

Einsatz gentechnischer Methoden zur Verbesserung der Kulturpflanzenresistenz gegenüber parasitären Pilzen

Dietmar J. Stahl, Klaus Schmidt und Reinhard Nehls

PLANTA Angewandte Pflanzengenetik und Biotechnologie GmbH, Grimsehlstraße 31, 37555 Einbeck
(r.nehls@kws.de)

Einleitung

Seit der Veröffentlichung der ersten Arbeit zur Verbesserung der Pilzresistenz von Kulturpflanzen durch gentechnologische Methoden (Broglie et al., 1991) wurden zahlreiche Ergebnisse zu diesem Thema präsentiert. Obwohl durch vielfältige Arbeiten gezeigt wurde, dass die Pilzresistenz von Pflanzen durch unterschiedliche Strategien verbessert werden kann, sind die bislang erzielten Ergebnisse noch nicht ausreichend für eine praktische Anwendung. Damit unterscheiden sich die Ergebnisse zur gentechnologischen Pilzresistenz von den Arbeiten zur gentechnologischen Virus- und Insektenresistenz, die praxisreife Lösungen für eine Vielzahl von Schaderregern und Kulturarten anbieten. Die anwendungsorientierten Arbeiten zur Pilzresistenz werden stark beeinflusst von den Ergebnissen der Grundlagenforschung zur Analyse der molekularen Interaktion zwischen Pathogen und Wirtspflanze. Die im Verlauf der vergangenen 20 Jahre durch die Biowissenschaften erzielten Erkenntnisse werden zielstrebig genutzt und die isolierten Gene schnell auf ihre Eignung zur Verbesserung der Pilzresistenz geprüft. Federführend sind dabei vor allem Biotechnologie-, Pflanzenschutz- und Saatgutunternehmen. Aufgrund der hohen Entwicklungs- und Zulassungskosten gentechnisch verbesserter Pflanzen, insbesondere für die Deregulierung des transgenen Ereignisses, muss aus der Sicht eines Saatgutunternehmens ein gentechnologischer Pilzresistenzansatz eine sehr hohe, fast vollständige und über die gesamte Vegetationsperiode anhaltende Resistenz gegenüber dem wichtigsten Schadpilz einer Nutzpflanze und eine deutliche Resistenz gegenüber Pathogenen mit geringerer wirtschaftlicher Bedeutung erbringen. Dabei darf der Ansatz zu keiner Ertragsreduktion führen, darf nicht die Anfälligkeit gegenüber bislang unbedeutenden Pathogenen steigern und muss von seiner Art gesellschaftlich akzeptabel sein.

Technische Konzepte

Die verfolgten technischen Konzepte sind ein Spiegel des wissenschaftlichen Fortschritts

auf dem Gebiet der molekularen Grundlagen der Krankheitsresistenz von Pflanzen und Tieren. Die Mehrzahl der Konzepte beruht auf der Verwendung von Faktoren der induzierten Resistenz von Pflanzen. So wurde in der ersten Hälfte der 90er Jahre des vergangenen Jahrhunderts intensiv die Eignung von Effektorgenen geprüft, deren Produkte, wie ‚pathogenesis related‘ (PR)-Proteine oder Phytoalexinsynthasen, eine direkte antifungale Wirkung ausüben. Inzwischen wird die Wirksamkeit von Komponenten der pflanzlichen Signaltransduktion oder Signalerkennung getestet. Die Isolierung von Faktoren der Nichtwirtsresistenz von Pflanzen bietet in der Zukunft weitere Möglichkeiten für neuartige Konzepte.

Daneben werden teilweise auch Faktoren der angeborenen und erworbenen Immunität (innate and acquired immunity) tierischer Organismen verwendet (Peschen et al., 2004; Osusky et al., 2005). Diese Konzepte sind jedoch aufgrund der wahrscheinlich sehr begrenzten Akzeptanz und ethischer Bedenken eher akademischer Natur und weniger für die Verwendung in Nutzpflanzen geeignet.

Expression von antifungal wirksamen Genen

PR-Proteine

PR-(,pathogenesis related‘) Proteine sind Proteine, die in gesunden pflanzlichen Geweben nicht oder nur gering nachweisbar sind, jedoch unter biotischen und abiotischen Stressbedingungen induziert werden. Die Mehrzahl der PR-Proteine zeigt eine direkte antifungale Aktivität *in vitro* oder ist mit der Pathogenabwehr assoziiert. Bis 2001 wurden 14 verschiedene Klassen von PR- Proteinen für Tabak und Tomate klassifiziert. Endo- β -Glucanasen (PR-2), Chitinasen (PR-3, -4, -8 und -11) und Proteinasen (PR-7) schwächen durch ihre hydrolytischen Aktivitäten pilzliche Zellwände. Thaumatin-ähnliche Proteine (PR-5), pflanzliche Defensine (PR-12), Thionine (PR-13) und Lipidtransfer Proteine (PR-14) wirken permeabilisierend auf pilzliche und bakterielle Plasmamembranen. Peroxidasen aus der PR-9 Familie können an der Verstärkung von pflanzlichen Zellwänden in Reaktion auf Pathogenbefall beteiligt sein. PR-1 Proteine zeigen eine direkte antifungale Wirkung gegen Oomyzeten (van Loon, 2001).

Die konstitutive Expression einer Chitinase der Bohne in Tabak und Raps mit Hilfe des 35S Promotors war der erste erfolgreiche Ansatz zur Verbesserung der Pilzresistenz von Pflanzen (Broglie et al., 1991). Diese Arbeit war der Auftakt zu einer ganzen Serie von Projekten, bei denen PR-Proteine konstitutiv in Pflanzen exprimiert wurden. Die singuläre Expression von PR-1, PR-2, PR-3, PR-5 und PR-12 Genen führte zu einer erhöhten Pilz- und Oomyzetenresistenz von Tabak, Raps, Kartoffel und Karotte gegenüber verschiedenen parasitären Pilzen und Oomyzeten. Eine weitere Verbesserung der Pathogenresistenz konnte bei der kombinierten Expression von mehreren PR-Proteinen beobachtet werden (Tabelle 1). Tabakpflanzen, die eine Chitinase und Glucanase coexprimierten, zeigten eine im Vergleich zur Expression der Einzelgene deutlich gesteigerte Resistenz gegen *Cercospora nicotianae* (Zhu et al., 1994). Eine

synergistische Wirkung gegenüber *Rhizoctonia solani* wurde für Tabak durch die Coexpression einer Chitinase und einer Glucanase bzw. einer Chitinase mit einem Ribosomen-inaktivierenden Protein (RIP) beschrieben (Jach et al., 1995). Während die Mehrzahl der Resistenzprüfungen transgener Pflanzen nur unter Klimakammer- oder Gewächshausbedingungen durchgeführt wurden, konnten Melchers und Stuiver (2000) bei Resistenzprüfungen von transgenen Karotten eine Erhöhung der breiten Pilzresistenz durch die Coexpression einer Chitinase und einer Glucanase im Feld beobachten. Die systematische Kombination zahlreicher PR-Proteine in der Modellpflanze Tabak zeigte jedoch insgesamt, dass entweder keine ausreichend hohe Resistenzsteigerung oder keine breite Pilzresistenz durch die Expression der PR-Proteine erreicht werden konnte (J. Ryals, pers. Mitteilung).

Phytoalexine

Phytoalexine sind niedermolekulare, antimikrobiell wirksame Substanzen, die unter biotischen und abiotischen Stressbedingungen gebildet werden. Phytoalexine sind von ihrer chemischen Natur spezifisch für einzelne Pflanzenfamilien und werden häufig über komplexe Stoffwechselwege synthetisiert. Eine Ausnahme hinsichtlich der Biosynthese stellt das Phytoalexin **Resveratrol** aus der Weinrebe dar. Dieses Phytoalexin vom Stilbentyp wird ausgehend von Malonyl-CoA und p-Coumaryl-CoA durch einen einzigen enzymatischen Schritt, der von der Resveratrolsynthase katalysiert wird, gebildet.

Durch Transformation des Resveratrolsynthasegens aus der Weinrebe in andere Nutzpflanzen können diese in die Lage versetzt werden, das neue Phytoalexin Resveratrol zu bilden. Tabakpflanzen, die mit den Resveratrolsynthasegenen Vst1 und Vst2 transformiert worden waren, zeigten eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber *Botrytis cinerea* (Hain et al., 1993). Eine Verbesserung der Pathogenresistenz konnte mit diesem Konzept auch in anderen Kulturpflanzen beobachtet werden (Tabelle 2). So zeigten Tomaten und Kartoffeln eine gesteigerte Resistenz gegen *Phytophthora infestans* (Thomzik et al., 1997; Stahl, unveröffentlichte Ergebnisse) und Rapspflanzen eine erhöhte Resistenz gegenüber *Phoma lingam* im Feld und im Gewächshaus gegenüber *Verticillium dahliae* (Stahl, unveröffentlichte Ergebnisse).

Modifikation der Signaltransduktion

Nachdem die prinzipielle Verbesserung der Pilzresistenz durch Expression von PR-Proteinen oder Phytoalexinen gezeigt worden war, war der nächste logische Schritt der Versuch einer Modifikation der Signaltransduktion der Pflanzen, um dadurch eine stärkere Resistenzantwort zu erreichen. Der Eingriff in die Signaltransduktion kann durch die erhöhte Produktion von Signalsubstanzen oder durch die Überproduktion von Regulationsproteinen der Signaltransduktionsketten erfolgen.

Tab. 1: Resistenzverhalten von Nutzpflanzen nach konstitutiver Expression von PR-Proteinen

Konstitutive Expression einzelner PR-Proteine					
Exprimiertes Protein	Spenderpflanze	Empfängerpflanze	Pathogen	Befallsreduktion	Referenz
PR-1a	Tabak	Tabak	<i>C. nicotianae</i> <i>P. parasitica</i> <i>P. nicotianae</i>	keine 30 % (14 d.p.i) 42% (7 d.p.i) 24 % (9 d.p.i)	Alexander et al., 1993
PR-2 (Glucanase)	Soja	Tabak	<i>P. nicotianae</i> <i>Alternaria alternata</i>	sehr stark sehr stark	Yoshikawa et al., 1993
PR-3 (Chitinase)	Bohne Tomate	Tabak Raps Raps ¹	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Phyitium spp.</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>C. concentricum</i> <i>Phoma lingam</i> <i>S. sclerotiorum</i>	40 - 50% keine 40 – 50% 21% 30% 70%	Brogliè et al., 1991 Grison et al., 1996
PR-5 (Osmotin)	Tabak Kartoffel	Tabak Kartoffel Kartoffel	<i>P. parasitica</i> <i>P. infestans</i> <i>P. infestans</i>	keine ja ja	Liu et al., 1994 Zhu et al., 1996
PR-12 (Defensin)	Radieschen	Tabak	<i>Alternaria alternata</i>	75 %	Terras et al., 1995
Coexpression verschiedener PR-Proteine (Synergie)					
Chitinase I Glucanase II ChitI x GluII	Reis Luzerne	Tabak	<i>Cercospora nicotianae</i>	40 – 50% 20 – 30% 80 – 90%	Zhu et al., 1994
RIP TypI Chitinase II Glucanase II Chit II/Glu II Chit II/RIP	Gerste	Tabak	<i>Rhizoctonia solani</i> <i>R. solani, A. alternata, B. cinerea</i>	10 – 40% 20 – 30% 20 – 50% max. 60% max. 60%	Jach et al., 1995
Chitinase I ² + Glucanase I ²	Tabak	Karotte ¹	<i>Alternaria dauci</i> <i>Alternaria radicina</i> <i>Cercospora carotae</i> <i>Erysiphe heraclei</i>	stark stark stark stark	Melchers and Stuiver, 2000

¹ Resistenzprüfungen unter Feldbedingungen

² Targeting der Proteine verändert (von der Vakuole in den Apoplast)

Die verstärkte Produktion von Wasserstoffperoxid durch die Expression von mikrobiellen **Glucoseoxidasen** in Kartoffel, Tabak und Baumwolle führte zu einem reduzierten Befall der Kartoffeln mit *P. infestans*, einer erhöhten Resistenz des Tabaks gegen *R. solani* und einer verbesserten Resistenz der Baumwolle gegen *V. dahliae* (Wu et al., 1995; Murray et al., 1999).

Tab. 2: Resistenzverhalten von Nutzpflanzen durch Expression der Resveratrolsynthase

Resistenzverhalten von transgenen Resveratrolsynthasepflanzen			
Pflanze	Pathogen	Befallsreduktion	Referenz
Tabak	<i>Botrytis cinerea</i>	50 %	Hain et al., 1993
Tomate	<i>Phytophthora infestans</i> <i>Botrytis cinerea</i>	40 – 70% 8 – 15 %	Thomzik et al., 1997
Kartoffel	<i>Phytophthora infestans</i>	40 % (5 d.p.i.) 10 % (14 d.p.i.)	Stahl (unveröffentlicht)
Raps	<i>Phoma lingam</i> <i>Verticillium dahliae</i>	30 – 35% 30 – 60%	Stahl (unveröffentlicht)

Das Regulationsprotein NPR1 (non expressor of PR genes) ist ein Schlüsselmolekül in der Regulation von Salicylsäure abhängigen pflanzlichen Verteidigungsreaktionen. Die Überexpression des NPR1 Gens in *A. thaliana* führt zu einer 2-3 fach gesteigerten Bildung der Proteine PR-1, PR-2 und PR-5 und einer erhöhten *Peronospora parasitica* Resistenz (Cao et al., 1998). NPR homologe Gene wurden in zahlreichen Kulturpflanzen gefunden, so dass die Überexpression dieses Regulatorproteins eine weitere Ansatzmöglichkeit zur Verbesserung der Pilzresistenz bietet, wie eine Arbeit mit Weizen belegt. In transgenen Weizen konnte die Resistenz gegen *Fusarium graminearum* durch Expression des AtNPR1 Gens verbessert werden (Makandar et al., 2006).

Neben der Überexpression von Signaltransduktionskomponenten können auch konstitutiv aktive Formen von Regulationsproteinen verwendet werden. Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Kaskade ist unter anderem beteiligt an der Weiterleitung extrazellulärer Reize in die pflanzliche Zelle, die bei Pathogenbefall im pflanzlichen Gewebe entstehen. Yamamizo et al. (2006) verwendeten eine konstitutiv aktive Form einer MAPK Kinase, um über die Induktion des NADPH Oxidasegens die induzierte Pflanzenresistenz zu aktivieren. Die Expression der konstitutiv aktiven MAPK Kinase unter der Kontrolle eines pathogenspezifischen Promotors führte in Kartoffeln zu einer hohen Resistenz gegen *P. infestans* und *Alternaria solani*.

Herbeiführung einer Hypersensitiven Reaktion

Die Hypersensitive Reaktion (HR) ist sichtbares Zeichen einer der effektivsten pflanzlichen Verteidigungsreaktionen und wird oftmals bei Resistenzgen vermittelten Verteidigungsreaktionen beobachtet. An der Infektionsstelle kommt es im Zuge der

pflanzlichen Abwehrmaßnahmen zum lokalen Absterben der infizierten Pflanzenzellen. Verschiedene Ansätze wurden beschrieben, bei denen eine HR oder ein Zelltod als eine HR-ähnliche Reaktion an der Infektionsstelle herbeigeführt wurde. Dieses Konzept besitzt aufgrund der bislang erzielten Ergebnisse ein großes Potenzial und beruht auf zwei Komponenten: Einer Effektor Komponente, welche die HR auslöst und einem pathogenspezifischen Promotor, der die HR lokal auf die Infektionsstelle beschränkt.

Strittmatter et al. (1995) nutzte die bakterielle Ribonuklease Barnase, um einen künstlichen Zelltod in transgenen Kartoffeln gezielt nach Pathogenbefall auszulösen. Die Expression des Barnasegens wurde durch eine verkürzte Variante des pathogenspezifischen *prp1-1* Promotors reguliert. Zusätzlich wurde Barstar, ein spezifischer Inhibitor der Ribonuklease, konstitutiv exprimiert, um unspezifische Aktivitäten des *prp1-1* Promotors in nicht infizierten Geweben zu kompensieren. Die Wirkung des Konzeptes äußerte sich in einer Reduktion der Sporulation von *P. infestans* in infizierten Blättern.

Keller et al. (1999) exprimiert das Elicitingen von *Phytophthora cryptogea* unter der Kontrolle des Tabakpromotors *hsr203J* in Tabak und konnte dadurch gezielt eine HR nach Infektion auslösen. Die transgenen Tabakpflanzen zeigten eine deutliche Befallsreduktion gegenüber zahlreichen Schadpilzen und damit eine breite Pilzresistenz. Im einzelnen wurden der Befall von Blättern durch *Erysiphe cichoracearum*, der Befall des Sprosses durch *Phytophthora parasitica* und die Schäden an den Wurzeln durch *Thielaviopsis basicola* deutlich reduziert.

Die genetischen Schlüsselkomponenten einer Gen-für-Gen Interaktion werden bei dem Zweikomponentenkonzept nach de Wit (1992) verwendet, um die Resistenzmechanismen der rassenspezifischen Resistenz biotechnologisch zu nutzen. Ein pflanzliches Resistenzgen (R-Gen) und ein korrespondierendes mikrobielles Avirulenzgen (Avr-Gen) werden in der Pflanzenzelle coexprimiert, um die R-Gen abhängigen Verteidigungsreaktionen auszulösen (Abb. 1). Durch die Verwendung eines pathogenspezifischen Promotors, der durch eine Vielzahl von Pathogenen aktiviert werden kann, kann mit den Komponenten der rassenspezifischen Resistenz eine breit wirksame Resistenz erreicht werden. Diese Resistenz sollte nicht nur gegenüber den verschiedenen Pathotypen eines einzelnen Krankheitserregers sondern gegenüber der Mehrzahl unterschiedlicher Schadpilze einer Kulturart wirksam sein. Obwohl dieses Konzept bereits 1990 vorgestellt wurde, konnte erst 1999 die Funktionalität des Ansatzes aufgrund der technischen Komplexität erfolgreich beschrieben werden. Tomaten, die das Resistenzgen *Cf-9* exprimieren und mit dem *Avr9* Gen aus *Cladosporium fulvum* transformiert worden waren, zeigten eine erhöhte Resistenz gegenüber *C. fulvum* und *Oidium lycopersicum*. Die Expression des *Avr9* Gens stand unter der Kontrolle des verkürzten *prp1-1* (*gst1*) Promotors (Joosten und de Wit, 1999).

Weitere Ergebnisse hinsichtlich der Wirkung des Konzeptes in anderen Kulturpflanzen stehen noch aus. Eine Ursache dafür mag die Spezifität der genetischen Komponenten sein. Aufgrund der Beschränkung der funktionellen Wirksamkeit von R-Genen auf die

einzelnen Pflanzenfamilien (restricted taxonomic specificity) und der Notwendigkeit, für jedes R-Gen das korrespondierende Avr-Gen zu isolieren, ist der Aufwand für die Vorarbeiten zur Konzeptevaluierung in anderen Pflanzen groß.

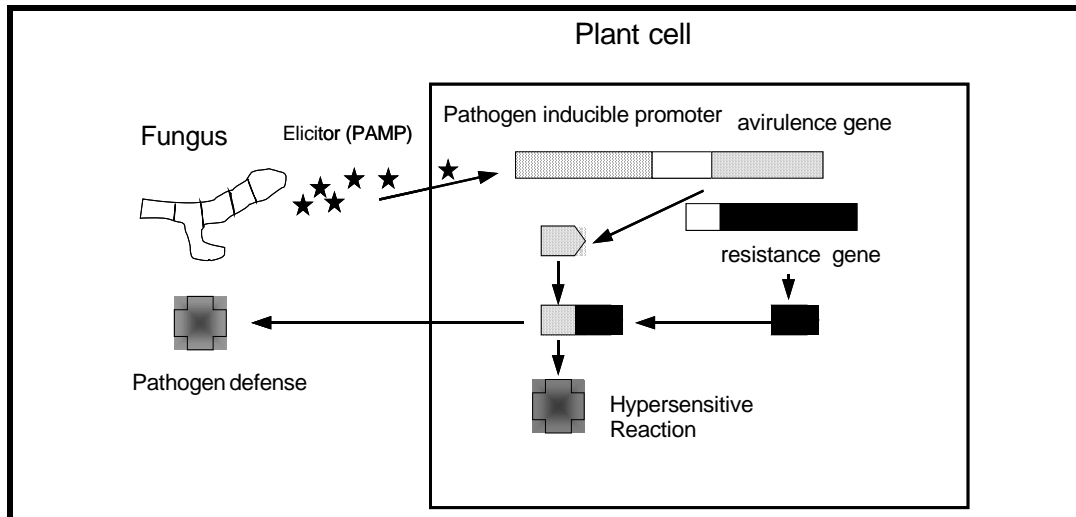


Abb. 1. Herbeiführung einer Hypersensitiven Reaktion durch die pathogeninduzierte Coexpression eines pflanzlichen Resistenz- und eines mikrobiellen Avirulenzgens nach de Wit (1992).

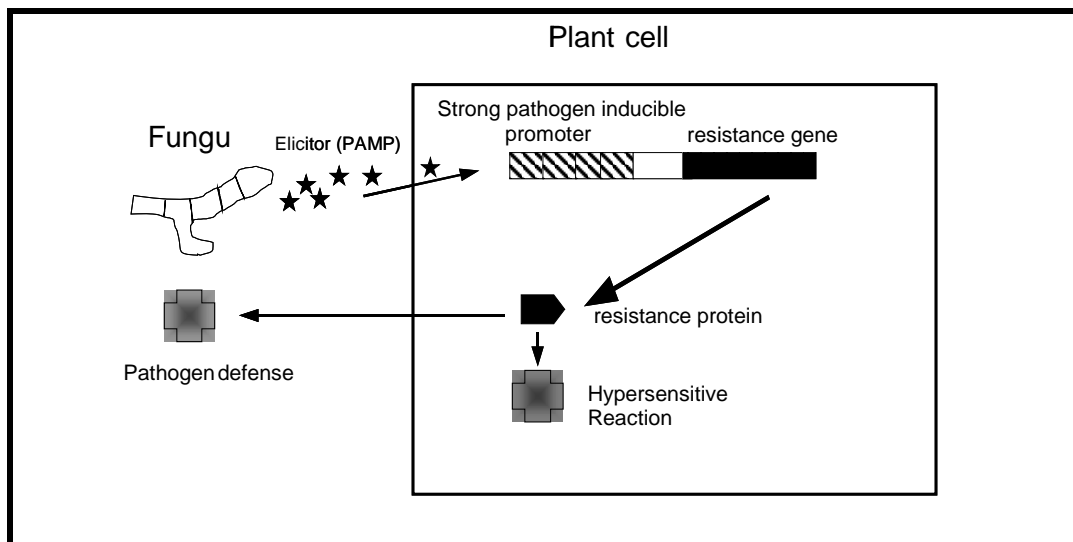


Abb. 2. Herbeiführung einer Hypersensitiven Reaktion durch die pathogeninduzierte Überexpression eines Resistenzgens in Abwesenheit des Avirulenzgens (Stahl, Schmidt, Nehls, unveröffentlicht).

Eine technische Alternative zu der Coexpression von R- und Avr-Genen könnte die induzierte Überexpression eines R-Gens in Abwesenheit des Avr-Gens sein (Abb. 2). Die konstitutive Expression von R-Genen führt zur Aktivierung der von den R-Genen kontrollierten Signaltransduktionswege und zu einer erhöhten Krankheitsresistenz (Oldroyd and Staskawicz, 1998; Tang et al., 1999). Die mit der konstitutiven Expression von R-Genen verbundenen unerwünschten agronomischen Eigenschaften wie Kleinwüchsigkeit und Mikronekrosen könnten durch die Verwendung von pathogenspezifischen Promotoren gelöst werden.

Pathogenspezifische Promotoren

Für die Umsetzung der Mehrzahl der hochwirksamen Konzepte, die auf der Auslösung der induzierten Resistenzmechanismen der Pflanzen beruhen, sind pathogenspezifische Promotoren notwendig. Diese pathogenspezifischen Promotoren sollen die Expression der Effektorcomponenten lokal und zeitlich begrenzt auf die Infektionsstelle beschränken. Dafür wurden bislang pflanzliche Promotoren von pathogenresponsiven Genen verwendet, deren Spezifität teilweise durch Verkürzungen noch verbessert wurde (Martini et al., 1993).

Da pathogenresponsive Gene, wie z. B. PR-Proteingene, nicht nur unter biotischem Stress, sondern auch in Reaktion auf abiotischen Stress, hormonelle Veränderungen und Entwicklungsreize, aktiviert werden, bleibt es fraglich, ob es überhaupt natürliche Promotoren mit einer ausreichenden Pathogenspezifität gibt. Eine vielversprechende Entwicklung ist in diesem Zusammenhang die Konstruktion von synthetischen, pathogenspezifischen Promotoren (Abb. 3).

Die pathogen-responsiven *cis*-Elemente der PR-Proteinpromotoren werden identifiziert, isoliert und zu neuen synthetischen Promotoren zusammengesetzt. Durch die Variation der Anzahl einzelner *cis*-Elemente und der Kombination mehrerer Elemente lassen sich sehr spezifische neue Promotoren entwickeln. Diese Technik wurde erstmals für *A. thaliana* und Petersilie demonstriert (Rushton et al., 2002) und konnte inzwischen erfolgreich auf Weizen (Schmidt, unpublizierte Ergebnisse) und Zuckerrübe (Klages et al., 2004) übertragen werden.

Akkumulation von R-Genen aus Wildformen

Neben der Entwicklung neuer Resistenzquellen können durch die Biotechnologie R-Gene und damit Resistenzen aus Wildformen isoliert und direkt in Kulturpflanzen übertragen werden. Dadurch sollen züchterisch schwierige oder unerwünschte Rückkreuzungen vermieden und zahlreiche R-Gene schnell in Kulturpflanzen akkumuliert werden. Ein Beispiel für diese Strategie ist die Isolierung und der erfolgreiche Transfer des *P. infestans* R-Gens Rpi-blb1 aus der Wildkartoffel *Solanum bulbocastanum* in die heutige Kulturform der Kartoffel (Song et al., 2003; van der Vossen et al., 2003).

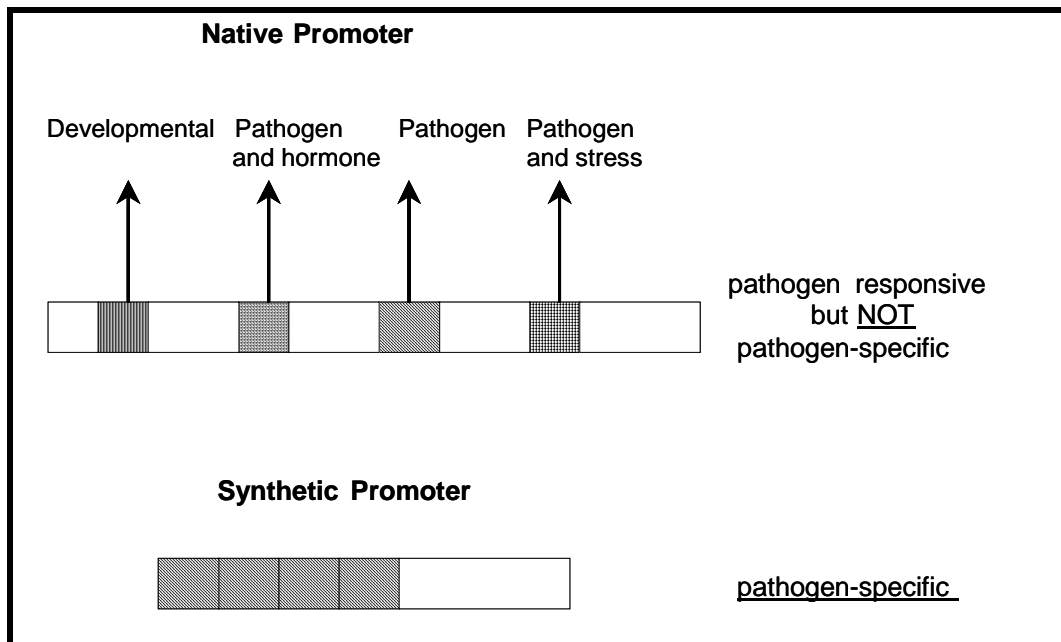


Abb. 3. Entwicklung eines pathogenspezifischen synthetischen Promotors ausgehend von einem natürlichen modular aufgebauten Promotor eines PR-Proteingens. Die einzelnen Kästchen stellen spezifische cis-Elemente innerhalb des Promotors dar.

Neutralisierung pilzlicher Virulenz und Pathogenitätsfaktoren

Die Kenntnis pilzlicher Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren erlaubt es, gezielte Maßnahmen zur Neutralisierung dieser Faktoren zu ergreifen und dadurch die pflanzliche Resistenz zu verbessern. Zahlreiche nekrotrophe Pilze wie *Botrytis cinerea* und *Sclerotinia sclerotiorum* induzieren während des Infektionsvorganges den **programmierten Zelltod** (PCD) im pflanzlichen Gewebe. Durch die Expression von tierischen und pflanzlichen **Anti-Apoptosegenen** konnte die Resistenz von Tabakblätter gegenüber *B. cinerea* und *S. sclerotiorum* und die Resistenz von Blättern und Wurzeln der Karotte gegenüber *B. cinerea* und *T. basicola* deutlich gesteigert werden (Dickman et al., 2001; Imani et al., 2006). Die ubiquitäre Expression dieser PCD-Inhibitoren erhöht aber gleichzeitig die Anfälligkeit gegenüber biotrophen Pathogenen wie *Blumeria graminis* in der Gerste (Imani et al., 2006). Abhilfe könnte eine spezifische Expression der Anti-Apoptosegene durch spezifische Promotoren sein, die eine nekrotrophe oder organspezifische Expression erlauben.

Gesamtbewertung und Ausblick

Die Entwicklung pilzresistenter Pflanzen mit gentechnologischen Methoden wird seit mehr als 15 Jahren verfolgt. Nach ersten ermutigenden Anfangserfolgen zeigte sich, dass die Erstellung hochresistenter Pflanzen mit einer breiten und anhaltend wirksamen Pilzresistenz noch nicht erreicht werden konnte. Die technischen Konzepte, die inzwischen verfolgt werden, sind deutlich komplexer als die Ansätze für die Gewinnung von virus- oder insektenresistenten Pflanzen und benötigen noch weitere Zeit für ihre vollständige Etablierung. Gleichzeitig wächst unser Verständnis zur Resistenz der Pflanzen und der Pathogenitätsmechanismen ihrer Pathogene, so dass sich in der Zukunft weitere konzeptionelle Möglichkeiten ergeben werden.

Literatur

- Alexander, D., Goodman, R. M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T., Ward, E., and Ryals, J., 1993: Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 7327-7331.
- Brogliè, K., Chet, I., Hollidat, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C. J., and Brogliè, R., 1991: Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254, 1194-1197.
- Cao, H., Li, X., and Dong, X., 1998: Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (11), 6531-6536.
- de Wit, P. J. G. M., 1992: Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 30, 391-418.
- Dickman, M. B., Park, Y. K., Oltersdorf, T., Li, W., Clemente, T., and French, R., 2001: Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 6957-62.
- Grisson, R., Grezes-Besset, B., Schneider, M., Lucante, N., Olsen, L., Leguay, J. J., and Toppan, A., 1996: Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing a chimeric chitinase gene. *Nature Biotechnology* 14, 643-646.
- Hain, R., Reif, H.-J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, H. P., Stöcker, R. H., Stenzel, K., 1993: Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361, 153-156.
- Imani, J., Baltruschat, H., Stein, E., Jia, G., Vogelsberg, J., Kogel, K.-H., and Hückelhoven, R., 2006: Expression of barley BAX inhibitor-1 in carrots confers resistance to *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol.* 7(4), 279-284.

- Jach, G., Görnhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J., and Maas, C., 1995: Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J* 8, 97-109.
- Joosten, M. H. A. J., and de Wit, P. J. G. M. (1999). The tomato-*Cladosporium fulvum* interaction: A versatile experimental system to study plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 335-367.
- Keller, H., Pamboukdjian, N., Ponchet, M., Poupet, A., Delon, R., Verrier, J.-L., Roby, D., and Ricci, P., 1999: Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *Plant Cell* 11, 223-235.
- Klages S., Baumeister M., Rohlf, C., Brieff, W., Rushton P., Kirsch C., Heise A., Somssich, I., and D. J. Stahl, 2004: Analysis of PR gene derived pathogen-inducible synthetic promoters in the crop sugar beet. International Joint Workshop on PR-Proteins and Induced Resistance. 5-9 May 2004, Elsinore-Denmark.
- Liu, D., Raghothama, K., G., Hasegawa, P. M., and Bressan, R. A., 1994: Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 1888-1892.
- Makandar, R., Essig, J. S., Schapaugh, M. A., Trick H. N., and Shah, J., 2006: Genetically engineered resistance to Fusarium head blight in wheat by expression of *Arabidopsis* NPR1. *Mol Plant Microbe Interact.* 19(2), 123-129.
- Martini, N., Egen, M., Rüntz, I., and Strittmatter, G., 1993: Promoter sequences of a potato pathogenesis-related gene mediate transcriptional activation selectively upon fungal infection. *Mol Gen Genet* 236, 179-186.
- Melchers, L. S., and Stuijver, M. H., 2000: Novel genes for disease-resistance breeding. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 147-152.
- Murray, F., Llewellyn, D., McFadden, H., Last, D., Elizabeth, S. D., and Peacock, W. J., 1999: Expression of the *Talaromyces flavus* glucose oxidase gene in cotton and tobacco reduces fungal infection, but is also phytotoxic. *Mol Breed* 5, 219-232.
- Oldroyd, G. E. D., and Staskawicz, B. J., 1998: Genetically engineered broad-spectrum disease resistance in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17), 10300-10305.
- Osusky, M., Osuska, L., Kay, W., and Misra, S., 2005: Genetic modification of potato against microbial diseases: in-vitro and in planta activity of a dermaseptin B1 derivative, MsrA2. *Theor Appl Genet* 111(4), 711-22.
- Peschen, D., Li H.-P., Fischer, R., Kreuzaler, F., and Liao, Y.-C., 2004: Fusion proteins comprising a Fusarium-specific antibody linked to antifungal peptides protect plants against a fungal pathogen. *Nature Biotech* 22 (6), 732-738

- Rushton P. J., Reinstadler A., Lipka V., Lippok B., Somssich I.E., 2002: Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell* 14(4), 749-62.
- Song, J., Bradeen, J. M., Naess, S. K., Raasch, J. A., Wielgus, S. M., Haberlach, G. T., Liu, J., Kuang, H., Austin-Phillips, S., Buell, C. B., Helgeson, J. P., and Jiang J., 2003: Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (16), 9128-9133.
- Strittmatter, G., Janssens, J., Opsomer, C., and Botterman, J., 1995: Inhibition of fungal disease development in plants by engineering controlled cell death. *Bio/Technology* 13, 1085-1089.
- Tang X., Xie M., Kim Y.J., Zhou J., Klessig D.F., Martin G.B., 1999: Overexpression of Pto activates defense responses and confers broad resistance. *Plant Cell* 11(1), 15-29.
- Terras, F. R., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N. V., Osborn, R. W., Kester, A., Rees, S. B., Torrekens, S., Van Leuven, L., and Vanderleyden, J., 1995: Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell* 7(5), 573-88.
- Thomzik J. E., Stenzel K., Stöcker R., Schreier P. H., Hain R., and Stahl D. J., 1997: Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiol Mol Plant Pathol* 51, 265-278.
- Van Loon, L. C., 2001 . The families of pathogenesis-related proteins. 6th International Workshop on PR-Proteins. 20-24 May 2001, Spa, Belgium.
- Wu et al., 1995: Disease resistance by expression of a gene encoding H₂O₂ generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7, 1357-1368.
- Yamamizo, C., Kuchimura, K., Kobayashi, A., Katou, S., Kawakita, K., Jones, J. D. G., Doke, N., and Yoshioka, H., 2006: Rewiring mitogen-activated protein kinase cascade by positive feedback confers potato blight resistance. *Plant Physiol* 140, 681-692.
- Yoshikawa, M., Tsuda, M., and Takeuchi, Y., 1993: Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase, from soybean. *Naturwissenschaften* 80, 417-420.
- Zhu, B., Chen, T. H. H., and Li, P. H., 1996: Analysis of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plants expressing sense and antisense genes for an osmotin-like protein. *Planta* 198, 70-77.
- Zhu, Q., Maher, E. A., Masoud, S., Dixon, R. A., and Lamb, C. J., 1994: Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Biotechnology* 12, 807-812.