Transformation von Pflanzenzellen mit isolierter DNA

Wegen des begrenzten Wirtsbereiches der Agrobakterien wurde parallel nach anderen Methoden gesucht, um genetisches Material in Pflanzen einzuschleusen. Als erfolgreichste Methode erwies sich dabei bisher die Transformation von Pflanzenprotoplasten mit isolierter DNA<sup>[103, 104]</sup>, wie sie schon bei Bakterien<sup>[105]</sup> und tierischen Zellen<sup>[106]</sup> praktiziert worden war. Dabei wird die Fremd-DNA in die Pflanzenzellen ohne Benutzung eines natürlichen pflanzeninfektiösen Systems wie *Agrobacterium tumefaciens* übertragen. Die zu transformierenden Zellen werden zusammen mit der DNA lediglich in einer geeigneten Lösung inkubiert und bestimmten Verfahren unterworfen, die auch schon in der mikrobiologischen Forschung zur Übertragung fremden genetischen Materials verwendet wurden. Dazu gehören insbesondere Behandlungen mit Polyethylenglycol sowie Hitze- und Elektroschocks (Elektroporation). Bei der Elektroporation werden durch kurze Elektro-pulse kleine Poren in der Zellmembran erzeugt, durch die DNA in die Zelle eindringen kann<sup>[104, 107]</sup>. So einfach dieses Verfahren auch scheinen mag, die Schwierigkeiten liegen im Detail, da die Versuchsparameter für jede Pflanzen-spezies optimiert werden müssen.

Die direkte Transformation hat den unbestrittenen Vor teil, daß sie bei allen protoplastierbaren Pflanzen angewendet werden kann. Dazu gehören neben vielen dikotylen Pflanzen auch einige Gramineen. So gelang es bisher unter anderem, Fremd-DNA in Protoplasten von Reis (*Or yza sativa*)<sup>[108]</sup>, Mais (*Zea mays*)<sup>[109]</sup> und Weizen (*Triticum monococcum*)<sup>[110]</sup> einzuschleusen.

Ein Nachteil der direkten Transformation von Protoplasten gegenüber der Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens* ist jedoch, daß die Regeneration von intakten Pflanzen aus Protoplasten sehr viel länger dauert als die Regeneration aus Gewebeteilen. Der größte Nachteil der direkten Transformation besteht allerdings darin, daß trotz intensivster Forschung bei den Getreiden bisher nur der Reis aus Protoplasten zur intakten Pflanze regeneriert werden konnte<sup>[2, 1]</sup>.

### 3.3. Andere Methoden des Gentransfers

Da bei den bisher diskutierten Transformationsmethoden die erwähnten Nachteile (enger Wirtsbereich der Agrobakterien, mangelnde Regenerationsfähigkeit der wichtigsten Nutzpflanzen) noch nicht in befriedigender Weise überwunden werden konnten, wurden auch andere

Transformationsmethoden erforscht. Dazu gehört das Einschleusen von genetischem Material durch pflanzenpathogene Viren. Die meisten Pflanzenviren gehören zwar zur Gruppe der RNA-Viren, da aber das molekularbiologische Arbeiten mit RNA ungleich schwieriger ist als mit DNA, wurde hauptsächlich mit DNA-Viren experimentiert. Bis-her sind erst zwei Klassen von pflanzenpathogenen DNA-Viren bekannt, die als DNA-Vektoren verwendet werden könnten: die Gemini- und die Caulimoviren<sup>[111]</sup>. Das mit Abstand am besten charakterisierte DNA-Virus, das zur Klasse der Caulimoviren zählende „Cauliflower Mosaic Virus“ (CaMV), wurde schon zur Übertragung von Genmaterial in Pflanzen benutzt<sup>[112]</sup>. Bei CaMV ist es aber aufgrund der besonderen Genomstruktur des Virus nur möglich, sehr kleine, bis ca. 500 Nucleotide lange DNA-Stücke in das Virus-Genom zu integrieren. Zudem ist CaMV wegen des engen Wirtsbereichs (nur Pflanzen der Familie der *Brassicaceae*) und der Tatsache, daß Virus-DNA nicht stabil in das Pflanzen-Genom eingebaut wird, kein universelles Transformationssystem.

Zur Umgehung der bei vielen Arten immer noch schwierigen Regeneration von Protoplasten wurde versucht, DNA direkt in bestimmte Gewebe zu transferieren. So wurde von mehreren Autoren beschrieben, daß nach Inkubation von Pollen mit Fremd-DNA und anschließender Bestäubung von Pflanzen mit diesen Pollen transformierte Nachkommen erhalten worden seien<sup>[113, 114]</sup>. Allerdings konnten diese Beobachtungen bisher nicht reproduziert werden<sup>[115]</sup>.

Die Mikroinjektion von DNA in Zellkerne mit einer sehr feinen Kanüle ist eine bewährte Methode zur Genmanipulation in tierischen Zellen<sup>[116]</sup>. Auch zur Transformation von Pflanzenzellen wurde diese Mikroinjektion angewendet<sup>[117]</sup>. In Anbetracht der sehr großen pflanzlichen Zellvakuole und des kleinen Zellkerns, in den die DNA injiziert werden muß, ist diese apparativ aufwendige Methode aber nicht sehr effizient.

Auch die Injektion von DNA in reproduktive Pflanzenorgane wird praktiziert. Ein Durchbruch scheint hier durch die Injektion von DNA in junge Infloreszenzen von Roggenpflanzen gelungen zu sein<sup>[118]</sup>. Nach Injektion eines Resistenz-Gens gegen das pflanzentoxische Antibioticum Kanamycin konnten zum ersten Mal resistente, transformierte Roggenpflanzen regeneriert werden.

## 4. Genexpression in Pflanzen

### 4.1. Regulationsbereiche pflanzlicher Gene

Die ersten erfolgreichen Versuche, fremde DNA mit Hilfe des Ti-Plasmids in Pflanzen einzuschleusen, wurden mit den bakteriellen Resistenz-Genen gegen die Antibiotika Streptomycin und Kanamycin durchgeführt<sup>[119, 83]</sup>. Die Gene wurden in die T-DNA inseriert und so in das Pflanzen-Genom eingeschleust. Eine Transkription konnte allerdings nicht festgestellt werden. Das gleiche wurde z. B. auch bei einem Alkohol-Dehydrogenase-Gen aus Hefe<sup>[120]</sup> und einem  $\beta$ -Globin-Gen<sup>[121]</sup> aus Säugetierzellen beobachtet: Die Gene wurden zwar integriert, waren aber in der Pflanze nicht aktiv. Deshalb wurde vermutet, daß be-

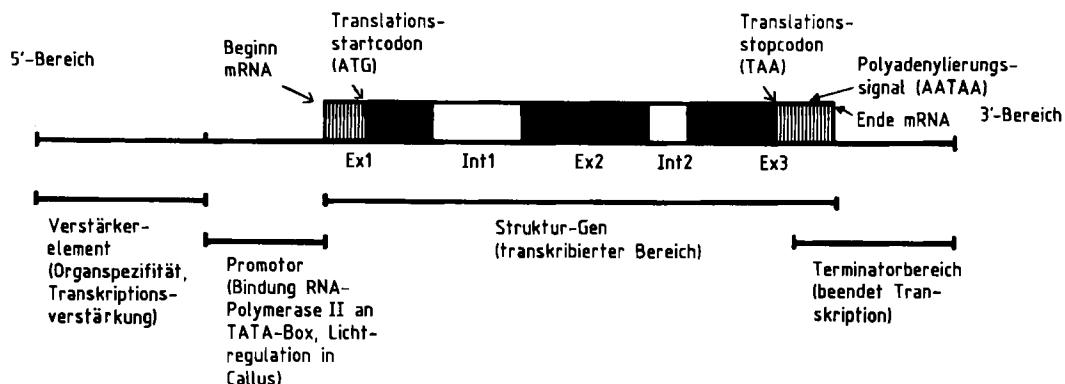


Abb. 11. Schematischer Aufbau eines pflanzlichen Gens am Beispiel eines ssRubisco-Gens. Verstärker-, Promotor- und Terminator-elemente regulieren die Expression des Struktur-Gens. Das gesamte Struktur-Gen wird transkribiert. Nach dem anschließenden Herausschneiden der Introns (Int) werden die als Exons (Ex) bezeichneten Bereiche zur fertigen mRNA zusammengesetzt. □ nicht-translatierte Bereiche der mRNA; ■ translatierte Bereiche der mRNA. Zur näheren Erklärung der hier verwendeten Begriffe wird auf [124] verwiesen.

stimmte pflanzenspezifische Transkriptionssignale zur Genaktivierung notwendig sind. Aus dem Studium tierischer Systeme war schon einiges über den Aufbau funktioneller eukaryontischer Gene bekannt<sup>[122]</sup>; Pflanzen-Gene zeigen prinzipiell die gleiche Struktur<sup>[123]</sup>. Ein typisches Pflanzen-Gen ist in Abbildung 11 dargestellt. Im nichttranskribierten 5'-Bereich eukaryontischer Gene befindet sich eine als Promotor bezeichnete DNA-Sequenz. An die Promotorsequenz, speziell an eine ca. 10 Bp lange, Adenin-Thymin-reiche Region, die TATA-Box<sup>[124]</sup>, bindet das Enzym RNA-Polymerase II, das die Synthese polyadenylierter eukaryontischer Transkripte (messenger-RNA) katalysiert. Promotorsequenzen sind demnach für die korrekte Initiation des Transkriptionsvorgangs zuständig. Die Transkription wird durch DNA-Sequenzen im 3'-Bereich, also am Ende des Gens, beendet. Diese Terminatorsequenzen sind auf bisher noch nicht genau geklärte Weise am Abbruch der Transkription und an der Anheftung der Poly-A-Sequenzen an die entstandenen RNA-Ketten (Polyadenylierung) beteiligt<sup>[126]</sup>. Zur Expression fremder Gene in Pflanzen wurde daher versucht, Promotor- und Terminatorsequenzen von solchen Genen zu benutzen, von denen bekannt war, daß sie in allen Pflanzengeweben aktiv sind. Das beste Gen hierfür war damals das Nopalinsynthase-Gen aus *Agrobacterium tumefaciens*. Es war isoliert<sup>[79]</sup>, es hatte eukaryontische Promotor- und Terminatorsequenzen und es wurde, wie aus Transformationsexperimenten mit Wildtyp-Agrobakterien bekannt war, unter anderem auch in pflanzlichem Callusgewebe exprimiert. Die Fusion der Promotor- und Terminatorbereiche an das bakterielle Gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase (Resistenz gegen Chloramphenicol) führte dann auch zur ersten Expression eines zusammengesetzten fremden Gens in Pflanzenzellen<sup>[127]</sup>. Zur Expression von Genen in Pflanzenzellen sind also bestimmte Regulationsbereiche notwendig, die bei der späteren funktionellen Analyse pflanzlicher Gene immer wieder gefunden wurden (Abb. 11).

In der folgenden Zeit wurde hauptsächlich daran gearbeitet, Resistenz-Gene gegen pflanzentoxische Antibiotika als selektierbare Marker in Pflanzen zu exprimieren, um transformierte und nichttransformierte Pflanzenzellen unterscheiden zu können. Es gelang, unter der Kontrolle der Nopalinsynthase-Regulationssequenzen, bakterielle Resi-

stanz-Gene gegen Kanamycin 3, Hygromycin und Methotrexat in callösem Pflanzengewebe zu exprimieren<sup>[128]</sup>. Dabei beruht z. B. die Resistenz gegen Kanamycin auf einer Phosphorylierung und damit einer Inaktivierung des Antibioticums durch die Expression des transferierten Gens der Neomycin-Phosphotransferase (Abb. 12).

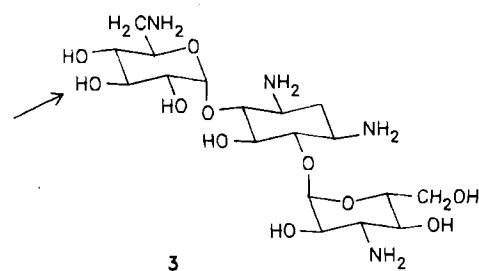


Abb. 12. Chemische Struktur des pflanzentoxischen Antibioticums Kanamycin 3 [129]. Die mit einem Pfeil gekennzeichnete OH-Gruppe wird durch das Enzym Neomycin-Phosphotransferase phosphoryliert. Dies führt zur Inaktivierung des Antibioticums.

#### 4.2. Differentielle Genexpression

Nachdem nun bewiesen war, daß fremde Gene in das Pflanzen-Genom eingeschleust und auch exprimiert werden können, wurde begonnen, komplexere Regulationsmechanismen pflanzlicher Gene auf molekularer Ebene zu untersuchen. Zu diesem Zweck mußten aber erst die integrativen und binären Vektorsysteme entwickelt werden, bei denen die Ti-Plasmid-codierten Tumor-Gene deletiert waren (siehe Abschnitt 3.1.3). Erst mit diesen Systemen war es möglich, nach der Transformation normal differenzierte Pflanzen zu regenerieren.

Zwei entwicklungsbiologische Phänomene werden derzeit besonders intensiv untersucht, da ihre Parameter relativ leicht zu definieren sind: zum einen die lichtspezifische und zum anderen die organspezifische Aktivierung bestimmter Gene.

Die lichtinduzierte Genexpression wird hauptsächlich an den Genen untersucht, die für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (ssRubisco)

und für das Chlorophyll-a/b-bindende Protein (CAB) codieren. Rubisco und CAB sind Schlüsselenzyme bei der  $\text{CO}_2$ -Fixierung bzw. bei der Photosynthese der Pflanzen<sup>[130]</sup>.

Auch die organspezifische Genexpression wird an den erwähnten Genen untersucht, die, neben ihrer lichtabhängigen Expression, nur in Chloroplasten enthaltenden Geweben (z. B. Blatt und Stengel) aktiviert werden. Eine andere wichtige Klasse der spezifisch exprimierten Gene codiert für die ernährungsphysiologisch wichtigen Speicherproteine<sup>[131]</sup>. So sind z. B. die Zein-Gene des Mais (*Zea mays*) oder die Legumin-Gene der Erbse (*Pisum sativum*) nur in Samen aktiv, in anderen Organen wie Blatt oder Wurzel jedoch nicht.

Im folgenden sollen einige grundlegende Versuchsansätze zur Erforschung von Genregulationsmechanismen mit DNA-Transfermethoden am Beispiel von ssRubisco beschrieben werden.

Das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase macht ca. 50% des löslichen Pflanzenproteins aus und ist somit das häufigste auf der Erde vorkommende Protein. Es setzt sich aus acht identischen großen Untereinheiten ( $M_r$ , 56 000 Dalton, LS-Rubisco) und acht identischen kleinen Untereinheiten ( $M_r$ , 14 000 Dalton, ssRubisco) zusammen. Während das Gen der großen Untereinheit im Chloroplasten-Genom lokalisiert ist, wird die kleine Untereinheit vom Zellkern codiert. Die ssRubisco-Untereinheiten werden im Cytosol gebildet und gelangen nach proteolytischer Abspaltung eines etwa 6000 Dalton großen Transit-Peptides in das Stroma der Chloroplasten. Hier lagern sie sich mit den in den Chloroplasten gebildeten LS-Rubisco-Untereinheiten zum funktionellen Holoenzym zusammen.

Das Enzym Rubisco kann nur im Gewebe belichteter Pflanzen nachgewiesen werden; im Dunkeln hört die Synthese des Enzyms nach kurzer Zeit auf<sup>[132]</sup>. Da bei den ins Dunkle gebrachten Pflanzen keine Rubisco-spezifische mRNA mehr nachgewiesen werden kann, wird die Genaktivität auf der Ebene der Transkription reguliert<sup>[133]</sup>. Zur Transkription eines Gens ist die Bindung der RNA-Polymerase II an die entsprechende Promotorsequenz nötig. Deshalb wurde vermutet, daß in diesem Promotorbereich eine spezifische Sequenz existiert, die in irgendeiner Weise mit der lichtabhängigen Expression zusammenhängt. An diese Sequenz könnten z. B. Faktoren binden, die eine Bindung der Polymerase an die DNA begünstigen oder inhibieren<sup>[134]</sup>. Eine Möglichkeit, diese Hypothese zu untersuchen, besteht darin, solche DNA-Bereiche zu isolieren und mit Strukturbereichen geeigneter Marker-Gene zu fusionieren. Die differentielle Expression dieser chimären Gene könnte dann in transgenen Pflanzen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein direkt vor der Transkriptionsstartstelle eines ssRubisco-Gens liegender, ca. 1000 Nucleotide langer Bereich dem Gen der bakteriellen Chloramphenicol-Acetyltransferase vorgeschaltet. Die Expression dieser Konstruktion wurde in transformierten Tabakzellen lichtabhängig reguliert und schien damit die oben genannte Hypothese zu bestätigen<sup>[135]</sup>. Mittlerweile konnte durch ähnliche Versuche gezeigt werden, daß ein nur 33 Basenpaare langer DNA-Bereich für die lichtspezifische Regulation eines ssRubisco-Gens in Callusgewebe ausreicht<sup>[136]</sup>. Durch diesen Bereich konnte aber keine normal starke Expression des Gens erreicht werden; die Genakti-

vität war um ein Vielfaches geringer. Daraufhin wurde ein weiteres „Verstärkerelement“ (siehe Abb. 11) von ca. 250 Bp Länge entdeckt, das – unabhängig von seiner Orientierung – die Aktivität eines sonst konstitutiv wirkenden Promotors lichtabhängig verstärkte<sup>[130]</sup>.

Die bisher isolierten pflanzenspezifischen Promotoren können in drei Kategorien eingeteilt werden: lichtabhängige Promotoren, gewebespezifisch regulierte Promotoren wie diejenigen der Samenspeicherprotein-Gene aus Mais, Weizen, etc., sowie Promotoren konstitutiv exprimierter Gene. Die Expressionshöhe transferierter Gene ist in transgenen, d. h. transformierten Pflanzen meist geringer als in den Pflanzen, aus denen die Gene isoliert wurden<sup>[137]</sup>. Deshalb sucht man speziell nach Promotoren von Genen, die an sich schon sehr hoch exprimiert werden. Einer der stärksten Promotoren, der bisher in Versuchen zur Pflanzentransformation eingesetzt wurde, ist viralen Ursprungs. Es ist der konstitutiv wirkende Promotor des 35S-Transkripts des pflanzenpathogenen Cauliflower-Mosaic-Virus, von dem berichtet wurde, er sei ungefähr 30mal stärker als der Nopaline-Synthase-Promotor<sup>[138]</sup>. Auf der Suche nach weiteren induzierbaren Genen wurden noch durch Hitze<sup>[139]</sup>, Dunkelheit<sup>[140]</sup> und Nitrat induzierbare<sup>[141]</sup> Gensequenzen isoliert.

Promotoren dikotyler Pflanzen scheinen die Expression eines Gens in anderen dikotylen Pflanzen korrekt zu regulieren. So wurde, neben vielen anderen Beispielen, ein organspezifisch exprimiertes Samenspeicherprotein-Gen aus der Sojabohne nach dem Transfer in Tabakpflanzen exakt nach dem gleichen zeitlichen und gewebespezifischen Muster exprimiert wie in der Sojabohne<sup>[142]</sup>.

Über die Funktion von Promotoren monokotyler Pflanzen in dikotylen Spezies gibt es hingegen sehr widersprüchliche Aussagen. Ein CAB-Gen aus Weizen wurde in Tabakpflanzen korrekt transkribiert<sup>[143]</sup>, während ein ss-Rubisco-Gen aus Weizen in Tabak nicht aktiv war<sup>[144]</sup>.

Neben der Stärke eines Promotors spielen noch andere Faktoren für die Expressionshöhe eines transferierten Gens eine wichtige Rolle. So wird beim Gentransfer oftmals nicht nur eine einzige Genkopie in das Pflanzen-Genom integriert; es konnten schon mehr als fünf Kopien eines transferierten Gens im Genom transgener Pflanzen nachgewiesen werden<sup>[137]</sup>. Aber selbst bei Berücksichtigung der unterschiedlichen Genkopienzahl wird eine große Variabilität in der Expression bei den transgenen Pflanzen eines Transformationsexperimentes beobachtet. Dieses Phänomen wird meist mit dem Positionseffekt erklärt<sup>[145]</sup>. Bei den Integrationsstellen von transferierter DNA im Pflanzen-Genom ergaben sich bisher bezüglich der Nucleotidsequenz noch keine offensichtlichen Gemeinsamkeiten; diese Stellen scheinen vollkommen zufällig zu sein<sup>[146]</sup>. Deshalb kann es vorkommen, daß Gene in mehr oder weniger stark transkribierte DNA-Bereiche integrieren und dadurch unterschiedlich stark exprimiert werden. Wegen dieser Variabilität in der Expressionshöhe ein und derselben Genkonstruktion müssen aus einer Anzahl transgener Pflanzen eines Transformationsversuchs diejenigen ausgewählt werden, welche die gewünschte Eigenschaft im erforderlichen Maße ausprägen. Ist ein Gen allerdings erst einmal in das Pflanzen-Genom eingebaut, wird es nach den Mendelschen Gesetzen stabil von Generation zu Generation weitergegeben<sup>[147]</sup>.

## 5. Ziele der angewandten Gentechnik mit Pflanzen

Einige der wichtigsten Ziele der Gentechnik mit Pflanzen sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Die erwähnten Ziele sind lediglich Beispiele, die ausgewählt wurden, um die vielfachen Möglichkeiten des Gentransfers auf Pflanzen zu verdeutlichen. Vollständigkeit wurde nicht angestrebt.

Tabelle 4. Gentechnik mit Pflanzen – mögliche Anwendungen.

1. Resistenzherzeugung gegen
Herbizide
Viruserkrankungen
pilzliche Erkrankungen
Schädlinge
Mikroorganismen
Stressbedingungen
2. Beeinflussung pflanzlicher Inhaltsstoffe
Veränderung der Aminosäurezusammensetzung oder des Proteingehalts
Veränderung der Zusammensetzung pflanzlicher Öle, Kohlenhydrate oder Metabolite
Beeinflussung von Inhaltsstoffen, die für Verarbeitung, Lagerung oder Transport von Bedeutung sind
3. Beeinflussung pflanzenphysiologischer Vorgänge
Beeinflussung der Photosynthese und/oder Photorespiration
4. Beeinflussung der Stickstofffixierung
5. Gentechnik als Hilfsmittel für die Pflanzenzüchtung
Diagnose von Krankheiten
Gen- und Genotypencharakterisierung

### 5.1. Erzeugung resistenter Pflanzen

#### 5.1.1. Herbizidresistenz

Der Anbau von Pflanzen, die eine Resistenz gegen Herbizide aufweisen, gehört seit langem zur landwirtschaftlichen Praxis, da „selektive Herbizide“ breite Anwendung finden. Diese Herbizide werden in bestimmten Kulturpflanzen metabolisch so verändert (z. B. durch Hydroxylierung, Konjugation mit Kohlenhydraten oder Glutathion, Desmethylierung), daß die herbizide Wirkung verloren geht. Beispiele hierfür sind Mais mit Resistenz gegen Atrazin<sup>[148]</sup>, Weizen mit Resistenz gegen Diclofop-Methyl<sup>[149]</sup>, Zuckerrüben mit Resistenz gegen Phenmedipham<sup>[150]</sup> oder Getreidearten mit Resistenz gegen Chlorsulfuron. Die genannten Kulturen haben folglich eine physiologisch bedingte, natürliche Herbizidresistenz, die vom Landwirt ausgenutzt wird.

Häufig ist beim landwirtschaftlichen Anbau die Anwendung mehrerer Herbizide oder die Verwendung von Herbizidmischungen erforderlich, da nur so alle auftretenden Unkräuter bekämpft werden können. Bei Einführung einer Resistenz gegen ein nichtselektives Herbizid kann wahrscheinlich auf die Anwendung mehrerer Herbizide verzichtet werden.

Pflanzen mit einer Resistenz gegen nichtselektive Herbizide werden voraussichtlich zu den ersten landwirtschaftlich nutzbaren Ergebnissen der Gentechnik mit Pflanzen gehören. Bei den meisten modernen Herbiziden ist der Wirkort bekannt und biochemisch charakterisiert. Dies ist in der Regel die Voraussetzung für die Entwicklung von Strategien zur Erzeugung herbizidresistenter Pflanzen mit der Gentechnik. Dieses Ziel erscheint in mehreren Fällen durch die Übertragung nur eines Gens oder weniger Gene

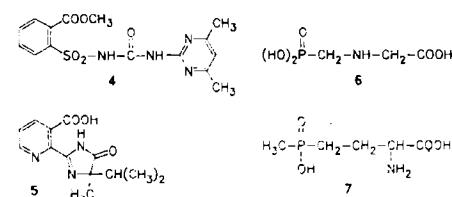
erreichbar. Weitere Gründe für die intensive Bearbeitung der Herbizidresistenz sind in den Vorteilen zu suchen, die resistente Pflanzen dem Landwirt bieten:

Bei Anbau resisterter Kulturen wird eine vorbeugende Herbizidanwendung überflüssig. Der Landwirt hat nun die Möglichkeit, das Herbizid erst bei Bedarf einzusetzen, nämlich nur dann, wenn die Verunkrautung ein erträgliches Maß übersteigt. Dies steht im Gegensatz zu der jetzt meist üblichen Praxis, bei der auf eine vorbeugende Herbizidanwendung nicht verzichtet werden kann.

Auch die Bodenerosion kann bei Verwendung herbizidresisterter Pflanzen herabgesetzt werden, denn durch den nun möglichen späteren Herbizideinsatz läßt sich das Auftreten freiliegender Flächen verhindern. Es sei erwähnt, daß herbizidresistente Kulturen auch für das Direktsaatverfahren<sup>[151]</sup> gut geeignet sind. Wegen der möglichen Anwendung von Herbiziden nach dem Schadschwellenkonzept und des Ersatzes mehrerer verschiedener Herbizide durch ein nichtselektives Herbizid ist längerfristig zu erwarten, daß durch herbizidresistente Kulturen der Gesamtverbrauch an Herbiziden vermindert wird. Hierin ist auch, neben der vereinfachten Anwendung, der wirtschaftliche Vorteil für den Landwirt zu sehen.

Auch durch Methoden der klassischen Zellbiologie (siehe Abschnitt 2.3) können herbizidresistente Pflanzen erhalten werden. Der Zusatz eines Herbizids zum Medium pflanzlicher Zellkulturen ermöglicht die Selektion resisterter Calli, aus denen später herbizidresistente Pflanzen gewonnen werden können<sup>[152, 153]</sup>. Am Beispiel einiger neuerer Herbizide sollen Möglichkeiten zur Gewinnung herbizidresistenter Pflanzen durch Zellbiologie und Gentechnik diskutiert werden (Tabelle 5).

Tabelle 5. Beispiele einiger Herbizide, gegen die eine Resistenz in pflanzlichen Zellen erzeugt wurde.



Herbizid	Wirkstoffklasse	Wirkort oder Wirkmechanismus	Lit.
4 Sulfometuron-methyl	Sulfonylharnstoff	Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylat-Synthetase, dadurch Verhinderung der Biosynthese verzweigter Aminosäuren	[154, 156]
5 Imazapyr	Dihydroimidazolon	wie bei 4	[155, 157]
6 Glyphosate	Aminosäure-Derivat	Hemmung der 5-Enolpyruvylshikimisäure-3-phosphat-Synthase, dadurch Verhinderung der Biosynthese aromatischer Aminosäuren	[153, 159, 161]
7 Phosphinotrichic acid (Glufosinate)	Aminosäure-Derivat	Hemmung der Glutamin-Synthetase, dadurch Anstieg der intrazellulären Ammoniumakkonzentration und Hemmung der Proteinbiosynthese	[160, 162]

Relativ neue Herbizide stammen aus den Verbindungs klassen der Sulfonylharnstoffe und Dihydroimidazolone. Diese Herbizide wirken durch Hemmung des Enzyms Acetolactat-Synthetase, das an der Biosynthese der verzweigten Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin in Pflanzen beteiligt ist<sup>[154, 155]</sup>. Bei den Sulfonylharnstoffen Chlorsulfuron und Sulfometuron-methyl konnten durch Selektion gegen diese Herbizide resistente Pflanzen erhalten werden<sup>[156]</sup>. Auch bei den Dihydroimidazolonen gelang die Selektion resistenter Pflanzen<sup>[157]</sup>, die wegen des gemeinsamen Wirkortes auch Kreuzresistenz gegen Sulfonylharnstoffe aufweisen.

In beiden Fällen scheint die Ursache der Resistenz entweder eine Überproduktion des Enzyms oder eine Mutation des Gens zu sein. Beide Möglichkeiten können mit der Gentechnik nach Isolierung des Gens der Acetolactat-Synthetase leicht überprüft und nachvollzogen werden.

Über die Gentechnik können folgende Wege zu herbizidresistenten Pflanzen führen (Wirkort ist in diesen Fällen ein Enzym):

- Veränderung des Wirkortes durch Mutation (z. B. Glyphosate<sup>[158]</sup>);
- Erhöhung der Konzentration des Wirkortes (z. B. Glyphosate<sup>[159]</sup>, Phosphinothricin<sup>[160]</sup>);
- Einführung metabolisierender Enzyme.

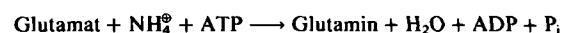
Zur Auswahl der günstigsten Strategie sind genaue Kenntnisse über den Wirkort und das Abbauverhalten des Herbizids notwendig. Meistens können mehrere der angegebenen Wege zur Erzeugung einer Herbizidresistenz führen.

Das Herbizid Glyphosate verhindert in pflanzlichen Zellen die Synthese aromatischer Aminosäuren durch Hemmung des Enzyms 5-Enolpyruylshikimisäure-3-phosphat-Synthase (EPSP-Synthase)<sup>[161]</sup>. Glyphosate ist eines der am weitesten verbreiteten nichtselektiven Herbizide. Resistente pflanzliche Zellkulturen konnten durch Selektion in Anwesenheit von Glyphosate erhalten werden. Ursache der Resistenz ist eine Erhöhung der Konzentration des Wirkorts, die auf einer Zunahme der Genzahl (Genamplifikation) beruht<sup>[159]</sup>. Bei der gentechnischen Erzeugung toleranter Pflanzen wurde eine ähnliche Strategie verfolgt. Das Gen der EPSP-Synthase, des Wirkortes, konnte aus Zellkulturen von *Petunia hybrida* isoliert werden. Die verstärkte Bildung des Enzyms in Pflanzen wurde durch den Austausch des Promoters des Gens der EPSP-Synthase gegen den konstitutiv wirkenden 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaic-Virus (Abschnitt 4.2) erreicht. Nach Wiedereinführung dieser Hybridkonstruktion in Petunienzellen konnte eine um das 40fache erhöhte Enzymaktivität in Pflanzencallus nachgewiesen werden, die als Ursache der zu beobachtenden Toleranz angesehen wurde<sup>[163]</sup>. Aus diesen Calli konnten tolerante Pflanzen erhalten werden.

Auch über Mutanten mit verändertem Wirkort für das Herbizid Glyphosate lassen sich tolerante Pflanzen erhalten. Nach Mutagenese von *Salmonella typhimurium* konnte ein Stamm gewonnen werden, dessen EPSP-Synthase unempfindlich gegen Glyphosate war. Die Resistenz beruhte auf dem Austausch einer der insgesamt 421 Aminosäuren des Enzyms aus *Salmonella*<sup>[158]</sup>. Das mutierte Struktur-Gen

wurde isoliert, mit Regulationselementen versehen, die in Pflanzen erkannt werden, und anschließend in das Genom von Tabakpflanzen eingebaut. Mit diesem aus Bakterien stammenden Resistenz-Gen gelang es ebenfalls, tolerante Pflanzen gegen Glyphosate zu erhalten<sup>[164]</sup>.

Als letztes Beispiel soll auf das Herbizid Phosphinothricin eingegangen werden<sup>[162]</sup>, das die Metabolisierung von Ammonium-Ionen in pflanzlichen Zellen durch Hemmung des Enzyms Glutamin-Synthetase verhindert. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion



Auch hier konnten resistente Zellkulturen erhalten werden. Als Ursache der Resistenz wurde eine Genamplifikation und dementsprechend eine erhöhte Konzentration des Enzyms Glutamin-Synthetase (Wirkort des Herbizids) festgestellt<sup>[160]</sup>. Eine solche resistente Zelllinie diente wegen der erhöhten Kopienzahl des Gens als Ausgangspunkt für die Isolierung des Gens der Glutamin-Synthetase aus Luzerne<sup>[165]</sup>. Kürzlich gelang die Expression des Gens einer pflanzlichen Glutamin-Synthetase in einer *E.-coli*-Mutante, die über keine eigene Glutamin-Synthetase mehr verfügte<sup>[166]</sup>.

### 5.1.2. Virusresistenz

Bei der gentechnischen Erzeugung virusresistenter Pflanzen konnten kürzlich beachtliche Erfolge erzielt werden. Ausgangspunkt war die seit langem bekannte Beobachtung, daß Pflanzen nach einer Infektion mit einem schwach pathogenen Virus keine Befallsymptome mehr entwickeln, wenn sie anschließend mit einem virulenten Stamm infiziert werden. Teilweise wird diese Eigenschaft bei der Anzucht von Tomaten oder Kartoffeln genutzt. Der molekulare Mechanismus einer solchen „Kreuzresistenz“ ist bisher noch nicht aufgeklärt; mehrere teilweise kontroverse Theorien warten noch auf experimentelle Bestätigung. Ausgehend von der Überlegung, daß eine Kreuzresistenz möglicherweise auch durch Expression einzelner Gene eines Virus erzeugt werden kann, transferierten Beachy et al.<sup>[167]</sup> das Gen für das Hüllprotein des Tabakmosaikvirus (TMV) mit *Agrobacterium tumefaciens* auf Tabakpflanzen. Tatsächlich wies ein hoher Prozentsatz der transformierten Pflanzen, die nun das Hüllprotein des Virus bilden, nach einer künstlichen Infektion mit TMV keine Symptome auf. Im Gegensatz dazu war bei allen Kontrollpflanzen nach drei bis vier Tagen eine deutliche Infektion zu erkennen.

Dieser sehr wichtige Erfolg bei der Erzeugung virusresistenter Pflanzen ermöglicht gezielte Untersuchungen zum Phänomen der Kreuzresistenz, da offensichtlich dazu lediglich die Expression eines einzelnen Gens notwendig ist, und eröffnet die Möglichkeit, virusresistentes Saatgut herzustellen.

Möglicherweise hängt die „induzierte Resistenz“ auch mit der Bildung von „Pathogen Related Proteins“ (PR-Proteins) zusammen. Mehrere Pflanzen bilden nach Infektion mit Viren, Viroiden, Bakterien oder Pilzen bestimmte Proteine, deren Auftreten mit der Bildung einer Resistenz gegen weitere Infektionen korreliert werden kann<sup>[168]</sup>. Die

Konzentration der PR-Proteine steigt bei Beginn einer Infektion bis zum 100fachen des Ausgangswertes<sup>[169, 170]</sup>; sie treten vorwiegend extrazellulär auf und sind weitgehend proteasesistent. Durch Kreuzung verschiedener Tabaksorten, die nach Induktion mit einem Pathogen das gleiche PR-Protein bilden, konnten Hybriden erhalten werden, die konstitutiv dieses PR-Protein bilden. Diese Hybriden zeigten eine deutlich erhöhte Resistenz gegen Virusinfektionen<sup>[171]</sup>. Weitere Untersuchungen zu den bisher noch unbekannten Funktionen dieser Proteine versprechen ein besseres Verständnis der Resistenzmechanismen bei Pflanzen.

Da Gensequenzen einiger dieser Proteine bereits kloniert sind<sup>[170]</sup>, erscheint auch die praktische Nutzung dieser Resistenzmechanismen in absehbarer Zukunft möglich. Auch die Untersuchung der Promotoren der PR-Protein-Gene eröffnet zahlreiche wissenschaftliche und praktische Möglichkeiten, da sie durch eine Infektion induziert werden und die PR-Proteine (es sind bis zu zehn identifiziert worden) höchstwahrscheinlich unterschiedliche Promotoren aufweisen. Die Überexpression einiger dieser Proteine könnte spezifische Schutzmechanismen aktivieren.

### 5.1.3. Resistenz gegen pilzliche Erkrankungen und Mikroorganismen

Die durch Pflanzenkrankheiten verursachten Schäden sind auch heute trotz des Einsatzes von Pflanzenschutzmitteln noch sehr hoch. Für 1976 wurde der weltweite Ernteverlust durch Krankheiten – im wesentlichen Pilzerkrankungen – auf 50 Milliarden US-Dollar geschätzt<sup>[172]</sup>. Ähnlich wie bei den meisten der vorherigen Beispiele kann die gentechnische Ausprägung von Resistzenzen gegen Krankheiten auf der Ausnutzung natürlicher Abwehrmechanismen beruhen, die entweder verstärkt oder via Gentechnik zwischen bisher nicht kreuzbaren Pflanzen übertragen werden. Ähnlich wie bei Virusinfektionen tritt auch bei Pilz- und Bakterieninfektionen eine „induzierte Resistenz“ auf, deren Ursache noch nicht geklärt werden konnte<sup>[173]</sup>. Pflanzen verfügen über mehrere unterschiedliche Abwehrmechanismen gegen Infektionen:

- Erhöhte Ligninbildung an der Zellwand und dadurch besserer Schutz gegen Eindringlinge;
- Bildung von Hydrolasen, deren Funktion die Auflösung von Polysacchariden in der Zellwand eindringender Pilze sein kann;
- Bildung niedermolekularer, sekundärer Stoffwechselprodukte, die toxisch für infizierende Organismen sein können;
- Bildung von „Hydroxyprolin Rich Proteins“ unbekannter Funktion, die in der Zellwand von Pflanzen auftreten und deren Konzentration nach einer Infektion stark ansteigen kann;
- Bildung infektionsspezifischer Proteine ungeklärter Funktion, die wahrscheinlich bei der Abwehr von Infektionen eine wichtige Rolle spielen<sup>[174]</sup>.

Für die gentechnische Erzeugung von Resistzenzen gegen Pilze oder Mikroorganismen bieten sich folgende Ansätze an, die in mehreren Laboratorien geprüft werden:

1. Die Induktoren und die Mechanismen, die zur Ausprägung der Abwehrreaktionen bei Pflanzen erforderlich sind,

müssen aufgeklärt werden. Es ließen sich bereits mehrere Auslöser für Abwehrreaktionen (Elicitoren) identifizieren. Außerdem gelang es, die Gene wichtiger Proteine, deren Expression bei einer Infektion stark ansteigt, zu charakterisieren<sup>[175, 176]</sup>.

2. Zahlreiche Pflanzen enthalten das Enzym Chitinase, dessen Aktivität bei einem Pilzbefall stark ansteigt<sup>[177]</sup>. Chitin (Poly-N-acetyl-D-glucosamin) tritt in pflanzlichen Zellen nicht auf, ist aber ein wichtiger Bestandteil der Zellwand von Pilzen. Es wird daher angenommen, daß die bei einer Infektion gebildete Chitinase die Funktion hat, pilzliche Zellwände zu hydrolysieren und damit einen Pilzbefall abzuwehren. Mehrere Chitinase-Gene konnten bereits isoliert werden<sup>[178]</sup>. Der nächste Schritt wäre nun, gentechnisch eine verstärkte Bildung der Chitinase bei Pilzbefall zu erzeugen.

3. Oftmals kommen in wildlebenden Verwandten unserer Kulturpflanzen wichtige Resistenz-Gene vor. Nicht in allen Fällen können diese Resistenz-Gene über Kreuzungsexperimente in Kulturpflanzen übertragen werden. Hier könnte die Gentechnik zu einem wichtigen Werkzeug für den Züchter werden. Ein Beispiel ist das Auftreten von Rost in Soja (*Glycine max*), der durch *Phakospora pachyrhizi* verursacht wird und hohe Verluste erzeugen kann. Resistenz-Gene sind in entsprechendem Zuchtmaterial nicht gefunden worden. In anderen Arten der Gattung *Glycine* sind allerdings Resistenz-Gene vorhanden, deren gentechnische Übertragung auf Soja einen erheblichen wirtschaftlichen Nutzen bedeuten würde<sup>[179]</sup>.

4. Bei einigen pflanzenpathogenen Organismen wurde festgestellt, daß nahe verwandte Stämme häufig keine Infektion in Pflanzen mehr verursachen können. Da bei Mikroorganismen molekularbiologische Untersuchungen leichter durchzuführen sind als bei Pflanzen, wird vielfach auch versucht, die Gene zu charakterisieren, die für die „Erkennung“ der anfälligen Wirtspflanzen und für den Beginn der pflanzenpathogenen Reaktion zuständig sind<sup>[180, 181]</sup>. Wenn diese Mechanismen verstanden werden, lassen sich im Gegenzug weitere gentechnische Strategien entwerfen, um eine Resistenz gegen diese Pathogene hervorzurufen.

### 5.1.4. Resistenz gegen Schädlinge

Ähnlich wie bei den bisher diskutierten Beispielen wird vermutet, daß Pflanzen auch Abwehrmechanismen gegen Insekten entwickelt haben; wahrscheinlich sind Bruchstücke der Zellwand (Oligosaccharide) die auslösenden Faktoren<sup>[176, 182]</sup>. Ein möglicher Abwehrmechanismus gegen tierische Schädlinge besteht in der Bildung von Protease-Inhibitoren als Reaktion auf Verletzungen der Pflanzen<sup>[182]</sup>. Diese Inhibitoren sind Proteine und wirken als potente Hemmstoffe für Serin-Proteasen, die am Verdauungsprozeß von Insekten beteiligt sind<sup>[183]</sup>; die Inhibitoren könnten daher eine Fraßhemmung hervorrufen. Da es sich um Proteine handelt, ermöglicht die Gentechnik durch Überexpression der entsprechenden Gene eine verstärkte Bildung dieser Inhibitoren, möglicherweise spezifisch in Blättern oder Früchten. Die Genstruktur und -sequenz eines solchen Inhibitors wurde kürzlich veröffentlicht<sup>[184]</sup>.

Die Übertragung von Genen für insektentoxische Proteine bietet eine weitere Möglichkeit zur gentechnischen

Erzeugung insektenresistenter Pflanzen. Ein Beispiel für ein solches Protein ist das Toxin aus *Bacillus thuringiensis*. Bakterien, die dieses Toxin produzieren, werden seit Jahrzehnten zur biologischen Bekämpfung bestimmter Raupen eingesetzt. Allerdings fanden die Bakterien keine breite Anwendung, weil sie langsamer als chemische Pflanzenschutzmittel wirken. Kürzlich gelang es, das entsprechende Gen zu isolieren und in Tabakpflanzen einzubauen<sup>[185]</sup>. Über die Insektenresistenz einer derart veränderten Pflanze läßt sich noch nichts aussagen. Eine wirksame Abwehr kann z. B. auch in der Bildung niedermolekularer Substanzen bestehen, deren Konzentration bei mechanischer Schädigung oder bei Insektenbefall stark zunimmt und die zumindest fraßhemmend wirken<sup>[175, 186, 187]</sup>. Diese Verbindungen können den unterschiedlichsten chemischen Klassen angehören und sind häufig sekundäre Stoffwechselprodukte: Phytoalexine, Tannine und sogar Substanzen, die bei Insekten eine Hormon- oder Signalwirkung ausüben (Ecdyson, Pheromone und Analoga des für die Entwicklung von Insekten wichtigen Juvenilhormons). Die gentechnische Ausnutzung dieser Abwehrstrategie erscheint problematisch, da einerseits an der Biosynthese dieser Verbindungen zahlreiche Enzyme (und Gene) beteiligt sind und andererseits die Verbindungen häufig auch unangenehme Nebenwirkungen für den Menschen aufweisen.

#### 5.1.5. Streßresistenz

Viele Umweltfaktoren wirken streßerzeugend auf Pflanzen: Hitze, Trockenheit, Staunässe, hoher Salzgehalt des Bodens usw. Als Abwehr gegen diese Streßbedingungen leitet die Pflanze Gegenreaktionen ein, deren Bedeutung noch nicht vollständig erkannt ist. Beispielsweise werden als Antwort auf einen Hitzeschock unter anderem Proteine synthetisiert, deren genaue Funktion man noch nicht kennt. Sie sind aber sicher an der Bildung eines Schutzmechanismus beteiligt und werden teilweise zu den Chloroplasten transportiert<sup>[188]</sup> und dort inkorporiert.

Unter anderen Streßbedingungen bilden sich häufig die gleichen Proteine wie unter den Bedingungen des Hitzeschocks, allerdings in geringerem Ausmaß<sup>[189]</sup>. Oft treten auch streßbedingte Schwankungen des Aminosäuregehalts auf; so kann der Prolinegehalt in Pflanzen stark zunehmen<sup>[190]</sup>.

Der gentechnische Ansatz zur Erhöhung der Streßresistenz könnte in der Identifizierung und Isolierung der wichtigsten am Schutz vor Streßbedingungen beteiligten Gene liegen, die anschließend von resistenten auf empfindliche Pflanzen übertragen werden.

#### 5.2. Beeinflussung pflanzlicher Inhaltsstoffe

Mehrere Beispiele, die in Abschnitt 5.1 unter dem Gesichtspunkt einer Resistenzerzeugung diskutiert wurden, betreffen bereits die verstärkte Bildung pflanzlicher Inhaltsstoffe. Es sollen nun weitere Möglichkeiten zur „Verbesserung“ der Eigenschaften eines Erzeugtes erwähnt werden. Unter anderem lassen sich durch die Gentechnik sowohl die Gewinnung und Verarbeitung von Nahrungsmitteln als auch die Erzeugung pflanzlicher Rohstoffe für die Industrie beeinflussen.

Die Samen von Getreide- und Gemüsepflanzen sind auch wegen des hohen Protein- und Aminosäuregehaltes ein wichtiger Faktor für die Ernährung von Mensch und Tier. Die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe dieser wichtigen Nahrungsquelle entspricht allerdings nicht immer den Bedürfnissen, da häufig essentielle Aminosäuren nicht in den notwendigen Anteilen vorhanden sind. Mais enthält z. B. nur wenig Lysin und Tryptophan. Aus diesem Grund wird bei Verwendung von Mais als Tierfutter in der Regel Sojamehl zugesetzt, das wiederum defizient an der Aminosäure Methionin ist. Eine längerfristige Aufgabe der Gentechnik könnte es nun sein, den Aminosäuregehalt der Speicherproteine wichtiger Pflanzen so zu verändern, daß eine ausgewogene Zusammensetzung entsteht. Über die klassische Züchtung konnten bei Mais bereits Sorten entwickelt werden, die einen höheren Lysingehalt aufweisen. Allerdings waren damit unerwünschte Merkmale wie geringer Ertrag, geringer Proteingehalt oder Anfälligkeit gegen Krankheiten verbunden<sup>[191]</sup>. Die gentechnische Bearbeitung eines solchen Projektes ist nicht leicht, da die Speicherproteine in der Regel durch umfangreiche Genfamilien codiert werden. Die verstärkte Expression eines einzelnen Gens dürfte daher kaum einen nennenswerten Beitrag zum gesamten Aminosäuregehalt leisten. Hier gilt es nun, entweder über die Gentechnik den Stoffwechsel im Samen so zu beeinflussen, daß der Gehalt an einer bestimmten freien Aminosäure stark zunimmt, oder mehrere, günstig veränderte Gene einzuführen. Weitere Möglichkeiten zur Steigerung der Qualität von Pflanzensamen werden in der Literatur diskutiert<sup>[192]</sup>.

Neben der gentechnischen Veränderung pflanzlicher Erzeugnisse, die für die Nahrung verwendet werden, ist sicher auch die verstärkte Bildung bestimmter Inhaltsstoffe wichtig, die in der Medizin oder als industrielle Rohstoffquellen genutzt werden können<sup>[193]</sup>. Als Beispiel sei die Beeinflussung von Ölplanten (z. B. Soja, Raps, Sonnenblume) genannt, mit dem Ziel, die Ölzusammensetzung zu verändern. Es ist vorstellbar, daß durch Transfer geeigneter Gene innerhalb gewisser Grenzen einheitliche Ölfraktionen erhalten werden, die maßgeschneidert für eine industrielle Verwendung sein könnten. Selbstverständlich ist hierfür noch intensive biochemische und molekularbiologische Grundlagenforschung notwendig. Die Möglichkeiten, die sich sowohl für die Landwirtschaft als auch für die Industrie eröffnen, scheinen aber einen solchen Einsatz durchaus zu rechtfertigen.

#### 5.3. Beeinflussung pflanzenphysiologischer Vorgänge

Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (Rubisco) ist ein Schlüsselenzym der Photosynthese, da es für die Fixierung von Kohlendioxid aus der Luft verantwortlich ist (siehe Abschnitt 4.2). Neben Kohlendioxid bindet dieses Enzym auch Sauerstoff und überträgt ihn auf Ribulose-1,5-bisphosphat; dadurch entstehen unerwünschte Nebenprodukte. Diese als Photorespiration bezeichnete Reaktion vermindert die Effizienz der Photosynthese.

Wegen der grundlegenden Bedeutung der Photosynthese und der Photorespiration hat es nicht an Versuchen gefehlt, durch Mutationen Enzyme zu erzeugen, bei denen die Photorespiration vermindert ist. Bisher konnten allerdings keine praktisch nutzbaren Ergebnisse erzielt werden.

In letzter Zeit haben sich die Chancen hierfür deutlich verbessert, da es gelungen ist, die Gene für die beiden Untereinheiten von Rubisco aus photosynthetischen Bakterien zu isolieren und auf *E. coli* zu übertragen. In *E. coli* bildete sich dann ein aktives Enzym<sup>[194]</sup>. Weiterhin wurde kürzlich die dreidimensionale Struktur des Enzyms aus dem Bakterium *Rhodospirillum rubrum*<sup>[195a]</sup> und *Alcaligenes eutrophus*<sup>[195b]</sup> aufgeklärt.

Darüber hinaus ist es sogar gelungen, in *E. coli* durch Gentransfer ein Hybrid-Enzym von Rubisco zu erzeugen, das aus der großen Untereinheit von Cyanobakterien und der kleinen Untereinheit aus Weizen zusammengesetzt ist<sup>[196]</sup>. Dieses Enzym ist aktiv. Damit sind die Voraussetzungen geschaffen, um durch gezielte Mutagenese mit synthetischen Genabschnitten nahezu jede beliebige Aminosäure zu verändern und anschließend den Effekt auf die enzymatische Aktivität untersuchen zu können. Die große Bedeutung eines Enzyms, daß durch eine erhöhte Fixierungsrate für Kohlendioxid eine effizientere Photosynthese bewirkt, braucht sicher nicht betont zu werden.

#### 5.4. Beeinflussung der Stickstofffixierung

Zunächst sei festgestellt, daß die gentechnische Gewinnung stickstofffixierender Pflanzen vor der Jahrtausendwende unwahrscheinlich sein dürfte. Dies ist aber auch die „Maximalforderung“; Teilerfolge könnten sehr wohl in den nächsten Jahren erreicht werden. In Tabelle 6 sind mehrere Möglichkeiten aufgeführt, die Stickstofffixierung gentechnisch zu beeinflussen. Zahlreiche bodenlebende Mikroorganismen wie *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Klebsiella* oder *Rhizobium* sind imstande, Stickstoff aus der Luft zu fixieren und Ammoniak zu bilden. Durch ihren Stoffwechsel tragen diese Bakterien zur Stickstoffdüngung bei. Diese „biologisch fixierte“ Menge an Stickstoff ist erheblich – weltweit beträgt sie ein Vielfaches der Menge des industriell erzeugten Ammoniaks<sup>[197]</sup>.

Stickstofffixierende Mikroorganismen können in zwei große Gruppen eingeteilt werden: Freilebende Fixierer und symbiotische Fixierer. Letztere benötigen die Partnerschaft mit Pflanzen, häufig mit Leguminosen. In dieser Partnerschaft stellen die Mikroorganismen der Pflanze das Produkt der Stickstofffixierung zur Verfügung und erhalten im Austausch von der Pflanze Assimilate aus der Photosynthese. Der Anteil des symbiotisch fixierten Stickstoffs ist dabei weit höher als der durch freilebende Mikroorganismen gebundene Stickstoff.

Struktur und Funktion der an der Stickstofffixierung beteiligten Gene wurden bisher am genauesten bei *Klebsiella pneumoniae*, einem freilebenden Fixierer, und *Rhizobium meliloti*, der eine Symbiose mit Luzerne eingeht, untersucht<sup>[198, 199]</sup>.

Tabelle 6. Stickstofffixierung: Möglichkeiten der Gentechnik.

- a) Fixierung durch bodenlebende Mikroorganismen:
  - Optimierung der Fixierungsreaktionen
- b) Symbiose Leguminose – Mikroorganismus:
  - Erhöhung der Effizienz (Anzahl der Knöllchen, Regulation)
  - Erweiterung des Wirksspektrums innerhalb der Leguminosen
  - Übertragung der Fähigkeit, Symbiosen einzugehen, auf Nicht-Leguminosen
- c) Stickstofffixierung in Pflanzen



Abb. 13. Wurzel einer Ackerbohne mit deutlicher Knöllchenbildung, die durch Symbiose mit Bakterien verursacht wird. In den Knöllchen wird Stickstoff aus der Luft fixiert.

In *K. pneumoniae* werden die spezifisch an der Stickstofffixierung beteiligten Enzyme durch einen Block von 17 zusammenliegenden Genen codiert. Die große Anzahl der an diesem Prozeß beteiligten Gene ist eine der Schwierigkeiten, die bei ihrer Übertragung auf Pflanzen überwunden werden muß. Bei all diesen Genen müssen die Kontrollregionen (Promotoren) geändert und auf die Bedingungen in der Pflanze abgestimmt werden. Zusätzliche Schwierigkeiten treten durch die Sauerstoffempfindlichkeit der Nitrogenase auf, des Enzyms, das Stickstoff reduziert, und durch den hohen Energiebedarf des gesamten Prozesses der Stickstofffixierung und Assimilation. Sowie genügend Ammonium-Ionen in der Umgebung vorhanden sind, stellen freilebende Fixierer die energieaufwendige Stickstofffixierung ein, da der Bedarf nun durch Aufnahme von Ammonium-Ionen gedeckt werden kann. Diese Regulation wird durch bestimmte Gene erreicht, die in Anwesenheit von Ammonium-Ionen die Bildung der fixierenden Enzyme verhindern. Für die landwirtschaftliche Anwendung kann die Gewinnung von Stämmen, bei denen diese Regulation durchbrochen ist, ein wichtiger Beitrag zur Verbesserung der Stickstoffversorgung darstellen.

Die symbiotische Stickstofffixierung von Rhizobien findet nach Bildung typischer Wurzelknöllchen statt (Abb. 13). Die Entstehung einer Symbiose hängt von zahlreichen komplexen Schritten ab: Wechselseitiges Erkennen zwischen Mikroorganismus und Pflanze, Infektion der Wurzel, Bildung der Knöllchen und schließlich die eigentliche Stickstofffixierung sowie der Austausch von Molekülen zwischen Pflanze und Mikroorganismus. Von der Pflanze sind rund 40 Gene an Bildung und Funktion der Knöllchen beteiligt, sogenannte Noduline<sup>[200]</sup>. Grundsätzlich eröffnet jeder der erwähnten Schritte mehrere Möglichkeiten für eine gentechnische Beeinflussung. Am wechselseitigen Erkennen und an der Bildung der Knöllchen sind niedermolekulare Substanzen (Flavone) beteiligt, die von der Pflanze ausgeschieden werden<sup>[201]</sup>. Durch Änderung von

Art und Menge der biosynthetisierten und ausgeschütteten Flavone kann möglicherweise die Anzahl der gebildeten Knöllchen erhöht und damit einhergehend die Stickstofffixierung verstärkt werden. Die Auffindung von Sojapflanzen, die mehr Knöllchen aufweisen als die Wildtyppflanze, läßt diese Möglichkeit vielversprechend erscheinen<sup>[202]</sup>.

Die symbiotischen Rhizobienstämme haben eine ausgeprägte Spezifität für bestimmte Wirtspflanzen. Je nach Bakterienstamm treten dabei deutliche Unterschiede im Wachstumsverhalten und in den Fixierungsraten auf. Es erscheint durchaus realistisch, das Wirtsspektrum der beteiligten Rhizobien zu verbreitern. Dadurch wäre die Möglichkeit gegeben, bei Leguminosen, die bisher nur eine Symbiose mit langsam wachsenden Rhizobien eingehen können, die Stickstoffversorgung deutlich zu verbessern.

Mehrere der Genprodukte, die an Bildung und Funktion der Knöllchen beteiligt sind, treten auch in Pflanzen auf, die keine Symbiose eingehen können. Es kann daher gentechnisch einfacher sein, diese Pflanzen zur Symbiose geeignet zu machen, als ihnen die Fähigkeit zu übertragen, den Stickstoff direkt zu fixieren.

## 5.5. Gentechnik als Hilfsmittel für die Pflanzenzüchtung

Molekularbiologische Methoden können genaue Informationen über die Anwesenheit bestimmter Gene in Pflanzen liefern. Die Empfindlichkeit solcher Techniken wurde soweit erhöht, daß sie sich mit weniger als zehn pflanzlichen Zellen durchführen lassen<sup>[203]</sup>. Daraus ergeben sich zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten für die Pflanzenzüchtung: Rasche Überprüfung der Nachkommen von Kreuzungsversuchen und unbekannter Genotypen auf die Anwesenheit bestimmter Gene, Charakterisierung eigener Sorten durch Aufstellung charakteristischer DNA-Bandenmuster (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism)<sup>[204]</sup>, Aussagen über die Verwandtschaft bestimmter Sorten sowie Tests auf Anwesenheit von Viren in Saatgut oder Zuchtmaterial. Der Vergleich molekularbiologischer Tests mit entsprechenden serologischen Tests auf Anwesenheit von Viren ergab, daß die durch Hybridisierung mit DNA erhaltenen Befunde zuverlässiger und aussagekräftiger sind<sup>[205]</sup>.

## 6. Sorgen und Gefahren

Die in Abschnitt 5 beschriebenen Ziele der Gentechnik mit Pflanzen werden kaum Anlaß zu Sorgen geben. Es ist nicht anzunehmen, daß ernsthafte Einwände gegen die Entwicklung resistenter oder ertragreicher Sorten gemacht werden können, da dies bereits seit vielen Jahrzehnten die Ziele der klassischen Pflanzenzüchtung sind. Im Falle der Herbizidresistenz erscheint allerdings eine Diskussion nützlich, um Mißverständnissen vorzubeugen. In diesem Abschnitt wird daher neben den hypothetischen Gefahren, die durch gentechnisch veränderte Pflanzen verursacht werden können, auch das Thema Herbizidresistenz diskutiert.

### 6.1. Gefahren durch gentechnisch veränderte Pflanzen

Die Gentechnik ermöglicht die Isolierung von Genen aus den verschiedensten Organismen und den Einbau die-

ser Gene in Pflanzen. Mit den heutigen Methoden können stets nur einige Gene übertragen werden. Dabei handelt es sich um charakterisierte Gene, deren Funktion bekannt ist. Hypothetische Gefahrenquellen sind

- Entstehung einer wildwuchernden, sich unkontrolliert vermehrenden Pflanze (Unkraut);
- Übertragung der transferierten Gene von Kulturpflanzen auf Unkräuter durch Fremdbefruchtung;
- Bildung toxischer Substanzen in den gentechnisch veränderten Pflanzen.

Erstens sei festgestellt, daß die Freisetzung gentechnisch veränderter Pflanzen weit weniger problematisch als die Freisetzung veränderter Mikroorganismen oder Tiere ist, denn unerwünschter Pflanzenwuchs kann notfalls mit Herbiziden oder mechanisch bekämpft werden; dies gehört zur täglichen Praxis des Landwirtes.

Zweitens werden gentechnisch veränderte Pflanzen vor einer Freilandprüfung zunächst unter Laborbedingungen und in Gewächshäusern erprobt. Während dieser Phase können unerwünschte oder schädliche Eigenschaften einer Pflanze erkannt werden.

Drittens haben Pflanzenzüchter seit Jahrhunderten mit gutem Erfolg die verschiedensten Kreuzungen durchgeführt, unter anderem auch Kreuzungen, die ohne menschliches Zutun nie zustandegekommen wären. Bei solchen Versuchen werden zehntausende verschiedener Gene neu kombiniert; bisher sind dadurch keine ernsten Gefahren entstanden. Auch durch zellbiologische Methoden wurden Genkombinationen in neuen Pflanzen erzeugt, die unter natürlichen Bedingungen nie entstanden wären. Es soll hier an die Protoplastenfusionen erinnert werden, die zur Bildung der „Tomatoffel“ führten<sup>[30]</sup>. Selbst bei kritischer Betrachtung konnte hier keine Gefahr erkannt werden. Es ist daher auch nicht denkbar, daß bei der Übertragung weniger Gene durch gentechnische Methoden eine gefährliche Situation entstehen könnte.

Viertens ist zu erwähnen, daß Eigenschaften wie schnelles und unkontrolliertes Wachstum (Verunkrautung) nur durch eine große Zahl von Genen, die aufeinander abgestimmt sein müssen, erreicht werden kann. Aus diesem Grunde ist es auch nicht vorstellbar, daß durch Gentechnik mit Pflanzen unbeabsichtigt neue Unkräuter entstehen.

Fünftens können Eigenschaften, die unbeabsichtigt auf andere Pflanzen übertragen werden (z. B. Unkräuter), sich nur halten und verbreiten, wenn ein entsprechender Selektionsdruck vorhanden ist. Dies ist für eine zufällige Übertragung einzelner Gene nicht anzunehmen, wenn die üblichen Regeln guter landwirtschaftlicher Praxis befolgt werden (z. B. Rotation der Kulturen und der Herbicide). Zudem sind nur in wenigen Fällen Kulturpflanzen und nahe verwandte Unkräuter kreuzbar.

Sechstens kann bei der klassischen Züchtung nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, daß die Konzentrationen pflanzeneigener toxischer Substanzen durch Kreuzung erhöht werden. Ein Beispiel hierfür ist die Entwicklung von Kartoffelsorten, die einen unangenehmen, brennenden Geschmack infolge einer erhöhten Konzentration an Glycoalkaloiden aufweisen<sup>[206]</sup>. Dies war ein sehr überraschendes Ergebnis, da viele Wildsorten der Kartof-

fel, auf die zur Entwicklung neuer Sorten häufig zurückgegriffen wird, bereits hohe Konzentrationen dieser Glycoal-kaloide enthalten. Auch hier ist daher nicht anzunehmen, daß der gezielte Transfer einiger weniger Gene ähnliche Effekte verursacht. Zudem lassen sich toxische Nebenprodukte leicht durch entsprechende Analysen und Testverfahren erkennen.

Zusammenfassend fällt es schwer, eine konkrete oder potentielle Gefahr durch gentechnisch veränderte Pflanzen zu erkennen.

## 6.2. Freisetzung gentechnisch veränderter Pflanzen

Gentechnisch veränderte Organismen dürfen in der Bundesrepublik Deutschland nicht im Freiland erprobt oder freigesetzt werden. Das Bundesgesundheitsamt kann auf Antrag und nach Anhörung der „Zentralen Kommission für Biologische Sicherheit“ im Einvernehmen mit den zuständigen biologischen Bundesanstalten Ausnahmen zulassen<sup>[207]</sup>. Bisher wurden unseres Wissens keine derartigen Versuche durchgeführt.

Kürzlich war aus der Presse zu entnehmen, daß in den USA zwei Feldversuche mit gentechnisch veränderten Tabakpflanzen von den zuständigen Behörden genehmigt wurden. Es handelt sich dabei um Pflanzen, die ein zusätzliches Gen aus Hefe enthalten (das Gen der Alkohol-Dehydrogenase), und um Pflanzen, denen das Toxin-Gen aus *Bacillus thuringiensis* eingebaut wurde. Mit den Tests soll hauptsächlich nachgewiesen werden, daß ein zusätzliches Gen unter Freilandbedingungen das Wachstumsverhalten nicht verändert. Im zweiten Fall wird zusätzlich eine Resistenz gegen Raupen unter Feldbedingungen erprobt.

Innerhalb Europas bestehen noch sehr unterschiedliche Voraussetzungen und Regelungen für Freilandversuche mit gentechnisch veränderten Organismen. Sowohl vom Standpunkt der Sicherheit als auch vom Standpunkt der Konkurrenzfähigkeit der beteiligten Unternehmen und Forschungsinstitute wäre eine einheitliche Regelung, zumindest innerhalb Europas, äußerst wünschenswert.

## 6.3. Herbizidresistenz

Die wichtigsten Vorteile des Anbaus herbizidresistenter Pflanzen werden nochmals zusammengefaßt:

- Einsatz von Herbiziden erst bei Bedarf, daher keine vorbeugende Anwendung mehr notwendig;
- erhöhte Wirtschaftlichkeit für den Landwirt;
- verstärkte Anwendung ökologisch günstiger (rasch abbaubarer) Herbizide zulasten älterer Produkte;
- verminderter Bodenerosion durch Verhinderung des Auftretens freiliegender Flächen;
- Ersatz von Herbizidmischungen durch ein nichtselektives Herbizid.

Diesen Vorteilen werden potentielle Nachteile sowie Befürchtungen gegenübergestellt:

- Schaffung ökologischer Probleme beim Anbau herbizidresistenter Kulturen durch verstärkte Anwendung von Herbiziden;

- Entstehung herbizidresistenter Unkräuter;
- weitere Einschränkung der Sortenvielfalt.

Bei der Diskussion über herbizidresistente Pflanzen<sup>[208]</sup> sollte nicht übersehen werden, daß bereits langjährige Erfahrungen mit der Anwendung selektiver Herbizide in der Landwirtschaft vorliegen. Die resistenten Kulturen haben Stoffwechselwege, die einzelne Herbizide unwirksam machen. Dadurch ist eine natürliche Herbizidresistenz gegeben, die nur für die jeweilige Kultur gilt. Die Anwendung dieser selektiven Herbizide bei den Kulturen mit natürlicher Resistenz unterscheidet sich nicht von der Anwendung nichtselektiver Herbizide bei den entsprechenden gentechnisch erzeugten herbizidresistenten Kulturen.

Wegen der Möglichkeit, Herbizide erst bei Bedarf einzusetzen, d. h. erst dann, wenn der Unkrautbefall ein erträgliches Maß übersteigt, und wegen des Ersatzes vieler verschiedener selektiver Herbizide durch ein nichtselektives Herbizid ist anzunehmen, daß die Herbizidresistenz den Einsatz dieser Wirkstoffe vermindern wird.

Bei der Entwicklung von Resistenz gegen langlebige Herbizide kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich im Laufe der Jahre das Herbizid im Boden anreichert und damit ökologische Probleme verursacht. Die bei allen Forschungsinstituten zu beobachtende Tendenz, Resistenzen bei Pflanzen nur gegen ökologisch günstige Herbizide zu entwickeln, ist daher zu begrüßen. Hierdurch wird deutlich, daß die spezifischen Eigenschaften des jeweiligen Herbizids die entscheidenden Faktoren bei der Diskussion der Herbizidresistenz sind (Abbau, Umweltverhalten, Toxizität, Möglichkeiten der Anreicherung usw.). Deshalb ist eine getrennte Diskussion für jedes Herbizid notwendig.

Die mögliche Bildung herbizidresistenter Unkräuter bei Verwendung nichtselektiver Herbizide ist wahrscheinlich kein größeres Problem. So sind z. B. trotz über zwölfjähriger Anwendung des Herbizids Glyphosate bisher keine Schwierigkeiten durch Bildung von Resistenzen entstanden. Sollten tatsächlich herbizidresistente Unkräuter entstehen, könnten sie durch Herbizide mit anderen biochemischen Wirkorten jederzeit bekämpft werden.

Es ist anzunehmen, daß eine Herbizidresistenz für eine bestimmte Sorte eine wichtige Eigenschaft sein wird, genauso wie beispielsweise Krankheitsresistenz, Standfestigkeit oder hoher Ertrag. Keine dieser Eigenschaften wird aber alleine ausschlaggebend sein, um andere Sorten in der Anbaufläche nennenswert zurückzudrängen. Es ist daher unwahrscheinlich, daß durch die Herbizidresistenz die existierende Sortenvielfalt stärker eingeschränkt werden wird als durch die anderen erwähnten Zuchziele. In diesem Zusammenhang sei noch betont, daß für die gentechnische Veränderung von Pflanzen die Erhaltung möglichst vieler Arten von besonderer Bedeutung ist, da nur so auf eine breite Vielfalt natürlicher Gene zurückgegriffen werden kann.

Die Herbizidresistenz dürfte eines der am leichtesten erreichbaren Ziele der Gentechnik mit Pflanzen sein. Die hier gewonnenen Erfahrungen lassen sich anschließend bei der Lösung komplexerer Probleme, z. B. der Erzeugung von Resistenzen gegen Virusinfektionen, tierische Schädlinge oder Pilzkrankheiten, anwenden.

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

Bei einer Reihe von Nutzpflanzen können aus Einzelzellen und Protoplasten Pflanzen regeneriert und mit Zellkulturttechniken in beliebiger Menge vermehrt werden. Solche regenerierfähigen Zellkulturen werden sowohl zur Selektion von Mutanten als auch zu DNA-Transformationsversuchen herangezogen. Der DNA-Transfer mit gentechnisch modifizierten Ti-Plasmiden von *Agrobacterium tumefaciens* ist inzwischen bei einer rasch größer werdenden Zahl von dikotylen Kulturpflanzen eine etablierte Technik.

Der Beweis der Transformierbarkeit aller Getreidearten durch Agrobakterien steht noch aus; daher wurden alternative Verfahren für den DNA-Transfer entwickelt. Als universell einsetzbar hat sich der direkte Gentransfer in Protoplasten erwiesen. Transformierte Getreidezellkulturen sind aus DNA-behandelten Protoplasten routinemäßig zugänglich. Das Dogma, Getreide-Protoplasten seien generell nicht regenerierbar, ist durch die erfolgreiche Pflanzenregeneration aus Reis-Protoplasten zu Fall gebracht worden.

Große Anstrengungen werden unternommen, um den Gentransfer unabhängig von Zellkulturmethoden zu machen. Beispielsweise wird versucht, sowohl durch Pollentransformation als auch durch direkte DNA-Injektion in junge Infloreszenzen fremde DNA in reproduktive Zellen zu übertragen.

Die Zahl der isolierten pflanzlichen Gene nimmt rasch zu. Durch die Analyse der Regulationssequenzen dieser Gene werden DNA-Segmente zugänglich, die eine gewebspezifische oder durch Umweltreize induzierbare Expression von Genen in Pflanzen verursachen.

Erste Gene, die wirtschaftliche Bedeutung für die Pflanzenzüchtung und den Pflanzenschutz haben können, sind bereits in Pflanzen übertragen worden. Dazu gehören Gene, die eine Virus-, Insekten- oder Herbizidresistenz in den Transformanten bewirken.

Die weitere Entwicklung der Biochemie und Molekularbiologie von Pflanzen lässt vermuten, daß in Zukunft auch die molekularen Mechanismen bisher noch nicht verstandener Pflanzenkrankheiten aufgeklärt werden. Hier sind beispielsweise Pilz- und Viroïdininfektionen zu nennen. Obwohl bei einigen Viroïden bereits die vollständige Sequenz der infektiösen RNA aufgeklärt ist<sup>[209]</sup>, besteht noch keine Klarheit über den Mechanismus und die Ursachen der Pflanzenschädigung.

Das Ergebnis der gentechnischen Bemühungen werden resistenter und leistungsfähigere Pflanzen sein. Solche Pflanzen werden dem Landwirt in den neunziger Jahren zur Verfügung stehen. Einerseits ist dies ein wichtiger Beitrag zur Lösung des Welthungerproblems, andererseits erschließt der Anbau maßgeschneiderter Rohstoffe für die Industrie der Landwirtschaft in den technisierten Ländern zusätzliche Märkte. Es kann sogar daran gedacht werden, aus Wildpflanzen neuartige Kulturpflanzen mit vorteilhaften Eigenschaften (z. B. Salztoleranz, hohe Biomasseproduktion, gute Proteinqualität im Erntegut) unter Einsatz züchterischer und gentechnischer Methoden zu schaffen<sup>[210]</sup>.

Die enge Zusammenarbeit von Biochemikern, Zellbiologen, Molekularbiologen, Pflanzenpathologen und Pflan-

zenzüchtern ist dringend notwendig, um das Ziel besonders leistungsfähiger, hoch anpassungsfähiger und wenig krankheitsanfälliger Nutzpflanzen zu erreichen.

Für die Anfertigung der lichtmikroskopischen Aufnahmen danken wir H. Dräger. Für wertvolle Hilfe bei der Fertigstellung des Manuskripts danken wir B. Diehls und P. Spönemann.

Eingegangen am 26. Januar 1987 [A 618]

- [1] D. M. Coen, J. R. Bedbrook, L. Bogorad, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5487.
- [2] K. Shinozaki, M. Ohme, M. Tanaka, T. Wakasugi, N. Hayashida, T. Matsubayashi, N. Zaita, J. Chunwongse, T. Obohata, K. Yamaguchi-Shinozaki, C. Ohto, K. Torazawa, B. Y. Meng, M. Sugita, H. Deno, T. Kamogashira, K. Yamada, T. Kusuda, F. Takaishi, A. Kato, N. Toh-doh, H. Schimada, M. Sugiura, *EMBO J.* 5 (1986) 2043.
- [3] M. D. Dibner, *Science* 232 (1986) 1367.
- [4] S. K. Sen, K. L. Giles (Hrsg.): *Plant Cell Culture in Crop Improvement*, Plenum, New York 1983.
- [5] L. C. Fowke, F. Constabel (Hrsg.): *Plant Protoplasts*, CRC Press, Boca Raton 1985.
- [6] I. K. Vasil (Hrsg.): *Cell Culture and Somatic Cell-genetics of Plants*, Academic Press, New York 1984.
- [7] E. Thomas, P. J. King, I. Potrykus, *Z. Pflanzenzücht.* 82 (1979) 1.
- [8] T. Murashige, F. Skoog, *Physiol. Plant.* 15 (1962) 473.
- [9] F. Skoog, C. O. Miller, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11 (1957) 118.
- [10] M. D. Sacristan, G. Melchers, *MGG Mol. Gen. Genet.* 105 (1969) 317.
- [11] C. J. Sluis, K. A. Walker, *IAPTC Newslett.* 47 (1985) 2.
- [12] K. A. Walker, S. I. Sato, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1 (1981) 109.
- [13] J. P. Ranch, L. Oglesby, A. C. Zieliński, *In Vitro* 21 (1985) 653.
- [14] E. Thomas, F. Hoffmann, I. Potrykus, G. Wenzel, *MGG Mol. Gen. Genet.* 145 (1976) 245.
- [15] K. Redenbaugh, I. Nichol, M. Kossler, B. Paasch, *In Vitro* 20 (1984) 256.
- [16] T. Nagata, I. Tabeke, *Planta* 99 (1971) 12.
- [17] K. K. Kartha, M. R. Michayluk, K. N. Kao, O. L. Gamborg, F. Constabel, *Plant Sci. Lett.* 3 (1974) 265.
- [18] J. F. Shepard, R. E. Totten, *Plant Physiol.* 60 (1977) 313.
- [19] F. J. Zapata, P. K. Evans, J. B. Power, E. C. Cocking, *Plant Sci. Lett.* 8 (1977) 119.
- [20] A. V. P. Dos Santos, D. E. Outka, E. C. Cocking, M. R. Davey, *Z. Pflanzenphysiol.* 99 (1980) 261; K. N. Kao, M. R. Michayluk, *ibid.* 96 (1980) 135.
- [21] T. M. Fujimura, M. Sakurai, H. Akagi, T. Negishi, A. Hirose, *Plant Tissue Cult. Lett.* 2 (1985) 74; J. A. Thompson, R. Abdullah, E. C. Cocking, *Plant Sci.* 47 (1986) 123; Y. Yamada, Z. Q. Yang, D. T. Tang, *Plant Cell Rep.* 5 (1986) 85.
- [22] K. Ohyama, O. L. Gamborg, R. A. Miller, *Can. J. Bot.* 50 (1972) 2077.
- [23] I. Potrykus, *Z. Pflanzenphysiol.* 70 (1973) 364.
- [24] L. Szabados, G. Hadlaczky, D. Dudit, *Planta* 151 (1981) 141.
- [25] W. A. Keller, G. Melchers, *Z. Naturforsch.* C 28 (1973) 737.
- [26] K. N. Kao, M. R. Michayluk, *Planta* 115 (1974) 355.
- [27] L. Menczel, K. Wolfe, *Plant Cell Rep.* 3 (1983) 196.
- [28] M. Senda, J. Takeda, S. Abe, T. Nakamura, *Plant Cell Physiol.* 20 (1978) 1441.
- [29] G. Melchers, M. D. Sacristan, A. A. Holder, *Carlsberg Res. Commun.* 43 (1978) 203.
- [30] Y. Y. Gleba, F. Hoffmann, *Planta* 149 (1980) 112.
- [31] O. Schieder, *MGG Mol. Gen. Genet.* 162 (1978) 113.
- [32] D. Dudit, O. Feijer, G. Hadlaczky, C. Koncz, G. B. Lazar, G. Horvath, *MGG Mol. Gen. Genet.* 179 (1980) 283.
- [33] D. Dudit, E. Maroy, T. Praznovszky, J. Györgyey, *Abstr. VII. Int. Congr. Plant Tissue Cell Cult.*, Univ. Minnesota, Minneapolis 1986, S. 20.
- [34] P. Carlson, *Science* 180 (1973) 1366.
- [35] G. Wenzel, *Annu. Rev. Phytopathol.* 23 (1985) 149.
- [36] P. Thanutong, J. Furusawa, M. Yamamoto, *Theor. Appl. Genet.* 66 (1983) 209.
- [37] M. Behnke, *Theor. Appl. Genet.* 55 (1979) 69.
- [38] M. Behnke, *Theor. Appl. Genet.* 56 (1980) 151.
- [39] E. Rehbein, *Dissertation*, Universität Bonn 1983, S. 64.
- [40] E. A. Shahin, R. Spivey, *Theor. Appl. Genet.* 73 (1986) 164.
- [41] M. D. Sacristan, *Theor. Appl. Genet.* 61 (1982) 193.
- [42] C. L. Hartmann, T. Y. McCoy, T. R. Knops, *Plant Sci. Lett.* 34 (1984) 183.
- [43] A. O. Latunde-Dada, J. A. Lucas, *Plant Sci. Lett.* 32 (1983) 205.
- [44] B. G. Gengenbach, E. Green, C. M. Donovan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 5113.
- [45] U. Matern, G. Strobel, J. Shepard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 4935.

- [46] J. F. Shepard, D. Bidney, E. A. Shahin, *Annu. Rev. Phytopathol.* 19 (1981) 145.
- [47] G. J. Jellis, R. E. R. E. Gunn, R. E. Boulton, *EAPR Abstr. Conf. Pap.* 1984, 380.
- [48] H. H. Murakishi, P. S. Carlson, *Plant Cell Rep.* 1 (1982) 94.
- [49] K. A. Barden, S. Schiller, H. H. Smith, H. H. Murakishi, *Plant Sci.* 45 (1986) 209.
- [50] F. Siegmund, *Biol. Zentralbl.* 100 (1981) 155.
- [51] F. D'Amato in J. Reiner, Y. P. S. Bajaj (Hrsg.): *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Springer, Berlin 1977, S. 343.
- [52] P. J. Larkin, W. R. Scowcroft, *Theor. Appl. Genet.* 67 (1981) 443.
- [53] D. A. Evans, W. R. Sharp, H. P. Medina-Filho, *Am. J. Bot.* 71 (1984) 759.
- [54] V. Walbot, C. A. Cullis, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36 (1985) 367.
- [55] V. M. Peschke, R. L. Phillips, B. G. Gengenbach, *Abstr. VII. Int. Congr. Plant Tissue Cell Cult.*, Univ. Minnesota, Minneapolis 1986, S. 285.
- [56] J. Schell in L. Ledoux (Hrsg.): *Genetic Manipulations with Plant Materials*, Plenum, New York 1975, S. 163.
- [57] M. Cleene, J. De Ley, *Bot. Rev.* 42 (1976) 389.
- [58] A. C. Braun, P. R. White, *Phytopathology* 33 (1943) 85.
- [59] A. Petit, S. Delheyne, J. Tempé, G. Morel, *Physiol. Vég.* 8 (1970) 205.
- [60] G. Bomhoff, P. M. Klapwijk, H. C. M. Kester, R. A. Schilperoort, J. P. Hernalsteens, J. Schell, *MGG Mol. Gen. Genet.* 145 (1976) 177.
- [61] J. Tempé, A. Petit, S. K. Farrand in D. P. S. Verma, T. Hohn (Hrsg.): *Plant Gene Research: Genes Involved in Microbe-Plant Interactions*, Springer, Berlin 1984, S. 271.
- [62] A. C. Braun, R. J. Mandl, *Growth* 12 (1958) 255.
- [63] I. Zaenen, N. van Larebeke, H. Teuchy, M. Van Montagu, J. Schell, *J. Mol. Biol.* 86 (1974) 109.
- [64] N. van Larebeke, G. Engler, M. Holsters, S. Van den Elsacker, J. Zaenen, R. A. Schilperoort, J. Schell, *Nature (London)* 252 (1974) 169.
- [65] A. Montoya, M.-D. Chilton, M. P. Gordon, D. Sciaky, E. W. Nester, *J. Bacteriol.* 129 (1977) 101.
- [66] J. Schell, M. Van Montagu, A. Depicker, D. De Waele, G. Engler, C. Genetello, J. P. Hernalsteens, M. Holsters, E. Messens, A. Silva, S. Van den Elsacker, N. van Larebeke, I. Zaenen in L. Bogorad, J. H. Weil (Hrsg.): *Nucleic Acids and Protein Synthesis in Plants*, Plenum, New York 1977, S. 329.
- [67] J. Leemans, R. Deblaere, L. Willmitzer, H. De Greve, J. P. Hernalsteens, M. Van Montagu, J. Schell, *EMBO J.* 1 (1982) 147.
- [68] G. Schröder, S. Waffenschmidt, E. W. Weiler, J. Schröder, *Eur. J. Biochem.* 138 (1984) 387.
- [69] L. Willmitzer, P. Dhaese, P. Schreier, W. Schmalenbach, M. Van Montagu, J. Schell, *Cell (Cambridge, Mass.)* 32 (1983) 1045.
- [70] M.-D. Chilton, M. H. Drummond, D. J. Merlo, D. Sciaky, A. L. Montoya, M. P. Gordon, E. W. Nester, *Cell (Cambridge, Mass.)* 11 (1977) 263.
- [71] M. D. Chilton, R. K. Saiki, N. Yadav, M. P. Gordon, F. Quetier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4060.
- [72] L. Willmitzer, M. De Beuckeleer, M. Lemmers, M. Van Montagu, J. Schell, *Nature (London)* 287 (1980) 359.
- [73] L. Willmitzer, G. Simons, J. Schell, *EMBO J.* 1 (1982) 139.
- [74] M. Lemmers, M. De Beuckeleer, M. Holsters, P. Zambryski, A. Depicker, J. P. Hernalsteens, M. Van Montagu, J. Schell, *J. Mol. Biol.* 144 (1980) 353.
- [75] M. F. Thomashow, R. Nutter, A. L. Montoya, M. P. Gordon, E. W. Nester, *Cell (Cambridge, Mass.)* 19 (1980) 729.
- [76] M. De Beuckeleer, M. Lemmers, G. De Vos, L. Willmitzer, M. Van Montagu, J. Schell, *MGG Mol. Gen. Genet.* 183 (1981) 283.
- [77] H. Van Onckelen, E. Prinsen, D. Inzé, P. Rüdelshiem, M. Van Lijsebetten, A. Follin, J. Schell, M. Van Montagu, J. De Greet, *FEBS Lett.* 198 (1986) 357.
- [78] L. S. Thomashow, S. Reeves, M. F. Thomashow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 5071.
- [79] A. Depicker, S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski, H. M. Goodman, *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (1982) 561.
- [80] H. De Greet, P. Dhaese, J. Seurinck, M. Lemmers, M. Van Montagu, J. Schell, *J. Mol. Appl. Genet.* 2 (1983) 499.
- [81] G. F. Barry, S. G. Rogers, R. I. Fraley, L. Brand, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 4776.
- [82] E. Messens, A. Lenaerts, M. Van Montagu, R. W. Hedges, *MGG Mol. Gen. Genet.* 199 (1985) 344.
- [83] D. J. Garfinkel, R. B. Simpson, L. W. Ream, F. F. White, M. P. Gordon, E. W. Nester, *Cell (Cambridge, Mass.)* 27 (1981) 143.
- [84] F. Salomon, R. Deblaere, J. Leemans, J. P. Hernalsteens, M. Van Montagu, J. Schell, *EMBO J.* 3 (1984) 141.
- [85] H. Joos, D. Inzé, A. Caplan, M. Sormann, M. Van Montagu, J. Schell, *Cell (Cambridge, Mass.)* 32 (1983) 1057.
- [86] P. Zambryski, H. Joos, C. Genetello, J. Leemans, M. Van Montagu, J. Schell, *EMBO J.* 2 (1983) 2143.
- [87] P. Zambryski, A. Depicker, K. Kruger, H. Goodman, *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (1982) 361.
- [88] K. Wang, L. Herrera-Estrella, M. Van Montagu, P. Zambryski, *Cell (Cambridge, Mass.)* 38 (1984) 455.
- [89] J. Schell, M. Van Montagu, *Bio/Technology* 1 (1983) 175.
- [90] Z. Koukolíková-Nicola, R. D. Shillito, B. Hohn, K. Wang, M. Van Montagu, P. Zambryski, *Nature (London)* 313 (1985) 191.
- [91] H. J. Klee, F. F. White, V. N. Iyer, M. P. Gordon, E. W. Nester, *J. Bacteriol.* 153 (1983) 878.
- [92] S. E. Stachel, E. W. Nester, *EMBO J.* 5 (1986) 1445.
- [93] S. E. Stachel, E. Messens, M. Van Montagu, P. Zambryski, *Nature (London)* 318 (1985) 624.
- [94] S. E. Stachel, P. Zambryski, *Cell (Cambridge, Mass.)* 46 (1986) 325.
- [95] D. J. Garfinkel, E. W. Nester, *J. Bacteriol.* 144 (1980) 732.
- [96] C. J. Douglas, R. J. Staneloni, R. A. Rubin, E. W. Nester, *J. Bacteriol.* 161 (1985) 850.
- [97] A. Hoekema, P. R. Hirsch, P. J. J. Hoykaas, R. A. Schilperoort, *Nature (London)* 303 (1983) 179.
- [98] G. An, B. D. Watson, S. E. Stachel, M. P. Gordon, E. W. Nester, *EMBO J.* 4 (1985) 277.
- [99] R. B. Horsch, J. E. Fry, N. L. Hoffmann, D. Eichholtz, S. G. Rogers, R. T. Fraley, *Science* 227 (1985) 1229.
- [100] L. Marton, G. J. Wullems, L. Molendijk, R. A. Schilperoort, *Nature (London)* 277 (1979) 129.
- [101] a) J. P. Hernalsteens, L. Thia-Tong, J. Schell, M. Van Montagu, *EMBO J.* 3 (1984) 3039; b) G. M. S. Hoykaas-Van Slooteren, P. J. J. Hoykaas, R. A. Schilperoort, *Nature (London)* 311 (1984) 763.
- [102] N. Grimsley, T. Hohn, J. W. Davies, B. Hohn, *Nature (London)* 325 (1987) 177.
- [103] M. R. Davey, E. C. Cocking, J. Freeman, N. Pearce, J. Tudor, *Plant Sci. Lett.* 18 (1980) 307.
- [104] I. Potrykus, R. D. Shillito, M. W. Saul, J. Paszkowski, *Plant Mol. Biol. Rep.* 3 (1985) 117.
- [105] D. Hanahan, *J. Mol. Biol.* 166 (1983) 557.
- [106] H. Potter, L. Weir, P. Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 7161.
- [107] R. D. Shillito, M. W. Saul, J. Paszkowski, M. Müller, I. Potrykus, *Bio/Technology* 3 (1985) 1099.
- [108] H. Uchimija, T. Fushimi, H. Hashimoto, H. Harada, K. Syono, Sugawara, *MGG Mol. Gen. Genet.* 1987, im Druck.
- [109] M. E. Fromm, L. P. Taylor, V. Walbot, *Nature (London)* 319 (1986) 791.
- [110] H. Lörz, B. Baker, J. Schell, *MGG Mol. Gen. Genet.* 199 (1985) 178.
- [111] R. J. Shepard, R. H. Lawson in E. Kurstak (Hrsg.): *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*, Elsevier, Amsterdam 1981, S. 847.
- [112] N. Brisson, J. Paszkowski, J. R. Penswick, B. Gronenborn, I. Potrykus, T. Hohn, *Nature (London)* 310 (1984) 511.
- [113] D. Heß, H. Lörz, E. M. Weisser, *Z. Pflanzenphysiol.* 74 (1974) 52.
- [114] Y. Ohta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 715.
- [115] J. C. Sanford, K. A. Skubik, B. J. Reisch, *Theor. Appl. Genet.* 69 (1985) 571.
- [116] M. R. Capecchi, *Cell (Cambridge, Mass.)* 22 (1980) 479.
- [117] H. H. Steinbüß, P. Stabel, R. Toepfer, R. D. Hirtz, J. Schell in G. P. Chapman, S. H. Mantell, R. W. Daniels (Hrsg.): *The Experimental Manipulation of Ovule Tissue*, Longman, New York 1985, S. 64.
- [118] A. de la Peña, H. Lörz, J. Schell, *Nature (London)*, 325 (1987) 274.
- [119] J. P. Hernalsteens, F. Van Vliet, M. De Beuckeleer, A. Depicker, G. Engler, M. Lemmers, M. Holsters, M. Van Montagu, J. Schell, *Nature (London)* 287 (1980) 654.
- [120] K. A. Barton, A. N. Binns, A. J. M. Matzke, M.-D. Chilton, *Cell (Cambridge, Mass.)* 32 (1983) 1033.
- [121] C. H. Shaw, J. Leemans, C. H. Shaw, M. Van Montagu, J. Schell, *Gene* 23 (1983) 315.
- [122] R. Breathnach, P. Chambon, *Annu. Rev. Biochem.* 50 (1981) 349.
- [123] J. Messing, D. Geraghty, G. Heidecker, N. T. Hu, J. Kridl, J. Rubenstein in T. Kosuge, C. P. Meredith, A. Hollaender (Hrsg.): *Genetic Engineering of Plants, An Agricultural Perspective*, Plenum, New York 1983, S. 211.
- [124] F. Wengenmayer, *Angew. Chem.* 95 (1983) 874; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 842.
- [125] F. Gannon, K. O'Hare, F. Perrin, J. P. Le Pennec, C. Benoist, M. Cochet, R. Breathnach, A. Royal, A. Garapin, B. Cami, P. Chambon, *Nature (London)* 278 (1979) 428.
- [126] M. Birnstiel, M. Busslinger, K. Strub, *Cell (Cambridge, Mass.)* 41 (1985) 349.
- [127] L. Herrera-Estrella, A. Depicker, M. Van Montagu, J. Schell, *Nature (London)* 303 (1983) 209.
- [128] L. Herrera-Estrella, M. De Block, E. Messens, J. P. Hernalsteens, M. Van Montagu, J. Schell, *EMBO J.* 2 (1983) 987.
- [129] J. Reden, W. Dürckheimer, *Top. Curr. Chem.* 83 (1979) 105.
- [130] R. Flühr, C. Kuhlemeier, F. Nagy, N. H. Chua, *Science* 232 (1986) 1106.
- [131] T. J. V. Higgins, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35 (1984) 191.
- [132] E. M. Tobin, J. L. Sutcliffe, *Plant Physiol.* 65 (1980) 641.
- [133] T. F. Gallagher, R. J. Ellis, *EMBO J.* 1 (1982) 1493.

- [134] M. P. Timko, A. P. Kausch, C. Castresana, J. Fassler, L. Herrera-Estrella, G. Van den Broeck, M. Van Montagu, J. Schell, A. R. Cashmore, *Nature (London)* 318 (1985) 579.
- [135] L. Herrera-Estrella, G. Van den Broeck, R. Maenhaut, M. Van Montagu, J. Schell, M. Timko, A. Cashmore, *Nature (London)* 310 (1984) 115.
- [136] G. Morelli, F. Nagy, R. T. Fraley, S. G. Rogers, N. H. Chua, *Nature (London)* 315 (1985) 200.
- [137] J. D. G. Jones, P. Dunsmuir, K. J. Bedbrook, *EMBO J.* 4 (1985) 2411.
- [138] P. R. Sanders, J. A. Winter, A. R. Barnason, S. G. Rogers, R. T. Froley, *Nucl. Acids Res.* 15 (1987) 1543.
- [139] F. Schöppi, E. Raschke, R. T. Nagao, *EMBO J.* 3 (1984) 2491.
- [140] E. Mössinger, A. Batschauer, E. Schäfer, K. Apel, *Eur. J. Biochem.* 147 (1985) 137.
- [141] N. M. Crawford, W. H. Campbell, R. W. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 8073.
- [142] J. K. Okamoto, K. D. Jofuku, R. B. Goldberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 8240.
- [143] G. Lamppa, F. Nagy, N. H. Chua, *Nature (London)* 316 (1985) 750.
- [144] B. Keith, N. H. Chua, *EMBO J.* 5 (1986) 2419.
- [145] P. Eckes, S. Rosahl, J. Schell, L. Willmitzer, *MGG Mol. Gen. Genet.* 205 (1986) 14.
- [146] M. Holsters, R. Villarroel, J. Gielen, J. Seurinck, H. De Greeve, M. Van Montagu, J. Schell, *MGG Mol. Gen. Genet.* 190 (1983) 35.
- [147] M. De Block, L. Herrera-Estrella, M. Van Montagu, J. Schell, P. Zamborsky, *EMBO J.* 3 (1984) 1681.
- [148] T. J. Mozer, D. C. Tiemeier, E. G. Jaworski, *Biochemistry* 22 (1983) 1068.
- [149] R. J. Shimabukuro, W. C. Walsh, R. A. Hoerauf, *J. Agric. Food Chem.* 27 (1977) 615.
- [150] H. Kassebeer, *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* 78 (1971) 158.
- [151] M. R. Gebhardt, T. C. Daniel, E. E. Schweizer, R. R. Allmaras, *Science* 230 (1985) 625.
- [152] R. S. Chaleff, *Science* 219 (1983) 676.
- [153] S. R. Singer, C. N. McDaniel, *Plant Physiol.* 78 (1985) 411.
- [154] D. Scheel, J. E. Casida, *Pestic. Biochem. Physiol.* 23 (1985) 398.
- [155] P. C. Anderson, K. A. Hibberd, *Weed Sci.* 33 (1985) 479.
- [156] R. S. Chaleff, T. B. Ray, *Science* 223 (1984) 1148.
- [157] D. Shaner, T. Maley, P. Anderson in C. G. Copping, P. Rodgers (Hrsg.): *Biotechnology and its Application to Agriculture*, BCPC Publications, Bracknell 1985, BCPC Mono. No. 32, S. 45.
- [158] D. M. Stalker, W. R. Hiatt, L. Comai, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 4724.
- [159] C. C. Smart, D. Johanning, G. Müller, N. Amrhein, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 16338.
- [160] G. Donn, E. Tischer, J. A. Smith, H. M. Goodman, *J. Mol. Appl. Genet.* 2 (1984) 621.
- [161] H. C. Steinrücken, N. Amrhein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94 (1980) 1207.
- [162] F. Schwerdtle, H. Bieringer, M. Finke, *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz, Sonderheft IX* (1981) 431.
- [163] D. M. Shah, R. B. Horsch, H. J. Klee, G. M. Kishore, J. A. Winter, N. E. Turner, C. M. Hironaka, P. R. Sanders, C. S. Gasser, S. Aykent, N. R. Siegel, S. G. Rogers, R. T. Fraley, *Science* 233 (1986) 478.
- [164] L. Comai, D. Facciotti, W. R. Hiatt, G. Thompson, R. E. Rose, D. M. Stalker, *Nature (London)* 317 (1985) 741.
- [165] E. Tischer, S. Das Sarma, H. M. Goodman, *MGG Mol. Gen. Genet.* 203 (1986) 221.
- [166] S. Das Sarma, E. Tischer, H. M. Goodman, *Science* 232 (1986) 1242.
- [167] P. P. Abel, R. S. Nelson, B. De, N. Hoffmann, S. G. Rogers, R. T. Fraley, R. N. Beachy, *Science* 232 (1986) 738.
- [168] L. C. van Loon, *Plant Mol. Biol.* 4 (1985) 111.
- [169] R. A. M. Hoot van Huijsdijnen, B. J. C. Cornelissen, L. C. van Loon, J. H. van Boom, M. Tromp, J. F. Bol, *EMBO J.* 4 (1985) 2167.
- [170] R. A. M. Hoot van Huijsdijnen, L. C. van Loon, J. F. Bol, *EMBO J.* 5 (1986) 2057.
- [171] P. Ahl, S. Gianinazzi, *Plant Sci. Lett.* 26 (1982) 173.
- [172] C. James, *Seed Sci. Technol.* 9 (1981) 679.
- [173] R. A. Dean, J. Kuc, *Trends Biotechnol.* 3 (1985) 125.
- [174] R. C. Riggelman, B. Fristensky, L. A. Hadwiger, *Plant Mol. Biol.* 4 (1985) 81.
- [175] J. Chappell, K. Hahlbrock, *Nature (London)* 311 (1984) 76; P. D. Bishop, D. J. Makus, G. Pearce, C. A. Ryan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 3536.
- [176] K. R. Davis, A. G. Darvill, P. Albersheim, *Plant Mol. Biol.* 6 (1986) 23.
- [177] A. Schlumbaum, F. Mauch, U. Vögeli, T. Boller, *Nature (London)* 324 (1986) 365.
- [178] J. D. G. Jones, K. L. Grady, T. V. Suslow, J. R. Bedbrook, *EMBO J.* 5 (1986) 467.
- [179] J. J. Burdon, D. R. Marshall, *Plant Dis.* 65 (1981) 44; W. J. Peacock, E. S. Dennis in S. Silver (Hrsg.): *Biotechnology: Potentials and Limitations*, Springer, Berlin 1986, S. 223.
- [180] B. J. Staskawicz, D. Dahlbeck, N. T. Keen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6024.
- [181] C. Boucher, A. Martinel, P. Barberis, G. Alloing, C. Zischek, *MGG Mol. Gen. Genet.* 205 (1986) 270.
- [182] C. A. Ryan in P. K. Stumpf, E. E. Conn (Hrsg.): *The Biochemistry of Plants, Vol. 6*, Academic Press, New York 1981, S. 351.
- [183] R. M. Broadway, S. S. Dussey, G. Pearce, C. A. Ryan, *Entomol. Exp. Appl.* 41 (1986) 33.
- [184] J. S. Lee, W. E. Brown, J. S. Graham, G. Pearce, E. A. Fox, T. W. Dreher, K. G. Ahren, G. D. Pearson, C. A. Ryan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 7277.
- [185] H. M. J. De Greve, M. B. L. F. Salgado, M. C. E. Van Montagu, M. A. Vaeck, M. F. O. Zabeau, J. J. A. Leemans, H. F. P. Hoste, *Eur. Pat.-Anm.* 193259 (1986), Plant Genetic Systems.
- [186] P. A. Hedin (Hrsg.): *Plant Resistance to Insects*, ACS Symp. Ser. 208 (1983).
- [187] A. G. Darvill, P. Albersheim, *Annu. Rev. Plant Pathol.* 35 (1984) 243.
- [188] E. Vierling, M. C. Mishkind, G. W. Schmidt, T. L. Key, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 361.
- [189] E. Czarnecka, L. Edelman, J. L. Key, *Plant Mol. Biol.* 3 (1984) 45; E. Czarnecka, W. B. Gurey, R. T. Nagao, L. Mosquera, J. L. Key, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 3726.
- [190] G. R. Stewart, F. Larker in B. J. Miflin (Hrsg.): *Biochemistry of Plants, Vol. 5*, Academic Press, New York 1980, S. 609.
- [191] W. D. Beversdorf, D. J. Hume in G. B. Collins, J. G. Petolino (Hrsg.): *Applications of Genetic Engineering to Crop Improvement*, Nijhoff, Dordrecht 1984, S. 189.
- [192] J. C. Polacco in G. B. Collins, J. G. Petolino (Hrsg.): *Applications of Genetic Engineering to Crop Improvement*, Nijhoff, Dordrecht 1984, S. 255.
- [193] M. F. Balandrin, J. A. Klocke, E. S. Wurtele, W. H. Bollinger, *Science* 228 (1985) 1154.
- [194] F. R. Tabita, C. L. Small, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 6100; M. Gurevitz, C. R. Sommerville, C. McIntosh, *ibid.* 82 (1985) 6546.
- [195] a) G. Schneider, Y. Lindqvist, C. I. Bränden, G. Lorimer, *EMBO J.* 5 (1986) 3409; b) A. Holzenburg, F. Mayer, G. Haraus, M. Van Heel, R. Tokuoka, T. Ishida, K. Harata, G. P. Pal, W. Saenger, *Nature (London)* 325 (1987) 730.
- [196] S. M. van der Vries, D. Bradley, A. A. Gatenby, *EMBO J.* 5 (1986) 2439.
- [197] D. Werner, *Angew. Bot.* 54 (1980) 67.
- [198] W. Klipp, A. Pühler in W. J. Broughton, A. Pühler (Hrsg.): *Nitrogen Fixation, Vol. 4: Molecular Biology*, Clarendon Press, Oxford 1986, S. 95; G. N. Gussin, C. W. Ronson, F. M. Ausubel, *Annu. Rev. Genet.* 20 (1986) 567.
- [199] A. L. M. Hodgson, G. Stacey, *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 4 (1986) Nr. 1, S. 1; A. Kondorosi in W. J. Broughton, A. Pühler (Hrsg.): *Nitrogen Fixation, Vol. 4: Molecular Biology*, Clarendon Press, Oxford 1986, S. 245.
- [200] D. P. S. Verma, M. G. Fortin, J. Stanley, V. P. Mauro, S. Purohit, N. Morrison, *Plant Mol. Biol.* 7 (1986) 51; F. Govers, T. Gloudemann, M. Moermann, A. van Kammen, T. Bisseling, *EMBO J.* 4 (1985) 861.
- [201] J. W. Redmond, M. Batley, M. A. Djordjevic, R. W. Innes, P. L. Kneppel, B. G. Rolfe, *Nature (London)* 323 (1986) 632; J. L. Firmin, K. E. Wilson, L. Rosien, A. W. B. Johnston, *ibid.* 324 (1986) 90.
- [202] B. J. Carroll, D. L. McNeil, P. M. Gresshoff, *Plant Physiol.* 78 (1985) 34.
- [203] A. Grossway, C. M. Houck, *Plant Mol. Biol.* 5 (1985) 183.
- [204] T. Helentjaris, G. King, M. Slocum, C. Siedenstrang, S. Wegman, *Plant Mol. Biol.* 5 (1985) 109.
- [205] R. Koenig, *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtsch.*, Berlin-Dahlem 232 (1986) 90.
- [206] S. L. Sinden, C. C. Sanford, R. E. Webb, *Am. Potato J.* 61 (1984) 141.
- [207] *Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in vitro neu kombinierte Nukleinsäure, S. – Überarbeitete Fassung*, Bundesminister für Forschung und Technologie, Hrsg. (1986) Abschnitte 19c (1) c und 19 (2).
- [208] F. Herzfeld, D. Gorlitz, M. Kiper, *Naturwissenschaften* 72 (1985) 582; M. Sun, *Science* 231 (1985) 1360.
- [209] M. Schnölzer, B. Haas, K. Ramm, H. Hofmann, H. L. Sänger, *EMBO J.* 4 (1985) 2181.
- [210] N. Vietmeyer, *Science* 232 (1986) 1379.