

Forschung

Gentechnisch veränderte Pflanzen

Punktuelle Eingriff mit unbeabsichtigten Effekten

von Ruth Richter und Johannes Wirz

Ruth Richter,
Dr. Johannes Wirz,
Forschungsinstitut am
Goetheanum,
CH-4143 Dornach 1,
ruth.l.richter@freeenet.de,
johannes.wirz@goetheanum.ch

Risikoabschätzungen von gentechnisch veränderten Pflanzen beschränken sich meist auf ihr ökologisches und gesundheitliches Gefahrenpotential. Auswirkungen des Eingriffs auf die Pflanze selbst werden auf der Ebene des Genoms (WILSON et al.

befasst sich das Projekt „Ganzheitliche Untersuchungen an transgenen Pflanzen“.

Haben Nachkommen gentechnisch veränderter Pflanzen unbeabsichtigte Eigenschaften, die sie von ihren Ausgangssorten unterscheiden? Seit 2001 wurden zu dieser Frage gentechnisch veränderte Kartoffeln aus der Forschungsanstalt in Changins (CH), Tomaten von der Universität Amsterdam (NL) und Weizen von der Universität Zürich (CH) mit einem Set von Methoden untersucht. Gegenstand der Beobachtung waren bei der *dynamischen Morphologie* die Pflanzen selbst und ihre Entwicklungsmuster während des Wachstums, bei der Empfindlichen *Kupferchloridkristallisation* nach Pfeiffer, der *Steigbildmethode* nach Wala und dem *Rundfilterchromatogramm* Gesamtextrakte aus Pflanzenorganen. Hier werden einige Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen an Tomaten vorgestellt.

wird. Bei Tomaten erhält man aus etwa 50 000 behandelten Zellen ca. 15 bis 20 verwendbare Linien (die Erfolgsquote liegt also unter 0,05%). Diese tragen alle das gleiche Konstrukt, an verschiedenen Orten im Genom eingebaut. Pflanzen gehen mit Fremdgenen unterschiedlich um: Das Genprodukt kann entweder in jeder Zelle vorhanden (exprimiert) sein. Oder aber das Gen kann stillgelegt sein, dann spricht man von Gen-Silencing. Oder die Nachkommen können das Fremdgen im Erbgang verlieren. Alle drei Varianten haben wir an Tomaten mit einem gentechnisch eingeführten GUS-Gen aus *E. coli* beobachtet, die für die Grundlagenforschung kreiert wurden. Das GUS-Gen codiert das Eiweiss Glucuronidase, das als Marker dient, um die Regulation von Genen in Geweben zu verfolgen (MES et al. 1999, 2000). Prof. Michel Haring, der uns Samen aus seinen Versuchen zur Verfügung stellte, hielt es für unwahrscheinlich, dass die Pflanzen sich von ihrer Ausgangssorte unterscheiden, da das codierte Eiweiss im Stoffwechsel der Tomate nach bisherigem Kenntnisstand keine Rolle spielt.



Abb.1: Je zwei Pflanzen der nicht manipulierte Kontrolle GCR 161 (oben), der Variante mit hoher Expression (HE, Mitte) und der Variante mit stillgelegtem Fremdgen (Sil, unten), ca. alle 10 Tage fotografiert. Die Kontrollpflanzen sind in der Jungpflanzenentwicklung schneller und haben mehr Blattmasse bei ausladender Wuchsform. Ab Juni bilden die Sil-Pflanzen längere Internodien und kleinere Blätter als die beiden anderen Varianten.

2004), der Transkription (HOLTORF et al. 2004) oder der Translation (LEHESRANTA et al. 2005) untersucht. Änderungen der Pflanzengestalt, d.h. des Phänotyps, wurden bisher kaum dokumentiert. Mit diesem Thema

Wie transgene Tomaten erzeugt werden

Die Gen-Konstrukte werden über das Bakterium *A. tumefaciens* ins Innere der Kerne einzelner Zellen eingeschleust. Der Ort des Einbaus im Genom ist zufällig. Aus jeder transformierten Zelle wird ein Pflänzchen regeneriert, das die Mutterpflanze einer transgenen Linie

Was heißt „ganzheitliche Untersuchungen“?

Ganzheitliche Forschung, das bedeutet nicht nur interdisziplinäre Bearbeitung des glei-

Kurz & knapp:

- Gibt es unbeabsichtigte Veränderungen bei transgenen Pflanzen? Die vorliegende Untersuchung geht dieser Frage anhand morphologischer Parameter nach.
- Tomaten zeigten als Nebeneffekte veränderte Wachstumsdynamik und Blattformen.
- Der Zusammenhang zwischen Wachsen und Reifen war disharmonischer.

chen Forschungsgegenstandes, sondern schliesst darüber hinaus eine synthetische Anschauung ein, die es dem Forscher ermöglicht, Einzelaspekte in einen Gesamtzusammenhang zu integrieren (LEIBER 2006). Nach der Theorie Goethes, dem Doppelten Gesetz zum Verständnis von Lebewesen (KUHNE 1964, WIRZ 2000) müssen bei der Beschreibung von Pflanzen und Tieren zwei Aspekte berücksichtigt werden: ein den Lebewesen innewohnendes *konstituierendes* Prinzip und *modifizierende* äussere Bedingungen. Was letztere für den Organismus bedeuten, zeigt er in einer integralen Reaktion. Diese Bedeutungsvergabe weist auf ein aktives Agens (MOSS 2005), das auch als Wesen bezeichnet und nur wahrgenommen werden kann, indem im Beobachter durch ständiges Vergleichen konkreter Einzelercheinungen ein bewegliches Bild der ihnen gemeinsamen Gesetzmässigkeit entsteht, aus dem sie – entsprechend den jeweiligen Bedingungen – abgeleitet werden können (BOCKEMÜHL 1996, STEINER 1886). Dieser Beobachtungsmodus wird bei Goethe als *Anschauendes Denken* bezeichnet.

Versuchsvarianten: Wann, Was, Wieviel und Wie

Insgesamt wurden von 2002 bis 2006 in vier Vegetationsperioden jeweils 14 bis 16 verschiedene Tomatenvarianten in 7 bis 8 Wiederholungen, also ungefähr 500 Pflanzen, im Gewächshaus kultiviert und beobachtet. Regelmässig wurden qualitative Eindrücke

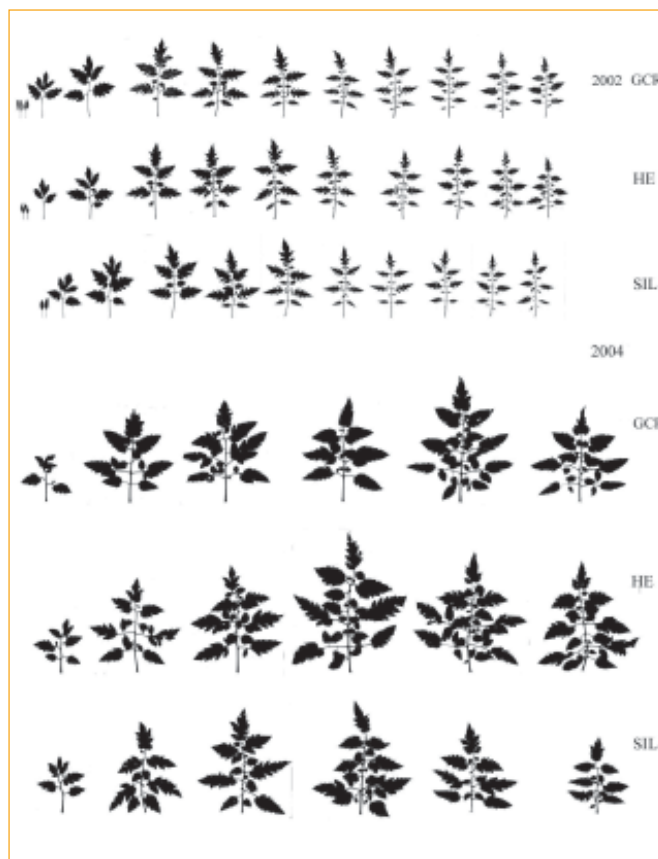
an den lebenden Pflanzen im Vergleich der Varianten beschrieben und Unterscheidungskriterien erarbeitet. Es wurden Parameter wie Wuchshöhe, Anzahl der Blütenstände und Früchte, Fruchtgewicht und Fläche, Umfang und Anzahl der Fiedern von ausgewählten Blättern erhoben. Um die Entwicklungsdynamik der einzelnen Varianten zu dokumentieren, wurden einige Messungen und das Fotografieren der Pflanzen in zweiwöchentlichem Rhythmus bis gegen Ende der Wachstumsperiode durchgeführt.

Erste Bekanntschaft mit transgenen Tomaten

Die Ausgangssorte GCR 16 (Kontrolle), in die das GUS-Gen eingeführt wurde, stammt von der Sorte Moneymaker ab, ist aber eine nur für wissenschaftliche Zwecke verwendete Inzuchtlinie, die qualitativ – auch im Fruchtgeschmack – nicht mit im Bioanbau verwendeten samenfesten Sorten konkurrieren kann. Der Vergleich mit zwei samenfesten Sorten im ersten Versuchsjahr 2002 ergab weit grössere Unterschiede zwischen den Sorten als zwischen den gentechnisch veränderten Linien und ihrer Ausgangssorte. Letztere unterschieden sich in mehreren Parametern wie Frischgewicht der Früchte, Anzahl der Blätter bis zum ersten Blütenstand, Wachstumsdynamik und Wuchsform. (Abb. 1). In diesem Jahr wurden alle Varianten in einer Nährstoffmangel-Situation kultiviert.

An den *Blattr Reihen* der ausgewachsenen Blätter bis zum

ersten Blütenstand waren zunächst Variantenunterschiede nur in der Dynamik der Reihen erkennbar: Die nicht manipulierte Kontrollen bildeten in dieser Situation am meisten Blattfläche im blütennahen Bereich, die Variante Silenced, in der das Fremdgen nicht exprimiert ist, zeigte ab Blatt 6 einen abrupten Bruch



in der Grösse der Blattflächen und damit die stärksten Unterschiede zwischen dem im vegetativen Jugendwachstum gebildeten unteren und dem oberen, bereits unter dem Einfluss des Blühimpulses entwickelten Bereich der Jungpflanzen; die Pflanzen mit hoher Fremdgenexpression lagen mit einem ausgeprägten Verhältnis der Blattflächen dazwischen (Abb.2 obere Hälfte). Die an gepressten Blättern mit ver-

Abb.2: Je eine Blattrreihe der Varianten aus Abb.1. 2002 (oben) sind alle Blätter bis zum ersten Blütenstand abgebildet, 2004 (unten) jedes zweite Blatt von Blatt 2–12, jeweils von links nach rechts in der Reihenfolge, wie sie an der Pflanze gewachsen sind. 2002 haben die Kontrollpflanzen im blütennahen Bereich (Blatt 6-9) am meisten, die Variante Sil am wenigsten Blattfläche. 2004 kommt die variantenspezifische Blattarchitektur besser zum Ausdruck: sowohl die zusammengezogene Blattform bei der Variante Sil, als auch die komplexeren Blattformen bei HE sind deutlich zu erkennen.

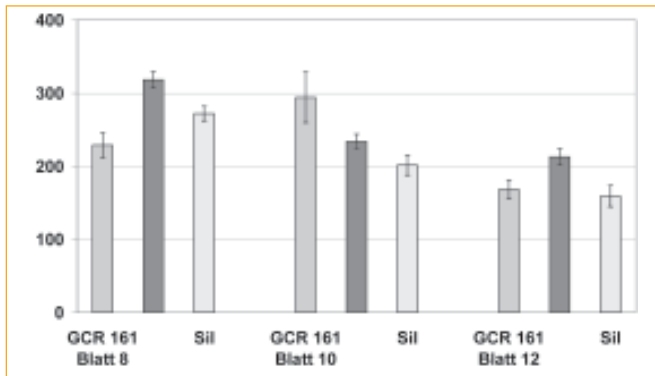


Abb.3: Mittelwerte und Standardfehler der Blattflächen von Blatt 8, 10 und 12 aus dem Jahr 2004 (Blattflächen in cm²). Bei Blatt 8 haben die HE-Pflanzen deutlich grössere Flächen als die Kontrollen ($P < 0,0001$) und die Variante Sil ($P < 0,005$), bei Blatt 10 die Kontrollpflanzen ($P < 0,001$ gegenüber HE, $P < 0,0005$ gg. Sil). Bei Blatt 12 gleichen sich die Varianten einander an. Die Blattflächen sind bei den Kontrollen etwas kleiner als bei HE (nicht signifikant), zwischen Sil und HE ist der Unterschied wenig grösser ($P < 0,05$).

schiedenen Formparametern gewonnenen Daten waren statistisch signifikant verschieden zwischen Linien mit niedriger, bzw. hoher Expression (RICHTER, 2005).

Dennoch erschien die Aussagekraft der Blattreihen enttäuschend. In der Annahme, dass die Pflanzen bei einer besseren Nährstoffversorgung variantenspezifische

Eigenarten besser ausbilden könnten, bauten wir sie 2004 in grösseren Töpfen an. Tatsächlich kam in den Formen der Blätter Charakteristisches sowohl der Einzelblätter als auch der Reihendynamik besser zum Ausdruck und die Varianten unterschieden sich wieder in mehreren Parametern signifikant. Gleichzeitig wurde deutlich, dass die Blattform bei der Tomate ein hochempfindlicher Indikator für physiologische Veränderungen ist. Je nachdem, welches Blatt, bzw. welcher Parameter ins Blickfeld rückt, sind die Verhältnisse zwischen den Varianten verschieden. Dazu ein Beispiel: Bei Pflanzen mit hoher Expression haben Blatt 8 und 12 die grösste Blattfläche, bei der Kontrolle (samenfeste, nicht gentechnisch veränderte Sorte) wird diese erst bei Blatt 10 erreicht (Abb. 2, untere Hälfte, Abb.3). Eine lineare Zuordnung von Eigenschaften zu bestimmten Varianten ist nicht möglich. Dennoch zeigten sich 2004 bei den hier vorgestellten Varianten einige Merkmale, die rückblickend schon 2002 als Tendenz erkannt wurden und sich auch im Nachbau 2005 wiederholten. Die Kontrolle zeichnete sich gegenüber allen gentechnisch modifizierten Varianten durch eine kompaktere Wuchsform, einfache Blattformen und das frühe Einsetzen der Frucht- reife aus. Die Blätter der Variante Silenced waren zu Beginn ihrer Entwicklung oft verdreht mit bauchigen Formen, ausgewachsen wirkten sie durch kurze Blattstiele kompakt. Die stärkste Differenzierung der Blattfläche in viele Zwischen- und Sekundärfiedern fand sich

bei den Pflanzen mit hoher Gen- Expression.

Zweiter Nachbau: Die Varianten bekommen eine „Identität“

Jedes Jahr haben wir nach Varianten getrennt Samen geerntet und im Folgejahr wieder ausgesät. Und jedes Jahr von Neuem fühlten wir uns überwältigt von der Fülle der Formen – bei tropischer Hitze im Gewächshaus, umgeben von über hundert wuchernden Tomatenpflanzen, randomisiert in Blöcken aufgestellt, von denen jede anders aussah. Es schien unmöglich, eine Ordnung in die Erscheinungsvielfalt zu bringen. Aber bei der Auswertung der Daten und unermüdlichem Vergleichen der Blattformen und Fotos entwickelte sich ein spezifischer Blick für die einzelnen Varianten, der zumindest in bestimmten Stadien der Vegetationsperiode Ergebnisse des Wiedererkennens ermöglichte. Diesem Blick liegt ein bewegliches inneres Bild der Variante zugrunde, das durch neue Wahrnehmungen ständig ergänzt und gerade dadurch beim Auffinden typischer Eigenschaften immer präziser wird.

In Bezug auf die Wuchsform wird auf Abb.4 deutlich, dass sich bei der Kontrollvariante und der Variante Silenced im Nachbau 2005 die gleiche Dynamik wiederholt wie 2002 (siehe Abb.2). Die Kontrollpflanzen unterschieden sich in allen Anbaujahren deutlich von allen gentechnisch veränderten Varianten durch rasche Keimung, kräftige Jugendentwicklung, frühen Fruchtansatz und – damit verbun-

Quellen

- BOCKEMÜHL, J. (1996): Ein Leitfaden zur Heilpflanzenkenntnis, Verlag am Goetheanum, Dornach
- GRIFFIN, J.L. (2003): Metabolic profiles to define genomes: can we hear the phenotypes? Phil. Trans. R. soc. London. B 359, pp 857-871
- Holtorf, H., Guitton, M-C. and Reski, R. (2004): Plant functional genomics. Naturwissenschaften 89/6, pp 235-249
- KUHN, D. (1964): Goethe, die Schriften zur Naturwissenschaft. Bd. 10. Weimar.
- LE GALL, G. et al. (2003): Metabolite Profiling of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Using ¹H NMR Spectroscopy as a Tool to Detect Potential Unintended Effects Following Genetic Modification. J. Agric. Food Chem. 51, 2447-2456.
- LEHESRANTA, S.J. et al. (2005): Comparison of tuber proteosome of potato varieties, landraces, and genetically modified lines. Plant Physiology 138, pp 1690-1699
- LEIBER, F. (2006), Tierernährung im Biolandbau: Wissenschaft zwischen Ideal und Praxis, in: Schriftenreihe des Instituts für Nutztierwissenschaften, ETH Zürich, Nr. 28, p. 49 ff.
- Mes, J. et al. (1999) : Loss of avirulence and reduced pathogenicity of a gamma-irradiated mutant of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, in: Phytopathology vol 89, n° 12, p. 1131-1137.
- Mes, J. et al. (2000): Expression of the *Fusarium* Resistance Gene I-2 localizes with the Site of Fungal Containment. Plant Journal, 23(2), p. 183-193.
- Moss, L. (2005), Darwinism, dualism and biological agency, In: Hösl, V. / Illies, C. (ed.) (2005), Darwinism and Philosophy. Notre Dame (Indiana), University of Notre Dame Press.
- PRESCOTT, V. et al. (2005): Transgenic expression of bean α -amylase inhibitor in peas results in altered structure and immunogenicity. Journal of agricultural and food chemistry, 53, p. 9023-9030.
- RICHTER, R., WALDBURGER, B., KNIPFENGA, H., WIRZ, J.: Qualitative Untersuchungen an transgenen Pflanzen mit ganzheitlichen Methoden im Hinblick auf Risikoabschätzung und Umweltschutz. Abschlussbericht über die Versuchsjahre 2000 – 2004 (2005), p. 24-96 Erhältlich im Forschungsinstitut am Goetheanum.
- STEINER, R. (1886): Grundlinien einer Erkenntnistheorie der Goetheschen Weltanschauung. Dornach (1999), GA 2.
- WILSON, A., LATHAM, J., STEINBRECHER, R (2004): Genome Scrambling – Myth or Reality? Technical Report Okt. 2004, EcoNexus, Brighton, UK.
- WIRZ, J. (2000): Typusidee & Genetik. In: Heusser, P. (ed.) Goethes Beitrag zur Erneuerung der Naturwissenschaften. Bern, Stuttgart, Wien.

den – eine Zurücknahme des Höhenwachstums. Die flächig ausgebreiteten Blätter ragen im Vergleich mit den anderen Varianten waagrecht vom Stängel in den Raum und die Pflanzen bleiben durch kürzere Internodien kompakter.

Die Variante mit hoher Expression (Abb. 2 und 4 Mitte) zeichnet sich dadurch aus, dass Merkmale unter neuen Bedingungen variieren. Diese Pflanzen blieben in der Extremsituation 2002 relativ niedrig und vereinigten in den Nachbaujahren zwei widersprüchliche und der Kontrollvariante entgegengesetzte Tendenzen: gehemmt Jugendwachstum mit stark gegliederten Blättern (Betonung der Differenzierung) und später starkes Blatt und Stängelwachstum (Betonung des Vegetativen). Im Nachbau stabil sind bei der Variante Silenced (Abb.2 und 4 unten) kräftige Jugendentwicklung, die nach dem Einsetzen des Blühimpulses abrupt abbricht und mit verstärktem Stängel- und verminderten Blattwachstum in eine nach oben spitz zulaufende Wuchsform übergeht. Diese Variante legte unter allen Kulturbedingungen am meisten Blüten an, vermochte die Früchte jedoch kaum zur Reife zu bringen.

Wir danken Prof. Michel Haring und Konrad Urech (Institut Hiscia, Arlesheim, CH) für die sachliche und fachliche Unterstützung, Louise Lemche und Rahel Flury für ihre tatkräftige Mithilfe bei der Pflege der Pflanzen und der Auswertung, und der Software- AG-Stiftung, Sampo, der Freien Gemeinschaftsbank Basel, der Anthroposophischen Gesellschaft Deutschland und dem Arbeitskreis für Ernährungsforschung für ihr finanzielles Engagement im Projekt.

Auffällig waren die nach unten gebogenen Blätter und die verdrehten Triebspitzen.

Fazit

Nicht beabsichtigte Effekte der gentechnischen Transformation manifestieren sich in Tomaten über mehrere Jahre in Veränderungen von Entwicklungsdynamik und Blattarchitektur. Ebenso wie auf die Manipulation von Umgebungsfaktoren reagierten die Pflanzen integral auf den Eingriff in die Erbsubstanz. Dies bestätigt die aus dem Goetheschen Organismusverständnis abgeleitete Auffassung, dass die genetische Ausstattung einer Pflanze zu den äusseren Bedingungen gehört, die lediglich modifizierenden Charakter haben. Es weist zudem auf (unvorhergesehene) Veränderungen von physiologischen Prozessen und Inhaltstoffspektrum infolge des Gentransfers hin und steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen der Analyse von Sekundärmetaboliten-spektren (GRIFFIN 2003, Le Gall et al. 2003; PRESCOTT et al. 2005).

Spross, Blatt-, Blüten- und Fruchtanlagen werden bei der Tomate nach der Entwicklung eines vegetativen Unterbaus gleichzeitig gebildet. Die Kontrollen hoben sich von den gentechnisch veränderten Varianten dadurch ab, dass sich die Anlage neuer „Sprossgenerationen“ zugunsten der Ausreifung von früher angelegten Früchten verlangsamt. Insofern brachten sie eine stärkere Kohärenz im Ineinandergreifen von Reife- und Wachstumsprozessen zum Ausdruck. Die gentechnisch



veränderten Pflanzen reagierten unterschiedlich auf verschiedene Umgebungsbedingungen. Sie zeigten aber durchwegs eine Verzögerung in Jugendwachstum und Beginn der Fruchtreife und reagierten auf eine Verringerung des Nährstoffangebotes im Verlauf der Topfkultur mit einer Betonung des Stängelwachstums und zum Teil mit einer Zurücknahme des Blatt- und Fruchtwachstums.

Entwicklungsdynamik und Morphologie weisen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Kristallisation von Blatt- und Fruchtextrakten auf eine Abnahme der Kohärenz zwischen aufbauenden und differenzierenden Prozessen hin. ■

Abb.4: Je zwei Pflanzen der Varianten GCR 161 (Kontrolle), HE und Sil im 2. Nachbau 2005, alle 2 Wochen fotografiert. Es zeigt sich die gleiche Entwicklungsdynamik wie 2002 (Abb.2), diesmal mit verbessertem Nährstoffangebot: Die Kontrollpflanzen (oben) wachsen im Jugendstadium kräftiger als die transgenen Linien; im Juni bleiben sie in der Höhe zurück und zeigen eine kompakte Wuchsform bei waagrecht Blattstellung. Die Sil-Pflanzen (unten) bilden ab Anfang Juni längere Internodien und schieszen in die Höhe, es werden viele Sprossgenerationen angelegt, aber nicht voll ausgebildet. Im frühen Jugendstadium am schwächsten sind die HE-Pflanzen (Mitte).