

Neue RNA-basierte Techniken – ein Paradigmenwechsel im Pflanzenschutz

Von Dr. Aline Koch und Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel,
 Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Pflanzen sind permanent von unzähligen pathogenen Mikroorganismen umgeben, die weltweit Ernteverluste von 30–50 Mrd. USD jährlich verursachen [1]. Neben konventionellen Pflanzenschutzmaßnahmen, wie dem Einsatz chemischer Pflanzenschutzmittel, sind alternative Kontrollstrategien erforderlich. Im Sinne eines „integrierten Pflanzenschutzes“ werden heutzutage gezielt biotechnologische Strategien zur nachhaltigen und umweltschonenden Kontrolle von Krankheitserregern und Schadinsekten in der Produktion von Kulturpflanzen entwickelt. Kernziele sind die Sicherung der Erträge sowie der Verbraucher- und Umweltschutz. Mittels innovativer Schlüsseltechnologien, wie der Nutzung der RNA-Interferenz-Technik (RNAi), sollen neue Impulse im integrierten Pflanzenschutz geschaffen werden.

Potenzielle Nutzung der RNAi-Strategie in der Agrarwirtschaft

RNAi stellt einen konservierten Mechanismus zur Genregulation dar, welcher ubiquitär in allen Eukaryonten an verschiedensten Prozessen beteiligt ist. Dabei wird dieser regulatorische Prozess von kleinen, nicht kodierenden RNAs (small non-coding RNAs; ncRNAs) gesteuert. In Pflanzen ist RNAi in eine Vielzahl von biologischen Prozessen involviert, welche durch äußere Einflüsse, wie abiotischen und biotischen Stress, beeinflusst werden [2]. Das RNAi-vermittelte post-transkriptionelle „gene silencing“ (PTGS) beginnt mit einer initialen Prozessierung respektive Spaltung eines doppelsträngigen Vorläufer-dsRNA-Moleküls in kleine, 21–23 Nukleotide (nt) kurze siRNA-Duplets durch ein RNase-III-ähnliches [3] (Abb. 1). Das PTGS verläuft im Zytoplasma der Zelle, wo die doppelsträngigen siRNAs in einen „RNA-induced silencing complex“ (RISC) inkorporiert werden. Dieser Multi-enzym-Komplex beinhaltet ein als „Argonaut“ bezeichnetes Protein, welches sowohl über eine RNA-Binde-Domäne als auch über eine endonukleolytische Aktivität verfügt [4]. In einer ATP-abhängigen Reaktion wird die siRNA durch RISC entwunden,

woraus ein als „sense“ und ein als „antisense“ bezeichneter Strang hervorgehen. Während der „sense“-Strang, der sequenz-identisch mit der zelleigenen mRNA ist, degradiert wird, bleibt der „antisense“-Strang an den RISC gebunden und kann nun via komplementärer Basenpaarung spezifisch an endogene Ziel-Transkripte binden und diese degradieren.

Obwohl die exakte physiologische Bedeutung des RNAi-Phänomens zum Teil noch unklar ist, sind die biotechnologischen Anwendungsgebiete für RNAi extrem vielseitig und reichen von der Aufklärung von Genfunktionen durch den gezielten „knock-down“ von Genen über den Einsatz in der industriellen Biotechnologie bis hin zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten in der Medizin. Darüber hinaus birgt die RNAi-Technologie großes Potenzial in der Entwicklung neuer, innovativer Strategien im Pflanzenschutz. Es wird postuliert, dass sich die RNA-„silencing“-Maschinerie zum Schutz vor viralen Infektionen und dem mutagenen Potenzial beweglicher genetischer Elemente, wie Transposons, evolutionär herausgebildet hat [5]. Dieses „natürliche“ Phänomen versucht man sich bei der Kontrolle von agronomisch relevanten Pathogenen und Schadorganismen (Schädlingen) nutzbar zu machen. Zum Beispiel können durch exogene Applikation, Fütterung oder Injektion von dsRNAs die Zielgene in Insekten [6], Nematoden [7] und Pilzen [8] inaktiviert werden. Die biotechnologische Erstellung von Pflanzen, welche diejenigen spezifischen dsRNAs in planta exprimieren, die letztlich zur Geninaktivierung im Zielorganismus führen, wird als „host-induced gene silencing“ (HIGS) bezeichnet (Abb. 1). Diese Technologie stellt eine vielversprechende Alternative zum konventionellen Pflanzenschutz dar, da sie sich hochselektiv für den Zielorganismus konzipieren lässt. Der Erfolg der RNAi wird durch die zahlreichen Studien reflektiert, welche die Effektivität dieser Technologie gegen verschiedenste Krankheitserreger und Schadorganismen, wie Viren, parasitäre Pflanzen, Nematoden, Insekten und Pilze, unter Beweis stellen [9].

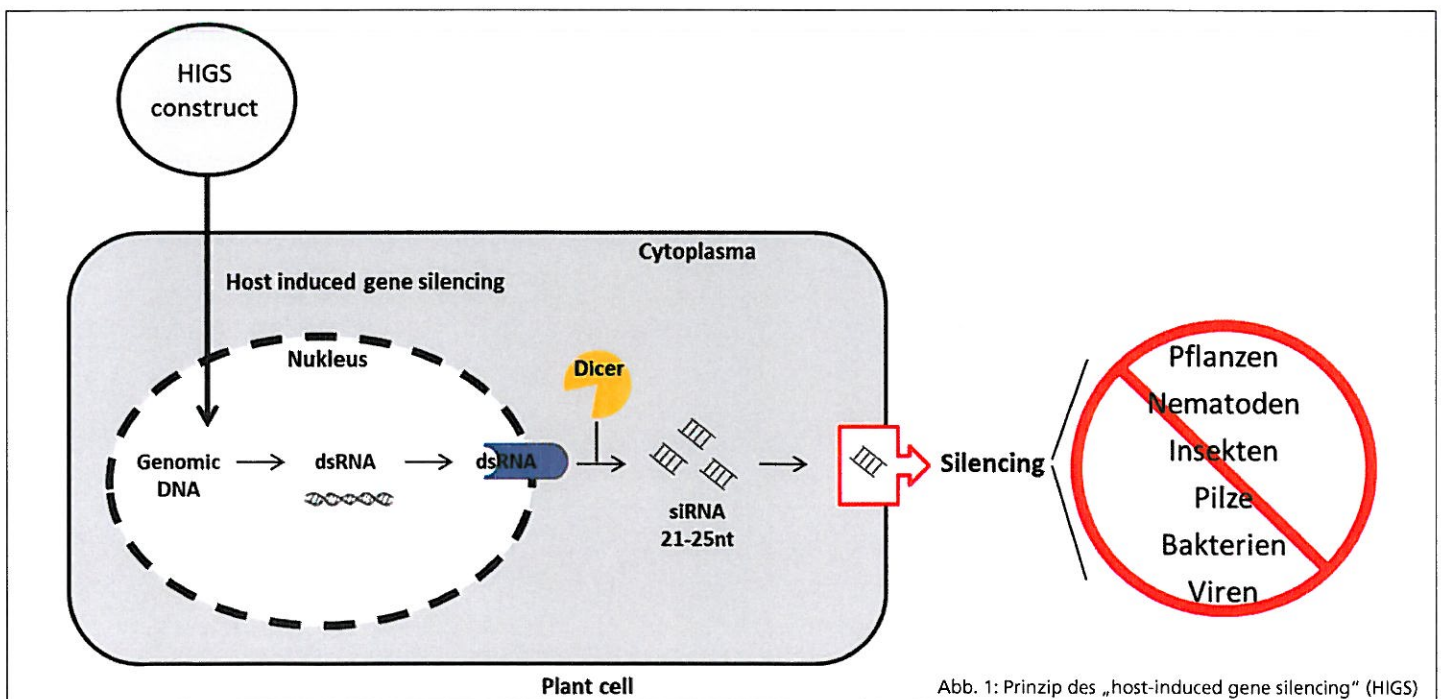


Abb. 1: Prinzip des „host-induced gene silencing“ (HIGS)

HIGS zur Kontrolle des Getreidepilzes *Fusarium graminearum*

Der Ascomycet *Fusarium graminearum* (*Fg*), einer der prominentesten Vertreter der Gattung *Fusarium*, gilt als einer der relevantesten Schaderreger in der Landwirtschaft und ist ursächlich für eine Vielzahl schwerwiegender Pflanzenkrankheiten im Getreideanbau, welche zumeist unter dem Begriff „Ährenfusariosen“ zusammengefasst werden. Er rangiert unter den Top Ten der „cereal killers“ weltweit, mit immensen globalen agrarökonomischen Auswirkungen auf das Erntegut Korn und die damit verbundene Industrie respektive die weltweite Nahrungs- und Futtermittelproduktion. Zusätzlich zu den Ernteverlusten sind auch Qualitätsverluste zu beklagen. Diese werden durch die Kontamination mit Mykotoxinen hervorgerufen, welche der Pilz während der Pathogenese, vermutlich als eine Art Virulenzfaktor, bildet. Die Bildung der Toxine Trichothecene (u. a. Deoxynivalenol (DON) und Nivalenol (NIV)) und Zearaleon (ZEA) stellt eine ernst zu nehmende Gefahr für die Gesundheit von Mensch und Tier dar. Die Maßnahmen zur Bekämpfung von *Fusarium* im Pflanzenschutz belaufen sich derzeit auf pflanzenbauliche Eingriffe, chemische Bekämpfung, d. h. Applikation von Fungiziden (protektiv und kurativ) sowie Resistenzzüchtungen. Momentan gilt die Applikation von systemisch wirkenden Azol-Fungiziden, wie den Sterol-Demethylierungs-Inhibitoren (DMI), als eine der gängigsten Maßnahmen zur Bekämpfung von *Fg*. DMI-Fungizide hemmen die Ergosterolbiosynthese des Pilzes, genauer das Enzym Cytochrom P450 Lanosterol C-14 α -Demethylase (CYP51). Die Funktion des CYP51 ist essenziell für die Ergosterolbiosynthese und garantiert Stabilität, Integrität sowie Fluidität der pilzlichen Zellmembran. In Ermangelung geeigneter Alternativen wurden die DMI seit ihrer Entdeckung (1973) und Markteinführung (1976) extensiv genutzt. Somit ist es kaum verwunderlich, dass im Laufe der Zeit einige pflanzenpathogene Pilze DMI-Insensitivitäten entwickelt haben. Die Identifizierung DMI-resistenter *Fg*-Isolate in den vergangenen Jahren [10] macht die Notwendigkeit alternativer Kontrollstrategien deutlich. Im Rahmen eines Forschungsvorhabens gelang es erstmals, eine solche alternative Kontrollstrategie von *Fg* via HIGS zu etablieren [11]. *Fusarium graminearum* besitzt drei paraloge CYP51-Gene, ausgewiesen als CYP51A, CYP51B und CYP51C, welche alle unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber DMIs aufweisen und als funktionell divers beschrieben werden [12]. Basierend auf der funktionalen Diversifikation wurden stabil transgene Pflanzen hergestellt, welche eine für alle drei *Fg*CYP51-Gene partiell komplementären chimären dsRNA exprimieren [11]. Anhand von Infektionsversuchen konnte dargelegt werden, dass die in-planta-Expression dieser spezifischen dsRNA die Resistenz von *Arabidopsis thaliana* und Gerste (*Hordeum vulgare*) gegenüber der *Fg*-Infektion bedingte (Abb. 2).

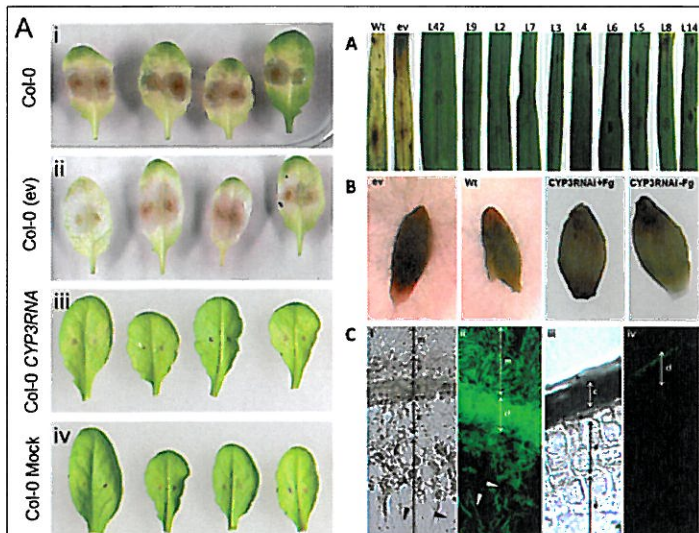


Abb. 2: Resistenzbeobachtungen in *Arabidopsis* und Gerste [11]

In diesem Zusammenhang konnte die Prozessierung der dsRNA durch Detektion entsprechender siRNAs in *Fg*-infizierten sowie nicht infizierten *Arabidopsis*-Pflanzen gezeigt werden. Die makroskopischen Resistenzbeobachtungen ließen sich auch auf mikroskopischer Ebene darstellen. So blieb das Pilzwachstum auf *Fg*-infizierten, transgenen *Arabidopsis*- sowie Gerstebältern lokal auf den Ort der Inokulation beschränkt [11]. Diese Ergebnisse demonstrieren hinsichtlich der enormen Resistenzerfolge in *Arabidopsis* und Gerste gegenüber *Fg*, welche revolutionären Einfluss das HIGS-Prinzip auf bestehende sowie zukünftige Pflanzenschutzstrategien nehmen könnte. Gleichwohl sind weitere Studien erforderlich, welche das Potenzial der RNAi-Technologie zur Reduktion des Einsatzes von Azolfungiziden in der Landwirtschaft herausstellen.

Schlussfolgerungen

Obwohl der „proof of concept“ bereits erbracht wurde, ist die Umsetzung der Forschungsergebnisse in die Praxis weiterhin problematisch. Bis heute wird die gentechnische Modifikation von Nutzpflanzen von einer breiten mitteleuropäischen Öffentlichkeit als bedenkliche Vorgehensweise abgelehnt. Dennoch gewinnen das Know-how solch innovativer Schlüsseltechnologien und der damit verbundene Zuwachs von Kernkompetenzen zunehmend an Praxisrelevanz, vor allem im Hinblick auf die sukzessive ansteigende Zahl von Resistenzen einiger Krankheitserreger gegenüber zugelassenen Wirkstoffen.

Ein wesentlicher Vorteil der RNAi-Technologie besteht darin, dass sie hochselektiv einsetzbar ist. Dadurch wird das Risiko von Schädigungen sogenannter Nichtzielorganismen („off-targets“), wie dem Menschen oder Nützlingen (Bienen etc.), im Vergleich zu konventionellen oder organisch-dynamischen Verfahren nochmals erheblich minimiert. Schon wegen des letztgenannten Umweltschutzaspektes ist es ein prioritäres Ziel der Wissenschaft, die neue Technologie fortzuentwickeln und ihre Praxistauglichkeit zu überprüfen.

Literatur

1. Cook, J.: Towards cropping systems that enhance productivity and sustainability. – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103 (2006), p. 18389–18394
2. Baulcombe, D.: RNA silencing in plants. – Nature 431 (2004), p. 356–363
3. Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond and G. J. Hannon: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. – Nature 409 (2001), p. 363–366
4. Fagard, M., S. Boutet, J. B. Morel, C. Bellini and H. Vaucheret: AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97 (2000) 21, p. 11650–11654
5. Voinnet, O.: Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. – Nat. Rev. Genet. 6 (2005) 3, p. 206–220
6. Zhang, H., H. C. Li and X. X. Miao: Feasibility, limitation and possible solutions of RNAi-based technology for insect pest control. – Insect science (2012), DOI: 10.1111/j.1744-7917.2012.01513.x
7. Lilley, C. J., L. J. Davies and P. E. Urwin: RNA interference in plant parasitic nematodes: a summary of the current status. – Parasitology 39 (2012) 5, p. 630–640
8. Nunes, C. C., and R. A. Dean: Host-induced gene silencing: a tool for understanding fungal host interaction and for developing novel disease control strategies. – Mol. Plant Pathol. 13 (2011) 5, p. 519–529
9. Koch, A., and K.-H. Kogel: New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. – Plant Biotechnology Journal (2014), DOI: 10.1111/pbi.12226
10. Yin, C., X. Chen, X. Wang, Q. Han, Z. Kang and S. H. Hulbert: Generation and analysis of expression sequence tags from haustoria of the wheat stripe rust fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*. – BMC Genomics (2009), DOI: 10.1186/1471-2164-10-626
11. Koch, A., N. Kumar, L. Weber, H. Keller, J. Imani and K.-H. Kogel: Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium spec.* – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2013), DOI: 10.1073/pnas.1306373110
12. Fan, J., M. Urban, J. E. Parker, H. C. Brewer, S. L. Kelly, K. E. Hammond-Kosack, B. A. Fraaije, X. Liu and H. J. Cools: Characterization of the sterol 14 α -demethylases of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific CYP51 function. – New Phytol. (2013), DOI: 10.1111/nph.12193

pb/w