

Die Abwehr von Fressfeinden: Selbstverteidigung im Pflanzenreich

Andreas Schaller, Zürich

Zusammenfassung

Das Antlitz der Erde ist durch Pflanzen geprägt, ungeachtet der herbivoren Ernährungsweise der Hälfte aller Insektenarten. Die Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegenüber herbivoren Insekten ist einer Fülle von Faktoren zu verdanken, die sich in Jahrtausenden wechselseitiger Anpassungen entwickelt haben. Anatomische Merkmale der Pflanzen stellen strukturelle Barrieren dar, die den Insekten den Zugang erschweren. Toxische Inhaltsstoffe tragen ebenso zur Resistenz bei wie die natürlichen Feinde der Schädlinge. Viele Resistenzfaktoren werden erst durch Insektenbefall induziert, wie zum Beispiel die Wundabwehrreaktion in Solanaceen, die das experimentell am besten untersuchte System darstellt. Nach Verwundung durch Insektenfrass kommt es hier zur Bildung von Systemin, einem Botenstoff, der eine systemische Resistenz auslöst. Die Abwehrreaktion manifestiert sich in einer dramatischen Änderung der Genexpression. In deren Folge kommt es zur Akkumulation von Abwehr-Proteinen in den Blättern der Pflanze. Mit dem Verzehr der Blätter werden diese Proteine aufgenommen und beeinträchtigen dann Wachstum und Entwicklung des Insekts. Diese Arbeit versucht einen Überblick über die Vielfalt und die faszinierende Komplexität der Resistenzbestimmenden Faktoren in Pflanzen zu vermitteln.

Herbivore resistance: Self-defense in the plant kingdom

Plants are the most prevalent organisms on this planet, despite the abundance of insect species, half of which feed on living plant tissue. Plant resistance is due to a multitude of characteristics that evolved in millions of years of reciprocal adaptation. Plant anatomical features constitute structural barriers that prevent access of the predator. Toxic secondary compounds contribute to resistance as do the natural enemies of insect herbivores. Many determinants of resistance are induced only after insect attack. The wound response in Solanaceae is the one system that has been investigated in more detail. Wounding by insect herbivores results in the release of systemin, a signal molecule that induces systemic resistance of the plant. Hallmark of the wound response is a dramatic change in gene expression resulting in the accumulation of defense proteins in the plant leaves. Upon consumption of the leaves these proteins are taken up by the insect and, as a consequence, insect growth and development is retarded. In this article, a synopsis is attempted of the diversity and fascinating complexity of the factors contributing to plant resistance against herbivores.

Key words: Herbivore Insekten – Koevolution – Microarray Analyse – Resistenz – Signaltransduktion – Systemin – Verwundung

1 EINLEITUNG

Die schädigende Wirkung des Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata*) ist allgemein bekannt. Sowohl die Larve und auch das adulte Insekt sind Herbivoren. Als Herbivore bezeichnet man Tiere, die sich von lebendem Pflanzenmaterial

ernähren, in diesem Fall sind es die Blätter der Kartoffelpflanze. Der Kartoffelkäfer ist damit – zumindest aus der Sicht des Landwirts – ein Fressfeind der Pflanze, und er wird stellvertretend für alle herbivoren Insekten im Laufe dieses Beitrages immer wieder auftauchen. Die Pflanze auf der anderen Seite ist ihrem Fressfeind durchaus nicht hilflos ausge-

liefert. Sie verfügt über eine Reihe verschiedener Möglichkeiten den Fressfeind abzuwehren und diese werden Thema dieses Artikels sein. Es sollen die Abwehrstrategien der Pflanzen gegen herbivore Insekten vorgestellt und die entscheidenden Faktoren, welche zur Resistenz der Pflanze beitragen, gezeigt werden. Im Weiteren wird an Hand eines ausgewählten Beispiels erläutert, welche biochemischen und molekularen Vorgänge den pflanzlichen Abwehrreaktionen zu Grunde liegen und wie solche Prozesse experimentell untersucht werden können.

Pflanzen und Insekten sind durchaus nicht immer Gegenspieler im Kampf ums Dasein. Im Gegenteil, sie sind in vielfältiger Weise wechselseitig voneinander abhängig. Wenn wir pflanzliche Resistenzmechanismen verstehen wollen, dann können wir diese Wechselbeziehungen nicht ausser Acht lassen. Es ist daher erforderlich, einen kurzen Blick auf die Entwicklungsgeschichte von Pflanzen und Insekten zu werfen, bevor auf die Abwehrstrategien der Pflanzen eingegangen werden kann.

2 WECHSELSEITIGE ANPASSUNGEN VON PFLANZEN UND INSEKTEN – KOEVOLUTION

Vor 135 Millionen Jahren, zu Anfang der Kreidezeit, war die Ära der Baumfarne, der Schachtelhalme und Bärlappe, die zuvor in gewaltigen Wäldern den Planeten bedeckten, schon lange vorbei. Es dominierten zu diesem Zeitpunkt die nacktsamigen Pflanzen (Gymnospermen), wie Nadelbäume und Gingko. Jetzt aber traten die ersten bedecktsamigen Blütenpflanzen (Angiospermen) auf, und die hatten auf der Weltbühne einen ungeheuren Erfolg: 70 Millionen Jahre später, gegen Ende der Kreidezeit, waren sie bereits absolut vorherrschend (und sind es noch immer). Wir kennen heute etwa 300 000 Pflanzenarten, und 250 000 davon sind Angiospermen. Die Blütenpflanzen sind ausgesprochen vielfältig und besiedeln alle erdenklichen Lebensräume. Ihrerseits bieten sie den Insekten Lebensraum und Nahrung. Mit der sich entwickelnden Vielfalt der Blütenpflanzen eröffneten sich den Insekten also eine Unzahl von neuen Nischen, und die Besiedlung dieser ökologischen Nischen beschleunigte die

Evolution der Insekten. Es ist offensichtlich, dass die entstehende Vielfalt der Insekten nicht ohne Einfluss auf die Pflanzenwelt bleiben konnte. Die meisten Blütenpflanzen werden durch Insekten bestäubt; sie sind zur gezielten Übertragung des Pollens auf die Insekten angewiesen. In Anpassung an die unterschiedlichen Formen und Ernährungsweisen der Insekten haben sich die unterschiedlichsten Blütenformen herausgebildet, was zu starker gegenseitiger Abhängigkeit der jeweiligen Pflanze und der bestäubenden Insektenarten geführt hat. Am augenfälligsten sind diese wechselseitigen Anpassungen in der Familie der Orchideen, der jüngsten, mit 26 000 Arten aber artenreichsten Familie höherer Pflanzen. Viele Orchideen, insbesondere die des Genus *Ophrys*, werden von nur einem Insekt, einer einzelnen Bienen- oder Wespenart bestäubt. Die Blüte ähnelt rein äusserlich dem Weibchen der jeweiligen Art. Das entsprechende Männchen wird aber nicht nur durch das Aussehen der Blüte angelockt. In vielen Fällen produziert die Pflanze auch Duftstoffe, die dem Sexuallockstoff der Bienenweibchen ähneln. Durch diese optische und chemische Mimikry¹ angezogen, bestäuben die Männchen die Blüte in einem als Pseudokopulation bezeichneten Vorgang. In Folge derartiger wechselseitiger Anpassungen, einem Prozess, den man auch als Koevolution bezeichnet, kam es zur heutigen Artenvielfalt der Insekten und Blütenpflanzen. Innerhalb der Insekten ist etwa die Hälfte aller Arten herbivor, ernährt sich also von Pflanzen. Es ist leicht vorstellbar, dass die Beziehungen zwischen den herbivoren Insekten und ihren Wirtspflanzen zu ähnlichen wechselseitigen Anpassungen geführt haben, wie gerade für die Blütenentwicklung beschrieben (eine umfassende Diskussion wechselseitiger Anpassungen zwischen Pflanzen und Insekten findet sich bei BENZ, 1998).

3 RESISTENZMECHANISMEN DER PFLANZEN

Der Kartoffelkäfer, wie es der Name bereits verrät, ist ein Schädling auf Kartoffelpflanzen; er akzeptiert aber auch Tomate, Aubergine und einige andere Vertreter der Nachtschattengewächse, der Solanaceen. Der Kartoffelkäfer frisst also einige wenige ausgewählte Pflanzenarten und man bezeichnet ihn deshalb als oligophag², was auf die Mehrzahl der

¹ Als Mimikry bezeichnet man im engeren Sinn die Nachahmung von Körpergestalt, Färbung, Geruch oder Verhalten eines Tieres, das auf Grund seiner Wehrfähigkeit oder seines schlechten Geschmacks vor Feinden geschützt ist. Mimikry dient also der Abschreckung von Fressfeinden. Viele Schwebfliegen (*Syrphidae*) ahmen so Wespen oder Bienen nach. Der Begriff wird hier in einem erweiterten Sinn gebraucht; die optische und chemische Mimikry der Orchideen ist nicht abschreckend, sondern attraktiv für die bestäubenden Insekten. In Abgrenzung dazu bezeichnet man eine Nachahmungstracht, die der Tarnung dient, als Mimese. So ähneln die Körper vieler Insekten Zweigen, Blättern oder Vogelkot und sind daher nur schwer von ihren Fressfeinden auszumachen.

² Insekten, die sich als ausgesprochene Spezialisten von nur einer Pflanzenart ernähren, werden als monophag, solche, die wenige verwandte Arten fressen, als oligophag bezeichnet. Generalisten, die ein breites Spektrum von Wirtspflanzen unterschiedlicher Pflanzenfamilien akzeptieren, nennt man polyphag.

herbivoren Insekten zutrifft. Das lässt vermuten, dass er in spezieller Weise an Solanaceen angepasst ist. Andere Pflanzen dagegen scheinen ihm gegenüber resistent zu sein. Aber auch innerhalb der Solanaceen gibt es Unterschiede: Warum sind einige Arten empfindlicher als andere? Warum sind andererseits Kartoffelpflanzen widerstandsfähig gegenüber den meisten anderen Frassschädlingen? Es soll hier nach den Resistenzmechanismen gefragt werden, die sich bei Pflanzen in Anpassung an herbivore Insekten ausgebildet haben, und diese Resistenzmechanismen sind es, die uns nun beschäftigen sollen.

Solche Resistenzmechanismen verstehen zu wollen, ist nicht nur ein esoterisches, sondern ein durchaus wirtschaftliches und gesellschaftliches Interesse. Jedes Jahr gehen ungeachtet des Einsatzes von chemischen Schädlings- und Unkrautvertilgungsmitteln weltweit grosse Teile der Ernte verloren (etwa 35 %), und zwar zu annähernd gleichen Teilen durch Pflanzenkrankheiten (12 %), durch Unkräuter (10 %), aber auch durch Insektenfrass (13 %; PIMENTEL, 1991). Durch ein Verständnis der natürlichen Resistenz- und Abwehrmechanismen hoffen wir in die Lage zu kommen, die durch Fressfeinde verursachten Verluste vermeiden und dabei gleichzeitig auf den Einsatz von Pestiziden verzichten zu können.

Bevor näher auf die Resistenzmechanismen der Pflanzen eingegangen wird, sollen die Möglichkeiten erwogen werden, die der Landwirtschaft in der Bekämpfung der Schädlinge zur Verfügung stehen. Da sind zum ersten rein mechanische Mittel. Man kann zum Beispiel – als vorbeugende Massnahme – ein Netz spannen, um die Vögel von den Kirschen fernzuhalten. Oder – als Reaktion auf den Befall – kann man den Kartoffelkäfer und seine Larven einsammeln. Das ist vielleicht mühsam und wenig effizient, war aber die beste Methode vor der Entwicklung von chemischen Mitteln, also Pestiziden. Sowohl mechanische als auch chemische Mittel richten sich zumeist direkt gegen den Schädling. Darüber hinaus ist aber auch eine indirekte, biologische Schädlingsbekämpfung denkbar, und damit ist die Bekämpfung durch die natürlichen Feinde der Schädlinge gemeint, wie zum Beispiel der Einsatz von Marienkäfern gegen die Blattläuse auf den Rosen unserer Gärten.

Die Resistenzmechanismen der Pflanze fallen in genau dieselben Kategorien (Abb. 1). Sie können mechanischer, chemischer oder biologischer Natur sein; sie können in vorbeugender Weise ständig ausgeprägt – also *konstitutiv* – sein,

Klassifizierung der Resistenzfaktoren
gegen herbivore Insekten

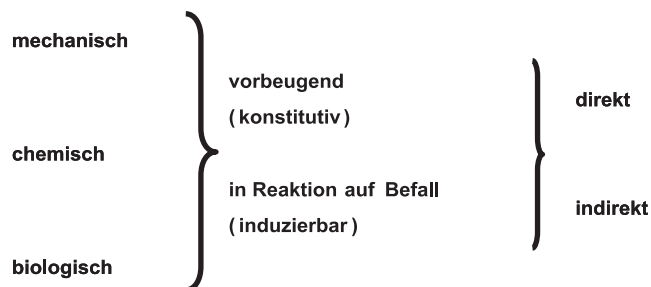


Abb. 1. Die Faktoren, die zur Resistenz gegen herbivore Insekten beitragen, können klassifiziert werden als mechanisch (strukturelle Barrieren), chemisch (sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe) oder biologisch (andere Organismen miteinbeziehend). Sie können in vorbeugender Weise immer (konstitutiv) ausgeprägt sein oder in Reaktion auf Schädlingsbefall induziert werden. Sie können sich direkt gegen den Schädling wenden oder indirekt dessen Feinde einbeziehen.

Fig. 1. Mechanical (structural barriers), chemical (secondary plant compounds) or biological (involving other organisms) factors contribute to herbivore resistance. These factors can be either constitutively present, or induced after pest attack. They either aim directly at the predator, or in an indirect fashion, involve the natural enemies of the predator.

oder sie können durch den Befall mit dem Schädling ausgelöst – also *induziert* – werden. Sie können sich direkt gegen den Schädling wenden, oder sie können die natürlichen Feinde der Schädlinge mit einbeziehen und dann indirekt wirken. Dies soll im Folgenden an Hand einiger Beispiele veranschaulicht werden.

3.1 Mechanische Resistenzfaktoren

Mechanische Resistenzfaktoren sind Barrieren, die dem Schädling den Zugang erschweren und die damit die Resistenz der Pflanze erhöhen. Verholzte oder verkieselte Zellwände stellen solche Barrieren dar. Eine andere Form der mechanischen Abwehr dürfte allgemein bekannt sein: Wer hat sich noch nicht an den Dornen eines Kaktus oder den Stacheln einer Rose verletzt? Dornen und Stacheln sind sehr wirksam in der Abwehr von Fressfeinden. Nicht immer aber sind die mechanischen Barrieren so auffällig: Wenn sie gegen kleine Insekten gerichtet sind, dann sind auch viel kleinere Strukturen schon wirksam. Auf der Blattoberfläche finden sich zumeist Haare (Trichome)³, die unter anderem der Insektenabwehr dienen. In Haaren sind oft mechanische und chemische Mechanismen vereinigt, wie zum Beispiel im

³ Haare oder Trichome sind Anhangsgebilde der Epidermis. Man unterscheidet einzellige und mehrzellige Trichome, die Schutz- oder Stützfunktion haben können. Drüsenhaare sekretieren sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die oft dem Schutz vor Fressfeinden dienen. Haare können auch einen Schutz vor Austrocknung darstellen. In diesem Fall sind die Zellen abgestorben und das Haar erscheint weiss.

Brennhaar der Brennnessel (*Urtica dioica*). Bei Berührung bricht die Spitze des Haars ab, und der verbleibende Schaft ist eine regelrechte Injektionskanüle, durch die dem Schädling irritierende Substanzen – unter anderem Histamin, Acetylcholin und Ameisensäure – gespritzt werden. Erstaunlicherweise stellen Brennhaare nicht nur einen konstitutiven, sondern auch einen induzierbaren Resistenzfaktor dar: Wenn Brennnesseln verwundet werden, auf einer beweideten Wiese etwa, dann wird die Dichte der Brennhaare auf allen sich neu entwickelnden Blättern grösser sein als auf den Blättern, die vor der Verwundung entwickelt wurden (PULLIN und GILBERT, 1989).

3.2 Chemische Resistenzfaktoren

Das Verhalten von Insekten wird in vielfältiger Weise von chemischen Substanzen der Pflanze reguliert. Die Chemie der Pflanze beeinflusst in entscheidender Weise die Auswahl der Wirtspflanze, die Eiablage und das Fressverhalten der Insekten.

Welcher Art sind diese Substanzen? Jede lebende Zelle, sei das nun eine Pflanzenzelle oder eine tierische Zelle, verfügt über einen Stoffwechsel, den Primärstoffwechsel, der für das Funktionieren der Zelle essenziell ist. Darüber hinaus gibt es den so genannten Sekundärstoffwechsel. Die Substanzen des Sekundärstoffwechsels sind für das Leben der einzelnen Zelle nicht notwendig. Ihre Funktion wird erst im Zusammenspiel der Zellen oder in der Interaktion des Organismus mit seiner Umgebung deutlich. Am Beispiel der Blütenfarbstoffe lässt sich die Funktion sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe gut illustrieren. Die Farbstoffe sind nicht notwendig für das Überleben der Zellen, die sie produzieren. Sie locken aber die blütenbestäubenden Insekten an und in diesem Zusammenhang wird ihre Funktion deutlich: Sie sind wichtig für die Fortpflanzung des Organismus. Es sind bis heute mehr als 100 000 sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe identifiziert worden, und viele davon tragen zur Resistenz gegen Frassschädlinge bei.

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe können abschreckend wirken, dann wird das Insekt die Pflanze von vornherein vermeiden. Es können Bitterstoffe sein, Geschmacksverderber sozusagen, oder die Substanzen können regelrecht toxisch wirken. Viele dieser Substanzen sind allgemein bekannt, denn ihre toxische Wirkung macht sich der Mensch auch zu Nutze. Hier sind vor allem die *Alkaloide* zu nennen, wie zum Beispiel das Nikotin des Tabaks, das Morphin des Schlafmohns, Strychnin oder Chinin. Die *Terpenoide* stellen eine

weitere grosse Klasse sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe. Hierzu gehören beispielsweise Menthol der Minze, Gossipol in der Baumwolle und herzwirksame Glucoside wie das Digitoxinin des Fingerhuts. Andere wiederum leiten sich von den *Phenolen* ab, wie Tannine oder Cumarin.

Mit der Produktion von Giften stellt die Pflanze sich selbst aber vor ein Problem, denn oftmals sind diese Substanzen nicht nur toxisch für die Insekten, sondern auch schädlich für die Pflanze selbst. Die Pflanze muss also Strategien entwickelt haben, sich vor ihrem eigenen Gift zu schützen⁴. Eine solche Strategie soll am Beispiel des Cumarins erläutert werden. Das Cumarin dient als Frassschutz beim Steinklee (*Melilotus albus*) und beim Waldmeister (*Galium odoratum*). Um sich nicht selbst der toxischen Wirkung auszusetzen, wird zunächst nicht das Cumarin selbst, sondern eine ungiftige Vorstufe gebildet, nämlich das Cumarsäure-Glucosid, das in der Vakuole gelagert wird (Abb. 2). Zur Bildung des Cu-

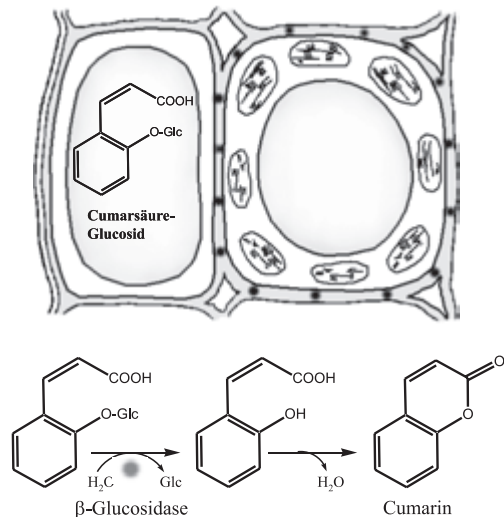


Abb. 2. Cumarin als chemischer Resistenzfaktor. Die Bildung des Cumarins aus seiner inaktiven Vorstufe, dem Cumarsäure-Glucosid, erfordert die enzymatische Aktivität einer β -Glucosidase. Die Vorstufe (in der Vakuole) und die β -Glucosidase (in der Zellwand) werden konstitutiv gebildet, aber räumlich getrennt voneinander gelagert. Erst bei Verwundung kommen Vorstufe und Enzym zusammen, und das Cumarin wird freigesetzt (nach MATILE, 1984).

Fig. 2. Coumarin as chemical factor of resistance. The formation of coumarin from glucosylcoumaric acid requires the activity of a β -glucosidase. Both the precursor and the β -glucosidase are formed constitutively, but stored in different compartments (the vacuole and the cell wall, respectively). Upon wounding, the enzyme acts upon the precursor resulting in the formation of coumarin (redrawn from MATILE, 1984).

⁴ Eine derart teleologische Beschreibung von Resistenzfaktoren wird hier, wie auch im weiteren Verlauf dieser Arbeit, nur um der besseren Anschaulichkeit willen gewählt. Selbstverständlich ist sich die Pflanze des Problems toxischer Inhaltsstoffe nicht bewusst, und die Anpassungen, die eine Akkumulation solcher Substanzen erlauben, sind nicht das Resultat einer bewussten Entscheidung.

marins ist ein Enzym, eine Glucosidase, erforderlich. Dieses Enzym wird aber räumlich getrennt von der Vorstufe gebildet. Wird die Pflanze nun verwundet, dann bricht die Vakuole auf, und die Vorstufe kommt in Kontakt mit der Glucosidase:

Es kommt zur Hydrolyse der glycosidischen Bindung, die Cumarsäure wird freigesetzt und reagiert spontan weiter zum Cumarin. In ganz ähnlicher Weise dient das Dhurrin als Frassschutz bei Hirse (*Sorghum bicolor*). Dhurrin ist ein cyanogenes Glukosid und selbst nicht toxisch. Nach Verwundung aber wird Blausäure freigesetzt, die als Frassschutz nicht nur gegen Insekten, sondern auch gegen Schnecken und Säugetiere dient (MATILE, 1984).

3.3 Biologische Resistenzfaktoren

Als biologische Resistenzfaktoren werden hier solche Abwehrstrategien bezeichnet, die die natürlichen Feinde der Frassschädlinge mit einbeziehen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Symbiose (griech.: symbiosis = Zusammenleben) zwischen Baumakazien in Zentralamerika bzw. Afrika und Ameisen (JANZEN, 1966). Diese Baumakazien (z. B. *Acacia cornigera* in Zentralamerika) tragen sehr grosse hohle Dornen, so genannte Domatien, die den Ameisen Lebensraum und Schutz bieten. Die Ameisenarten solcher Symbiosen (in diesem Fall die Art *Pseudomyrmex ferruginea*) sind ungewöhnlich aggressiv. Sie greifen alle herbivoren Insekten an, die den Baum befallen könnten. Der Baum profitiert also von der Anwesenheit der Ameisen. Die Ameisen ihrerseits profitieren von einem zuckerreichen Nektar, den die Pflanze ihnen in extrafloralen Nektarien zur Verfügung stellt. Dieses Arrangement scheint für beide Partner von grossem mutualistischem Vorteil zu sein, denn solche Abhängigkeiten haben sich im Laufe der Evolution unabhängig voneinander mehrfach entwickelt (KLÖTZLI, 1993).

Auch in unseren Breiten finden sich Beispiele solch komplexer Interaktionen, wie etwa die Abwehrreaktionen von Kohlpflanzen (*Brassica oleracea*) gegen den Kohlweissling (*Pieris brassicae*). Die Larve des Kohlweisslings ist ein ausgesprochener Spezialist. Sie ernährt sich von Kohl und ist ganz speziell an diese Nahrungsquelle angepasst. Sie hat sozusagen gelernt, mit den chemischen Abwehrsubstanzen des Kohls (so genannten Glucosinolaten) umzugehen, und deswegen greift dieser Resistenzfaktor nicht mehr. Die Pflanze ist also auf Hilfe angewiesen, und die findet sie in einer Wespe (*Cotesia glomerata*). Diese Wespe ist ein Parasitoid; sie legt ihre Eier in die Raupe des Kohlweisslings, die dann den Wespenlarven als Wirt dient. Der Kohl rekrutiert *Cotesia glomerata*, indem er als Reaktion auf Verwundung durch den Frassschädling flüchtige Substanzen synthetisiert

und emittiert, Duftstoffe also, die man als einen chemischen Hilferuf auffassen kann. Die Duftstoffe werden von der Wespe erkannt und signalisieren die Gegenwart der herbivoren Larve. Die Wespe wird angelockt, parasitiert die Larve und bekämpft so den Kohlschädling (MATTIACCI et al., 1994).

4 INDUZIERTER RESISTENZ – DIE WUNDREAKTION IN SOLANACEEN

Im Arsenal der Möglichkeiten liegen somit mechanische, chemische und biologische Resistenzfaktoren. Diese können konstitutiv exprimiert oder durch Befall induziert werden, sie können sich direkt gegen den Schädling wenden oder auch deren Feinde miteinbeziehen (Abb. 1). Im Folgenden soll etwas genauer auf die biochemischen und molekularen Vorgänge eingegangen werden, die diesen Resistenzmechanismen zu Grunde liegen. Dabei ist von besonderem Interesse, wie es denn eigentlich der Pflanze möglich ist zu reagieren, d. h. also erst nach Befall durch einen Frassschädling neue Resistenzfaktoren auszuprägen. Dabei soll nur ein System exemplarisch vorgestellt werden: nämlich die Wundabwehr-Reaktion bei Solanaceen, speziell bei Tomatenpflanzen. Dieses System ist über viele Jahre intensiv untersucht worden und steht daher modellhaft für ähnliche Resistenzmechanismen (RYAN, 2000). Bei dieser Reaktion handelt es sich um einen chemischen Abwehrmechanismus, der durch Befall induziert wird und der sich direkt gegen den Frassschädling richtet.

Vor dreissig Jahren beobachteten Green und Ryan (GREEN und RYAN, 1972), dass Tomatenpflanzen nach Befall mit adulten Kartoffelkäfern oder deren Larven, bzw. nach mechanischer Verwundung einen Proteinase-Inhibitor (PI) synthetisieren und in den Blättern akkumulieren. Bei diesem Proteinase-Inhibitor handelt es sich um ein kleines Protein, das in der Lage ist, die Verdauungsenzyme Trypsin und Chymotrypsin zu inaktivieren. Der Proteinase-Inhibitor gelangt beim Verzehr der Blätter in den Verdauungstrakt des Insekts, die Verdauungsenzyme werden gehemmt, und in der Folge kommt es beim Insekt zu Mangelerscheinungen, durch die sich Wachstum und Entwicklung verzögern. Die Autoren vermuteten, dass es sich bei dieser Reaktion um einen induzierbaren Abwehrmechanismus handelt, der die Resistenz gegenüber Insekten erhöht. Weiterführende Arbeiten haben gezeigt, dass neben diesem Proteinase-Inhibitor noch eine ganze Reihe weiterer Abwehr-Proteine (so genannte «systemic wound response proteins», SWRPs) gebildet werden, die gemeinsam zur induzierten Resistenz beitragen (BERGEY et al., 1996; SCHALLER et al., 1995).

4.1 Signaltransduktion in der Wundreaktion

Wie kommt es zur Akkumulation der Abwehrproteine (SWRPs)? Zwar ist die Pflanze nach Verwundung immer noch dieselbe; sie ist genetisch unverändert. Ihr physiologischer Zustand aber, charakterisiert durch die Akkumulation der SWRPs, ist ein anderer. Die Synthese der Abwehrproteine ist Ausdruck einer Veränderung in der Genexpression: Die Gene der SWRPs sind aktiviert worden. Es kommt zu einer verstärkten Transkription der Gene; das führt zu einer Anhäufung der entsprechenden Messenger-RNAs (mRNAs), und die werden im Prozess der Translation in die SWRPs übersetzt⁵, die sich daraufhin anhäufen. Interessanterweise sind all diese Prozesse nicht auf verwundete Pflanzenteile beschränkt. Die Expression der SWRPs wird in gleicher Masse in verwundenen wie in unverwundenen Blättern induziert. Green und Ryan postulierten daher die Existenz eines mobilen Faktors, der am Ort der Verwundung gebildet wird, der daraufhin im Spross der Pflanze verteilt wird und der in der Lage ist, die Expression der Abwehrgene auch in unverwundenen Pflanzenteilen auszulösen (GREEN und RYAN, 1972; Abb. 3).

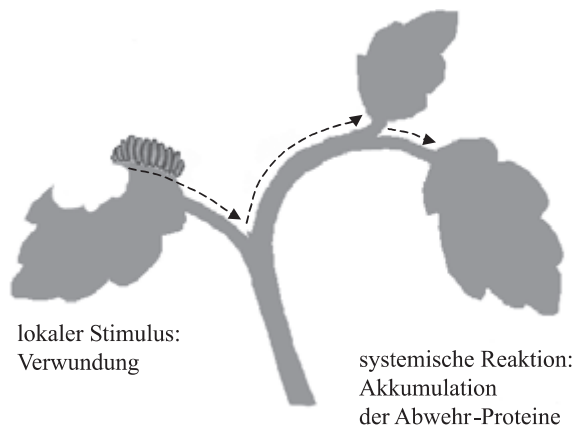


Abb. 3. Schematische Darstellung der Wundreaktion in Solanaceen. In Folge von Insektenfrass oder mechanischer Verwundung kommt es zur Ausschüttung eines Botenstoffes, der sich in der Pflanze verteilt und in lokalen wie in systemischen Geweben die Abwehrreaktion auslöst.

Fig. 3. Schematic representation of the wound response in Solanaceae. As a result of insect attack or mechanical wounding, a signal molecule is released at the wound site and translocated throughout the plant. It induced the defense response locally as well as in systemic, undamaged tissues.

⁵ Der Zusammenhang zwischen DNA, RNA und Protein wird durch das so genannte «zentrale Dogma der Molekularbiologie» beschrieben. Danach ist die genetische Information in der Basenabfolge der DNA-Sequenz enthalten und in einem Code verschlüsselt, nach dem drei aufeinander folgende Basen jeweils eine Aminosäure codieren. Diese Information dient, vermittelt durch die mRNA, als Vorlage zur Synthese des entsprechenden Proteins. Der Informationsfluss verläuft demnach immer von Nukleinsäure (DNA, mRNA) zum Protein, nie umgekehrt.

⁶ Peptide bestehen wie Proteine aus Aminosäuren, die über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Je nach Anzahl der Aminosäuren (Länge der Kette) unterscheidet man Di-, Tri-, Tetra-, Oligo- oder Polypeptide.

Nach diesem zunächst hypothetischen Faktor ist viele Jahre lang intensiv gesucht worden. Die Arbeiten gipfelten 1991 in der Entdeckung von Systemin (PEARCE et al., 1991). Systemin ist ein Oligopeptid⁶, bestehend aus 18 Aminosäuren, und es ist damit das erste Peptid mit hormonähnlicher Wirkung, das jemals in Pflanzen gefunden wurde. Im folgenden Jahr wurde in der gleichen Arbeitsgruppe auch das Gen für Systemin charakterisiert. Es stellte sich heraus, dass dieses Gen für ein grösseres Vorläuferprotein codiert, das als Prosystemin bezeichnet wurde. Prosystemin besteht aus einer Kette von 200 Aminosäuren, und die 18 Aminosäuren der Systeminsequenz finden sich eingebettet nahe am carboxy-terminalen Ende des Vorläufers (Abb. 4).

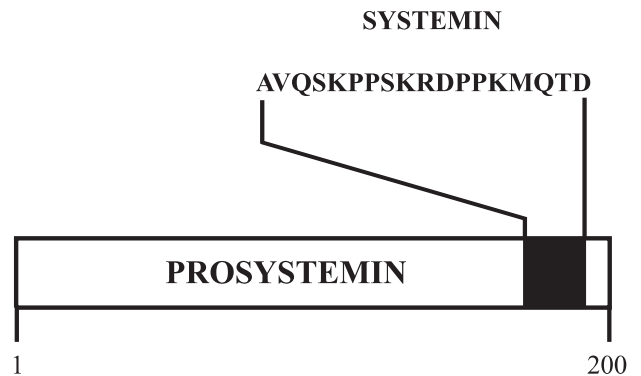


Abb. 4. Schematische Darstellung von Systemin und Prosystemin. Das Prosystemin Polypeptid von 200 Aminosäuren Länge stellt eine Vorstufe von Systemin dar. Die 18 Aminosäuren der Systeminsequenz finden sich eingebettet, nahe des Carboxy-Terminus der Vorstufe.

Fig. 4. Schematic representation of Systemin and Prosystemin. The 200 amino acid polypeptide prosystemin is a precursor of systemin. The 18 amino acids of the systemin sequence are located close to the carboxy terminus of the precursor.

4.2 Systemin ist hinreichend und notwendig für die Auslösung der Wundantwort

Es ist heute unumstritten, dass Systemin bzw. Prosystemin eine zentrale Rolle in der Vermittlung der Wundantwort spielt. Dieses Wissen beruht auf Experimenten, die zeigen, dass (Pro)Systemin sowohl hinreichend als auch notwendig zur Ausprägung der Wundantwort ist. Aus einer Vielzahl von Experimenten, die dies belegen, sollen exemplarisch nur zwei herausgegriffen werden. Falls also Systemin ausreichen

sollte, die Wundantwort auszulösen, dann sollte man erwarten, dass das synthetisch hergestellte Peptid dieselben Genexpressionsänderungen induziert wie die Verwundung selbst. Um diese Hypothese zu testen, erfordert es einen experimentellen Ansatz, der es erlaubt, die Genexpression in unverwundeten Tomatenpflanzen mit der in Systemin-behandelten Pflanzen zu vergleichen. Dazu eignet sich die so genannte Mikroarray-Analyse, mit der die relative Konzentration bestimmter mRNAs in zwei RNA-Extrakten bestimmt werden kann (Abb. 5). In diesem Experiment wird zunächst einmal die mRNA der zwei Tomatenpflanzen (unbehandelte Kontrollpflanze, Systemin-behandelte Pflanze) isoliert. Dann wird die gesamte mRNA-Population in komplementäre DNAs, in cDNAs, umgeschrieben. Diesen Vorgang bezeichnet man als reverse Transkription, und in diesem Prozess werden alle cDNA-Moleküle mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert: rot für die behandelten Pflanzen, grün für die Kontrolle. Anschließend werden beide Proben gemischt. Was heisst das nun für die Mischfarbe? Wenn ein bestimmtes Gen durch Verwundung induziert wird, dann wird die entsprechende mRNA akkumulieren, und in der Mischung wird die rote Farbe dominieren. Sollte anderenfalls die Expression eines Gens unterdrückt werden, wird die Konzentration des entsprechenden Transkriptes entsprechend vermindert sein, und demzufolge ist die Mischung vorwiegend grün. Falls sich die Expression eines Gens nicht verändert, dann liegen die mRNAs in einem Verhältnis von 1:1 vor. Anschließend gibt man die farbmarkierte Mischung von cDNAs auf ein Mikroarray, das in einer gerasterten Anordnung eine beliebige Anzahl von DNA-Fragmenten umfasst. Jeder Punkt des Rasters enthält DNA eines bestimmten, uns bekannten Gens der Tomate. Die markierten cDNAs werden jetzt in einem als Hybridisierung bezeichneten Prozess an die DNA des korrespondierenden Gens binden. Anschließend bestimmt man für jedes Gen (jeden Punkt im Raster) den roten und grünen Farbanteil und kann so leicht das Expressionsverhältnis von verwundeten im Vergleich zu gesunden Pflanzen ermitteln.

Das Ergebnis eines solchen Experimentes ist für eine kleine Auswahl von Genen in Abb. 6 dargestellt, die Systemin-induzierte Veränderungen in der Genexpression 1, 3 und 6 Stunden nach Behandlung der Pflanzen zeigt. Nach 6 Stunden ist eine starke Akkumulation der mRNAs der SWRPs zu beobachten (PI-I, PI-II, CPI, CDI, LAP, PPO, TD). Die Transkripte von Proteinen, die zur Resistenz gegenüber pathogenen Mikroorganismen beitragen, sind dagegen nicht induziert (PR-1a – PR-3b). Darüber hinaus ist eine rasche, aber vorübergehende Akkumulation einer Reihe weiterer

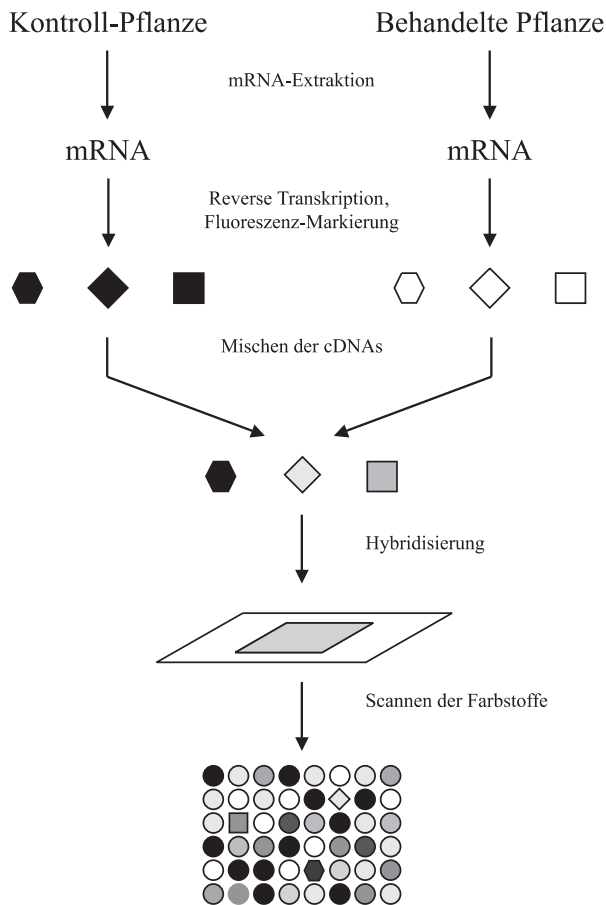


Abb. 5. Ablauf eines Microarray-Experimentes zur Analyse der Genexpression. Von behandelten wie auch von Kontrollpflanzen wird die gesamte mRNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Dabei werden die beiden cDNA-Proben mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die cDNAs werden gemischt und gegen ein Raster von DNA-Fragmenten bekannter Gene hybridisiert. Für jeden Punkt des Rasters wird der relative Anteil der beiden Farbstoffe bestimmt, um daraus das Expressionsverhältnis des entsprechenden Gens abzuleiten (weitere Details im Text).

Fig. 5. Design of a microarray experiment for the analysis of gene expression. In a first step, mRNA is isolated from both treated and control plants. The mRNA is then converted into cDNA by reverse transcription and, in that process, the two samples are each labelled with a different fluorescent dye. The cDNA samples are mixed and hybridized against an array of DNA fragments. For each point of the array, the relative intensity of the two dyes is determined, and the expression ratio of the respective gene is deduced (further detail is given in the text).

mRNAs zu beobachten (LOXD, AOS1, AOC, OPR3), die für Enzyme der Jasmonsäure-Biosynthese codieren (auf die Relevanz dieses Befundes wird im folgenden Kapitel etwas näher eingegangen). Diese Genexpressionsänderungen stim-

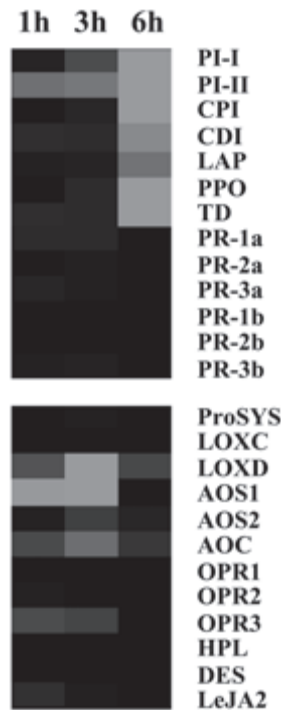


Abb. 6. Systemin-induzierte Genexpressionsänderungen. Mit Hilfe der Microarray-Analyse wurden Veränderungen in der Genexpression in Tomatenpflanzen 1, 3 und 6 Stunden nach Behandlung mit Systemin untersucht. Je heller ein Feld, desto stärker war die Akkumulation des entsprechenden Transkriptes in behandelten gegenüber Kontrollpflanzen. Der obere Block zeigt Gene der Wundabwehr (SWRPs: Proteinase Inhibitor I und II (PI-I, PI-II), Carboxypeptidaseinhibitor (CPI), Cathepsin D Inhibitor (CDI), Leucinaminopeptidase (LAP), Polyphenoloxidase (PPO) und Threonindeaminase (TD)), sowie Gene der Pathogenabwehr («Pathogenesis-related») (PR)-Proteine 1a, 2a, 3a, 1b, 2b, 3b). Der untere Block zeigt einige Gene, für die eine Rolle in der Signalübermittlung diskutiert wird (Prosystemin (ProSYS), Lipoxygenase (LOX) C und D, Allenoxid-Synthase (AOS) 1 und 2, Allenoxid-Cyclase (AOC), Oxophytodiensäure Reduktase (OPR) 1, 2 und 3, Hydroperoxid-Lyase (HPL), Divinylether-Synthase (DES) und ein Transkriptionsfaktor (LeJA2).

Fig. 6. Systemin induced changes in gene expression. Systemin-induced changes in gene expression were analysed in tomato plants 1, 3, and 6 hours after treatment with systemin using cDNA microarray analysis. The brighter a field, the more abundant was the respective mRNA in treated versus control plants. The upper panel shows wound response genes (SWRPs: proteinase inhibitors I and II (PI-I, PI-II), carboxypeptidase inhibitor (CPI), Cathepsin D Inhibitor (CDI), leucine aminopeptidase (LAP), polyphenol oxidase (PPO) and threonine deaminase (TD)), as well as pathogen defense genes (pathogenesis-related) (PR)-proteins 1a, 2a, 3a, 1b, 2b, 3b). The lower panel shows genes with putative roles in signal transduction (prosystemin (ProSYS), lipoxygenase (LOX) C and D, alleneoxid synthase (AOS) 1 and 2, alleneoxid cyclase (AOC), oxo-phytodienoic acid reductase (OPR) 1, 2 and 3, hydroperoxide lyase (HPL), divinylether synthase (DES) and a transcription factor (LeJA2).

men weitgehend mit den nach Verwundung zu beobachtenden Veränderungen überein. Es zeigt sich, dass Verwundung nicht erforderlich ist: Systemin reicht aus, die Wundreaktion auszulösen.

Um zu zeigen, dass Systemin nicht nur hinreichend, sondern auch notwendig für die Wundreaktion ist, wurden transgene Pflanzen (d. h. Pflanzen, in deren Genom mit Hilfe von gentechnischen Methoden zusätzliche DNA-Abschnitte eingeführt wurden) eingesetzt. Die Expression von Prosystemin wurde in transgenen Tomatenpflanzen buchstäblich ausgeschaltet (MCGURL et al., 1992). Um das zu tun, hat man ein künstliches Gen hergestellt, ein so genanntes Antisense-Gen. Dieses Gen kodiert für eine mRNA, die zur normalen Prosystemin mRNA komplementär ist. In transgenen Pflanzen unterdrückt dieses Antisense-Gen die Expression von Prosystemin. Anschliessend wurde die Resistenz der transgenen Pflanzen gegenüber der herbivoren Larve des Tabakswärmers (*Manduca sexta*) mit der Resistenz normaler Tomatenpflanzen verglichen. Es zeigte sich, dass die transgenen Pflanzen erheblich anfälliger sind. Die Larven des Tabakswärmers konsumierten wesentlich mehr Blattmaterial der transgenen Pflanzen und zeigten auf diesen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich schnellere Gewichtszunahme (OROZCO-CARDENAS et al., 1993). Offenbar ist Prosystemin zur Ausprägung der Wundreaktion und der damit verbundenen Resistenz gegenüber herbivoren Insekten unentbehrlich. Das Experiment zeigt zum einen, wie wirkungsvoll dieser induzierbare Resistenzfaktor ist, und es macht weiter deutlich, dass Prosystemin für die Wundreaktion notwendig ist.

4.3 Ein Modell der Wundsignaltransduktion

Wir haben gesehen, dass (Pro)Systemin für die Ausprägung der Wundreaktion hinreichend und notwendig ist. Damit stellt sich nun die Frage, wie denn (Pro)Systemin die Expression der SWRPs auslöst. Welche molekularen Vorgänge sind hieran beteiligt? Ein von Farmer und Ryan (1992) entwickeltes Modell fasst unsere derzeitigen Vorstellungen von der Wirkungsweise von Systemin und Prosystemin zusammen (Abb. 7). Somit kommt es infolge der Verwundung zur Freisetzung von Systemin aus seinem Vorläuferprotein, aus Prosystemin. In Zielgeweben interagiert es mit einem Rezeptorprotein an der Zelloberfläche. Durch diese Interaktion kommt es zur Aktivierung einer Lipase (ein hydrolytisches Enzym), die eine Fettsäure, die Linolensäure, aus Membranlipiden freisetzt. Durch eine Reihe von enzymatischen Umformungen wird die Linolensäure in ein weiteres Signalmolekül, die Jasmonsäure, umgewandelt, die ihrerseits die Expression der SWRPs indu-

ziert (FARMER und RYAN, 1992). Im zuvor beschriebenen Microarray-Experiment war neben der Akkumulation von mRNAs der SWRPs eine raschere und transiente Anreicherung einer zweiten Gruppe von Transkripten zu beobachten. Diese mRNAs (LOXD, AOS1, AOC, OPR3, vgl.

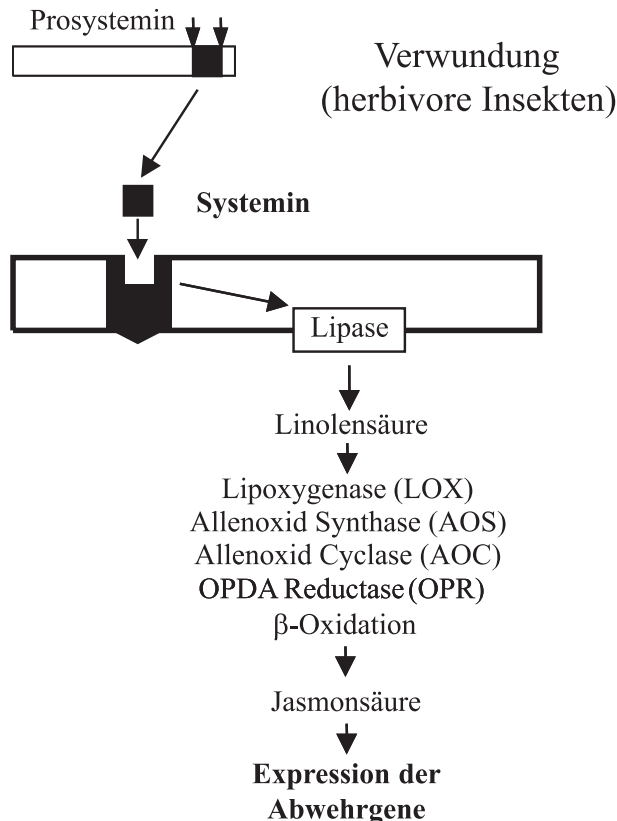


Abb. 7. Ein Modell des Wundsignaltransduktionsweges. Infolge der Verwundung wird Systemin aus seiner Vorstufe freigesetzt. Es interagiert mit einem Plasmamembran-ständigen Rezeptor, infolge dessen es zur Aktivierung einer Lipase kommt. Linolensäure wird freigesetzt und in einer Reihe von enzymatischen Schritten zu Jasmonsäure umgewandelt. Jasmonsäure bewirkt die Induktion der Abwehrgene (nach FARMER, 1992).

Fig. 7. A model of the wound signal transduction pathway. Systemin is released from its precursor as a consequence of wounding. It interacts with a plasmamembrane receptor resulting in the activation of a lipase. Linolenic acid is released from membrane lipids. A series of enzymatic reactions results in the formation of jasmonic acid which ultimately induces defense gene expression (acc. to FARMER, 1992).

Abb. 6 und Abb. 7) codieren für die Enzyme, die für die Jasmonsäure-Biosynthese verantwortlich sind. Die hier zu beobachtende zeitliche Abfolge der Genaktivierung, nämlich die rasche Induktion der Gene für die Jasmonsäure-Biosynthese, gefolgt von der Induktion der Abwehrgene, ist konsistent mit dem in Abb. 7 gezeigten Modell der Wundsignaltransduktion.

Ein solches Modell muss immer als vorläufig, als hypothetisch angesehen werden. Es ist nur so lange gültig, solange es allen experimentellen Beobachtungen Rechnung trägt. Im Laufe der letzten Jahre wurde eine Vielzahl von Experimenten durchgeführt, um die Haltbarkeit dieses Modells zu prüfen, und in der Tat scheint es die tatsächlichen Gegebenheiten recht gut zu beschreiben⁷. Trotzdem bleiben noch viele Fragen ungeklärt. So ist zum Beispiel die Lipase, deren Existenz man für die Freisetzung der Linolensäure postulieren muss, noch nicht identifiziert worden. Weiterhin ist bislang unbekannt, wie es zur Signalübertragung von der Zelloberfläche ins Zellinnere kommt. Die Forschung der nächsten Jahre wird sich darüberhinaus mit noch komplexeren Problemen auseinandersetzen müssen: Spiegeln die im Gewächshaus und Labor erhaltenen Ergebnisse wirklich die Verhältnisse in freier Natur wider? Dort geht Verwundung immer einher mit potenziellen, mikrobiellen Infektionen. Die induzierte Resistenz gegen Herbivorie lässt sich also nicht losgelöst von Pathogenresistenz betrachten. Wie verhalten sich beide zueinander? Ausserdem ist die Ausprägung von Resistenzfaktoren nicht umsonst: Die Pflanze investiert Ressourcen, die anderenfalls dem Ertrag zu Gute kommen könnten. Bringt also induzierte Resistenz auch Nachteile mit sich? Welche sind das? All diese Fragen werden zu klären sein im Interesse einer umweltverträglichen, nachhaltigen Landwirtschaft, die auf den Einsatz von Pestiziden weitgehend verzichten kann.

5 VERDANKUNGEN

Ich danke Christina Sie, die im Rahmen ihrer Diplomarbeit an der ETH Zürich das Microarray-Experiment zur Analyse der Systemin-induzierten Genexpressionsänderungen durchgeführt hat. Ausserdem bedanke ich mich bei der ETH Zürich, beim Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und vor allem bei Herrn Prof. Dr. Nikolaus Amrhein für die gewährte Unterstützung.

⁷ Für eine ausführlichere Diskussion der Signaltransduktion und der unterstützenden experimentellen Daten sei auf Übersichtsartikel bei RYAN, 2000, und SCHALLER und RYAN, 1995, verwiesen.

6 LITERATUR

- BENZ, G. 1998. Wechselseitige Beziehungen zwischen Insekten und Pflanzen als Beispiele von Koevolution. – Neujahrsblatt der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich 201.
- BERGEY, D.R., HOWE, G.A. & RYAN, C.A. 1996. Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12053–12058.
- FARMER, E.E. & RYAN, C.A. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. – Plant Cell 4, 129–134.
- GREEN, T.R. & RYAN, C.A. 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against insects. – Science 175, 776–777.
- JANZEN, D. 1966. Coevolution of mutualism between ants and acacias in Central America. – Evolution 20, 249–275.
- KLÖTZLI, F.A. 1993. Oekosysteme: Aufbau, Funktionen, Störungen. – UTB 1479, Fischer, Stuttgart, 447 pp.
- MATILE, P. 1984. Das toxische Kompartiment der Pflanzenzelle. – Naturwissenschaften 71, 18–24.
- MATTIACCI, L., DICKE, M. & POSTHUMUS, M.A. 1994. Induction of parasitoid attracting synomone in Brussels sprouts plants by feeding of *Pieris brassicae* larvae: role of mechanical damage and herbivore elicitor. – J. Chem. Ecol. 20, 2229–2247.
- MCGURL, B., PEARCE, G., OROZCO-CARDENAS, M. & RYAN, C.A. 1992. Structure, expression and antisense inhibition of the systemin precursor gene. – Science 255, 1570–1573.
- OROZCO-CARDENAS, M., MCGURL, B. & RYAN, C.A. 1993. Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces the resistance toward *Manduca sexta* larvae. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 8273–8276.
- PEARCE, G., STRYDOM, D., JOHNSON, S. & RYAN, C.A. 1991. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. – Science 253, 895–898.
- PIMENTEL, D. 1991. Diversification of biological control strategies in agriculture. – Crop Protection 10, 243–251.
- PULLIN, A.S. & GILBERT, J.E. 1989. The stinging nettle, *Urtica dioica*, increases trichome density after herbivore and mechanical damage. – Oikos 54, 275–280.
- RYAN, C.A. 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. – Biochim. Biophys. Acta 1477, 112–121.
- SCHALLER, A. & RYAN, C.A. 1995. Systemin – a polypeptide defense signal in plants. – BioEssays 18, 27–33.
- SCHALLER, A., BERGEY, D.R. & RYAN, C.A. 1995. Induction of wound response genes in tomato leaves by bestatin, an inhibitor of aminopeptidases. – Plant Cell 7, 1893–1898.

Dr. Andreas Schaller, ETH Zürich, Institut für Pflanzenwissenschaften, Universitätsstrasse 2, LFW E51, 8092 Zürich
 Derzeitige Adresse:

Universität Hohenheim, Institut für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen (260), D-70953 Stuttgart, Deutschland