

Institut für Pflanzenernährung  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Abteilung Gewebekultur

**Die Insertion von rol-Genen in  
zellzyklussynchronisierte  
Karottenzellkulturen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Ökotrophologie am  
Fachbereich 09 der Justus-Liebig-Universität Gießen „Agrarwissenschaften,  
Ökotrophologie und Umweltmanagement“

vorgelegt von Claudia Geisler  
Göttingen

gestellt von Prof. Dr. K.-H. Neumann

Gießen 2001

|               |                         |
|---------------|-------------------------|
| Dekan:        | Prof. Dr. P. M. Schmitz |
| Vorsitzender: | Prof. Dr. J. Bottler    |
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. K.-H. Neumann |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. W. Friedt     |
| Prüfer:       | Prof. Dr. I. Bitsch     |
| Prüfer:       | Prof. Dr. B. Honermeier |

Minas und meiner Familie gewidmet

|   | Seite |
|---|-------|
| <b>1. Einleitung</b> .....  | 1     |
| <b>2. Literaturübersicht</b> .....  | 3     |
| 2.1. Steuerung des Zellzyklus .....   | 3     |
| 2.1.1. Ablauf des Zellzyklus .....  | 3     |
| 2.1.2. Abgeänderte Zellzyklen .....   | 4     |
| 2.1.2.1. Restitutionszyklen .....   | 5     |
| 2.1.2.2. Endozyklen .....   | 5     |
| 2.1.2.3. Differentielle Replikation .....   | 6     |
| 2.1.2.3.1. Unterreplikation .....   | 6     |
| 2.1.2.3.2. Amplifikation .....  | 7     |
| 2.1.3. Der Mechanismus der DNS-Replikation während der S-Phase .....  | 8     |
| 2.1.4. Der Einbau von Fremd-Genen während der S-Phase des Zellzyklus .....  | 10    |
| 2.1.4.1. Insertion der Fremd-DNS mithilfe von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....  | 11    |
| 2.1.5. Der Beginn der Replikation an bestimmten Replikationsstartpunkten .....  | 12    |
| 2.1.6. Replikationskompetenz des Chromatins und seine Markierung .....  | 13    |
| 2.1.7. Prozeß der Replikation .....   | 15    |
| 2.1.7.1. Eukaryontische DNS-Polymerasen .....   | 15    |
| 2.1.7.2. Der Replikationsmechanismus .....  | 16    |
| 2.1.8. Einfluß von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (CDK) auf den Ablauf des Zellzyklus .....  | 17    |
| 2.2. Molekularbiologische Aspekte des Einbaus von Fremdgenen in das pflanzliche Genom mit Berücksichtigung der Chromatinorganisation, deren Expression sowie „gene silencing“ ..... | 18    |
| 2.2.1. Genetische Transformation .....  | 18    |
| 2.2.2. Transformation von Pflanzenzellen durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....   | 19    |
| 2.2.2.1. Herkunft und Wirkungsweise von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....  | 19    |
| 2.2.2.2. Der T-DNS-Komplex und seine Integration in das Pflanzengenom .....   | 20    |
| 2.2.2.3. T-DNS-Stabilität und Expression .....  | 25    |
| 2.2.3. Chromosomenorganisation .....  | 26    |
| 2.2.4. Verminderte Expression inserierter Fremd-DNS und „gene silencing“ im Rahmen der Genregulation .....  | 28    |
| 2.2.4.1. DNS-Methylierung in Pflanzen .....   | 29    |
| 2.2.4.1.1. Funktion der DNS-Methylierung .....  | 29    |
| 2.2.4.1.2. Das Prinzip der DNS-Methylierung im pflanzlichen Genom .....   | 30    |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 2.3.       | rol-Gene und ihr Einsatz : Vorkommen und Wirkungen in Abhängigkeit vom Promotor .....             | 33        |
| 2.3.1.     | Vorkommen .....   | 33        |
| 2.3.2.     | Der Ri-Phänotyp .....   | 33        |
| 2.3.3.     | Eigenschaften der rol-Gene .....  | 34        |
| 2.3.3.1.   | Eigenschaften des rolA-Gens .....   | 34        |
| 2.3.3.2.   | Eigenschaften des rolB-Gens .....   | 35        |
| 2.3.3.3.   | Eigenschaften des rolC-Gens .....   | 36        |
| 2.3.3.4.   | Eigenschaften der Kombination von rolABC .....  | 37        |
| 2.3.3.5.   | Eigenschaften des rolD-Gens .....   | 37        |
| 2.3.4.     | Wirkungen der rol-Gene beim Einsatz unterschiedlicher Promotoren .....                            | 37        |
| 2.3.4.1.   | Der 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus .....  | 38        |
| 2.3.4.1.1. | rolA .....  | 38        |
| 2.3.4.1.2. | rolB .....  | 39        |
| 2.3.4.1.3. | rolC .....  | 39        |
| 2.3.4.1.4. | rolABC .....  | 40        |
| 2.3.5.     | Der eigene Promotor .....   | 40        |
| 2.3.5.1.   | rolA .....  | 40        |
| 2.3.5.2.   | rolB .....  | 41        |
| 2.3.5.3.   | rolC .....  | 42        |
| 2.3.5.4.   | rolABC .....  | 42        |
| <b>3.</b>  | <b>Material und Methoden .....</b>  | <b>44</b> |
| 3.1.       | Anzucht der Pflanzen .....  | 44        |
| 3.2.       | Gewebekultur .....  | 44        |
| 3.2.1.     | Kulturbedingungen .....   | 44        |
| 3.3.       | Nährmedien .....  | 45        |
| 3.4.       | Suspensionskulturen .....   | 47        |
| 3.5.       | Synchronisation der Karottenzellsuspension .....  | 48        |
| 3.6.       | Bisbenzimidfärbung der Kern-DNS .....   | 49        |
| 3.7.       | Cytophotometrische DNS-Messung der Zellkerne .....  | 50        |
| 3.8.       | Verwendung des Plasmids pPCV 002 .....  | 51        |
| 3.9.       | Verwendung der Bakterienstämme <i>Escherichia coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ..... | 52        |
| 3.9.1.     | Nährmedien für Bakterienkulturen .....  | 52        |
| 3.9.2.     | Verwendung von Antibiotika .....  | 53        |
| 3.9.3.     | Bakterienstämme .....   | 53        |
| 3.9.3.1.   | Glycerineinlagerung von Bakterien .....   | 54        |
| 3.9.3.2.   | Verwendung der E.coli-Stämme HB 101 und S17-1 .....   | 54        |
| 3.9.4.     | Minipräparation .....   | 55        |
| 3.9.4.1.   | Lösungen für die Minipräparation .....  | 55        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.9.4.2.  | Kleine Präparation der Plasmid-DNS aus Bakterien .....   | 56        |
| 3.9.5.    | Quantitative und qualitative Bestimmung des DNS-Gehaltes .....   | 56        |
| 3.9.6.    | Nachweis der Plasmid-DNS .....   | 57        |
| 3.9.6.1.  | Restriktionsverdau der Plasmid-DNS .....   | 57        |
| 3.9.6.2.  | Gel-Elektrophorese .....   | 57        |
| 3.9.7.    | Konjugation von <i>E. coli</i> S17-1 mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....  | 58        |
| 3.9.8.    | Verdau der Plasmid-DNS .....   | 59        |
| 3.10.     | Cokultur von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> und Suspension von <i>Daucus carota</i> .....                                      | 60        |
| 3.11.     | Aufbereitung der DNS des Pflanzenmaterials mithilfe eines DNS-Extraktionskits .....  | 61        |
| 3.12.     | Nachweis des Einbaus der Fremdgene in das Karottengenom durch die Polymerase-<br>Ketten-Reaktion (PCR) .....                     | 62        |
| 3.13.     | Southern Blot .....  | 65        |
| 3.13.1.   | Gelbehandlung .....  | 65        |
| 3.13.2.   | Aufbau des Southerntransfers .....   | 66        |
| 3.13.3.   | Zusammensetzung der verschiedenen Lösungen und Puffer für den Southern Blot .....  | 67        |
| 3.13.4.   | Verdau der genomischen DNS der transgenen Karotten .....   | 69        |
| 3.13.5.   | Elektrophorese .....   | 71        |
| 3.13.6.   | Kovalente Bindung der DNS an die Membran .....   | 71        |
| 3.13.7.   | Herstellung der Sonde .....  | 71        |
| 3.13.7.1. | Aufbereitung der Sonden-DNS aus dem Gel .....  | 72        |
| 3.13.7.2. | Random primed DNS-Markierung der Sonde mit Digoxigenin-dUTP .....  | 73        |
| 3.13.8.   | Prähybridisierung .....  | 74        |
| 3.13.9.   | Hybridisierung .....   | 74        |
| 3.13.10.  | Posthybridisierung und Waschvorgänge .....   | 75        |
| 3.13.11.  | Immunologische Detektion und Färbung .....   | 75        |
| 3.14.     | Chemikalienliste .....   | 76        |
| 3.14.1.   | Chemikalienliste für die Gewebekultur .....  | 76        |
| 3.14.2.   | Chemikalienliste für molekularbiologische Untersuchungen .....   | 76        |
| 3.14.3.   | Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Längenmarker für<br>molekularbiologische und gentechnologische Untersuchungen ..... | 77        |
| <b>4.</b> | <b>Ergebnisse</b> .....  | <b>79</b> |
| 4.1.      | Zellzyklussynchronisation .....  | 79        |
| 4.2.      | Gewebekultur .....   | 80        |
| 4.2.1.    | Embryonalentwicklung der Transformation I (4 Stunden Cokultur) .....   | 81        |
| 4.2.2.    | Embryonalentwicklung der Transformation II (8 Stunden Cokultur) .....  | 83        |
| 4.2.3.    | Embryonalentwicklung der Transformation III (48 Stunden Cokultur) .....  | 84        |
| 4.2.4.    | Bonitur der transgenen Pflanzen .....  | 87        |
| 4.2.4.1.  | Auswertung der Bonituren und Einteilung der Pflanzen in sog. „Morphotypen“ .....   | 87        |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
| 4.2.4.2.  | Quantitative Auswertung des Auftretens bestimmter Morphotypen zu den verschiedenen Transformationszeitpunkten ..... | 90  |
| 4.3.      | Molekularbiologie .....   | 95  |
| 4.3.1.    | PCR-Auswertungen .....  | 95  |
| 4.3.2.    | Southern Blots .....  | 100 |
| <b>5.</b> | <b>Diskussion</b> .....   | 103 |
| <b>6.</b> | <b>Zusammenfassung</b> .....  | 128 |
| <b>7.</b> | <b>Literaturverzeichnis</b> .....   | l   |
| <b>8.</b> | <b>Anhang : Tabellen und Abbildungen</b>  |     |

**Tabellen:**

Tabelle 1: Bonitierungstabelle aller transgenen Karottenpflanzen

Tabelle 2: Morphotypen und ihre Charakteristika

Tabelle 3: Zusammenfassung der Boniturergebnisse aller transgenen Pflanzen als Morphotypenkatalogisierung

Tabelle 4: Quantitative Auswertung aller transgenen Pflanzen nach Morphotypen

Tabelle 5: Gesamt-Auswertung der PCR-Ergebnisse aller rol-Gene bei allen verfügbaren transgenen Pflanzenproben

Tabelle 6: Auswertung aller durchgeführten PCR-Untersuchungen an aufbereiteten, transgenen Pflanzenproben

Tabelle 7: Schema der durchgeführten Southern Blots

Tabelle 8: Übersicht über die durchgeführten Southern Blots und die MG-Bereiche der detektierten Banden in Bezug auf die Transformationsbedingungen

**Abbildungen:**

Abbildung 1: Der Zellzyklus

Abbildung 2: Mechanismus der Replikation

Abbildung 3: Substrate und phasenspezifische Aktivierung der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen im Zellzyklus

Abbildung 4: Physische Plasmidkarte des Plasmids pPCV 002

Abbildung 5: Diagramm der Lage der rol-Gene bzw. ihrer ORFs im Plasmid pPCV 002

Abbildung 6: Thymidin-Applikation und *Agrobacterium*-Zugabe innerhalb des Zellzyklus nach 24stündiger FdU-Wirkung

Abbildung 7: Aufbau des Southern Transfers

Abbildung 8: DIG-Labeling und Detektion

- Abbildung 9: Synchronisationsschemata der Bisbenzimid-Messung der *Daucus carota*-Kerne der Suspensionen der Transformation I (4 h Cokultur)
- Abbildung 10: Synchronisationsschemata der Bisbenzimid-Messung der *Daucus carota*-Kerne der Suspensionen der Transformation II (8 h Cokultur)
- Abbildung 11: Synchronisationsschemata der Bisbenzimid-Messung der *Daucus carota*-Kerne der Suspensionen der Transformation III (48 h Cokultur)
- Abbildung 12: Synchronisationsschemata der Bisbenzimid-Messung *Daucus carota*-Kerne einer  $B_5^+$ -Suspension
- Abbildung 13: Suspensionskulturen der verschiedenen Transformationszeitpunkte der Transformation I (4 h Cokultur) nach 77 Tagen Kultur im Vergleich
- Abbildung 14: Suspensionskulturen der verschiedenen Transformationszeitpunkte der Transformation II (8 h Cokultur) nach 14 Tagen Kultur im Vergleich
- Abbildung 15: Embryonalstadien der verschiedenen Transformationszeitpunkte der Transformation II (8 h Cokultur) nach 21 Tagen Kultur im Vergleich
- Abbildung 16: Einteilung der Morphotypen
- Abbildung 17: Auftreten der verschiedenen Morphotypen nach Zellzyklusanregung bei der Transformation I (4 h Cokultur)
- Abbildung 18: Auftreten der verschiedenen Morphotypen nach Zellzyklusanregung bei der Transformation II (8 h Cokultur)
- Abbildung 19: Auftreten der verschiedenen Morphotypen nach Zellzyklusanregung bei der Transformation III (48 h Cokultur)
- Abbildung 20: Ausgewählte Elektrophoresen der PCR-Nachweise des rolA-Gens der Transformation I (4 h Cokultur) und der Plasmid-DNS
- Abbildung 21: Ausgewählte Elektrophoresen der PCR-Nachweise des rolA-Gens der Transformation II (8 h Cokultur)
- Abbildung 22: Ausgewählte Elektrophoresen der PCR-Nachweise des rolA-Gens der Transformation III (48 h Cokultur)
- Abbildung 23: Ausgewählte Elektrophoresen der PCR-Nachweise des rolB-Gens der Transformation I (4 h Cokultur)
- Abbildung 24: Ausgewählte Elektrophoresen der PCR-Nachweise des rolB-Gens der Transformation II (8 h Cokultur)
- Abbildung 25: Ausgewählte Elektrophoresen der PCR-Nachweise des rolB-Gens der Transformation III (48 h Cokultur)
- Abbildung 26: Ausgewählte Elektrophoresen der PCR-Nachweise des rolC-Gens der Transformation I (4 h Cokultur)
- Abbildung 27: Ausgewählte Elektrophoresen der PCR-Nachweise des rolC-Gens der Transformation II (8 h Cokultur)
- Abbildung 28: Ausgewählte Elektrophoresen der PCR-Nachweise des rolC-Gens der Transformation III (48 h Cokultur)
- Abbildung 29: Southern Blots ausgesuchter Pflanzenproben



## Verwendete Abkürzungen

|                    |  |
|--------------------|--|
| Abb.               | Abbildung  |
| AMP                | Adenosinmonophosphat   |
| ARS                | Autonomously Replicating Sequence                                |
| ATP                | Adenosintriphosphat  |
| AT-reich           | reich an den Basen Adenin und Thymin                             |
| B5                 | Nährmedium, modifiziert nach GAMBORG et al. (1968)               |
| B5 <sup>+</sup>    | B5-Nährmedium mit 0,5 ppm 2,4-D                                  |
| B5 <sup>-</sup>    | B5-Nährmedium ohne 2,4-D   |
| bp                 | base pairs (=Basenpaare)   |
| CAMV               | Cauliflower Mosaic Virus (= Blumenkohl-Mosaik-Virus)             |
| CdCp               | Cell division Cycle Protein (=Zellzyklus-Protein)                |
| cDNA               | complementary DNA  |
| CDK                | Cyclin-Dependent Proteinkinase (=Cyclin-abhängige Proteinkinase) |
| CKI                | Inhibitor der CDK  |
| 2,4-D              | 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure                                     |
| dATP               | Desoxi-Adenosintriphosphat                                       |
| dCTP               | Desoxi-Cytosintriphosphat  |
| dGTP               | Desoxi-Guanosintriphosphat                                       |
| dNTP               | Desoxi-Nucleotidtriphosphat                                      |
| dTTP               | Desoxi-Thymidintriphosphat                                       |
| dUTP               | Desoxi-Uridintriphosphat   |
| ddH <sub>2</sub> O | bidestilliertes Wasser   |
| DIG                | Digoxigenin  |
| DNA                | desoxyribonucleic acid = DNS                                     |
| DNS                | Desoxiribonucleinsäure   |
| E. coli            | Escherichia coli   |
| FdU                | 5-Fluoro-2'-Desoxi-Uridin  |
| G                  | Gravität   |
| G1-Phase           | Gap1-Phase   |
| G2-Phase           | Gap2-Phase   |
| GA                 | Gibberellinsäure   |
| GC-reich           | reich an den Basen Guanin und Cytosin                            |

|                     |   |
|---------------------|---|
| GUS                 | β-Glucuronidase   |
| h                   | Stunde  |
| H                   | Histon  |
| kDa                 | KiloDalton  |
| kV                  | Kilovolt  |
| LB-Medium           | Luria-Bertani-Medium  |
| M                   | Mol   |
| M-Phase             | Mitose-Phase  |
| MCM                 | Mini Chromosome Maintenance   |
| MG                  | Molekulargewicht  |
| μA/Skt.             | Mikro-Ampère pro Skalenteil   |
| 3'-OH-Gruppe        | Hydroxylgruppe am 3'-Ende   |
| onc-Gene            | oncogenous (= tumorauslösende) Gene                                       |
| ORC                 | Origin Recognition Complex  |
| ORF                 | Open Reading Frame (= transkriptionsfähiger Leserahmen einer DNS-Sequenz) |
| PCR                 | Polymerase Chain Reaction (= Polymerase-Kettenreaktion)                   |
| PCV                 | packed cell volume (in ml nach Zentrifugation)                            |
| PEMs                | Pro-embryogene Massen (Zellcluster aus embryogenen Zellen)                |
| Ri-Plasmid          | Root-Inducing (Wurzelwachstum-induzierendes) Plasmid                      |
| RNS                 | Ribonucleinsäure  |
| R.E.                | relative Fluoreszenzintensitätseinheit                                    |
| RPA                 | Replication Protein A (=Replikationsprotein A)                            |
| rol                 | rooting loci (= Loci im Chromosom, die für die Wurzelinduktion codieren)  |
| S                   | Svedberg-Einheit bzw. Sedimentationskoeffizient                           |
| S-Phase             | DNS-Synthese-Phase  |
| SDS                 | Natriumdodecylsulfat  |
| SSB-Proteine        | Single-Strand DNA-Binding-Proteine (=einzelstrangbindende Proteine)       |
| T                   | Tag   |
| T-DNS               | Transfer-DNS  |
| T <sub>L</sub> -DNS | Transfer-DNS links  |
| T <sub>R</sub> -DNS | Transfer-DNS rechts   |
| Tab.                | Tabelle   |

|                |   |
|----------------|---|
| Taq-Polymerase | Polymerase, gewonnen aus dem Bakterium <i>Thermus aquaticus</i> |
| Ti-Plasmid     | Tumor-Inducing Plasmid (= tumorinduzierendes Plasmid)           |
| U              | Unit ( $\mu\text{Mol/Minute}$ )                                 |
| UpM            | Umdrehungen pro Minute  |
| V              | Volt  |
| vir-Gene       | Virulenz-Gene   |
| Vir-Protein    | Genprodukt der vir-Gene   |
| vir-Region     | Virulenz-Region   |

## 1. Einleitung

Bereits Aristoteles soll eine Pflanzenkrankheit beschrieben haben, die vorwiegend an Wurzelhälsen verschiedener Pflanzen als Wucherungen zu beobachten ist. Im Jahr 1907 wurde diese von SMITH und TOWNSEND erstmals charakterisiert und als Verursacher das gramnegative Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* identifiziert. Nach weiteren Forschungen, die bis zum heutigen Tag andauern, konnten die Mechanismen, die für die Auslösung des Tumor-Wachstums im Pflanzengewebe verantwortlich sind, detaillierter aufgeklärt und für die molekularbiologische Anwendung genutzt werden (AMBROS et al., 1986, DE NEVE et al., 1997, GHEYSEN et al., 1987, HERMAN et al., 1990, KONCZ et al., 1989 und 1992, ROSSI et al., 1993, STACHEL et al., 1986, WALLROTH et al., 1986).

Im Laufe der Zeit etablierte sich die Methode, Fremd-DNS mithilfe des *Agrobacterium tumefaciens* und seines Ti-Plasmids in Empfänger-Genome einzuschleusen. Häufig werden Marker-Gene oder Sequenzen, die nach ihrer Insertion zu morphologischen Veränderungen der Pflanze führen, wie beispielsweise die rol-Gene, in das Ti-Plasmid eingebracht (SCHMÜLLING et al., 1988, STACHEL et al., 1986, WEBER et al., 2001, ZAMBRISKY, 1992). Jedoch erfolgt die Insertion der exogenen Gensequenzen ungerichtet und in eine willkürliche Position des Pflanzen-Genoms über eine nicht-homologe Kombination (DEROLES und GARDNER, 1988, OTTEN et al., 1981, PETIT et al., 1986, VERGUNST und HOOYKAAS, 1998, WALLROTH et al., 1986).

Es kann davon ausgegangen werden, daß Fremd-DNS vorwiegend – jedoch nicht ausschließlich – während der DNS-Replikationsphase des Zellzyklus in transkriptionsfähiges, aktives Chromatin inseriert wird (KONCZ et al., 1989 und 1992). Bei Zellzyklus-Studien konnte nachgewiesen werden, daß auch außerhalb der S-Phase DNS-Amplifikationen auftreten können, und demzufolge auch zu anderen Zeitpunkten als der DNS-Replikationsphase eine Insertion von exogener DNS denkbar wäre (ARNHOLDT-SCHMITT, 1993b und 1995, ARNHOLDT-SCHMITT et al., 1995).

Die vorliegenden Untersuchungen hatten als Ziel festzustellen, ob durch eine Synchronisierung des Zellzyklus eine gerichtete Insertion von Fremd-DNS-Sequenzen in ein Empfängergenom (hier *Daucus carota*) mithilfe von *Agrobacterium tumefaciens* induziert werden könnte. Da eine Insertion auch außerhalb der DNS-Synthese-Phase vorstellbar ist,

sollte der Einfluß verschiedener Transformationszeitpunkte im Verlauf des Zellzyklus auf den Einbau der Fremd-DNS geklärt werden. Durch die Verwendung eines Plasmid-Konstrukts, das unter Kontrolle der eigenen Promotoren eine Kombination von rol-Genen (rolABC) beinhaltet, sollte ein morphologischer Marker geschaffen werden, der eine frühe visuelle Selektion und Bonitur der durch die Transformation bedingten Veränderungen der Phytomorphologie erlaubte.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Steuerung des Zellzyklus

#### 2.1.1. Ablauf des Zellzyklus

Die Reproduktion eukaryotischer Zellen erfolgt über einen zyklischen Prozeß, in dem sich in der Regel vier Phasen unterscheiden lassen: die Mitose-(M-)Phase, die DNS-Synthese-(S-)Phase und zwei bzw. drei Gap-(G-)Phasen ( $G_1$ ,  $G_2$  und  $G_0$ ) (s. Abb. 1).

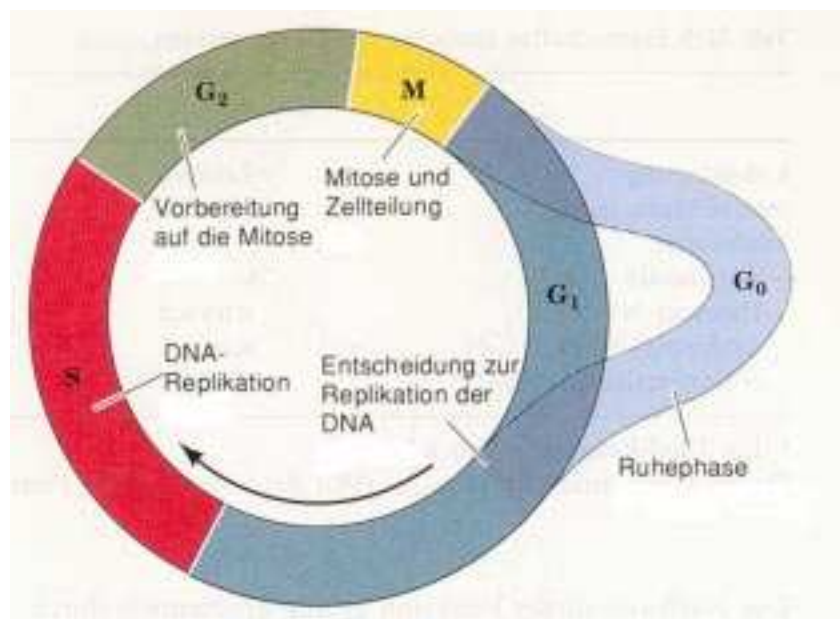


Abb. 1: Der Zellzyklus (Aus: VOET und VOET (1992): Biochemie, VCH)

Die M-Phase sorgt für die reguläre Verteilung von je einer Spalthälfte des Chromosoms, einer Chromatide, von jedem einzelnen Chromosom des Karyotyps auf die Tochterzellen. Sie kann beispielsweise durch eine Blockierung der DNS-Synthese unterdrückt werden, da eine Mitose erst dann möglich wird, wenn die Chromosomen repliziert wurden (GOULD, 1984).

Die  $G_1$ -Phase liegt zwischen dem Zeitraum der M- und S-Phase. Sie ist bei Eukaryonten durch eine große Variabilität ihrer Dauer gekennzeichnet (GOULD, 1984).

Man geht davon aus, daß in der  $G_1$ -Phase ein Kontrollpunkt angesiedelt ist, der für das weitere Fortschreiten des Zellzyklus von Bedeutung ist (CAVALIER-SMITH, 1985).

G<sub>1</sub>-Phase-Zellen können zu diesem Zeitpunkt in eine Art Ruhezustand (G<sub>0</sub>-Phase) übergehen und werden dann als postmitotische Zellen bezeichnet. Manche dieser Zellen können später jedoch wieder in die G<sub>1</sub>-Phase zurückkehren und im Zellzyklus fortfahren. Im Gegensatz zu den G<sub>0</sub>-Zellen unterscheidet man die sog. Stammzellen oder intermitotischen Zellen in Meristemen, die kontinuierlich teilungsaktiv bleiben (ALBERTS et al., 1994, BROOKS et al., 1989, SLUDER, 1989).

Während der S-Phase wird die Kern-DNS über verschiedene Mechanismen repliziert. Die Dauer der S-Phase schwankt gewebe-, stadien- und artspezifisch und nimmt während der Embryonalentwicklung ständig zu. Dabei ist die Zahl der Replika umgekehrt proportional zur Dauer der S-Phase und man beobachtet typische, immer wiederkehrende Replikationsmuster, die für einen bestimmten Zelltyp charakteristisch sind. (CHENG et al., 1999, GLICK und PASTERNAK, 1997, MUZI-FALCONI und KELLY, 1995, MUZI-FALCONI et al. 1996, PARK et al., 1999, SCHULTZ et al., 1999, SEYFFERT et al., 1998, WANG et al., 1999). Auf die DNS-Replikation soll jedoch in einem gesonderten Kapitel (2.1.3.) eingegangen werden.

Als G<sub>2</sub>-Phase wird der Bereich zwischen S- und M-Phase bezeichnet. Auch an dieser Stelle wird ein Kontrollpunkt, in diesem Fall für die Mitose, diskutiert. Fernerhin wird in der G<sub>2</sub>-Phase die höchste RNS- und Proteinsyntheserate in Vorbereitung für die Mitose beobachtet, die mit der zyklischen Veränderung der Chromatin-Kondensation in Zusammenhang steht (KLEINIG und SITTE, 1986 ).

Die zyklische Aufeinanderfolge dieser Phasen beschreibt einen normalen Zellzyklus, der durchschnittlich 12 bis 30 Stunden für einen Durchlauf benötigt, der jedoch auch wesentlich länger oder kürzer andauern kann. In verschiedenen Zelltypen oder durch bestimmte Modifikationen kann es zu stark verkürzten Zellzyklen ohne sichtbare G-Phasen oder zu stark verlängerten Zellzyklen kommen. Auf einige dieser Besonderheiten soll im folgenden Kapitel eingegangen werden (GLICK und PASTERNAK, 1995, NAGL, 1976, SEYFFERT et al., 1998).

### 2.1.2. Abgeänderte Zellzyklen

Im Rahmen der Phylo- und Ontogenese können einige Veränderungen des oben beschriebenen Zellzyklusprogramms auftreten. Häufig beobachtet man Verkürzungen des

mitotischen Zyklus, die beispielsweise zu Restitutionszyklen, Endozyklen oder differentieller Replikation führen (NAGL, 1976).

#### 2.1.2.1. Restitutionszyklen

Man spricht nach NAGL (1976) dann von einem Restitutionszyklus, wenn der Zellzyklus vor Vollendung der Karyokinese abgebrochen wird. Das Hauptcharakteristikum des Restitutionszyklus ist der Eintritt des Kerns in eine anfänglich normale Mitose, die zu einem bestimmten Zeitpunkt blockiert wird und den Übergang der Chromosomen in die Interphase zur Folge hat.

Abhängig vom Zeitpunkt der Restitution entstehen charakteristische Kernformen: Wenn bereits in der Prophase eine Mitosehemmung auftritt, führt diese zu regelmäßig geformten Kernen, die anhand ihrer Chromatinstruktur von endozyklisch entstandenen Kernen abgegrenzt werden können. Bei Restitution in der Anaphase entstehen hantelförmige Kerne, da sich die Kernhülle um die bereits in Segregation befindlichen Chromosomen bildet. Bei metaphasischer Restitution, die auch durch Spindelhemmung mit Colchicin zu beobachten ist, entstehen unregelmäßig geformte, gelappte oder ringförmige Kerne (NAGL, 1976).

Generell kann festgestellt werden, daß Chromosomen aus Restitutionsmitosen häufig überkontrahiert und verklebt vorliegen, da die Restitution neben einer Spindelstörung vermutlich auch zu anderen Veränderungen führt. Sowohl in vivo bei Pflanzen und Tieren sowie in vitro in Gewebekulturen können diese verkürzten Zellzyklen beobachtet werden (BAYLISS und GOULD, 1974, BUTCHER et al., 1975, HESSE, 1970, NAGL, 1962).

#### 2.1.2.2. Endozyklen

Endozyklen führen über Endoreplikations- oder Endomitosezyklen zur Endopolyploidie, einer Form der somatischen Polyploidie. Die Kernhülle bleibt bei diesen veränderten Zyklen während der gesamten Zeit erhalten, während die Spindelbildung unterbleibt. Im endomitotischen Zyklus sind strukturelle Veränderungen der Chromosomen, die denen während der Mitose ähneln, zu beobachten, im Endoreduplikationszyklus jedoch nicht. Bei Pflanzen wird eine Endozyklusdauer von 20 bis 40 Stunden angenommen. Somit wird die Entstehung von Riesenkernen möglich (NAGL, 1976).



Die Endomitose der Pflanze ist durch eine rigide Verkürzung der Mitose in der frühen Prophase charakterisiert. Wird der Zellzyklus zu einem noch früheren Zeitpunkt abgekürzt, liegt eine Endoreduplikation vor, bei der ein ständiger Wechsel von Endo-S- und Endo-G-Phasen erfolgt (D'AMATO, 1964, SUNDERLAND et al., 1974). Höher endopolyploide Kerne weisen aufgrund der Fusion der heterochromatischen Abschnitte der endomitotisch entstandenen Schwesterchromosomen eine deutlich unterschiedliche Struktur zu den ursprünglich diploiden Ausgangskernen auf. Die euchromatischen Bestandteile sind entweder diffus verteilt, strahlen sternförmig aus den Endochromozentren oder bleiben gebündelt und bilden die sog. Polytän- oder Riesenchromosomen. Diese bleiben in der Regel bis zur Degeneration in dieser Form erhalten. Manchmal werden sie durch eine Kondensation zerstört. Sind nur die heterochromatischen Regionen benachbart, können diese nach einiger Zeit auseinanderfallen. Manchmal erfolgt der Zerfall der Polytänchromosomen nach dem Erreichen einer bestimmten Endopolyploidie-Stufe (BEERMANN, 1962, BIER, 1959, CZEIKA, 1956, SCHLICHTINGER, 1956).

### 2.1.2.3. Differentielle Replikation

Über die differentielle Replikation entstehen Zellkerne, die weder einen diploiden noch einen polyploiden DNS-Gehalt besitzen. Die ablaufenden Replikationen finden vorwiegend im Heterochromatin statt. Man unterscheidet die Unterreplikation und die Amplifikation.

#### 2.1.2.3.1. Unterreplikation

Die Unterreplikation findet in der S-Phase von Endozyklen statt und kann sowohl im centromerischen Heterochromatin als auch in Chromosomenregionen mit repetitiver DNS nachgewiesen werden. Kerne, die Unterreplikationszyklen durchlaufen haben, verlieren die Fähigkeit zur Mitose, da durch diese Zyklen in erster Linie das centromerische Heterochromatin betroffen ist, das für die Befestigung des Spindelapparates während der Mitose zuständig zu sein scheint. Vielleicht ist der Verlust der Mitosekapazität im Gegensatz dazu für die Zelle aus „ökonomischen“ Gründen günstiger, die in endopolyploiden Kernen nicht mehr benötigten Teile des Genoms nicht mehr zu replizieren. Vielleicht kann das von der Unterreplikation betroffene DNS-Material nicht mehr die Replikation des kompakten

Heterochromatins auslösen (BARLOW und SHERMAN, 1972, BYFIELD, 1972, NAGL und RÜCKER, 1974).

Auffällig sind bei der Unterreplikation die relativ kleine Kerngröße und sehr kleine Chromozentren, die eigentlich aufgrund der Ploidiestufe im Vergleich zu diploiden Kernen viel größer zu erwarten waren. FOX folgerte daraus, daß das Euchromatin mehr Replikationsrunden durchläuft als das Heterochromatin (FOX, 1970, FOX, 1971, LAIRD, 1973). Dies konnten verschiedene Forschergruppen am  $\alpha$ -Heterochromatin bei *Drosophila* nachweisen, das nur einige Male repliziert wird, während in der gleichen Zeit das Euchromatin 10 mal repliziert wurde (GALL und PARDUE, 1971, RUDKIN, 1969). Besonders die Satelliten-DNS des Heterochromatins wird vermutlich in den Endozyklen überhaupt nicht repliziert, während andere repetitive Sequenzen in verschieden starker Weise unterrepliziert werden (BLUMENFELD und FORREST, 1972, GALL, 1973, HENNIG, 1972, LAKHOTIA, 1974, WOODCOCK und SIBATANI, 1975). Bei Pflanzen konnten diese Ergebnisse ebenfalls bestätigt werden: VAN OOSTVELDT und VAN PARIJS (1972) wiesen in polyploiden Kernen im Erbsenepikotyl weniger repetitive DNS nach als in diploiden Kernen des Meristems. PEARSON et al. (1974) sowie INGLE und TIMMIS (1975) fanden eine selektive Unterreplikation der Satelliten-DNS im Heterochromatin von Cucurbitaceen.

#### 2.1.2.3.2. Amplifikation

Die DNS- oder Genamplifikation beinhaltet die Extrareplikation bestimmter Sequenzen oder Gene, die von der Zelle in einem bestimmten Entwicklungsstadium benötigt werden (BROWN und DAWID, 1968, NAGL und RÜCKER, 1974).

Bei Pflanzen können verschiedene Amplifikationen beobachtet werden: In Protokormen von *Cymbidium* wurden während der Gewebekultur zwei Arten von Kernpopulationen gefunden. Eine dieser Arten zeigte eine normale Endopolyploidisierung und enthielt damit die sog. Standardkerne, die andere Population von Kernen erhöhte während der Differenzierungsphase die Menge des vorhandenen Heterochromatins. Verschiedene Analysen bewiesen, daß es tatsächlich zur Extrareplikation eines gewissen Heterochromatinteils gekommen war. Eine funktionelle Erhöhung des Heterochromatinanteils wurde ausgeschlossen (NAGL, 1972, NAGL und RÜCKER, 1972). ARNHOLDT-SCHMITT (1993a) konnte bei Karotten-Wurzelphloemexplantaten DNS-Amplifikationen beobachten.

Auch bei *Xenopus laevis* konnten verschiedene DNS-Amplifikationen nachgewiesen werden (BROWN und BLACKLER, 1972, CRIPPA und TOCCHINI-VALENTINI, 1971).

### 2.1.3. Der Mechanismus der DNS-Replikation während der S-Phase

Die Hauptaufgabe der S-Phase ist die semikonservative Reduplikation der DNS-Doppelhelix. In der frühen bis zur mittleren S-Phase wird das Euchromatin repliziert, das Heterochromatin von der frühen mittleren bis zum Ende der S-Phase. Die Polymerisationsrate liegt dabei zwischen 500 Nucleotiden pro Sekunde bei Bakterien und etwa 50 Nucleotiden pro Sekunde bei Säugetieren. Diese schnelle Syntheserate erfordert einen Multienzymkomplex, der sicherstellt, daß die DNS korrekt dupliziert wird (ALBERTS et al., 1994, LASKEY et al., 1989, LOEB und KUNKEL, 1982, NAGL, 1976 ).

Während der S-Phase werden die verschiedenen Regionen des gleichen Chromosoms zu verschiedenen Zeiten nach einem bestimmten Muster repliziert (CRAIG und BICKMORE, 1993, STUBBLEFIELD, 1975). Je höher der Kondensationsgrad des Chromatins, desto später erfolgt die Assemblierung. Während das Heterochromatin auch während der Interphase hoch kondensiert vorliegt und deshalb spät in der S-Phase repliziert wird, liegt das Euchromatin in der Interphase in dekontensierter Form vor. Bei diesem geringen Verpackungsgrad wird der Zugang des Multienzymkomplexes an die DNS erleichtert, so daß die vor der DNS-Replikation notwendige RNS-Synthese initiiert werden kann und eine Replikation zu einem frühen Zeitpunkt der S-Phase erfolgen kann (HEMLEBEN, 1990, LIMA-DE-FARIA und JAWORSKA, 1968).

Möglicherweise bleibt das spät replizierende Heterochromatin auch nach der Mitose inaktiv und dekontensiert erst während der Mitte der S-Phase, so daß dann der Zugriff für alle Replikationsstartstellen dieser Domäne zum gleichen Zeitpunkt erfolgen kann (CRAIG und BICKMORE, 1993, OSTASHEVSKY, 1998).

Man geht davon aus, daß in der DNS-Synthese-Phase zunächst Gen-reiche DNS repliziert wird (d.h. zunächst in der sehr frühen S-Phase „housekeeping genes“, die in allen Zellen zur Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels essentiell sind), die für den Metabolismus von größerer Wichtigkeit als die sog. Satelliten-DNS ist. Gene, die lediglich in einigen Zellen aktiv sind, werden in diesen speziellen Zellen früh in der S-Phase abgelesen, in den anderen, nicht-spezialisierten Zellen dagegen später (MCQUEEN et al., 1998).

Die Replikation eines bestimmten Gen-Locus ist abhängig davon, ob er transkriptionelle Aktivität zeigt oder nicht. Ein transkriptionsfähiger Locus wird früh in der S-Phase repliziert, ein inaktiver jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt. AMIEL et al. (1998) konnten nachweisen, daß sich bei Krebspatienten im Unterschied zu Gesunden oder in vitro nach Zugabe von DNS-schädigenden Reagentien der Replikationszeitpunkt der gleichen Loci weiter nach hinten in der S-Phase verschiebt (GARTLER et al., 1999, SHIRAHIGE et al., 1998, YESHAYA et al., 1998).

Denkbar wäre auch eine Art von variablem Heterochromatin, das zu einem bestimmten Zeitpunkt des Zellzyklus- nicht notwendigerweise während der S-Phase- aktiv werden könnte und so z.B. die S-Phase-unabhängige Insertion von Fremdgenen ermöglichen könnte.

Das Auftreten von Satelliten-DNS ist in tierischen und pflanzlichen Systemen bekannt. In der Regel sind diese Satelliten GC-reich, in einigen Pflanzen aber auch AT-reich (INGLE et al., 1973). DÜHRSEN und NEUMANN (1980) und DÜHRSEN et al. (1984) untersuchten die DNS-Zusammensetzung von stark proliferierendem Karottengewebe nach Dichtegradienten-Zentrifugation und stellten fest, daß verschiedene schwere Satelliten (1,703-1,721 g/ml) vorlagen. Nach <sup>3</sup>H-Thymidin-Labeling stellte sich heraus, daß nach 24 Stunden Thymidininkorporation präferentiell die Satellitenfraktion von 1,702-1,704 g/ml synthetisiert worden war. Die Satelliten-DNS der Fraktion von 1,703 g/ml wurde im weiteren für Hybridisierungsexperimente mit nichtmarkierter Karottenwurzel-DNS verwendet. 83% der Satelliten-DNS hybridisierten mit der Wurzel-DNS bei einer Reassoziationskinetik mit Cot 1/2 von 0,639, die mit dem Wert der Fraktion der repetitiven DNS in der Gesamt-DNS korreliert. Folglich kann der größte Anteil die Satelliten-DNS als repetitive DNS bezeichnet werden. Hochrepetitive Sequenzen konnten aber auch in der DNS-Hauptfraktion gefunden werden. Beim Vergleich verschiedener *Daucus carota*-Sorten wurde bei der Analyse der DNS-Zusammensetzung deutlich, daß die verschiedenen Sorten ein gewisses „Basis-Genom“ enthielten, das nur geringfügige Unterschiede aufwies, jedoch auch artenspezifische DNS-Komponenten, die besonders durch die hochrepetitive Satelliten-DNS charakterisiert waren. Die Sorte „Rote Riesen“ zeigte eine geringere Kopienanzahl oder das Fehlen von DNS-Sequenzen in 2 Cot-Regionen im Vergleich zur Wildkarotte, im Vergleich zur Sorte „Lobbericher“ in 4 Cot-Regionen. Möglicherweise waren diese Veränderungen eine Folge des Inkulturnahmeprozesses von *Daucus carota*. Die Autoren folgerten, daß sich die DNS-Zusammensetzung im Laufe der Zellentwicklung verändert, wobei Variationen in der Dichte

und im Auftreten der Satelliten-DNS vorliegen. Diese Art der DNS-Amplifikation von repetitiven Sequenzen könnte bei der Differenzierung von Zellen oder Zellgewebe eine wesentliche Rolle spielen. Ebenfalls einen Einfluß auf die Zelldifferenzierung besitzen Phytohormone. Nach einer GA<sub>3</sub>-Applikation findet eine selektive Synthese spezifischer DNS-Sequenzen, beispielsweise bei *Daucus carota*, statt (SCHÄFER und NEUMANN, 1978).

ARNHOLDT-SCHMITT (1995) untersuchte die wachstumsabhängige, quantitative Variabilität von repetitiven Fragmenten bei *Daucus carota* L. und fand bei Kulturen mit einer hohen Zellwachstumsrate nach einer Kulturzeit von 14 Tagen eine starke Verminderung der Menge der repetitiven Fragmente im Vergleich zum Beginn der Kultur. Im weiteren Verlauf der Kultur kam es, während des Übergangs zur stationären Wachstumsphase, zu einer Amplifikation der repetitiven Sequenzen. Zwei zusätzliche repetitive DNS-Fragmente wurden sogar in einem höheren Maße amplifiziert als im Ausgangsgewebe. Diese Form der differentiellen Replikation scheint genetisch determiniert zu sein und zur Genomvariabilität zu führen. Denkbar wäre auch eine erhöhte DNase-Aktivität, die die Degradation der repetitiven Fragmente bewirken könnte (MATOUSEK et al., 1987). JENNS und BRYANT (1978) beobachteten eine reversible Erhöhung der DNase-Aktivität in *Pisum*-Kulturen unmittelbar vor Beginn der DNS-Replikation. Weil davon ausgegangen werden kann, daß das eukaryontische Chromatin in topologisch unabhängigen Schleifen organisiert und diese Schleifenform in hohem Maße für die strukturelle Regulation der Genexpression verantwortlich ist, könnte eine starke Reduktion von repetitiven DNS-Elementen zu einer Verkürzung der DNS-Schleifen führen (ALLEN et al., 1993, BONIFER et al., 1990, BONIFER et al., 1991, NAGL, 1992). Die daraus resultierende Veränderung von Replikon-Längen ist für die Dauer der S-Phase im Zellzyklus durch nachfolgende Veränderungen der Replikationsstartstellen als wichtig zu bewerten und trägt möglicherweise zu verfrühter oder verspäteter Replikation bei (FLAVELL et al., 1974, OLSZWESKA et al., 1990, WATERBORG und SHALL, 1985).

#### 2.1.4. Der Einbau von Fremdgenen während der S-Phase des Zellzyklus

Unabhängig davon, mithilfe welcher Methode Fremd-DNS in ein pflanzliches oder tierisches Genom inseriert wird, geschieht dies präferentiell in sich replizierende DNS, also hauptsächlich während der S-Phase des Zellzyklus. Man geht davon aus, daß der Einbau während der S-Phase durch nicht-homologe Rekombination erfolgt, die in der Regel eine

stabile und permanente Position der gesamten Fremd-DNS im Genom nach sich ziehen sollte. Dabei erfolgt die Insertion der Fremd-DNS jedoch zufällig in eine mehr oder weniger willkürliche Position des Genoms. Bei diesem Vorgang kann es zu Veränderungen der inserierten DNS kommen (DEROLES und GARDNER, 1988, OTTEN et al., 1981, PETIT et al., 1986, POTRYKUS et al., 1985, VERGUNST und HOOYKAAS, 1998, WALLROTH et al., 1986).

Es wird jedoch auch diskutiert, ob die M-Phase aufgrund des Fehlens der Kernmembran eine Rolle bei der Insertion von Fremdgenen spielen könnte. Ohne eine Kernmembran wäre möglicherweise die Passage der Fremd-DNS aus dem Cytoplasma in die Chromosomen des Empfänger-genoms vereinfacht. Der Einbau der exogenen DNS-Sequenzen müßte in der folgenden S-Phase erfolgen. Es könnte demzufolge nicht nur von Bedeutung sein, wann die Fremd-DNS im Empfänger-genom repliziert wird, sondern auch, zu welchem Zeitpunkt des Zellzyklus exogene DNS in der Nähe des Zellkerns akkumulieren kann, um dann in der nächsten Runde des Zellzyklus inseriert zu werden (LOYTER et al., 1982, OKADA et al., 1986).

#### 2.1.4.1. Insertion der Fremd-DNS mithilfe von *Agrobacterium tumefaciens*

Wird eine exogene DNS-Sequenz über *Agrobacterium tumefaciens* während der S-Phase in eine Pflanzenzelle eingebracht, so erfolgt die Insertion, wie bereits erwähnt, an einer zufälligen Position im Pflanzengenom (HOBBS et al., 1990, MAESSEN, 1997, VERGUNST und HOOYKAAS, 1998). Verschiedene Autoren berichten von einer Insertion, die anscheinend präferentiell zu invertierten Repeats der Fremd-DNS im Pflanzengenoms führt. Dabei treten ebenfalls direkte Inserts, multiple Kopien und Deletionen von T-DNS-Bereichen auf (DEROLES und GARDNER, 1988, JONSEN et al., 1987, JORGENSEN et al., 1987, PORSCH et al., 1998).

JONSEN et al. (1987) führten einen Versuch mit Petunien durch, die mit *Agrobacterium tumefaciens* transformiert wurden, und stellten fest, daß die Fremdgene häufig als invertierte Repeats in das Petuniengenom eingebaut worden waren. Ein Teil der Transformanten wies eine einfache T-DNS-Kopie auf, die jedoch nicht immer komplett inseriert und bestimmte Sequenzen offenbar deletiert worden waren. Andere Transformanten zeigten zwei unverbundene Kopien, weitere transformierte Pflanzen wiesen einfache oder mehrere invertierte Repeats der T-DNS auf. Nach Ansicht der Autoren liegen invertierte Repeats der T-DNS wesentlich häufiger als direkte Repeats inseriert in das Pflanzengenom vor. Jedoch

stehen weder die Anzahl der invertierten Repeats noch die Kopienzahl in einer positiven Korrelation zur Genexpression. Es scheint vielmehr, daß die Genexpression durch die Insertion der Fremd-DNS in eine bestimmte Region im Pflanzengenom beeinflußt wird.

JORGENSEN et al. (1987) konnten ebenfalls den präferentiellen Einbau von T-DNS in Form von invertierten Repeats in das Tomatengenom feststellen.

Wird bei der Transformation der Zellzyklus mehrfach durchlaufen oder wird die Pflanzenzelle mit mehreren Stämmen von *Agrobacterium tumefaciens* gleichzeitig oder nacheinander transformiert, besteht die Möglichkeit der multiplen T-DNS-Integration an verschiedenen Loci des Chromosoms (DEPICKER et al., 1985, PETIT et al., 1986).

#### 2.1.5. Der Beginn der Replikation an bestimmten Replikationsstartpunkten

Eukaryontische Chromosomen bestehen aus vielen Replikons, d.h. Replikationseinheiten, die nicht alle zur gleichen Zeit repliziert werden. Es scheint, als ob Gruppen von 20 bis 80 benachbarter Replikons von einem bestimmten Startpunkt aus abgelesen werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß die DNS der Eukaryonten viele Replikationsstartpunkte besitzt, deren Anzahl abhängig von Gewebe und Spezies ist. Diese Initiationsstellen besitzen eine unterschiedlich hohe Effizienz, und die Zahl dieser Einheiten in einem bestimmten Chromosom ist abhängig von der Zeitdauer des Zellzyklus bzw. der S-Phase. Vermutlich wird ein Startpunkt in der Form aktiviert, daß unter der Kontrolle eines mit dem Replikationsstartpunkt assoziierten Enhancers ein Primer transkribiert wird, der ein Replikon aktiviert (JACKSON et al., 1990, THOMAS, 1984, UMEK et al., 1989).

In der Literatur wird ein eukaryontisches Replikationsprotein (replication protein A = RPA) diskutiert, das vermutlich an einzelsträngige DNS bindet und wahrscheinlich eine Rolle bei der Initiierung der DNS-Replikation und -Reparatur spielt. Es besitzt ein konserviertes Zinkfingermotiv des 4-Cystein-Typs, das durch zelluläre Redoxmechanismen reguliert werden kann. Auf diese Art und Weise scheint RPA in die DNS-Replikation einzugreifen (PARK et al., 1999).

Bei *Saccharomyces cerevisiae* ist eine Kinase (Dbf4p/cdc7p) isoliert worden, die die Aktivierung individueller „origin recognition complexes“ (ORC) reguliert, die nach ihrer Aktivierung sequentiell nach einem bestimmten, jedoch noch unbekanntem Muster repliziert

werden. Mutationen mit DNS-zerstörenden Reagentien in Checkpointgenen, wie z.B. rad53, führen zu einem Verlust der Replikationsreihenfolge der ORCs. So werden normalerweise spät replizierende Replikationsstartpunkte früh initiiert (SHIRAHIGE et al., 1998). Die Kinase (Dbf4p/cdc7p) kann durch CDK (Cyclinabhängige Proteinkinasen) an konservierten Subdomänen phosphoryliert werden und besitzt eine Domäne zur Erkennung von Kernlokalisationsignalen. Man bezeichnet diese Kinase in Eukaryonten als Mmcdc7p. Der Locus der Mmcdc7p-Kinase befindet sich bei Säugern auf dem Chromosom 5, Bande 5E (FAUL et al., 1999, LEPKE et al., 1999, WANG et al., 1999).

Bei *E. coli* konnte ein RepE-Protein nachgewiesen werden, das in Bakterien die DNS-Replikation initiiert und reguliert, indem es Replikationsinitiatormoleküle an repetitive Gensequenzen bindet. In Klonungsexperimenten konnte beobachtet werden, daß das RepE-Protein und die Initiatorproteine mit den ori- und inc-Sequenzen eine Kreuzstruktur ausbilden, die ihrerseits eine Extrareplikation inhibiert (UGA et al., 1999).

#### 2.1.6. Replikationskompetenz des Chromatins und seine Markierung

Damit das Chromatin kompetent für eine Replikation wird, müssen schrittweise Replikationsproteine angelagert werden, bei denen eine bestimmte Assemblierungshierarchie eingehalten wird: Zunächst binden die Komponenten des sog. Origin-Erkennungskomplexes (ORC=origin recognition complex) an die Initiationsstellen für die DNS-Replikation. Der ORC existiert bei allen Eukaryoten und besitzt bestimmte autonom replizierende Sequenzen (ARS =autonomously replicating sequence), an denen zur Einleitung der Replikation sechs Proteine binden und die die DNS während des gesamten Zyklus gegen Verdauung durch DNase I schützen. Die ORC-Proteine markieren mit ihrer Bindung an das Chromatin die Startstelle für die Replikation und stellen dabei eine Anheftungsstelle für weitere Proteine dar. Nach den ORC-Proteinen bindet das Protein Cdc6p (Cell division cycle-Proteine =Zellzyklusproteine) und danach die Proteine der MCM-Gruppe (MCM=mini chromosome maintenance). Diese sind essentieller Bestandteil des Replikationskomplexes und bestehen aus sechs Klassen (MCM2 bis MCM7), die untereinander multimer Komplexe bilden. Vermutlich codieren sie für DNS-abhängige ATPasen. Die DNS-Replikation erfolgt erst nach Bindung aller drei Proteingruppen (MIYAKE et al., 1996, SABELLI et al., 1996).



Replikationskompetentes Chromatin ist durch die Bindung der drei genannten Proteinfamilien charakterisiert. Während der Replikation werden Cdc6p und die sechs MCM-Proteine vom Chromatin entfernt, die ORC-Proteine dagegen nicht. Repliziertes Chromatin besitzt also nur noch eine Art Protein und ist damit replikationsinaktiv. Die Regeneration der Replikationskompetenz wird in der G<sub>2</sub>-Phase aktiv durch eine Kinase verhindert, die vermutlich die abgespaltenen Proteingruppen phosphoryliert. Es ist jedoch noch nicht ganz klar, ob diese Phosphorylierung die Verdrängung von Chromatin in der S-Phase induziert oder die erneute Bindung an das Chromatin in der G<sub>2</sub>-Phase verhindert.

Das weitere Schicksal des Cdc6p ist nicht bekannt, es könnte ubiquitinvermittelt degradiert werden oder auch an die Kernmembran binden. Die Beschränkung der DNS-Replikation auf eine einzige Runde pro Zellzyklus ist also von der Tatsache abhängig, daß repliziertes Chromatin nur noch eine Art Protein gebunden hat. Die Regeneration der Replikationskompetenz erfordert Veränderungen einer Protein-Kinase-Aktivität, die vermutlich die MCM-Proteine betrifft. In Eukaryoten kann die Zerstörung der G<sub>2</sub>-Kinaseaktivität zu einer zusätzlichen DNS-Replikation führen. Auf diese Weise werden die MCM-Proteine wieder dephosphoryliert und können erneut an das Chromatin binden (CHEVALIER und CHEVALIER, 1997, MIYAKE et al., 1996, SABELLI et al., 1996, SHERMAN und FORSBURG, 1998, STERNER et al., 1998).

Bei *Saccharomyces* ist das Schlüsselenzym für die Initiierung der DNS-Replikation das Genprodukt von Cdc28p, nämlich der Kinase, die für die Phosphorylierung von Cdc6p und der MCM-Proteine verantwortlich ist. Sinkt die Cdc28p-Kinase-Aktivität in der G<sub>2</sub>-Phase ab oder wird *cdc6* überexprimiert, wird die Dephosphorylierung von Cdc6p und den MCM-Proteinen möglich und es können im weiteren Verlauf präreplikative Komplexe beobachtet werden, die zu einer Re-Replikation der DNS führen. In diesem Zusammenhang erscheint es wahrscheinlich, daß Cdc6p nur vor der Aktivierung der Cdc28p-Kinase in der G<sub>1</sub>-Phase an das Chromatin binden kann. Das Anschalten der Kinase induziert die Replikation und blockiert vermutlich die Bildung neuer Präreplikationskomplexe bis hin zur Mitose und damit zusätzliche Replikationsrunden im gleichen Zellzyklus. Ebenfalls wichtig für die Verhinderung einer Zusatzreplikation ist, daß die Integrität der Kernmembran gewahrt bleibt, d.h. daß diese keine Verletzungen, Risse o.ä. aufweist (LOPEZ-GIRONA et al., 1998).

### 2.1.7. Prozeß der Replikation

Für diesen komplexen Vorgang werden die folgenden Enzyme und Proteine benötigt: 1. eine DNS-Gyrase, 2. Proteine zur Trennung der DNS-Stränge an der Replikationsgabel, 3. Proteine, die verhindern, daß die Einzelstränge sich wieder zusammenlagern, bevor sie repliziert wurden, 4. Enzyme für die RNS-Primer-Synthese, 5. eine DNS-Polymerase, 6. ein Enzym, das die RNS-Primer entfernt und 7. ein Enzym, das aufeinanderfolgende Okazaki-Fragmente verknüpft (ALBERTS et al., 1994, , LASKEY et al., 1989, LOEB und KUNKEL, 1982, NAGL, 1976).

#### 2.1.7.1. Eukaryontische DNS-Polymerasen

Eukaryontische DNS-Polymerasen lassen sich aufgrund ihrer intrazellulären Lokalisation, ihrer kinetischen Charakteristika und ihres Verhaltens gegenüber Inhibitoren in  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -DNS-Polymerasen unterscheiden.

Die  $\alpha$ -DNS-Polymerase ist im Nucleus angesiedelt und ist Bestandteil eines 220 kDa-Enzymkomplexes, in dem ebenfalls eine Primase angesiedelt ist. Sie besitzt eine mittlere Prozessivität und ist vermutlich für Priming und Polymerisation wichtig.

Über die DNS-Polymerase  $\beta$  ist nur sehr wenig bekannt. Sie ist ebenfalls im Nucleus lokalisiert und ist möglicherweise in DNS-Reparaturmechanismen involviert.

In Mitochondrien und Chloroplasten findet man dagegen die  $\gamma$ -Polymerase, die hochprozessiv arbeitet. Sie ist lediglich für die Polymerisation zuständig.

Die  $\delta$ -Polymerase gehört zu einem Enzymkomplex aus mehreren Untereinheiten, der für die Leitstrangsynthese verantwortlich ist. Vermutlich besitzt das Enzym auch eine 3'->5'-Exonuclease-Aktivität, die für eine Regulation der Replikation sprechen könnte (ALBERTS et al., 1994, SO und DOWNEY, 1988).

### 2.1.7.2. Der Replikationsmechanismus

Man geht davon aus, daß die DNS-Polymerase an ein ringförmiges Protein gebunden ist, das verhindert, daß sich das Enzym bereits nach der Synthese kurzer Nucleotidsequenzen von der DNS-Matrize ablöst (ALBERTS, 1985, STRUKENBERG et al., 1991).

Die Replikation stellt ein Zusammenspiel der bisher erwähnten Enzyme und Proteine dar und läuft vermutlich nach folgendem Mechanismus ab (s. auch Abb. 2):

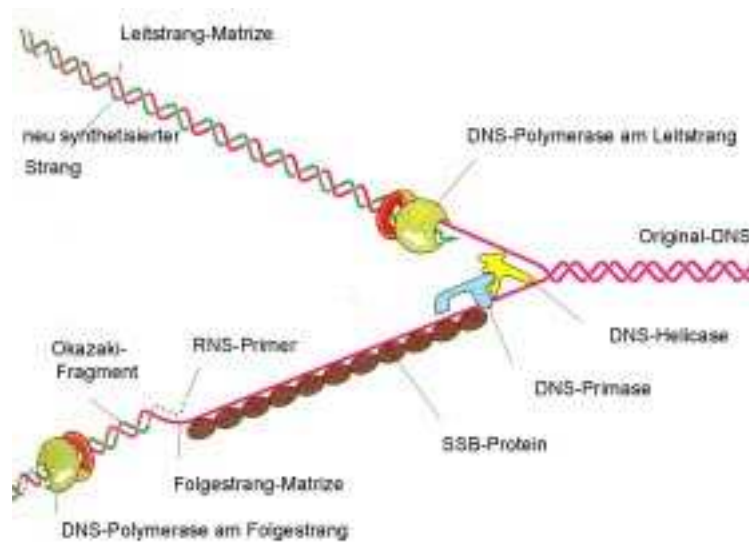


Abb. 2: Mechanismus der Replikation (Aus ALBERTS et al. (1994): Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing Inc.)

Zunächst wird die DNS-Doppelhelix durch Topoisomerasen und Helicasen entwunden und stabilisiert. An der Replikationsgabel binden nun zwei identische Polymerase-Moleküle, von denen das eine den Leitstrang, das andere den Folgestrang repliziert. Während der Leitstrang kontinuierlich durch Anfügen von Nucleotiden verlängert werden kann, muß das Polymerase-Molekül am Folgestrang in kurzen Intervallen unter der Verwendung kurzer RNS-Primer, die von der DNS-Primase bereitgestellt werden, neu mit der Synthese beginnen. Das Primase-Molekül ist dabei direkt an die DNS-Helicase gebunden und bildet mit dem Folgestrang das sog. Primosom, zu dem bei *E. coli* noch mindestens 6 weitere Proteine gehören. Über deren genaue Wirkung ist noch nicht sehr viel bekannt, man geht jedoch davon aus, daß sie die

Fortbewegung des Primosoms, die Entfernung der SSB-Proteine, die Erkennung der Startsequenz für das Priming und die Polymerisation der Ribonucleotide katalysieren. Auf diese Art und Weise kann das Primosom sich mit der Replikationsgabel bewegen und ständig RNS-Primer synthetisieren, die von der DNS-Polymerase für die Bildung von Okazaki-Elementen herangezogen werden. Diese Okazaki-Elemente werden dann von der DNS-Ligase verbunden. Nach Ende der Replikation wird die DNS mit Histonen verpackt (ALBERTS et al., 1994, KORNBERG, 1988a und 1988b, THOMMES und HUBSCHER, 1990).

### 2.1.8. Einfluß von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (CDKs) auf den Ablauf des Zellzyklus

Die wichtigsten regulatorischen Proteine des Zellzyklus sind Cyclin-abhängige Proteinkinasen (CDKs), Cycline und Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (CKIs).

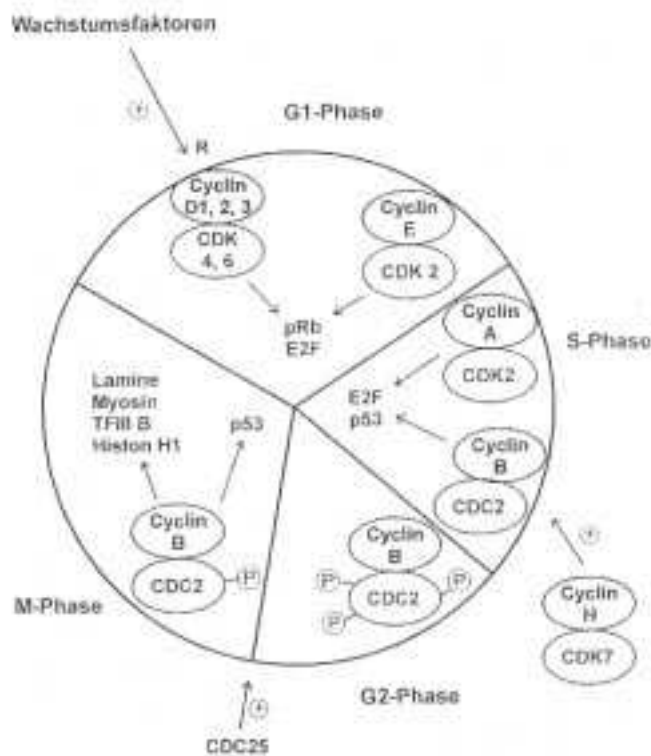


Abb. 3: Substrate und phasenspezifische Aktivierung der CDKs (Cyclin-abhängige Proteinkinasen) im Zellzyklus. Gezeigt ist eine Übersicht über die phasenspezifische Aktivierung der wichtigsten CDK-Cyclin-Komplexe sowie einige ausgewählte Substrate. Die Pfeile geben Aktivierungen bzw. Phosphorylierungen an. CDK: Cyclin-abhängige Proteinkinase, p53: Tumorsuppressor-Protein p53, pRb: Tumorsuppressor-Protein pRb, CDC25: CDC25-Phosphatase, TFIIIB: Transkriptionsfaktor TFIIIB, E2F: Transkriptionsfaktor E2F, R: Restriktionspunkt. (Aus: GLICK und PASTERNAK (1995): Molekulare Biotechnologie, Spektrum)

Wie auch in der Abb. 3 erkennbar, bilden Cycline eine Proteinfamilie, die in verschiedenen Phasen des Zellzyklus eine unterschiedliche Aktivität zeigt und deren Häufigkeit in Phase zum Zellzyklus oszilliert. Man unterscheidet zwei Klassen von Cyclinen: sog. G1-Cycline für die DNS-Replikationskontrolle und die sog. G2-Cycline für die Kontrolle des M-Phase-Eintritts.

Die verschiedenen Typen der Cycline besitzen eine spezifische Bindungsaffinität zu verschiedenen Zellkomponenten, wie z.B. zu bestimmten CDK-Subtypen (CDK=Cyclin-abhängige Proteinkinasen), so daß während des Zellzyklus spezifische Kombinationen von Cyclinen und CDKs beobachtet werden können. Die Hauptaufgabe der Cycline besteht darin, die CDKs, die man sich in einem inaktiven Pool in konstanter Konzentration vorliegend vorstellt, in einen aktiven Zustand zu überführen. Da die CDKs normalerweise im Überschuß zu ihrem Cyclin vorliegen, wird die Menge an aktivierten CDKs durch die Cyclin-Konzentration begrenzt. CDKs besitzen mehrere Bindungsstellen für Proteinkinasen, die nur dann einen aktivierenden oder inhibierenden Einfluß haben können, wenn das zugehörige Cyclin an die CDK gebunden vorliegt. Substrate der CDKs sind beispielsweise der Transkriptionsfaktor E2F, das Tumorsuppressorprotein pRb sowie viele andere Proteine wie z.B. für die Reorganisation des Cytoskeletts, der Kernmembran und der Ausbildung des Spindelapparates. Durch Phosphorylierung bestimmter Gruppen der Substratmoleküle erfolgt deren Aktivierung oder Inhibierung während des Zellzyklus (SEYFFERT et al., 1998).

2.2. Molekularbiologische Aspekte des Einbaus von Fremdgenen in das pflanzliche Genom mit Berücksichtigung der Chromatinorganisation, deren Expression sowie „gene silencing“

2.2.1. Genetische Transformation

Transformation wurde zunächst in Bakterien als erster natürlicher Rekombinationsprozeß beobachtet und ist durch die Freigabe von hochmolekularen DNS-Fragmenten in das umgebende Medium, die Aufnahme der DNS durch kompetente Bakterienzellen mit aktivem Transport durch die Zellwand und –membran und den Einbau in homologe Bereiche des Bakterienchromosoms charakterisiert. Es scheint so zu sein, daß große Moleküle der Donor-DNS von mehreren Rezeptoren der Zellmembran gleichzeitig gebunden und durch diese Bindung bestimmte Erkennungssequenzen aktiviert werden, die dann zur Insertion in das Bakteriengenom führen (SEYFFERT et al., 1998).

## 2.2.2. Transformation von Pflanzenzellen durch *Agrobacterium tumefaciens*

Die Insertion von DNS-Fragmenten in Pflanzenzellen kann über mehrere Verfahren erreicht werden. Am häufigsten und einfachsten ist die Transformation mithilfe von *Agrobacterium tumefaciens* als Genföhre, weiterhin über die Partikelbeschuß-Technik, Elektroporation oder mithilfe von Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  oder Polyethylenglycol bei der Protoplastentransformation (STEINBIß, 1995). An dieser Stelle soll nur die Methode des Gentransfers über *Agrobacterium tumefaciens* betrachtet werden.

### 2.2.2.1. Herkunft und Wirkungsweise von *Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens* ist ein gramnegatives Bodenbakterium, das der Gruppe der Alpha-Purpurbakterien zuzuordnen ist. Die Gattung *Agrobacterium* umfaßt die Arten *tumefaciens* und *rhizogenes*, auf die in einem gesonderten Kapitel eingegangen werden soll, *radiobacter*, *rubi* und *vitis*. Die Einteilung der Arten wurde nach den Unterschieden der Plasmide, der ringförmigen, extrachromosomalen DNS-Fragmente, vorgenommen.

Die Plasmid-DNS ist der extrachromosomale Teil der Gesamt-DNS eines Bakteriums, die für die Forschung von großer Bedeutung ist. Sie umfaßt ungefähr vier Prozent der gesamten DNS des Bakteriums und enthält neben Virulenzgenen die sogenannten Ti-Plasmide (Ti = Tumor inducing), die zwischen den einzelnen Arten durch Konjugation weitergegeben werden und auch ohne Verlust der Überlebensfähigkeit des Bakteriums verloren gehen können.

*Agrobacterium tumefaciens* zeigt einen sehr großen Wirtsbereich. Die Transformation ist bei vielen Angio- und Gymnospermen erfolgreich. Transformationsprobleme traten nur zu Beginn der Forschung bei Getreiden auf (DE CLEENE und DE LEY, 1976). Häufig konnte bei diesen nur eine geringe Transformationsrate beobachtet werden, die inzwischen auf eine inhibierte vir-Gen-Expression zurückgeführt werden konnte. Es scheint, daß die Getreidepflanze, im Besonderen die Wurzel (z.B. bei *Zea mays*), eine spezifische Blockierung der vir-Gene aus *Agrobacterium tumefaciens* als Phytopathogen-Abwehrmechanismus hervorruft und auf dieser Weise die Transformation verhindert (ZHANG et al., 2000). Eine effiziente Transformation von Getreiden ist jedoch trotzdem zu erreichen, wenn meristematische Gewebe, Embryonen oder Zellsuspensionen zur Transformation verwendet werden (ZHANG et al., 1997a+b). Auch Calli, die aus Scutellum-Gewebe (etwa bei *Oryza sativa* L.) induziert wurden, führen zu guten Transformationsergebnissen (HIEI et al., 1997,

VIJAYACHANDRA et al., 1995). Eine weitere Verbesserung der Transformationsrate ist fernerhin durch eine Zugabe von Acetosyringon zum Cokultur-Medium zu erreichen (HIEI et al., 1997, IMANI, 1999).

In der Pflanze löst das nicht-veränderte Ti-Plasmid des *Agrobacterium tumefaciens* sowohl während der primären Wachstumsphase wie auch zum Zeitpunkt des sekundären Dickenwachstums die sogenannten Wurzelhalsgallen-Tumore aus. Dabei ist das Bakterium nur für die Induktion des Tumors, nicht aber die Aufrechterhaltung des Tumorwachstums nötig. *Agrobacterium tumefaciens* muß folglich die Pflanzenzelle so verändern, daß sie zu autonomen Wachstum fähig wird. Dies geschieht über die Induktion der Synthese von Phytohormonen, die in den Metabolismus der Pflanze eingreifen (HOOYKAAS und SCHILPEROORT, 1992, WALDEN und SCHELL, 1990). Die Gene für die Auxin-Synthese *iaaM* und *iaaH*, *aux1* und *aux2* oder *tms1* und *tms2* (Nomenklatur abhängig vom Bakterienstamm) führen dazu, daß in der transgenen Pflanze Tryptophan zuerst in Indol-3-acetamid und dann zu IES umgebaut wird. Die Induktion der Synthese von Cytokininen erfolgt durch die *iptZ* oder *tmr*-Gene (CAMILLERI und JOUANIN, 1991, GAUDIN et al., 1994, GHEYSEN et al., 1998, ZAMBRISKY, 1992). Weitere Gene, die auf der T-DNS lokalisiert sind, die sog. Gene 5 und 6, regulieren ebenfalls auf noch nicht geklärte Weise den Auxin- und Cytokininmetabolismus (GAUDIN et al., 1994, KÖRBER et al., 1991, SPANIER et al., 1989, TINLAND et al., 1990).

#### 2.2.2.2. Der T-DNS Komplex und seine Integration in das Pflanzengenom

Die Pflanzenzelle scheidet nach Verletzungen Stoffe (z.B. Acetosyringon (Tabak), Zimtsäuren, Flavonolglykoside oder andere phenolische Stoffe (Getreide) ) aus, die über Chemotaxis verschiedene Reaktionen im *Agrobacterium* auslösen, die letztendlich zum Transfer der T-DNS führen. Die Gene, die für diesen Transfer notwendig sind, sind außerhalb der T-DNS teilweise in der *vir*-Region, teilweise auch auf dem bakteriellen Chromosom lokalisiert. Der spezifische Kontakt zwischen dem Bakterium und der Pflanzenzelle wird durch die Gene codiert, die sich auf der chromosomalen DNS befinden. Die Produkte dieser Gene (Polymere aus Glucose und Oberflächenproteine) werden ohne auslösende, externe Faktoren exprimiert (SAHI et al., 1990, STACHEL et al., 1986).

Viele Phasen des Integrationsvorganges sind noch unbekannt bzw. ungenügend geklärt. Die bisher bekannten Einzelergebnisse können daher nicht unbedingt zu einem einheitlichen Gesamtbild zusammengefaßt werden.

Es stellt sich die Frage, ob die Integration mithilfe der linken oder rechten Bordersequenz erfolgt. Da man häufig die rechte Bordersequenz nur gering verändert in Pflanzen auffinden kann, wird davon ausgegangen, daß schon die Homologie von fünf bis sieben Basenpaaren genügt, um einen Kontakt der rechten Bordersequenz mit der Pflanzen-DNS herzustellen. Die Abwesenheit oder Zerstörung der rechten Bordersequenz scheint den Beginn der T-DNS-Synthese zu verhindern, die der linken dagegen nicht, da sie offenbar weniger effizient auf die Stimulation der T-Strang-Synthese wirkt (HERMAN et al., 1990, JOOS et al., 1983, WANG et al., 1987). Wahrscheinlich lagert sich das 5'-Ende zuerst an die Pflanzen-DNS in der Nähe der Replikationsgabel an (DE NEVE et al., 1997, GHEYSEN et al., 1987, MAYERHOFER et al., 1991, ROSSI et al., 1993, TINLAND et al., 1992). Durch diesen Vorgang kann es zu internen Umstrukturierungen der Pflanzen-DNS über DNS-reparierende Enzyme (zur Schließung von Lücken und Brüchen) kommen. Diese DNS-Veränderungen sind um so gravierender, je größer das Genom ist (HOHN, 1992, TINLAND et al., 1992) und werden im weiteren Verlauf dieses Kapitels berücksichtigt.

Die linke Bordersequenz ist im Unterschied zur rechten sehr variabel. Dies führt zu der Annahme, daß die Integration der T-DNS durch homologe Rekombination erfolgen kann, wenn in der linken Bordersequenz starke Homologien zu bestimmten Bereichen der Pflanzen-DNS vorkommen.

Erstaunlicherweise ist es prinzipiell möglich, Plasmide oder chromosomale DNS ohne Bordersequenzen in das Pflanzengenom einzubringen, jedoch nur mit einer sehr geringen Transformationsrate von  $10^{-4}$  (HERMAN et al., 1990).

Bei beiden Hypothesen bleibt ungeklärt, wie lange die schützende Proteinhülle erhalten bleibt und ob die T-DNS ihre Integration ins Pflanzengenom selbst steuert oder auf die zellzyklisch wiederkehrende Replikation der Pflanzen-DNS zurückgreift.

Eine weitere Hypothese geht davon aus, daß die bakterielle Produktion von Pflanzenhormonen die DNS-Synthese der Pflanze während des T-DNS-Transfers steuert. Es ist aber auch möglich, daß der T-DNS-Transfer an sich zur Induktion einer Pflanzenzellantwort führt, durch die die anschließende DNS-Synthese, Reparatur oder Rekombination gesteuert wird (FELDMANN, 1992).



Der Transfer der T-DNS erfolgt in einigen Schritten ähnlich wie eine Bakterienkonjugation und benötigt die Funktion der *vir*-Gene. Die Gene der *vir*-Region, die sich aus sechs Operonsystemen (*virA* bis *virG*) zusammensetzt, sind für den Transfer sehr wichtig. Das Genprodukt von *virA* (das Protein VirA) nimmt den Reiz auf und schaltet den Aktivator *virG* ein, der die Transkription von *virB*, *virC*, *virD* und *virE* induziert. Das VirA-Protein ist in der inneren Membran des *Agrobacterium*s lokalisiert (WINANS, 1990, WINANS, 1991) und wirkt wahrscheinlich in homodimeren Zustand als Sensor (PASZKOWSKI, 1994). Vermutlich phosphoryliert das durch Umgebungsfaktoren (phenolische Komponenten, Zucker oder pH-Wert) induzierte VirA-Protein das VirG-Protein, das seinerseits die Kaskade der anderen *vir*-Gen-Produkte induziert. Eine Mutation von *virG* führte bei Tabak zu einem *virA*-unabhängigen, gesteigerten T-DNS-Transfer (HANSEN et al., 1994). Auch der Einsatz eines Konstruktes mit multiplen *virG*-Gen-Kopien in *Agrobacterium tumefaciens* verbesserte den T-DNS-Transfer, somit die Transformationsrate und ebenfalls die transiente Transformation von Karotten- und Selerie-Calli sowie von Reis- und Selerie-Explantaten (LIU et al., 1992).

Über die Aktivierung der Virulenzgene *virD1/virD2* werden Endonucleasen synthetisiert, die an den Bordersequenzen den DNS-Strang des doppelsträngigen Ti-Plasmids aufschneiden, und somit die einsträngige T-DNS freisetzen, die durch die von der DNS-Polymerase neu gebildete, lückenverschließende DNS verdrängt wird (WANG et al., 1987, YANOFKY et al., 1986). T-DNS konnte bei der Cokultur von Protoplasten und *Agrobacterium* schon nach 30 Minuten in den Pflanzenprotoplasten beobachtet werden. Denkbar ist ebenfalls, daß die T-DNS doppelsträngig vorliegen könnte. Rekombinationsexperimente von OFFRINGA et al. (1990) haben bewiesen, daß wenigstens ein Teil der einzelsträngigen T-DNS in doppelsträngige konvertiert wurde, die nicht notwendigerweise in das Pflanzengenom inseriert werden muß.

Möglicherweise besitzt das VirD1-Protein eine Topoisomerase-Aktivität, die allerdings noch nicht empirisch nachgewiesen werden konnte. Die *virD2*-Gene codieren für eine positionsspezifische, Einzelstrang-DNS-aufschneidende Endonuclease, die möglicherweise aktiv am Integrationsprozeß teilnimmt. Man geht davon aus, daß VirD2 die T-DNS mithilfe von VirE2-Proteinen an die DNS-Strangbrüche der Pflanze über Interaktion mit Chromatin-gebundenen Proteinen dirigiert und zudem auch für die Reparatur der Strangbrüche zuständig ist. Somit würde VirD2 eine Endonuclease-Ligase-Aktivität aufweisen und auf diese Art und Weise die nicht-homologe Rekombination unterstützen (VOGEL und DAS, 1992).

Die T-DNS wird von VirD2- und VirE2-Proteinen, die Kernlokalisierungssignale enthalten, durch die die Vir-Proteine an spezifische Porenproteine binden und somit durch die Kernpore

gelangen können, eingehüllt. Dieser Komplex wird durch bestimmte Poren in der Zellwand, die durch VirB-Protein-Einfluß entstehen, in die Pflanzenzelle übertragen. Es ist wahrscheinlich, daß das VirD2-Protein über eine Bindung am Tyrosin 29 am 5'-Ende der T-DNS an der rechten Bordersequenz bis in den Kern der Pflanzenzelle verbleibt (HERRERA-ESTRELLA et al., 1988 und 1990, WARD et al., 1991).

Das VirE2-Protein wird ebenfalls in die Pflanzenzelle eingeschleust, wobei jedoch der T-DNS-Bereich, mit dem VirE2 interagiert, noch ungeklärt ist. Die Bewegung der T-DNS und des VirE2-Proteins ist wahrscheinlich durch die membranständigen Proteine VirB und Vir D4 induziert (STAHL et al., 1998). Es besteht die Hypothese, daß das VirE2-Protein die Zielsequenz im Pflanzengenom erkennt und diese Ziel-DNS für den Fortgang der Rekombination schon durch seine Bindung beginnt zu entspiralisieren. Möglicherweise besitzt das VirE2-Protein auch die Fähigkeit, als Untereinheit der DNS-Polymerase zu agieren, die an die durch den T-DNS-Strang gebildete Replikationsgabel bindet. Die weiteren Schritte der Integration werden durch nicht-homologe Rekombinationsvorgänge bestimmt (CHASE und WILLIAMS, 1986, BIANCHI und RADDING, 1983, DRESSLER und POTTER, 1982).

Weil bisher keine signifikante Homologie zwischen T-DNS-codierenden Regionen und Pflanzen-Kern-DNS festgestellt werden konnte, erscheint es daher unwahrscheinlich, daß die Integration der T-DNS über homologe Rekombination verläuft. Cytologische und DNS-Hybridisierungsstudien von AMBROS (1986) und WALLROTH (1986) haben ergeben, daß die Insertion der T-DNS an zufälligen Chromosomenpositionen erfolgt und normalerweise die T-DNS zwischen den beiden Border-Repeats ins Pflanzengenom integriert wird. Daß die Pflanzen-DNS, die das Insert flankiert, durch den Einbau der Fremd-DNS in Mitleidenschaft gezogen werden kann, liegt auf der Hand. Man beobachtet Deletionen, Umstrukturierungen und Duplikationen der Pflanzen-DNS, die zu passenden, fehlerhaften, direkten oder invertierten Repeats führen können (DE BLOCK und DE BROUWER, 1991, GHEYSEN et al., 1990 und 1991, JORGENSEN et al., 1987, JORGENSEN, 1990, MATSUMOTO et al., 1990).

Nach Forschungen verschiedener Gruppen scheint sich die T-DNS vorwiegend in transkriptionsfähiges, aktives Chromatin zu inserieren (KONCZ et al., 1989 und 1992). Häufig können auch Integrationen in Sequenzen beobachtet werden, die regulatorischen Transkriptionseinheiten benachbart sind (GOLDSBOROUGH und BEVAN, 1991, TOPPING et al., 1991).

Wurde der 35S-Promotor des Blumenkohlmosaik-Virus im Konstrukt verwendet, enthält das T-DNS-Insert zudem viele Kopien regulatorischer Elemente, die nach Einbau zur Aktivierung

der Expression der pflanzlichen Regulator-Gene, die der T-DNS benachbart sind, führen können (HAYASHI et al., 1992).

Ein weiterer Aspekt der T-DNS-Insertion ist die Charakterisierung von bestimmten T-DNS-Insertionsbereichen in das Pflanzengenom. Wahrscheinlich spielen bestimmte Proteine als Bindungsstellen bei diesem Prozeß eine Rolle. Dabei ist es von Bedeutung, ob die T-DNS als einfache Kopie oder als komplexes Insert mit mehreren Kopien vorliegt, da die Pflanzen-DNS sich abhängig von der jeweiligen Form unterschiedlich umstrukturiert (GHEYSEN et al., 1991, MATSUMOTO et al., 1990, MAYERHOFER et al., 1991).

Bei der Integration einer einfachen Kopie in das pflanzliche Genom konnte durch die Bindung der T-DNS an die Pflanzen-DNS die Deletion kurzer T-DNS-Sequenzen (nur einige Nucleotide lang) an beiden Enden der Border-Repeats nachgewiesen werden (MAYERHOFER, 1991). Die entstehenden, verkürzten Sequenzen zeigen eine Homologie mit kurzen Segmenten der Ziel-Pflanzen-DNS, die möglicherweise einen Einfluß auf die Stelle des Bruchs in der T-DNS ausübt. Der Bruch in der Pflanzen-DNS kann aber auch schon vorher aufgetreten sein oder es kann ein Doppelstrangbruch vorliegen. In diesem Fall ist es denkbar, daß beide Enden des T-DNS-Stranges mit diesem Doppelstrangbruch interagieren.

Die T-DNS kann dann präzise in die Bruchstellen der Pflanzen-DNS, die selbst möglicherweise durch die Homologie von Pflanzen- und T-DNS-Basenpaaren an einer bestimmten Stelle induziert werden, eingefügt werden. Dies bedeutet, daß bereits eine partielle Homologie des T-DNS-Stranges zu freien Pflanzen-DNS-Enden ausreicht, um eine Integration vorzunehmen (MAYERHOFER, 1991). Der Prozeß der Integration der T-DNS erfolgt über nicht-homologe Rekombination und ist für einzel- und doppelsträngige DNS gültig (ANDERSON et al., 1984, ANDERSON und ELIASON, 1986, MARVO et al., 1983).

Ist die T-DNS integriert, wird sie über Basenpaarung, Processing und Ligatur mit der Pflanzen-DNS stabilisiert, wobei Lücken im Pflanzen-DNS-Strang über Reparaturmechanismen aufgefüllt werden (MAYERHOFER et al., 1991).

Bei der Mehrzahl der einfach vorliegenden T-DNS-Inserts werden homologe Sequenzen und Deletionen nur am 3'-Ende des T-DNS-Stranges gefunden. Bindungen mit der Pflanzen-DNS am 5'-Ende des T-DNS-Stranges enthalten gewöhnlich nur drei Nucleotide des 25 bp-Borderrepeats, die fest mit dem VirD2-Protein verknüpft sind. (MAYERHOFER et al., 1991).

Demzufolge läßt sich die T-DNS in der Pflanze oft als vollständige Einzelkopie (DEROLES und GARDNER, 1988, SPIELMANN und SIMPSON, 1986), manchmal aber mehrfach hintereinander als Tandem- oder invertierter Repeat angeordnet (DE BLOCK und DE

BROUWER, 1991, DE NEVE et al., 1997, GREVELDING et al., 1993, JORGENSEN et al., 1987) oder auch stark verkürzt nachweisen. Manche Forscher beobachteten eine hohe Frequenz von aberranten T-DNS-Insertionen, bei denen am häufigsten eine oder beide Endsequenzen der T-DNS fehlten (CASTLE et al., 1993, DEROLES und GARDNER, 1988, SPIELMANN und SIMPSON, 1986). Es wurden auch Zersplitterungen der T-DNS in Pflanzen nachgewiesen. Diese Beobachtungen lassen erkennen, daß sowohl während des T-DNS-Einbaus viele Faktoren eine Rolle spielen, daß aber ebenfalls zu einem späteren Zeitpunkt nach der Integration Umstrukturierungen der Pflanzen-DNS mit Deletionen, Rekombination zwischen Repeats, Inversionen, Translokationen und Amplifikationen auftreten können (ALBERTINI et al., 1982, DAS et al., 1990, SELKER, 1990).

Ebenfalls erwähnenswert ist die Tatsache, daß der T-DNS-Strang ein bakterielles Methylierungsmuster zeigt. Deshalb ist es möglich, daß die T-DNS über die Induktion von DNS-Replikations- und Reparaturmechanismen auch die Demethylierung benachbarter Pflanzen-DNS, vielleicht von Repeats, promoviert. Oft wird die T-DNS als hypomethyliert vom pflanzlichen Methylierungssystem erkannt und dieser „Fehler“ durch Methylierung der Sequenz korrigiert. So kommt es zu einer verminderten Expression der T-DNS-Sequenzen (s. auch Kapitel 2.2.4.1.) (HOBBS et al., 1990, JORGENSEN et al., 1987).

### 2.2.2.3. T-DNS-Stabilität und Expression

Die erfolgreiche Anwendung eines Transformationssystems schließt auch die genetische Stabilität der transgenen Pflanze ein. Verschiedene Forschergruppen wiesen nach, daß die T-DNS in ihrer Struktur in den transgenen Pflanzen stabil bleibt und an die Nachkommen weitergegeben wird (DE BLOCK et al., 1984, MÜLLER et al., 1987).

In der Gewebekultur können dagegen häufiger genetische Instabilitäten festgestellt werden (RISSEEUW et al., 1997) als innerhalb verschiedener Generationen von transgenen Pflanzen.

Weitere Probleme stellen die Variabilität der in der transformierten Pflanze synthetisierten Proteine und der Transkriptionslevel dar. Die Konzentration kann sich innerhalb einzelner Transformanten um das 100fache unterscheiden. Diese Variabilität wird häufig auf sog. Positionseffekte zurückgeführt, wobei die Hypothese besteht, daß die Expressionslevels der inserierten Gene direkt durch die strukturellen und funktionellen Gegebenheiten der Pflanzen-DNS in oder an der Region der Insertion beeinflußt werden. Die lokale Chromatinstruktur und das Methylierungsmuster der umgebenden DNS könnten ebenfalls eine Rolle spielen.

Wahrscheinlich existieren auch noch andere Silencing-Mechanismen, die keine oder eine verminderte Expression der inserierten Gene nach sich ziehen. Manchmal kommt es aufgrund einer transienten Genexpression, bei der die Fremd-DNS zwar im Zellkern vorliegt, aber noch nicht ins Pflanzengenom inseriert ist, mit zunehmender Zeitdauer zur Verminderung der Expression, da die nicht integrierte DNS nur solange transkriptionsaktiv ist, bis sie von DNAsen abgebaut wird (BREYNE et al., 1992a, BREYNE et al., 1992b, ELKIND et al., 1995).

Nach der Transformation von *Xenopus*-Oocyten nimmt ein kleiner Teil der Fremd-DNS mithilfe von Histonen eine chromatinartige Struktur an und liegt dann als sog. „Minichromosom“ vor. Somit wird die exogene DNS vor dem enzymatischen Abbau geschützt und für längere Zeit stabilisiert (GURDON und MELTON, 1981, RYOJI und WORCEL, 1985).

Eine besonders gute Genexpression ist bei einer intakten einfach inserierten Kopie zu beobachten, während zusammenhängende multiple Inserts mit großer Häufigkeit ein Silencing bewirken (MEYER, 1995).

### 2.2.3. Chromosomenorganisation

Im Zellkern liegen die Gene nicht in freier Form vor, sondern sind auf einem gemeinsamen Träger nacheinander angeordnet. Zu den Genophoren gehören in der Zelle Chromosomen, Mitochondrien und Plastide. Der Aufbau eines Chromosoms umfaßt gewisse, immer wiederkehrende Strukturkriterien. Die DNS ist mit RNS und Proteinen assoziiert, die in einem konstanten Verhältnis (2:1) zur DNS stehen. Etwa die Hälfte dieser Proteine dient der Verpackung der DNS. Dieser Protein-DNS-RNS-Komplex im Interphasekern wird als Chromatin bezeichnet (SEYFFERT et al., 1998).

Das Chromatin kann auf unterschiedliche Arten verpackt sein, die ineinander überführbar sind, wie im Zellzyklus deutlich wird. Die Grundeinheit des Chromatins ist ein Nucleosom, dessen Aufbau in allen Eukaryonten gleich ist und als unterste Stufe der DNS-Verpackung (mit einer 700fachen Kompaktierung) betrachtet werden kann. Eine weitere Verpackung der DNS wird durch eine schraubenförmige Verdrehung der Nucleosomenelemente zu einer Chromatinfibrille über das Histon H1 erreicht. Sowohl über Histon H1 stark verpacktes Chromatin als auch Chromatin, das in einem noch höheren Verpackungsgrad vorliegt, ist transkriptionsinaktiv (BRITTEN und DAVIDSON, 1969, ELLISTON und MESSING, 1988, GANAL et al., 1988, GRIERSON und COVEY, 1988).

Chromatin liegt in zwei morphologischen Formen, als Eu- und Heterochromatin, vor. Der Gehalt einer Zelle an den jeweiligen Chromatintypen schwankt, da der Verpackungsgrad abhängig vom Aktivitäts- und Funktionszustand der DNS sowie dem Zellentwicklungszustand ist.

**Euchromatin** liegt locker, d.h. ohne Histon H1, verpackt vor, und ist somit zur Transkription fähig. Wenn nötig, kann es jedoch gewebespezifisch reversibel kondensiert werden, um eine funktionelle Repression der Transkription zur regulatorischen Zwecken zu ermöglichen.

Der Begriff **Heterochromatin** wird meist im Sinne von genetisch inaktiv gebraucht. Diese Definition kann allerdings nicht als vollständig betrachtet werden, da auch das Heterochromatin eine gewisse regulatorische Funktion bei der Transkription ausübt. Heterochromatin wird nach BROWN (1966) in zwei Typen eingeteilt: konstitutives und fakultatives.

Unter **konstitutivem Heterochromatin** versteht man nach HEITZ (1929) DNS, die durch einen hohen Anteil an repetitiven, d.h. nicht-codierenden Sequenzen charakterisiert ist, nur wenige eingebaute Gen-Loci besitzt und häufig in Telomer-, Centromer- oder Nucleolus-Organisator-Regionen zu finden ist. Das konstitutive Heterochromatin liegt in allen Zellen eines Organismus in beiden homologen Chromosomen an der gleichen Stelle vor.

Unter **fakultativem Heterochromatin** versteht man größere Teile des Euchromatins, manchmal sogar ganze Chromosomen, die durch dichte Verpackung inaktiviert werden. Damit übt das fakultative Chromatin eine Regulationsfunktion auf die Transkription aus, da prinzipiell transkriptionsfähige DNS in nicht-transkribierbare konvertiert wird. Die Kondensation wird identisch an die Tochterzelle durch sog. „imprinting“ vererbt. Zellen geben also die Information an ihre Nachkommen weiter, welche Bereiche heterochromatisch bleiben müssen (BROWN, 1966, HEITZ, 1929).

Die Replikation erfolgt für das zelleigene Euchromatin vom Beginn bis zur Mitte der S-Phase, für das Heterochromatin von der frühen mittleren bis zum Ende der S-Phase (BRITTEN und DAVIDSON, 1969, ELLISTON und MESSING, 1988, GANAL et al., 1988, GRIERSON und COVEY, 1988, MCCLINTOCK, 1951, WILLMITZER, 1988).

Der Zustand des Chromatins und der die DNS umgebenden Histone spielt eine bedeutende Rolle für die Replikations- und Transkriptionsfähigkeit einer Domäne und ändert sich offenbar im Laufe des Zellzyklus bzw. der Onto- oder Phylogenese. Somit kann eine transkriptionelle

Kontrolle auf molekularer Ebene ausgeübt werden, die von verschiedenen Forschergruppen charakterisiert werden konnte:

BUZEK et al. (1998a) konnten nachweisen, daß das fakultative Heterochromatin bei *Gagea lutea* an den Histonen H4 und H3 unteracetyliert an den Lysingruppen 5, 8 und 12, aber nicht 16, vorlag. Einige Bereiche dieses Heterochromatins, jedoch nicht alle, enthielten hochgradig methylierte DNS. Diese Form der DNS-Modifikation bei blühenden Pflanzen stellt nach Ansicht der Autoren einen transkriptionellen Kontrollmechanismus dar, um epigenetische Informationen der Genexpression zu übertragen. Auch die Lage der Heterochromatin-Domänen veränderte sich im Laufe der Pflanzenentwicklung: In jungen Endospermen von *Gagea lutea* waren die Heterochromatinbereiche in den Nuclei verstreut angesiedelt. Im Laufe der Entwicklung verkleinerten und verdichteten sich die Nuclei, wobei sich die Heterochromatin-Domänen vorwiegend in die Nähe der nucleären Peripherie verschoben (BUZEK et al., 1998b).

Eine Hypoacetylierung der transkriptionell inaktiven, spät-replizierten Heterochromatin-Regionen war ebenso bei *Vicia faba* an den Lysingruppen 5, 8 und 12 festzustellen, hingegen eine Hyperacetylierung für alle Histon H4-Varianten in der transkriptionell aktiven, sog. „nucleolus organizer region“ (NOR) der Metaphase-Chromosomen (BELYAEV et al., 1997).

Während des Alterungsprozesses des Schnittlauchs (*Allium schoenoprasum*) vermindert sich nicht nur der DNS-Gehalt der Nuclei um etwa 15% im Vergleich zu juvenilen Zellen, sondern auch deren Euchromatingehalt. Der Alterungsprozeß beginnt in verschiedenen Geweben in individuellen Zellen, jedoch erst nach einer Induktion durch die Verminderung des DNS-Gehaltes der Nuclei. Somit kann von einem, auf molekularer Basis vorprogrammierten, Alterungsprozeß gesprochen werden (DRUMM und NAGL, 1982).

#### 2.2.4. Verminderte Expression inserierter Fremd-DNS und „gene silencing“ im Rahmen der Genregulation

Häufig wird inserierte DNS in der Pflanze durch verschiedene Mechanismen nicht vollständig oder zum Teil sogar überhaupt nicht exprimiert. Die Möglichkeiten der Intervention einer Zelle sind recht vielfältig. Sie reichen von der Methylierung bestimmter Gensequenzen über Mutationen, Gen-Aberrationen, Rekombination, Positionseffekten bis zu Veränderungen in der Phase der Transkription.

## 2.2.4.1. DNS-Methylierung in Pflanzen

### 2.2.4.1.1. Funktion der DNS-Methylierung

Über die Methylierung bestimmter DNS-Sequenzen am Cytosin- oder Adeninmolekül kann deren Transkription sowohl positiv als auch negativ beeinflusst werden, da auf diese Art und Weise Protein-DNS-Interaktionen verändert werden (FINNEGAN et al., 1998).

Es wurde beobachtet, daß spezifische Methylierungsmuster der DNS an die Tochterzellen vererbt werden (WIGLER et al., 1981), um die Expression bestimmter Regionen zu unterdrücken, daß sich jedoch im Gegensatz dazu das Methylierungsmuster im Laufe der Entwicklung oder auch gewebespezifisch als regulatorische Einheit verändern kann (JOST und SALUZ, 1993). Manche DNS-Bereiche sind nur zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung hypomethyliert und werden dann mit fortschreitendem Wachstum bis zu einer bestimmten prozentualen Rate an den Cytosin-Resten methyliert (ARNHOLDT-SCHMITT, 1993b, ARNHOLDT-SCHMITT et al., 1995, LOSCHIAVO et al., 1989, PASZKOWSKI, 1994). So läßt sich beispielsweise nachweisen, daß der Methylierungsstatus der DNS in jungen Setzlingen bei Tomaten und *Arabidopsis* um etwa 20% niedriger liegt als bei den ausgewachsenen Blättern (MESSEGUER et al., 1991).

Die Veränderungen der Methylierungsmuster auch während der Vernalisation sind ein weiteres Beispiel für die Bedeutung der DNS-Modifikation innerhalb bestimmter Entwicklungsstadien (BURN et al., 1993, DENNIS et al., 1996).

Außerdem bietet die Methylierung einen Schutz gegen Fremd-DNS und einen Mechanismus, die Transposonbildung zu kontrollieren (MEYER und HEIDMANN, 1994, WANG et al., 1996). Es ist denkbar, daß Veränderungen in der Chromatinstruktur –durch Demethylierung, Mutagenese oder Insertion von Fremd-DNS-Sequenzen- zur Induktion einer verstärkten Methylierung führen, um die normale Genomstruktur und den ursprünglichen Methylierungsstatus zu erhalten (FINNEGAN et al., 1996, FINNEGAN et al., 1998).

Durch Methylierung kann aber auch die Bindung regulatorischer Proteine verhindert werden und die Methylierung des Promotors oder codierender Sequenzen kann die Transkription sogar vollständig unterdrücken (JOST und SALUZ, 1993). Eine Hypermethylierung bestimmter DNS-Bereiche führt dazu, daß diese Bereiche eine verminderte Sensitivität für die DNase



aufweisen, die zu einer verminderten oder sogar vollständig unterdrückten Genexpression führt (FINNEGAN, 1998).

Somit stellt der Methylierungsstatus einer Gensequenz eine Form der Genregulation dar (MEYER, 1994, WANG et al., 1996) und ist für die Pflanze essentiell (FINNEGAN et al., 1996, KAKUTANIS et al., 1995, RONEMUS et al., 1996).

#### 2.2.4.1.2. Das Prinzip der DNS-Methylierung im pflanzlichen Genom

Eine Methylierung erscheint bei Pflanzen fast ausschließlich im nukleären Genom. Dort tritt die CH<sub>3</sub>-Modifikation häufig (bis zu 80%) in Sequenzen wie CpG und CpNpG auf und wird auch innerhalb des Zellzyklus an die Tochterzellen weitergegeben (FINNEGAN et al., 1993, FINNEGAN und DENNIS, 1993, GRUENBAUM et al., 1981).

Wie verschiedene Forschergruppen beobachten konnten, erscheint die Methylierung der Cytosinreste sowohl bei natürlich vorkommenden als auch transgenen Pflanzen häufig in nicht-symmetrischen Bereichen der DNS (MEYER und HEIDMANN, 1994, OAKELEY und JOST, 1996, WANG et al., 1996). Hier liegt das Methylcytosin nicht zufällig angeordnet, sondern konzentriert in hintereinandergereihten Repeats vorwiegend um die Centromer-, Telomer- oder Nucleusorganisations-Regionen und inmitten von hochrepetitiven Sequenzen von Retroelementen, die selbst hochmethyliert sind, vor (BENNETZEN, 1996, MATZKE und MATZKE, 1998, SAN MIGUEL et al., 1996).

ARNHOLDT-SCHMITT et al. (1995) untersuchten den Methylierungsstatus des Karottengenoms an Explantaten des sekundären Phloems der Karottenwurzel unterschiedlicher Herkunft und Sorte mithilfe von zwei Restriktionsenzymen (BspNI und EcoRII), von denen ersteres sensitiv für eine methyliert vorliegende Erkennungssequenz war und diese weiter schneiden konnte, das zweite jedoch nicht. Obwohl morphologisch sehr unterschiedliche Sorten gewählt worden waren, wurde die Restriktionsenzym-Erkennungssequenz in analogen Geweben jedoch in gleichem Maße methyliert. Eine gesteigerte Zellteilungsgeschwindigkeit führte, unabhängig von der Wachstumsrate und dem Alter der Gewebe, zu einer Erhöhung der genomischen Methylierung, während die Zugabe von Kinetin zu einer Unterdrückung oder zumindest einer Verzögerung der *de novo*-Methylierung führte. Die Cytokiningaben führten nur dann zu einer Modifikation des Genoms, wenn es sich beim kultivierten Gewebe um Zellen handelte, die

sich in einem dedifferenzierten Zustand befanden. Demzufolge ist die Methylierung des Karottengenoms in erster Linie vom jeweiligen Differenzierungszustand des Gewebes abhängig.

Im Gegensatz dazu scheinen die Beobachtungen von LOSCHIAVO et al. (1989) zu stehen: Sie konnten keine Veränderungen des genomischen Methylierungsmusters bei Karotten durch eine Cytokininapplikation zur Zellsuspension erreichen. Dieses Ergebnis ist insofern erklärbar, daß sich vermutlich in diesen Karottenzellsuspensionen bereits ein stabiles Methylierungsmuster etabliert hatte, das eine Methylierungsrate von 16% der Cytosinreste umfaßte. Insofern konnte durch die Cytokiningaben keine weitere Modulation erreicht werden (ARNHOLDT-SCHMITT et al., 1995).

Der Mechanismus der Methylierung soll im Folgenden beschrieben werden: Das essentielle Enzym für den Methylgruppen-Transfer vom S-Adenosylmethionin auf den Pyrimidinring der Cytosinreste von neureplizierter DNS ist die DNS-Methyltransferase (BILLEN, 1968, LARK, 1968).

Die meisten pflanzlichen Methyltransferasen werden in vegetativen und reproduzierenden Geweben exprimiert, am höchsten ist ihre Expression jedoch in meristematischen Zellen (BERNACCHIA et al., 1998, RONEMUS et al., 1996).

Eukaryotische Cytosin-Methyltransferasen besitzen eine konservierte Struktur mit einer Methyltransferase-Domäne am Carboxylende, die aus 8 Proteinmotiven besteht. In der Regel ist diese Domäne an eine große, regulatorische aminoternale Region fusioniert. Diese Region dient vermutlich dazu, Proteine in die Replikationsgabel im S-Phase-Kern zu dirigieren, und bewirkt eine Methylierung von hemimethylierten DNS-Matrizen (ANIELLO et al., 1996, BERNACCHIA et al., 1998, BESTOR, 1992, BESTOR und TYCKO, 1996, FINNEGAN et al., 1993, KIMURA et al., 1996, YEN et al., 1992).

Man unterscheidet zwei Klassen pflanzlicher Methyltransferasen, die sich in ihrem Aufbau unterscheiden. Die Klasse 1-Methyltransferasen bestehen, wie bereits oben erwähnt, aus einer aminoternalen und einer Methyltransferase-Domäne. Ihr Molekulargewicht beträgt 180 bis 200 kDa. Im Unterschied dazu besteht die Klasse 2-Methyltransferasen nur aus der Methyltransferase-Region und besitzt ein Molekulargewicht von etwa 95 kDa. Bei Karotten treten nur Gene auf, die für die Klasse 1-Methyltransferase codieren (BERNACCHIA et al., 1998).

Man geht davon aus, daß die pflanzlichen Methyltransferasen sich in ihrer Spezifität unterscheiden. Es wurde an verschiedenen Pflanzen gezeigt, daß die Methylierung der Cytosinreste in CpG-Dinucleotiden und CpNpG-Sequenzen eine unterschiedlich Sensitivität gegenüber Methylierungsinhibitoren aufwiesen (PRADHAN und ADAMS, 1995). Daraus wurde gefolgert, daß die Methylierung durch verschiedene Enzyme katalysiert werden muß (KOVARIK et al., 1994).

Beim Methylierungsvorgang wird die DNS in eine Lücke zwischen der katalytischen und der Zielerkennungsdomäne des Enzyms gebunden. Der danach folgende Methyltransfer aus dem S-Adenosylmethionin führt zunächst zu einer Herauslösung des Ziel-Cytosin-Restes aus der DNS-Helix und damit zu einer Schwächung der DNS-Struktur. Anschließend wird im Enzym die Methylgruppe auf das Cytosin übertragen und dieses wieder in die Helix eingebaut (CHENG et al., 1993, KLIMASAUSKAS et al., 1994, REINISCH et al., 1995).

Über Versuche mit Mutanten verdichteten sich die Hinweise, daß außer den Methyltransferasen auch andere Proteine für die DNS-Methylierung benötigt werden (KAKUTANIS et al., 1995, VONGS et al., 1993). Über diese Proteine, ihre Funktion und ihre Wirkungsweise ist allerdings so gut wie nichts bekannt.

Zu Veränderungen im Methylierungsmuster kommt es durch *de novo*-Methylierung oder durch passive und aktive Demethylierung (FINNEGAN et al., 1998). Eine aktive Demethylierung konnte bei Explantaten von *Daucus carota* in bestimmten Entwicklungsphasen beobachtet werden. Explantate, die in Nährlösungen ohne Kinetin kultiviert wurden, zeigten sogar eine vermehrte Demethylierungsrate (ARNHOLDT-SCHMITT et al., 1995). Die Regulation der *de novo*-Methylierung ist nicht geklärt. Häufig werden transgene Elemente durch diese Art der Modifikation inaktiviert, da sich die Methylierung oft nicht bis in die flankierenden Pflanzen-DNS-Sequenzen erstreckt (MEYER und HEIDMANN, 1994, WANG et al., 1996).

### 2.3. rol-Gene und ihr Einsatz : Vorkommen und Wirkungen in Abhängigkeit vom Promotor

#### 2.3.1. Vorkommen

Als rol-Gene werden bestimmte Gen-Sequenzen der T-DNS im pathogenen Bodenbakterium *Agrobacterium rhizogenes* bezeichnet, deren Integration ins Pflanzengenom morphologische und physiologische Konsequenzen nach sich zieht (KONCZ und SCHELL 1986, VILAINE et al., 1987). Das *Agrobacterium rhizogenes* besitzt extrachromosomal das sogenannte Ri-(root inducing)Plasmid, das für eine verstärkte Wurzelbildung bei infizierten Pflanzen verantwortlich ist. Wie bei *Agrobacterium tumefaciens* unterscheidet man die einzelnen *Agrobacterium rhizogenes*-Stämme nach der Art der Opine, die synthetisiert werden. Die Gene für die Opin- und Auxinbiosynthese liegen auf der T<sub>R</sub>-DNS (T-DNS rechts), die Gene bzw. ORF für die Ausprägung des Ri-Phänotyps liegen auf der T<sub>L</sub>-DNS (T-DNS links). Vermutlich ist das synergetische Agieren von T<sub>L</sub>- und T<sub>R</sub>-DNS wichtig, um die Gesamtwirkung der integrierten T-DNS zu gewährleisten (MCINNES et al., 1991).

Die morphologische Ausprägung des Ri-Phänotyps wird jedoch vor allem durch das Zusammenspiel der rol-Gene A, B und C (eventuell auch D) hervorgerufen und soll im weiteren definiert werden (SCHMÜLLING et al., 1988, VILAINE et al., 1987, VAN DER SALM et al., 1996, VAN DER SALM et al., 1997). Unter rol-Genen versteht man Gene mit „root loci“, d.h. Orten für die Wurzelbildung an bestimmten Stellen auf dem Plasmid.

Man unterscheidet die rol-Gene A bis F, die unterschiedliche phänotypische Wirkungen ausüben. Sie führen beispielsweise zu Veränderungen der Pflanzenform, des Wachstums, der Wurzelbildung, Blüte und Fertilität über Mechanismen, bei denen die transformierten Zellen über die T<sub>L</sub>-DNS möglicherweise eine erhöhte Sensitivität für Auxine und deren Wirkung erhalten (CARDARELLI et al., 1985, CARDARELLI et al., 1987).

#### 2.3.2. Der Ri-Phänotyp

Unter dem Ri-Phänotyp oder dem „hairy-root“-Syndrom versteht man die Ausprägung einer definierten Morphologie, die durch die Integration von rolABC in der Pflanze hervorgerufen wird. Man beobachtet eine erhöhte Rhizogenese von Adventiv- und Lateralwurzeln mit einer hohen Wachstumsrate. Die Wurzeln sind lang und dünn und stark verzweigt und besitzen eine

größere meristematische Zone als die Wildtyp-Pflanzen, die durch eine hohe Zellteilungsrate ausgezeichnet ist. Außerdem zeigen die Wurzeln eine sehr große Auxinsensitivität.

Die Pflanzen sind kleiner als der Wildtyp, und häufig kann ein Zwergwuchs beobachtet werden. Sie sind durch verkürzte Internodien-Abstände, den Verlust der Apikaldominanz, Veränderungen von Organen, wie z.B. der Blätter, die klein und faltig sind, Erhöhung der Wurzelmasse und verminderte Fertilität charakterisiert (MENGOLI et al., 1992, OOMS et al., 1985, SPANÓ et al., 1988, TANAKA, 1997, TEPFER et al., 1984). Außerdem kann eine verspätete Blüte und ein verzögertes Ausreifen von Früchten beobachtet werden (OOMS et al., 1986, SUN et al., 1991).

COOKE und WEBB konnten über den Nachweis der GUS-Aktivität in transgenen Pflanzen zeigen, daß die rol-Gen-Wirkung von bestimmten Außenfaktoren abhängig ist. Licht- oder Dunkelphasen spielen offensichtlich bei der Ausprägung des transgenen Phänotyps keine Rolle, jedoch Temperaturschwankungen. Bei Temperaturen unter 15°C wird das Wurzelwachstum bei *Lotus corniculatus* inhibiert und man kann nur noch wenige primäre Lateralwurzeln nachweisen. Liegt die Temperatur über 35°C, wird die Rhizogenese ebenfalls inhibiert und es treten dunkle, dicke Wurzeln auf (COOKE und WEBB, 1997).

Generell kann definiert werden, daß die Kombination der drei rol-Gene, Zweierkombinationen oder auch einzelne rol-Gene in den Hormonmetabolismus und/oder die Hormonsensitivität der Pflanze eingreifen und so auf teilweise noch ungeklärte Weise deren Morphologie und Wachstum modifizieren. Dabei scheint die Kombination aller drei rol-Gene am stärksten in die Pflanzenphysiologie und -morphologie einzugreifen (SPENA et al., 1987).

### 2.3.3. Eigenschaften der rol-Gene

#### 2.3.3.1. Eigenschaften des rolA-Gens

Das rolA-Gen umfaßt einen ORF von 302 bp und codiert ein Proteinmolekül mit 100 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 11 kDa (NILSSON und OLSSON, 1997).

Die Integration des rolA-Gens (codiert über den ORF 10) in eine Pflanze führt zu faltigen Blättern, verkürztem Internodienabstand, Veränderungen des Polyaminstoffwechsels, teilweise auch zu kleinen Blüten, einer verspäteten Blüte und modifizierten Antheren. Es kann

auch eine Induktion des Adventivwurzelwachstums beobachtet werden (SCHMÜLLING et al., 1988, SINKAR et al., 1988, SUN et al., 1991).

Tabakpflanzen, die mit rolA transformiert wurden, wiesen in der Blütezeit eine 100fach erhöhte Auxinsensitivität, gemessen über die Aktivität der Plasma-Membran-H<sup>+</sup>-ATPase, im Vergleich zu den Kontrollpflanzen auf, in der vegetativen Periode wurden jedoch gleiche Enzymaktivitäten beobachtet. Vermutlich hat das rolA-Genprodukt demzufolge eine Wirkung auf die Auxin-Signalübertragung an der Plasmamembran (VANSUYT et al., 1992).

Das einzige konsistente Charakteristikum, das bei allen Pflanzen, die mit rolA transformiert wurden, festzustellen ist, ist die erniedrigte GA<sub>1</sub>-Konzentration in den Blättern der transgenen Pflanzen, die vielleicht –als Sekundäreffekt- den kleinen Wuchs nach sich zieht (NILSSON und OLSSON, 1997).

#### 2.3.3.2. Eigenschaften des rolB-Gens

Das rolB-Gen enthält einen ORF mit 779 bp, der ein Protein mit 259 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 30kDa codiert (NILSSON et al., 1997). Das Protein ist vermutlich an der Plasmamembran lokalisiert (FILIPPINI et al., 1994).

Das rolB-Gen (ORF 11) wird für die Induktion des Wurzelwachstums verantwortlich gemacht (CARDARELLI et al., 1985, CARDARELLI et al., 1987, SPENA et al., 1987) und spielt somit eine wichtige Rolle für die Ausbildung des Ri-Phänotyps. Über rolB wird die Auxinsensitivität auf noch unbekannte Weise (vermutlich durch die Wirkung des RolB-Proteins bei der Auxinwahrnehmung oder Transduktion) erhöht (MAUREL et al., 1991, MAUREL et al., 1994) und außerdem die Auxin-Bindungsfähigkeit von Membranen verstärkt (FILIPPINI et al., 1994). Es wurde fernerhin eine Indoxyl-β-Glucosidase-Aktivität des RolB-Proteins beobachtet, die darauf hinweisen könnte, daß rolB ebenfalls eine Wirkung bei der Synthese aktiver Auxine durch Spaltung von Derivaten hätte (ESTRUCH et al., 1991b). Wie auch das rolA-Gen induziert das rolB-Gen gewöhnlich eine vermehrte Adventivwurzelbildung in der transgenen Pflanze (SCHMÜLLING et al., 1988, SCHMÜLLING et al., 1989).

Allgemein gesehen ist die Wirkung des rolB-Gens auf die Pflanzenmorphologie nicht so eindeutig wie bei anderen rol-Genen. Gewisse Abweichungen vom Wildtyp können aber auch hier in mehr oder weniger ausgeprägter Form beobachtet werden: Betrachtet man die Blätter einer Mutanten, sind diese zwar von normaler Größe, aber oft von abgerundeter oder sogar runder Form (SCHMÜLLING und RÖHRIG, 1995). Der Stiel oder Stamm einer solchen Pflanze

ist häufig dünner (MARIOTTI et al., 1989) oder kürzer als der des Wildtyps, und es konnte auch eine erhöhte Apikaldominanz beobachtet werden (VAN ALTVORST et al., 1992).

Wie ALTAMURA und SCHMÜLLING nachweisen konnten, wird rolB hauptsächlich in teilungsaktiven Geweben und im vaskulären System ausgewachsener Organe exprimiert (ALTAMURA et al., 1991, SCHMÜLLING et al., 1988, SCHMÜLLING et al., 1989).

#### 2.3.3.3. Eigenschaften des rolC-Gens

Das rolC-Gen enthält einen ORF von 539 bp und codiert ein 180 Aminosäuren-umfassendes Protein mit einem Molekulargewicht von 20kDa (NILSSON et al., 1997).

Wie auch das rolB-Gen wird rolC (ORF 12) in starkem Maße für die Ausbildung des Ri-Phänotyps verantwortlich gemacht. Sein Genprodukt, eine Cytokinin- $\beta$ -Glucosidase, die freies Cytokinin aus Glucosid-Konjugaten spalten kann, scheint einen cytokininähnlichen Effekt auf die Ausbildung eines buschigen Phänotyps zu haben, der sich besonders in einer verminderten Apikaldominanz, kurzen Internodienabständen und einer kleinen Größe der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp manifestiert. Trotz einer normalen Photosyntheserate kommt es offenbar zu einem verlangsamten Wachstum der Pflanze (ESTRUCH et al., 1991a, ESTRUCH et al., 1991c, SCHMÜLLING et al., 1989, SCORZA et al., 1994). Außerdem weisen die transgenen Pflanzen oft einen verminderten Chlorophyllgehalt auf und haben zum Teil hellgrüne oder durchscheinende, lanzettförmige Blätter. Diese Beobachtungen stehen zwar im Widerspruch zu der o.g. Cytokinin-Wirkung, konnten aber bisher von den Autoren nicht erklärt werden (ESTRUCH et al., 1991a, ESTRUCH et al., 1991c, SCHMÜLLING et al., 1989, SCORZA et al., 1994). Es konnte außerdem – den Phytohormonmetabolismus betreffend – festgestellt werden, daß rolC nicht nur auf die Cytokininsynthese bzw. den Cytokininhaushalt Einfluß nimmt, sondern daß bei transgenen Pflanzen von Tabak und Pappeln eine Down-Regulation des GA-Metabolismus bewirkt wird. Dies scheint sich in beiden Spezies über die Inhibierung der Konvertierung von GA<sub>19</sub> zu GA<sub>20</sub> zu manifestieren (NILSSON et al., 1993).

Betrachtet man den Einfluß von rolC auf die Wurzelbildung, kann eine verminderte Lateralwurzelbildung, jedoch eine Stimulation des Adventivwurzelwachstums, allerdings in geringerem Umfang als durch rolB induziert, beobachtet werden (SCHMÜLLING et al., 1993).

Unter seinem eigenen Promotor wird das rolC-Gen vor allem im Wurzelphloem, Stielen und Blättern exprimiert (SCHMÜLLING et al., 1993), wobei sein Genprodukt vorwiegend im Cytosol lokalisiert ist (ESTRUCH et al., 1991a, ESTRUCH et al., 1991c).

#### 2.3.3.4. Eigenschaften der Kombination von rolABC

Die Transformation einer Pflanze mit rolABC, d.h. allen drei rol-Genen zusammen, bewirkt den morphologisch am stärksten sichtbaren Effekt, der auch als Ri-Phänotyp bezeichnet wird. Es konnte sowohl ein sehr stark erhöhtes Wurzelwachstum durch Erhöhung der Bewurzelungseffektivität und -kapazität als auch gleichzeitig eine stark erhöhte Auxinsensitivität festgestellt werden. Die Pflanzen sind kleiner mit einer verminderten Apikaldominanz, geringeren Internodienabständen und schmalen Blättern (MENGOLI et al., 1992, OOMS et al., 1985, OOMS et al., 1986, SPANÓ et al., 1988, SUN et al., 1991, TANAKA, 1997, TEPFER et al., 1984).

#### 2.3.3.5. Eigenschaften des rolD-Gens

Das rolD-Gen beinhaltet einen ORF von etwa 1000bp, der ein Protein mit 344 Aminosäuren codiert (NILSSON und OLSSON, 1997).

Das rolD-Gen (ORF 15) und seine Funktion gehört zu den am wenigsten erforschten rol-Genen. Wahrscheinlich wirkt rolD als eine Art transportabler Faktor, der eine verfrühte Organogenese der Blüten und eine frühe Blüte induziert (COSTANTINO et al., 1994). Transkripte des rolD-Gens wurden vor allem in Wurzeln gefunden (LEACH und AOYAGI, 1991). Vermutlich wird es abhängig vom Entwicklungsstadium exprimiert, besonders in der Zeit der Elongations- und Reifungsphasen verschiedener Gewebe (TROVATO et al., 1997).

#### 2.3.4. Wirkungen der rol-Gene beim Einsatz unterschiedlicher Promotoren

Um die pleiotropischen Effekte der rol-Gene besser isolieren zu können, wurden viele Experimente mit nur einem rol-Gen und einem bestimmten Promotor, der ebenfalls einen wichtigen Einfluß auf die Merkmalsausprägung haben kann, durchgeführt.



#### 2.3.4.1. Der 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus

Der 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus (cauliflower mosaic virus =CAMV) besitzt eine Länge von ca. 400 bp und führt *per se* in Virus-infizierten Pflanzenzellen zu einer hohen, konstitutiven Expression viraler Gene, die für eine 35S-RNS codieren (GUILLEY et al., 1982). Koppelt man den 35S-Promotor an ein Markergen, beispielsweise GUS, und wird dieses Konstrukt stabil in ein Pflanzengenom inseriert, so läßt sich eine starke Expression des Markergens in vielen Zellen beobachten. Der 35S-Promotor stellt somit einen relativ unspezifischen, in Pflanzen mehr oder weniger uneingeschränkt wirksamen Promotor dar (JEFFERSON, 1987).

##### 2.3.4.1.1. rolA

Wie DEHIO und SCHMÜLLING zeigen konnten, führt eine Transformation mit rolA und dem 35S-Promotor zu kleinen und verkrüppelten Tabakpflanzen, die ein retardiertes Wachstum und dunkle, faltige Blätter aufweisen (DEHIO et al., 1993, SCHMÜLLING et al., 1988). Außerdem induziert rolA auch die Rhizogenese (SPENA et al., 1987).

Auch in Bezug auf die Blüte wurden verschiedene transgene Pflanzen analysiert. Tabak- und Tomatenpflanzen entwickelten sich nach der Transformation drei bis vier Wochen später als die Kontrolle keine oder kleine Blüten in verminderter Anzahl mit veränderten Petalen und Antheren, die in ihrer Fertilität stark herabgesetzt waren. Die Pollenproduktion und Pollenüberlebensfähigkeit waren stark vermindert (DEHIO et al., 1993, SCHMÜLLING et al., 1988, SUN et al., 1991). DEHIO (1993) folgerte, daß multiple gewebespezifische Veränderungen der Phytohormonkonzentration die Konsequenz der Integration des rolA-Gens in die Pflanze sind, da neben den genannten morphologischen Aspekten auch starke Veränderungen des Gibberellins A1 (signifikant erniedrigt) und der Cytokinine (verminderte Konzentration) vorliegen.

Am deutlichsten konnten die genannten Effekte für das rolA-Gen unter dem 35S-Promotor beobachtet werden (GUIVARCH et al., 1996, NILSSON und OLSSON, 1997).

#### 2.3.4.1.2. rolB

SPENA konnte nachweisen, daß es beim Einbau von rolB unter dem 35S-Promotor zur Induktion der Rhizogenese kommt. Allerdings ist die Kombination von rolB mit rolA oder rolB mit rolC wirksamer als das Gen allein (SPENA et al., 1987).

Das rolB-Gen zeigt auch Wirkung während der Blüte und führt bei transgenen Tabakpflanzen zu einem verstärkten Griffelwachstum, außerdem können runde und nekrotische Blätter beobachtet werden (SCHMÜLLING et al., 1988).

#### 2.3.4.1.3. rolC

FLADUNG konnte an Kartoffelpflanzen beobachten, daß diese eine erhöhte Knollenanzahl pro Pflanze hervorbrachten, wenn man sie mit dem rolC-Gen unter dem 35S-Promotor, der vor allem in Sproß und Knolle exprimiert wurde, transformiert hatte. Die Knollen waren länger, hatten eine größere Anzahl von Augen, einen reduzierten Glucose-, aber einen erhöhten Fructose-Gehalt. Dies spricht für einen hormonellen Einfluß des rolC-Genproduktes auf die Kohlenhydratzusammensetzung in der Pflanze. Insgesamt betrachtet war der Gesamtertrag jedoch geringer als beim Wildtyp und zeigte eine negative Korrelation zur rolC-Expression (FLADUNG et al., 1993).

Das rolC-Gen wurde in Tabakpflanzen unter dem 35S-Promotor im Gegensatz zum eigenen Promotor stark in Blättern exprimiert. Dies führte dann vermutlich zur Ausbildung einer verminderten Apikaldominanz und einem verkürzten Internodienabstand sowie einer Erhöhung der Sproßanzahl und der Genese kleiner, lanzettförmiger, hellgrüner Blätter und damit insgesamt zu einem buschig aussehenden Phänotyp (SCHMÜLLING et al., 1988). Ähnliche Ergebnisse erzielte KURIOKA bei *Atropa belladonna* und KAENDLER bei *Solanum tuberosum* und *Solanum papita* (KAENDLER et al., 1996, KURIOKA et al., 1992). SCHMÜLLING untersuchte außerdem die Phytohormonkonzentrationen bei rolC-transformierten Pflanzen und stellte fest, daß die Isopentenyladenin-, Dihydrozeatin-Ribosid- und die trans-Zeatin-Ribosid-Cytokinin-Konzentrationen erhöht waren. Außerdem stellte NILSSON fest, daß der rolC-abhängige Zwergwuchs möglicherweise in einer Beziehung zur Verminderung des Gibberellin A1-Gehaltes steht (NILSSON et al., 1993, NILSSON et al., 1996, SCHMÜLLING et al., 1993). Auch die ABA-Konzentration war verändert (KAENDLER et al., 1996).

Außerdem wiesen die Pflanzen ein verstärktes Wurzelwachstum auf, das sogar noch stärker als das mit dem eigenen Promotor induzierbar war (SPENA et al., 1987). Die Pflanzen zeigten eine verfrühte Blüte mit kleinen Blüten. Außerdem war die Pollenüberlebensfähigkeit herabgesetzt, teilweise sogar durch schwere Pollenproduktionsstörungen bis hin zur Infertilität (KURIOKA et al., 1992, SCHMÜLLING et al., 1988, SCORZA et al., 1994).

#### 2.3.4.1.4. rolABC

Wie bereits erwähnt, sind Kombinationen verschiedener rol-Gene wirksamer in Bezug auf die Ausbildung des Ri-Phänotyps als einzelne rol-Gene. SPENA und SCHMÜLLING konnten nachweisen, daß beim Tabak nur die Kombination der drei rol-Gene zum erwünschten phänotypischen Ergebnis des „hairy-root“-Typs führten (SPENA et al., 1987, SCHMÜLLING et al., 1988). Gleiche Beobachtungen machten auch VILAINE (ebenfalls bei Tabak) und AMSELEM (mit Gurken), die nachweisen konnten, daß die T<sub>L</sub>-DNS die Rhizogenese ohne exogene Phytohormonzufuhr induziert (AMSELEM und TEPFER, 1992, VILAINE et al., 1987). Das rolABC-Gen scheint bei *Atropa belladonna* zu einer verstärkten Alkaloidproduktion bei einer vermehrten Wurzelbildung zu führen (BONHOMME et al., 2000).

Es konnte fernerhin beobachtet werden, daß rolABC zwar die Wurzelbildung beeinflusst, daß aber vermutlich die T<sub>R</sub>-DNS über die aux-Gene für ein vermehrtes Wurzeldickenwachstum und ein vermindertes Längenwachstum verantwortlich ist. Dabei besteht offensichtlich keine Korrelation zwischen Phänotyp und inserierter Kopienanzahl (AMSELEM und TEPFER, 1992).

#### 2.3.5. Der eigene Promotor

##### 2.3.5.1. rolA

Der rolA-Promotor ist ein Promotor, der im Samen inaktiv ist und erst bei Beginn der Keimung in den Kotyledonen und in der Elongationszone der Wurzel auf noch ungeklärte Weise aktiviert wird. Während der vegetativen Periode und der Blütephase bleibt er aktiv. Vermutlich setzt sich der rolA-Promotor aus drei Untereinheiten (Domäne A, B und C) zusammen. Die Bedeutung der Domäne A ist bisher unbekannt, Domäne B und C induzieren die Ausbildung faltiger Blätter und kurzer Internodienabstände. Domäne B und C sind

vorwiegend im Stielgewebe, teilweise auch in den Blättern aktiv. Man geht davon aus, daß der aktive Promotor dazu führt, daß die an den transgenen Zellen lokalisierten, umgebenden Parenchymzellen nur eine verminderte Größe ausbilden können. Möglicherweise spielt bei diesem Prozeß ein noch unbekannter diffusibler Faktor des Promotors eine Rolle (GUIVARC'H et al., 1996).

SERINO konnte bei der Transformation mit dem rolA-Gen unter der Kontrolle des eigenen Promotors eine gewebespezifische Expression des Gens in Blättern und Stielen, z.T. auch im Wurzelapex nachweisen. Vermutlich ist der Promotor nicht auxinsensitiv (SERINO et al., 1994).

Die Arbeitsgruppe um ALTABELLA transformierte Blattsegmente von *Nicotiana tabacum* und konnte eine signifikante Erhöhung des Polyamingehaltes der induzierten Tabakwurzeln sowohl in der freien als auch der gebundenen Fraktion durch die Transformation mit rolA feststellen. Im Gegensatz dazu ergab sich bei gleicher Transformation mit dem 35S-Promotor keine Veränderung (ALTABELLA et al., 1995).

#### 2.3.5.2. rolB

Der rolB-Promotor scheint normalerweise im Phloem, Phloemparenchym und Wurzelspitzen aktiviert zu werden (NILSSON et al., 1997), kann aber während des Beginns der Lateralwurzelbildung auch in den Strahlencellen des Phloems und in der Kambiumzone des Stiels gefunden werden (NILSSON et al., 1997). Der Promotor kann durch Auxine aktiviert werden (MAUREL et al., 1994).

Die Expression des rolB-Gens ist bei transgenen Tabakpflanzen vorwiegend in meristematischen Zellen, im Protoderm und der Wurzelhaube nachweisbar (SERINO et al., 1994). In Karotten-Explantaten konnte die Induktion vermehrten Wurzelwachstums beobachtet werden, das jedoch in der Ausprägung des Ri-Phänotyps hinter der Transformation mit rolABC lag (CAPONE et al., 1989).

#### 2.3.5.3. rolC

Der rolC-Promotor wird besonders in den das Phloem umgebenden Zellen aktiviert (GUIVARC'H et al., 1996, NILSSON et al., 1996), aber auch vor und nach der Lateralwurzelinitiation in manchen Gruppen der Perizykelzellen und bei der Bildung von Adventivwurzeln (NILSSON et al., 1997). Der Promotor kann stark durch Saccharose-Gaben moduliert werden (NILSSON et al., 1996).

Im Unterschied zu den Transformationen mit dem 35S-Promotor scheint das rolC-Gen nur schwach in allen Organen exprimiert zu werden (KURIOKA et al., 1992). Lediglich die Expression im Phloem war signifikant (SCHMÜLLING et al., 1989).

#### 2.3.5.4. rolABC

Auch bei der Verwendung der eigenen Promotoren ist das rolABC-Gen besonders wichtig für die Ausbildung des Ri-Phänotyps. Man beobachtet eine hohe Wurzelwachstumsrate und eine starke Verzweigung der langen, dünnen Wurzeln (ALTABELLA et al., 1995, CAPONE et al., 1989).

Obwohl sich bereits viele Forschergruppen mit dem Thema der genetischen Transformation von Pflanzen in den verschiedensten Bereichen auseinandergesetzt haben, fehlt bisher die Betrachtung eines Zusammenhanges zwischen dem Zeitpunkt der Transformation des Pflanzenmaterials mit *Agrobacterium tumefaciens* und der möglichen morphologischen und molekularbiologischen Auswirkungen für die transgene Pflanze.

Wie aus der Literatur bekannt, erfolgt bei der Transformation die Insertion der exogenen Gensequenzen ungerichtet und in eine willkürliche Position des Pflanzen-Genoms über eine nicht-homologe Kombination vorwiegend, aber nicht ausschließlich, während der DNS-Replikationsphase des Zellzyklus in transkriptionsaktives Chromatin (DEROLES und GARDNER, 1988, KONCZ et al., 1989 und 1992, OTTEN et al., 1981, PETIT et al., 1986, VERGUNST und HOOYKAAS, 1998, WALLROTH et al., 1986). Weil jedoch bei Zellzyklus-Studien nachgewiesen werden konnte, daß auch außerhalb der S-Phase DNS-Amplifikationen auftreten können (ARNHOLDT-SCHMITT, 1993a und 1995, ARNHOLDT-SCHMITT et al., 1995),

kann davon ausgegangen werden, daß auch zu anderen Zeitpunkten im Zellzyklus eine Insertion von exogener DNS in das Pflanzengenom erfolgen könnte.

Das Ziel dieser Arbeit soll es also sein, mithilfe eines Versuchssystems, das eine frühe visuelle Bonitur der zu erwartenden morphologischen Veränderungen ermöglicht, eine zellzyklussynchronisierte Karotten-Zellsuspension zu verschiedenen Zeitpunkten im Zellzyklus zu transformieren (auch außerhalb der S-Phase) und somit einen gerichteten Einbau der Fremd-DNS zu erreichen. Der Einsatz von rol-Genen führt nach Literaturangaben (s.o.) nach Transformation zu transgenen Pflanzen, die sich, bei Verwendung der Kombination rolABC, durch eine spezifische Morphologie auszeichnen, dem sog „hairy-root“-Syndrom. Man beobachtet neben einer erhöhten Rhizogenese eine sehr große Auxinsensitivität der Wurzeln, verkürzte Internodien-Abstände, den Verlust der Apikaldominanz und Veränderungen von Organen, wie z.B. der Blätter (MENGOLI et al., 1992, OOMS et al., 1985, SPANÓ et al., 1988, TANAKA, 1997, TEPFER et al., 1984). Die Verwendung der rol-Gen-Kombination mit jeweils eigenen Promotoren erscheint deshalb am sinnvollsten, weil die Verwendung einzelner rol-Gene offensichtlich zu weniger spezifischen morphologischen Veränderungen führt (BONHOMME et al., 2000, MARIOTTI et al., 1989, SPENA et al., 1987, SCHMÜLLING et al., 1988 und 1995).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Anzucht der Pflanzen

Alle Versuche wurden mit der Karottensorte *Daucus carota* L. Rotin (aus dem Samenhandel) durchgeführt.

Der Karottensamen wurde zur Oberflächensterilisation 1 Minute in 70%igem Ethanol belassen und anschließend 1 Stunde unter Rühren mit einem Magnetrührer mit einer 1 : 1,5 verdünnten Natrium-Hypochloridlösung (ca. 7% aktives Chlor) und einem Tropfen Tween 80 behandelt. Unter sterilen Bedingungen wurde der Karottensamen anschließend mehrmals mit sterilem Aqua dest. gewaschen und auf einem B<sub>5</sub><sup>-</sup>-Agar-Medium ausgelegt. Die Samen wurden dann für 14 Tage bei 28°C und einer Dauerbeleuchtung von ca. 4000 Lux (Osram, Lumilux white) kultiviert.

#### 3.2. Gewebekultur

##### 3.2.1. Kulturbedingungen

Die in vitro-Kultur erfolgte bei allen Versuchen bei 28°C und einer Dauerbeleuchtung mit ca. 4000 Lux (Osram, Lumilux white). Die Pflanzen, die durch somatische Embryogenese entstanden waren, wurden bei den gleichen Kulturbedingungen aufgezogen.

Zur Kulturnahme der Pflanzen bzw. der Suspensionen wurden neben Erlmeyerkolben (100 bis 250 ml) auch Tuben (für 15 ml Nährlösung) verwendet. Für Festkulturen mit Agar wurden „Babynahrungsgläschen“ mit 50 ml Medium benutzt. Die Gefäße wurden mit 3lagiger Aluminiumfolie verschlossen.

Die Kultivation der Zellsuspensionen erfolgte auf einer Schüttelplatte mit 90 UpM, der Tuben in einem von NEUMANN nach STEWARD, CAPLIN und MILLAR (1952) modifizierten Auxophyton mit 1 UpM unter den o. g. Bedingungen.

### 3.3. Nährmedien

Es wurden bei allen Versuchen zwei Nährmedien benutzt, die sich lediglich in der Verwendung von 2,4-D unterschieden. Es handelte sich dabei um B<sub>5</sub>-Nährmedien, die von SCHÄFER et al. (1988) nach GAMBORG et al. (1968) modifiziert wurden und die im Folgenden in ihrer Zusammensetzung dargestellt werden sollen: Die Medien wurden zur späteren Verwendung vollständig angesetzt und auf einen pH-Wert von 5,70 bis 5,75 eingestellt. Anschließend wurden die Medien im Autoklaven bei 121°C und 1,1 bar für 40 Minuten sterilisiert.

Zusammensetzung gebrauchsfertiger B<sub>5</sub> – Medien (Angaben für 1 l Kulturmedium\*)

| Nährmedium                      | B <sub>5</sub> <sup>+</sup> | B <sub>5</sub> <sup>-</sup> |
|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Saccharose (g)                  | 20                          | 20                          |
| Caseinhydrolysat (mg)           | 250                         | 250                         |
| Stammlösung B <sub>5</sub> (ml) | 100                         | 100                         |
| Fe-Lösung (ml)                  | 10                          | 10                          |
| Mg-Lösung (ml)                  | 7                           | 7                           |
| Vitamin-Lösung (ml)             | 1                           | 1                           |
| Inosit-Lösung (ml)              | 10                          | 10                          |
| 2,4-D-Lösung (ml)               | 5                           | 0                           |
| Gelrite (g)                     | 4,2                         | 2,2                         |
| pH-Wert                         | 5,70-5,75                   | 5,70-5,75                   |

\* ad 1 l Aqua dest.



Die für die unterschiedlichen Nährmedien angegebenen Lösungen setzen sich wie folgt zusammen :

**Stammlösung B<sub>5</sub>** (modifiziert von SCHÄFER et al. (1988) nach GAMBORG et al. (1968))

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Makroelemente</b>                                  | g/l *       |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O | 1,5         |
| KNO <sub>3</sub>                                      | 30,00       |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>       | 1,34        |
| MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                | 5,00        |
| CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O                | 1,50        |
| <b>Mikroelemente</b>                                  | mg/l *      |
| MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O                  | 100,00      |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                        | 30,00       |
| ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                | 20,00       |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O  | 2,50        |
| CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O                | 0,25        |
| KJ  | 7,50        |
| <b>Fe-Lösung</b>                                      | g/l *       |
| Fe-EDTA   | 4,63        |
| <b>Mg-Lösung</b>                                      | g/l *       |
| MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O                | 36,00       |
| <b>Vitamin-Lösung</b>                                 | mg/100 ml * |
| Nikotinsäure  | 50,00       |
| Thiamin   | 10,00       |
| Pyridoxin   | 10,00       |

**Hormonlösungen**

|                                     |                    |                 |
|-------------------------------------|--------------------|-----------------|
| Myo-Inosit                          | 500,00 mg/100 ml * |                 |
| 2,4-D (in reinem Ethanol vorgelöst) | 100,00 mg/100 ml * | * ad Aqua dest. |

## **Frische Kokosnußmilch**

Einige Kokosnüsse wurde aufgestochen und das flüssige Endosperm durch einen Faltenfilter filtriert. Das Filtrat wurde autoklaviert, durch einen Blaubandfilter unter Vakuum abgenutscht und in Portionen eingefroren. Es wurden je 10 Volumen% Kokosnußmilch zur Nährlösung zugesetzt.

### 3.4. Suspensionskulturen

Von den steril angezogenen Pflänzchen wurden die Blattlamina sowie das Hypokotyl und die Wurzeln steril entfernt und die Petiolen in ca. 1 cm lange Stücke geschnitten. Anschließend wurden die Petiolen als Schutz vor dem Eintrocknen in sterilem Aqua dest. aufbewahrt. Danach wurden 5-6 Petiolenstücke in je eine Tube mit 15 ml  $B_5^+$ -Nährlösung (d.h. mit 0,5 ppm 2,4-D) gegeben und für etwa 3-4 Wochen kultiviert. Nach dieser Zeit konnte die in den Tuben gebildete Zellsuspension in eine Flüssigkultur im Erlmeyerkolben (250 ml) mit  $B_5^+$ -Medium überführt werden.

Um eine Suspensionskultur aufrecht zu erhalten, war ein 14tägiger Austausch des Nährmediums ausreichend. Dafür wurde die Zellsuspension durch ein handelsübliches Kaffeesieb gesiebt, im Becherglas absetzen lassen. Das alte Nährmedium wurde abdekantiert, die verbleibenden Zellen wurden in einen Erlmeyerkolben mit neuer Nährlösung überführt.

Zu Versuchszwecken war dieser Ansatz jedoch nicht ausreichend genau. Die Stammkulturen für Experimente wurden aus den oben beschriebenen Erhaltungskulturen hergestellt. Dazu wurden die Zellen steril durch ein 90µm Nylonsieb gestrichen, nach der Sedimentation abdekantiert und in ein graduiertes, konisches Zentrifugenglas pipettiert und mit Aluminiumfolie und Nescofilm verschlossen. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 300 g (HAEREUS-CHRIST-Zentrifuge) konnte das „packed cell volume“ (pcv) in ml abgelesen werden. Diese Zellen wurden in einen Erlmeyerkolben mit neuem  $B_5^+$ -Medium in einer Endkonzentration von 5% einpipettiert (d.h. 5 ml Zellen/100 ml Nährlösung).

Die Stammkulturen wurden alle 14 Tage nach dem genannten Verfahren subkultiviert, meist wurde die Stammkultur vor Versuchsbeginn 2 bis 3 mal umgesetzt.

Für die Versuche selbst wurde eine in  $B_5^+$  kultivierte Stammkultur nach 6 bis 14 Tagen nach der letzten Subkultur durch ein 90 µm Nylonsieb gestrichen, wobei die Zellen mit neuer

Nährlösung nachgewaschen wurden. Nach dem Sedimentieren wurde die alte Nährlösung abdekantiert, die übrig bleibenden Zellen in ein graduiertes, konisches Zentrifugenglas pipettiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 300 g (HAREUS-CHRIST-Zentrifuge) wurde das Zellvolumen abgelesen. Die Suspension wurde in 100 ml-Erlmeyerkolben mit  $B_5^+$  jeweils auf ein bestimmtes pcv eingestellt.

Im Falle der weiteren Kultivation der Zellen in  $B_5^-$  wurde das abgenommene Sediment geteilt und jede Variante 3 mal mit  $B_5^-$  durch Zentrifugation gewaschen. Nach Aufnehmen des Sedimentes wurde das pcv bestimmt und eingestellt.

Die Kultivierung im Erlmeyerkolben erfolgte für die Vermehrungsphase in  $B_5^+$ -Medium mit Zellen, die in einer Endkonzentration von 2,5 ml/100 ml Medium vorlagen. Für die Realisierungsphase der somatischen Embryogenese in  $B_5^-$ -Medium wurden Karottenzellen in einer Endkonzentration von 0,5 ml/100 ml Medium kultiviert (GRIEB, 1991/2, NEUMANN und GRIEB, 1992).

### 3.5. Synchronisation der Karottenzellsuspension

Zur Synchronisation des Zellzyklus durch 5-Fluoro-2'-Desoxy-Uridinmonophosphat (FdU) ist es möglich, die Zellen vor der S-Phase zu arretieren und sie dort zu akkumulieren, da FdU die Bildung von dTMP über die Hemmung der Thymidilatsynthase verhindert und damit die DNS-Replikation inhibiert. Der Zellzyklus wird durch Zugabe von 2'-Desoxy-Thymidin wieder angeregt und der Eintritt in die S-Phase initiiert, in der sich die Zellen dann synchron teilen (HARBERS, 1964). In Vorversuchen wurden die geeigneten FdU- und Thymidinkonzentrationen ermittelt und die Lösungen vor der Zugabe in die Suspension über Rotrandfilter (0,2  $\mu$ m, Firma SCHLEICHER und SCHÜLL) sterilfiltriert.

Jeweils am 5. Tag nach der Subkultivierung einer Stammkultur wurde der Suspension sterilfiltriertes FdU in wässriger Lösung in einer Endkonzentration von  $7,5 \cdot 10^{-6}$  M zugesetzt. Parallel zu den Proben mit FdU wurde eine Kontrolle mit der entsprechenden Menge sterilem Aqua dest. (anstelle von FdU) pipettiert. Der Ansatz wurde nun für 24 Stunden bei den bereits beschriebenen Kulturbedingungen schütteln gelassen (BLASCHKE et al., 1978, FROESE, 1993). Nach 24 Stunden wurde die Suspension in den Kolben mit FdU absetzen gelassen und leicht abdekantiert. Dabei war es wichtig, möglichst keine Zellen zu verlieren. Danach wurde das Zellmaterial in Zentrifugengläser pipettiert und bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, in jedes Zentrifugenglas wurde frisches  $B_5^+$ -Medium ohne FdU

zugegeben, resuspendiert und wiederum zentrifugiert (entspricht dem Waschen des Zellmaterials). Dieser Vorgang wurde noch 2 mal wiederholt, um alle Reste des FdU zu entfernen. In die 100ml-Erlmeyerkolben mit  $B_5^+$  wurde nun Thymidin (ausgehend von einer Stammlösung mit 2,42 mg Thymidin/ml Aqua dest.) in einer Endkonzentration von  $10 \cdot 10^{-5}$  M zugegeben. Die Zellen wurden mit diesem Medium resuspendiert und in den entsprechenden Erlmeyerkolben überführt. Somit konnte die Zellsuspension wieder in den Zellzyklus (genauer gesagt in die S-Phase) eintreten.

### 3.6. Bisbenzimidfärbung der Kern-DNS

Nach 24 Stunden FdU-Wirkung wurden 2 ml Suspension entnommen, um den Erfolg der Zellsynchronisation über die mikrofluorimetrische DNS-Messung mithilfe der Bisbenzimidfärbung nachzuweisen. BLASCHKE et al. und KIBLER hatten bereits 1978 das Verfahren modifiziert, mit dem über das Fluorochrom Bisbenzimid H 33258 (RIEDEL DE HAEN) in 0,005% wäßriger Lösung der Ploidiegrad sowohl von Einzelzellen als auch von Suspensionen bestimmt werden konnte. Da BLASCHKE et al. (1978) und KIBLER (1978) jedoch mit anderem Pflanzenmaterial gearbeitet hatten, war es nötig, das von ihnen beschriebene Verfahren für die Durchführung dieser Versuchsreihe leicht zu modifizieren:

Die aus den Erlmeyerkolben entnommenen Zellen wurden jeweils in ein unsteriles, graduiertes, konisches Zentrifugenglas (10 ml) pipettiert und bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Zellanteil (als pcv) mit dem 15fachen Volumen eines Gemisches von 70% Ethanol und Eisessig (3:1) überschichtet. Der Ansatz wurde bei 4°C im Kühlschrank etwa 1 Stunde aufbewahrt. Anschließend wurde das Zellmaterial unter leichtem Vakuum über Schwarzbandfilterpapier aufgefangen und mit Aqua dest. 6 mal nachgewaschen, um die Essigsäure vollständig aus den Zellen zu entfernen. Ungenügendes Spülen mit Aqua dest. führte unter sauren pH-Bedingungen zu nichtspezifischen Färbungen der Zellwand. Mit einem Spatel wurden die Zellen vorsichtig vom Filterpapier entfernt und in 1 ml 0,1 M Citratpuffer pH 5 resuspendiert (wobei sich der Citratpuffer aus 0,1 M Citronensäure-Monohydrat und 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat zusammensetzte). Nun wurde pro 1ml Citratpuffer 1µl der Bisbenzimidstammlösung zugesetzt, so daß eine Endkonzentration von 0,005% erreicht wurde.

Nach ca. 10 bis 15 Minuten war die gewünschte Färbung der Zellsuspension erreicht. Um die Zellsuspension auf einem Objektträger zu fixieren, wurde dieser zunächst dünn mit

Phenolgelatine bestrichen. Nun wurden 200 µl der angefärbten Zellsuspension auf den Objektträger pipettiert. Der Objektträger wurde etwa 5 Minuten auf einer Heizplatte bei 55°C belassen, um das Wasser zu verdunsten. Schließlich wurden die Zellen mit Histokitt (Firma ROTH) eingekittet und mindestens 24 Stunden bei Zimmertemperatur trocknen lassen.

### 3.7. Cytophotometrische DNS-Messung der Zellkerne

Der Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid bindet spezifisch an DNS-Strukturen und emittiert nach Anregung mit Licht eine Strahlung, die eine längere Wellenlänge als die Anregungswellenlänge besitzt. Ihre Dauer ist proportional zur Einwirkzeit der Anregungsstrahlung auf das Präparat. Da vorausgesetzt werden kann, daß Bisbenzimid immer im gleichen Verhältnis an eine bestimmte Menge von DNS bindet, kann über die Auswertung der Lichtemissionsmessung auf die tatsächlich vorhandene Menge DNS geschlossen werden. Nach der Färbung der Zellkerne konnte eine Messung frühestens nach 24 Stunden vorgenommen werden. Die Fluoreszenzmessungen wurden am MPV 1 der Firma LEITZ bei etwa 875facher Vergrößerung (Fluoreszenzobjektiv 70/1 für Ölimmersion) vorgenommen. Das Anregungslicht wurde von einer Xenonlampe mit 150 W abgestrahlt. Die Filtereinstellung am Auflichtilluminator betrug 1 = 2mm UG1. Zur Messung wurde die Position 2 des Schaltrades der Kombination Teilerspiegel und Sperrfilter = TK 455 und K 460 vorgenommen. Als Sperrfilter wurde K 490 in den Filterschlitz eingeführt und somit wurden für die Messung hauptsächlich Wellenlängen über 490 nm benutzt. Das Maximum der Fluoreszenzmessung liegt bei ca. 495 nm. Die Verstärkung des hochstabilisierten Netzgerätes vom Typ KNOTT (NUP BN 601) konnte aufgrund der vorgewählten Einstellungen und der hohen Fluoreszenzintensität des Präparates mit 1,2 kV und einer Empfindlichkeit des Galvanometers von 2µA/Skt. relativ gering gewählt werden. So konnten eventuelle Außeneinflüsse, die sich negativ auf die Messung auswirken konnten, stark minimiert werden. Zur Messung gelangte der Anregungsstrahl von oben über einen Auflichtilluminator mit dichromatischem Teilerspiegel durch das Objektiv auf das Präparat. Der gefärbte Zellkern wurde mit einer variablen Meßblende in seiner gesamten Größe erfaßt und emittierte eine Strahlung. Diese wurde in seiner Intensität nach Verstärkung durch den Multiplier in Skalenteilen am Galvanometer abgelesen. Nach der Messung des Kernes wurde in unmittelbarer Nähe des gemessenen Kernes der Hintergrund als Blindwert erfaßt und dieser Wert vom Meßwert des Kernes subtrahiert. Somit konnte der bereinigte Nettowert in relativen

Fluoreszenzeinheiten (RE) angegeben werden. Pro Versuchsglied wurden 100 Messungen durchgeführt (nach BLASCHKE et al., 1978).

### 3.8. Verwendung des Plasmids pPCV 002

Das hier verwendete Plasmid pPCV 002 wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe DR. C. KONCZ vom Max-Planck-Institut aus Köln zur Verfügung gestellt.

Das Plasmid enthält die rol-Gene ABC unter Kontrolle der eigenen Promotoren sowie den veränderten Promotor des T-DNS-Gens 5, auf den im Näheren in der Diskussion (Kapitel 5) eingegangen werden soll. Fernerhin sind auf dem Konstrukt Resistenzen gegen Ampicillin, Carbenicillin sowie Kanamycin und eine sog. "multiple cloning site" als Schnittstelle der unterschiedlichen Restriktionsenzyme lokalisiert (s. Abb. 4 und 5).

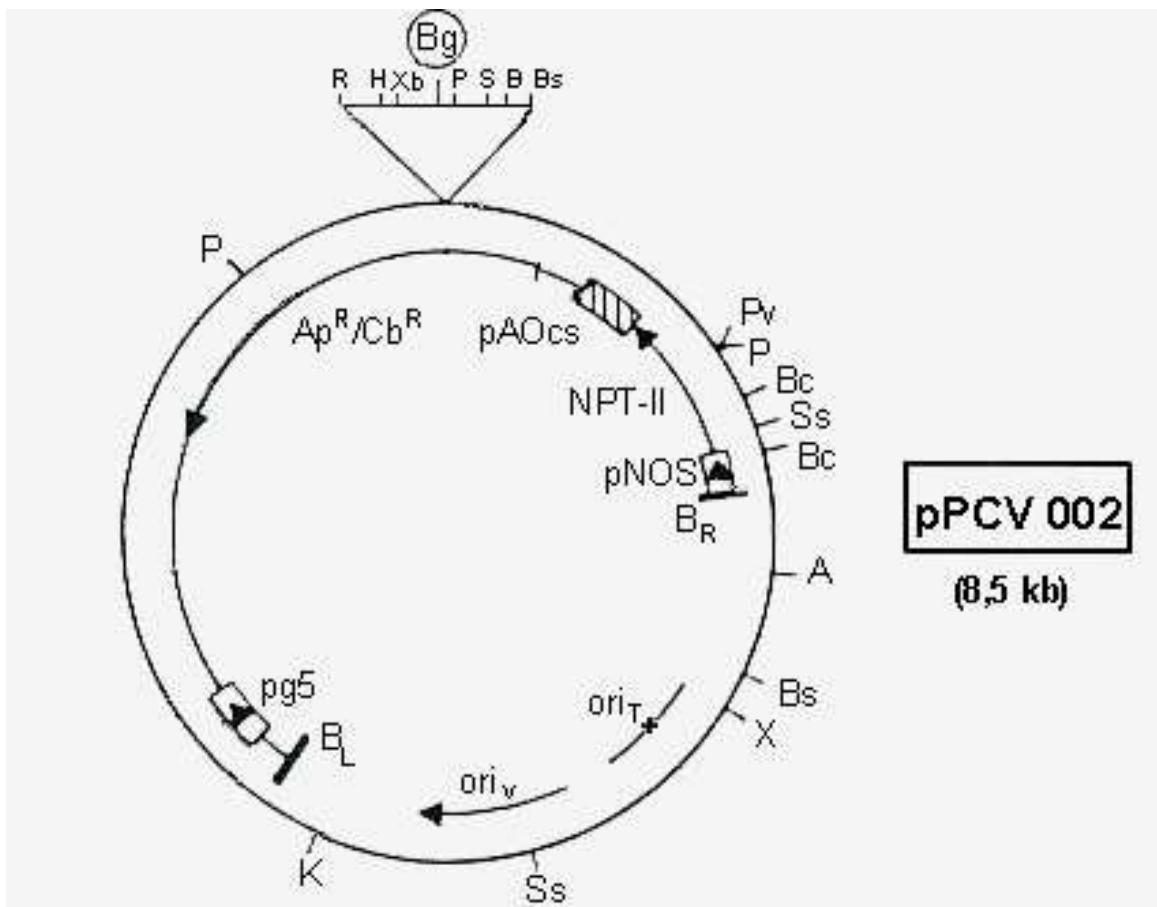


Abb. 4: Physische Plasmidkarte des Binärvektors pPCV 002 (nach KONCZ und SCHELL, 1986).

A (ApaI), B (BamHI), Bc (BclI), Bg (BglII), Bs (BstEII), H (HindIII), K (KpnI), P (PstI), Pv (PvuII), R (EcoRI), S (SalI), Ss (SstII), X (XhoI), Xb (XbaI): Restriktionsschnittstellen, B<sub>L</sub> = left border- und B<sub>R</sub> = right border-Sequenzen der Vektor-T-DNS, pg5: veränderter Promotor des T<sub>L</sub>-DNS-Gens 5, Ap<sup>R</sup>/Cb<sup>R</sup>: Ampicillin- bzw. Carbenicillinresistenzgen, pAOCs: polyadenylation sequence of octopine synthase (Polyadenylierungssequenz der Octopin-Synthase), NPTII: Neomycin-Phosphotransferase-Gen (entspricht dem Gen der Kanamycin-Resistenz), pNOS: Promotor des Nopalinsynthase-Gens, ori<sub>T</sub>: origin of conjugational plasmid transfer, ori<sub>v</sub>: origin of vector transfer. Die Pfeile geben die Richtung der Transkription an.

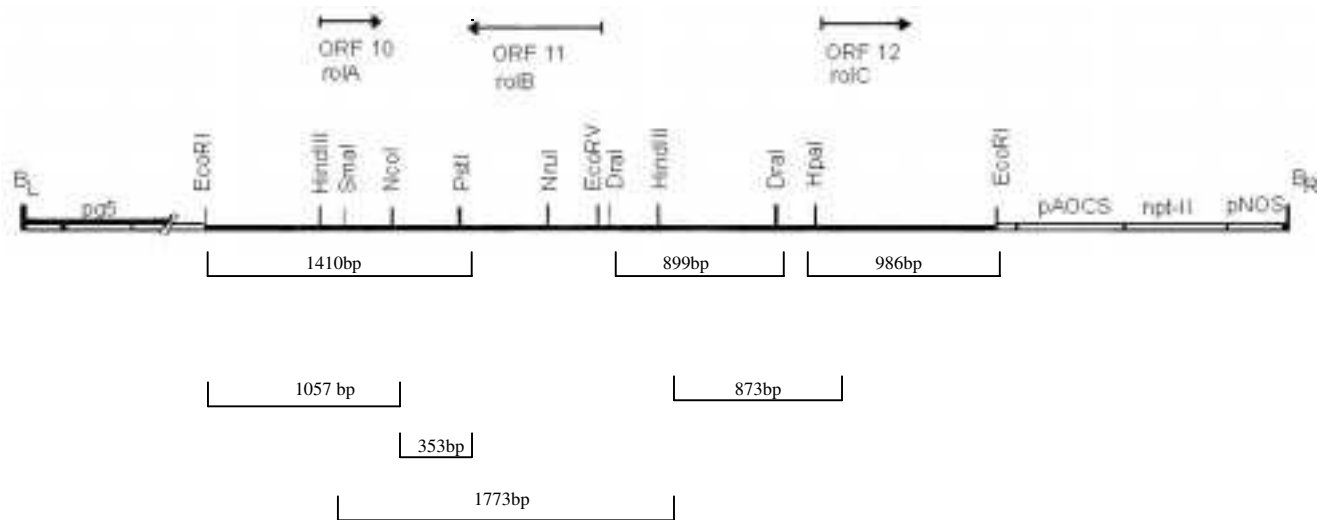


Abb. 5: Diagramm der Lage der rol-Gene bzw. ihrer ORFs im Plasmid pPCV 002 (nach SPENA et al., 1987). EcoRI, EcoRV, HindIII, SmaI, NcoI, PstI, NruI, DraI, HpaI: Restriktionsschnittstellen, B<sub>L</sub> = left border- und B<sub>R</sub> = right border-Sequenzen der Vektor-T-DNS, pg5: veränderter Promotor des T<sub>L</sub>-DNS-Gens 5, pAOCS: polyadenylation sequence of octopine synthase (Polyadenylierungssequenz der Octopin-Synthase), NPTII: Neomycin-Phosphotransferase-Gen (entspricht dem Gen der Kanamycin-Resistenz), pNOS: Promotor des Nopalinsynthase-Gens. Die Pfeile geben die Richtung der Transkription an.

### 3.9. Verwendung der Bakterienstämme *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

#### 3.9.1. Nährmedien für Bakterienkulturen

Alle Nährmedien wurden vor Gebrauch bei 1,1 bar und 121°C für 30 Minuten autoklaviert.

#### **LB (Luria-Bertani)-Medium** (ad 1 l Aqua dest.) (MANIATIS et al., 1982)

|        |                  |
|--------|------------------|
| 10 g   | Caseinhydrolysat |
| 5 g    | Hefeextrakt      |
| 10 g   | NaCl             |
| pH 7,5 |                  |

**YEB-Medium** (ad 1 l Aqua dest.) (MILLER, 1972)

|        |  |
|--------|--|
| 5 g    | Caseinhydrolysat   |
| 5 g    | Fleischextrakt   |
| 1 g    | Hefeextrakt  |
| 5 g    | Saccharose   |
| 0,05%  | 2mM Magnesiumsulfat bzw. 2 ml Magnesiumchlorid (sterilfiltriert durch einen Rotrandfilter der Firma SCHLEICHER und SCHÜLL, zum Medium nach dem Abkühlen der Lösung nach dem Autoklavieren bei etwa 50°C zugesetzt) |
| pH 7,2 |  |

Zum Gießen von Agarnährböden wurde zum Medium jeweils 1,5% (w/v) Bactoagar zugegeben.

## 3.9.2. Verwendung von Antibiotika

Zur Selektion der Resistenzen wurden folgende Antibiotika benutzt. Die verwendeten Konzentrationen wurden im Text angegeben (s. S. 54f., S. 58f., S. 61).

Stammlösungen:

Ampicillinstammlösung: mit einer Konzentration von 25 mg/ml.

Carbenicillinstammlösung: mit einer Konzentration von 25 mg/ml.

Cefotaximstammlösung: mit einer Konzentration von 50 mg/ml.

Kanamycinstammlösung: mit einer Konzentration von 10 mg/ml.

Rifampicinstammlösung: mit einer Konzentration von 25 mg/ml.

Streptomycinstammlösung: mit einer Konzentration von 25 mg/ml.

Ticarcillin/Clavulanic Acid-Stammlösung: mit einer Konzentration von 50 mg/ml.

Alle Antibiotika-Lösungen wurden steril filtriert und bei -20°C aufbewahrt.

## 3.9.3. Bakterienstämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden schüttelnd bei 180 UpM vermehrt, die *E.coli*-Arten bei 37°C, das *Agrobacterium tumefaciens* bei 28°C.



Der *E. coli*-Stamm HB101 eignet sich zur Transformation und zu Plasmidvermehrungen, der Stamm S17-1 besitzt neben der chromosomalen Streptomycinresistenz auch die Mobilisations- und Transfer-Funktion, die die Übertragung des Plasmids in andere Bakterien sicherstellt (SIMON, 1984). Häufig, und so auch in der vorliegenden Arbeit, wird für Transformationen der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV3101 als Standardsystem benutzt. Er enthält das chromosomale Markergen für die Rifampicin-Resistenz. Da der Binärvektor ein Kanamycin-Resistenzgen besitzt, wurde das Helferplasmid pMP90 verwendet, das seinerseits ein Gentamycin-Resistenzgen und die vir-Funktion für den T-DNS-Transfer vom Bakterium in die Pflanzenzelle besitzt (KONCZ und SCHELL, 1986, KONCZ et al., 1990).

#### 3.9.3.1. Glycerin-Einlagerung von Bakterien

Ein Aliquot einer Zellsuspension wird in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit autoklaviertem Glycerin im Verhältnis 3:1 (v/v) gemischt. Die Kultur wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Bakterienstämme oder transformierte Bakterien können auf diese Weise für einen längeren Zeitraum gelagert werden und können bei Bedarf auf Eis aufgetaut wieder in Kultur gebracht werden.

#### 3.9.3.2 Verwendung der *E. coli*-Stämme HB 101 und S17-1

Das verwendete Konstrukt war ursprünglich in das Bakterium *E. coli* Stamm HB 101 transformiert worden. Dieser Stamm eignet sich für Plasmidvermehrungen. Um jedoch eine höhere Transformationsrate bei der späteren Cokultivation mit *Agrobacterium tumefaciens* zu erhalten, wurde das Konstrukt direkt in S 17-1 transformiert. 100  $\mu\text{l}$  Glycerinkultur (s. oben) des Stammes HB 101 wurden in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin<sub>100</sub> übernacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  schüttelnd inkubiert. Parallel dazu wurden 100  $\mu\text{l}$  Glycerinkultur des Stammes S 17-1 ohne Plasmid in 5 ml LB-Medium mit Streptomycin<sub>100</sub> bei  $37^{\circ}\text{C}$  schüttelnd übernacht kultiviert.

Am nächsten Tag wurden von jeder Kultur 500  $\mu\text{l}$  entnommen, 10 Minuten bei 5000 UpM abzentrifugiert und jeweils in 50  $\mu\text{l}$  LB-Medium resuspendiert. Anschließend wurden beide Kulturen gut miteinander gemischt. Die Mischung wurde auf LB-Agarmedium ohne

Antibiotika tropfenweise ausplattiert und bei 37°C übernacht inkubiert, wobei durch Konjugation das Plasmid in den Stamm S 17-1 übertragen wurde.

Am nächsten Tag wurden alle sichtbaren Plaques mit einer Impföse aufgenommen und in 2 ml LB-Medium resuspendiert. Von dieser Stammlösung wurde eine 100fache und eine 1000fache Verdünnung hergestellt. Je 100 µl jeder Lösung wurden auf LB-Festmedium mit Streptomycin<sub>100</sub> und Ampicillin<sub>100</sub> ausplattiert und bei 37°C übernacht inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Bakterien, die das Plasmid inseriert hatten, selektiert werden. Ausgewählte Klone, sichtbar als Plaques, wurden wiederum in LB-Medium mit Streptomycin<sub>100</sub> und Ampicillin<sub>100</sub> überführt und übernacht bei 37°C im Wasserbad schüttelnd vermehrt.

Der Nachweis der erfolgreichen Insertion des Plasmids pPCV 002 wurde über eine Minipräparation erbracht.

#### 3.9.4. Minipräparation

##### 3.9.4.1. Lösungen für die Minipräparation

Alle Lösungen wurden nach BIRNBOIM und DOLY (1979) angesetzt und vor Benutzung bei 121°C und 1,1 bar für 30 Minuten autoklaviert.

##### **Lösung I** (ad 100ml Aqua bidest.)

50 mM (900,8 mg) Glucose

25 mM (394 mg) Tris-HCl

10 mM (372 mg) EDTA

Der pH-Wert wurde mit NaOH bzw. HCl auf 8,0 eingestellt.

##### **Lösung II** (ad 100ml Aqua bidest.)

0,2 N (0,8 g) NaOH

1% (w/v) ( 1 g) Natrium-Dodecylsulfat (SDS)

##### **Lösung III** (ad 100ml Aqua bidest.)

5 M (49,07g) Kaliumacetat

11,5 ml Eisessig

pH 4,8

#### 3.9.4.2. Kleine Präparation (Mini-Präp) der Plasmid-DNS aus Bakterien

Es gibt mehrere Methoden der Plasmid-Präparation (MANIATIS et al., 1982), sowohl über kommerziell hergestellte „Kits“ mit Säulen als auch über die hier benutzte Methode von BIRNBOIM und DOLY (1979) zur alkalischen Plasmid-DNS-Extraktion, die im Folgenden beschrieben werden soll:

Es wurden 1,5 ml der S 17-1-Kultur in ein Eppendorfreaktionsgefäß (1,5 ml) pipettiert und 10 Minuten bei 4000 UpM bei Raumtemperatur in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zum Probenpellet wurden nun 100 µl Lösung I und 5 µl RNase A (10 mg/ml Stammlösung) hinzugegeben, um die in den Bakterienzellen vorhandene RNS abzubauen. War nach Resuspendierung eine milchige Suspension entstanden, wurden bei Raumtemperatur für den alkalischen Zellaufschluß 200 µl Lösung II hinzupipettiert. Nach vorsichtigem Schwenken wurde die Suspension einige Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 180 µl Lösung III die Proteinausfällung und gleichzeitig die Wiederherstellung des neutralen pH-Wertes. Wiederum wurde die Probe geschwenkt und für 5 Minuten auf Eis gelegt. Danach wurde die Lösung bei 13.000 UpM für 5-10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, in dem die Plasmid-DNS enthalten war, wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert. Es wurden 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 6) und 2/3 Volumenteile Isopropanol zur DNS-Fällung zugegeben. Die Probe wurde für 5 Minuten auf Eis gelegt. Nun wurde 10 Minuten bei 13.000 UpM zentrifugiert, so daß die DNS im Eppendorfreaktionsgefäß als Pellet sichtbar wurde. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 90 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und im Eppendorfreaktionsgefäß verbliebene Ethanol-Rückstände im Exikator oder Trockenschrank evaporieren lassen. Das getrocknete Pellet wurde in 90 µl autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O gelöst.

#### 3.9.5. Quantitative und qualitative Bestimmung des DNS-Gehaltes

Um den DNS-Gehalt der Lösung quantitativ und qualitativ zu bestimmen, wurde ein Aliquot der DNS-Lösung auf 1/100 verdünnt. Anschließend wurde die Absorption in Quarzküvetten im Spektralphotometer (ULTROSPEC II, LKB, BICHROM) gemessen. Weil die Menge der DNS direkt proportional zur optischen Dichte der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm ist,

kann eine optische Dichte von 1 mit einer Konzentration von 50 µg/ml DNS (bei genannter Wellenlänge) gleichgesetzt werden (MANIATIS et al., 1982).

### 3.9.6. Nachweis der Plasmid-DNS

#### 3.9.6.1. Restriktionsverdau der Plasmid-DNS

Vor Durchführung der Elektrophorese wurde die Plasmid-DNS mit einer Größe von 12 kb mit Restriktionsenzymen (DraI, EcoRI, HindIII, NcoI und PstI, alle von der Firma AMERSHAM LIFE SCIENCE) verdaut, um zu prüfen, ob die rol-Gene erfolgreich in den *E. coli*-Stamm S17-1 inseriert worden waren. Bei der anschließenden Elektrophorese mußten die entstehenden Banden mit den vorher berechneten übereinstimmen. Für den ORF von rolA wurde eine Bande im Bereich von 650bp (nach Verdau mit den Restriktionsenzymen HindIII und NcoI), für den ORF von rolB nach Restriktionsverdau mit PstI und HindIII eine Bande im Bereich von 1050bp und für ein größeres Fragment, das den ORF für rolC umschließt (nach Verdau mit den Restriktionsenzymen EcoRI und DraI), ein etwa 1100bp großes Fragment erwartet (nach SPENA et al., 1987).

#### 3.9.6.2. Gelelektrophorese

Puffer zur Elektrophorese :

#### **TBE-Puffer** (10fach)(ad 1l ddH<sub>2</sub>O)

108g TRIS-Base

55g Borsäure

9,3g EDTA

pH 8,3

Zur Elektrophorese wurde ein 1,5 %iges Agarosegel in 1fachem TBE-Puffer mit 1,5 µl Ethidiumbromid verwendet. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die DNS-Basen und fluoresziert bei UV-Bestrahlung orange. Auf diese Weise sind im Gel DNS-Mengen bis zu 1-5 ng nachweisbar (NICHOLL, 1995). Pro Probenflasche wurden je 5µl der gelösten Plasmid-DNS mit 1µl Bromphenolblau (Firma SIGMA, G 2526) versetzt und auf das Gel aufgetragen.

Neben den verschiedenen Proben der Plasmid-DNS wurde ein Marker (Lambda DNA HindIII Digest, Firma SIGMA) aufgetragen.

Bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 70mA wurden die Proben etwa 1 h laufen lassen, bis  $\frac{3}{4}$  des Gels durchlaufen waren.

Im UV-Licht wurde nun anhand des Markers festgestellt, ob die sichtbaren Banden den vorher berechneten entsprachen. Für den ORF von **rolA** wurde eine Bande im Bereich von **650bp** detektiert, für den ORF von **rolB** wurde eine Bande im Bereich von **1050bp** und für den ORF für **rolC** ein etwa **1100bp** großes Fragment nachgewiesen (nach SPENA et al., 1987). Somit konnte die Insertion des Konstruktes im Stamm S 17-1 erfolgreich nachgewiesen und mit der Konjugation von *E. coli* S 17-1 und *Agrobacterium tumefaciens* begonnen werden.

### 3.9.7. Konjugation von *E.coli* S 17-1 mit *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

Um die Pflanzenzelle mit dem Fremdgen zu infizieren, wurde das Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 als Genfähre benutzt. Zunächst mußte die Plasmid-DNS in das *Agrobacterium* transformiert werden. Dabei diente der *E.coli*-Stamm S17-1 als Donor für das Plasmid pPCV 002, das *Agrobacterium tumefaciens* als Akzeptor, das zusätzlich zur genomischen Rifampicin-Resistenz durch die Konjugation das aus *E.coli* übertragene Carbenicillinresistenz-Gen erhielt. Auf diese Weise konnten nach Inkubation auf einem Nährmedium mit Rifampicin und Carbenicillin Kolonien von *Agrobacterium tumefaciens*, die den gewünschten Plasmidabschnitt inseriert hatten, selektiert werden.

Die konjugative Übertragung des Binärvektors pPCV 002 aus dem *E.coli*-Stamm S17-1 in den *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV3101 (pMP90) verlief nach der Methode der triparentalen Paarung (BOYER UND ROULLAND-DUSSOIX, 1969).

Nachdem mithilfe einer Minipräparation und anschließender Elektrophorese sichergestellt worden war, daß die Transformation von *E. coli* S 17-1 erfolgreich verlaufen war, wurden die Colibakterien einen Tag im Kühlschrank aufbewahrt, da *Agrobacterium tumefaciens* sich –im Gegensatz zu den *E.coli*-Stämmen- langsamer vermehrt und eine Wachstumszeit von 2 Tagen benötigt.

In der Zwischenzeit wurden 5 ml YEB-Medium mit Rifampicin<sub>100</sub> versetzt und ein steriler Abstrich von *Agrobacterium tumefaciens* ohne Konstrukt hineingegeben. Dieser Ansatz wurde im Klimaraum bei 28°C für 2 Tage schüttelnd inkubiert.

Nach einem Tag der Inkubation der *Agrobacterium tumefaciens*-Bakterien wurden die *E. coli*-Bakterien (100µl der Bakterien aus Glycerinkultur) in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin<sub>100</sub> bei 37° C im Schüttelbad für einen Tag inkubiert.

Am folgenden Tag wurden je 500 µl der Suspension der *E. coli*-Bakterien Stamm S 17-1 und 500 µl der Suspension der *Agrobakterien* bei 4000 UpM zentrifugiert und dann mit je 50 µl YEB-Medium resuspendiert. Anschließend wurden beide Bakterienstämme in einem Eppendorfreaktionsgefäß vereinigt (im Verhältnis 1:1) und durch Pipettieren gemischt. Nun wurde das Gemisch der Bakterienlösungen tropfenweise mit einer Eppendorfpipette auf eine Agarplatte mit YEB-Medium ohne Antibiotika aufgetragen, in der Sterilbank trocknen gelassen und anschließend für einen Tag bei 28°C inkubiert.

Als sich genügend Plaques gebildet hatten, wurden alle Kolonien mit einer Impföse aufgenommen und in 2 ml YEB-Medium resuspendiert (entspricht der Stammlösung). Anschließend wurden Verdünnungen erstellt (1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>4</sup>, 1:10<sup>6</sup>, 1:10<sup>8</sup>) (PAULER et al., 1998), um Einzelkolonien zu erhalten. Anschließend wurden von jeder Verdünnung 100 µl auf YEB-Agarplatten mit Rifampicin<sub>100</sub> und Carbenicillin<sub>100</sub> ausplattiert und für zwei Tage bei 28°C im Klimaraum inkubiert.

Nach zwei Tagen wurden einige Einzelkolonien entnommen und diese für zwei Tage bei 28°C in YEB- Medium mit Carbenicillin<sub>100</sub> wachsen lassen. Danach wurde erneut eine Mini-Präp mit anschließender Elektrophorese durchgeführt, um sicher zu gehen, daß das Plasmid pPCV 002 in *Agrobacterium tumefaciens* inseriert worden war.

### 3.9.8. Verdau der Plasmid-DNS

Vor Durchführung der Elektrophorese wurde die Plasmid-DNS verdaut, um zu prüfen, ob die rol-Gene erfolgreich in das *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 inseriert worden waren (s. Kapitel 3.9.6.1.). Da das Konstrukt in den Agrobakterien nachgewiesen werden konnte, konnte im weiteren Verlauf eine Cokultur von *Agrobacterium tumefaciens* und der Suspension von *Daucus carota* durchgeführt werden.

### 3.10. Cokultur von *Agrobacterium tumefaciens* und Zellsuspensionen von *Daucus carota*

Um die rol-Gene in das Karottengenom zu inserieren, wurde *Agrobacterium tumefaciens* mit der *Daucus carota*-Suspension kokultiviert.

Insgesamt wurde zu 9 verschiedenen Zeitpunkten nach Initiierung der S-Phase des Zellzyklus *Agrobacterium tumefaciens* zur Karottensuspension zugegeben. Der Zeitpunkt T bezeichnet dabei die Zugabe des 2'-Desoxy-Thymidins zur Karottensuspension und somit den Wiedereintritt in die S-Phase des Zellzyklus, die Index-Ziffer bezeichnet den Zeitpunkt der Zugabe des *Agrobacterium tumefaciens*, angegeben in Stunden nach der Zellzyklusinitiierung, d.h. „T<sub>0,5</sub>“ bedeutet beispielsweise, daß diese Karottenzellsuspension ½ Stunde nach S-Phase-Beginn mit dem *Agrobacterium* transformiert wurde. Die folgenden Transformationen wurden durchgeführt (s. auch Abb. 6 im Kapitel 8. Anhang):

- ◇ 1.) Sofort nach Thymidinzugabe (T<sub>0</sub>)
- ◇ 2.) Kontrolle (unsynchronisiert), transformiert parallel zu T<sub>0</sub>
- ◇ 3.) 30 Minuten nach Thymidinzugabe (T<sub>0,5</sub>)
- ◇ 4.) 1 h nach Thymidinzugabe (T<sub>1</sub>)
- ◇ 5.) 1,5 h nach Thymidinzugabe (T<sub>1,5</sub>)
- ◇ 6.) 2 h nach Thymidinzugabe (T<sub>2</sub>)
- ◇ 7.) 3 h nach Thymidinzugabe (T<sub>3</sub>)
- ◇ 8.) 4 h nach Thymidinzugabe (T<sub>4</sub>)
- ◇ 9.) 6 h nach Thymidinzugabe (T<sub>6</sub>)

Fernerhin wurde zur Kontrolle der Synchronisation und Transformation eine unsynchronisierte, untransformierte Suspension mitkultiviert.

Für die Cokultur wurden je 1,5 ml Bakteriensuspension mit einer O.D.<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,7 (Optische Dichte, gemessen bei 600 nm), d.h. in der mittleren Logphase, in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß abpipettiert, bei 4000 UpM für 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das dabei entstehende Bakterienpellet wurde mit 500µl B<sub>5</sub><sup>+</sup>-Medium resuspendiert, zur Karottenzellsuspension hinzugegeben und unter Schütteln (90 UpM) 30 Minuten im Dunkeln kokultiviert. Anschließend wurde der Kolbeninhalt in ein steriles Becherglas abdekantiert und absetzen lassen. Der Bakterienüberschuß wurde verworfen, die

Zellen wurden in neues  $B_5^+$ -Medium überführt und im Dunkeln mit Hinblick auf die Fragestellung im Zellzyklus 4 h (entspricht Transformation I), 8 h (entspricht Transformation II) bzw. 48 h (entspricht Transformation III) bei 28°C kokultiviert.

Nach entsprechender Kokultur wurde die Suspension wiederum in ein Becherglas zum Absetzen dekantiert. Der Überstand wurde verworfen und ein Teil der Zellen in je einen Erlenmeyerkolben mit  $B_5^+$ -Medium mit Antibiotika (Cefotaxim (150 µg/ml) und Ticarcillin (150 µg/ml)) überführt, um *Agrobacterium tumefaciens* abzutöten.

Neben der o.g. „Stammkultur“ wurden die übrigen Zellen der Suspension zur Gewinnung von Karottenpflanzen über die somatische Embryogenese in hormonfreiem  $B_5$ -Medium kultiviert. Dazu wurde ein Teil der Zellen der „Stammkultur“ in Zentrifugengläser pipettiert und abzentrifugiert. Nun wurde 3 mal mit  $B_5^-$ -Medium nachgewaschen. Danach wurde die jeweilige Probe mit einer pcv-Endkonzentration von 0,5% in Kolben mit  $B_5^-$ -Medium (ebenfalls mit Cefotaxim (150 µg/ml) und Ticarcillin (150 µg/ml) versetzt) einpipettiert. Die Suspensionen wurden nun bei 28°C und unter Dauerlicht weiterkultiviert. Nach jeweils 2 Wochen wurde mit dem Selektionsantibiotikum Kanamycin (Kanamycin<sub>30</sub>) umgesetzt.

Bei der Transformation I (4stündige Kokultur) wurde zusätzlich Suspension aus den Kolben entnommen und mit einer pcv-Endkonzentration von 1% in Tuben mit  $B_5^-$ -Medium mit Antibiotika und 10 Volumen% frischer Kokosnußmilch kultiviert, bis eine Pflanzenmorphogenese beobachtet werden konnte. Die Kulturzeiten waren abhängig von den einzelnen Transformationszeitpunkten und sind ausführlich im Ergebnisteil (Kapitel 4, S. 80ff.) beschrieben.

### 3.11.           Aufbereitung der DNS des Pflanzenmaterials mithilfe eines DNS-Extraktionskits

Die DNS der transgenen Pflanzen wurde mithilfe eines DNS-Extraktionskits von QIAGEN (DNeasy Plant Mini Kit) gewonnen, zum Teil auch mithilfe des DNeasy Plant Maxi Kits für 500 mg Frischgewicht. Hier soll die Aufbereitung mit dem Mini Kit beschrieben werden:

Maximal 100 mg der transgenen Karotten wurden pro Aufbereitung ausgewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in einem Mörser fein gemörsert und in ein



Eppendorfreaktionsgefäß eingefüllt. Dann wurden 400 µl eines Lysispuffers sowie 4 µl RNase zugegeben, um die Pflanzenzellen aufzuschließen und die RNS aufzuspalten, und der Ansatz unter 2 bis 3maligem Schwenken bei 65°C für 10 Minuten im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 130 µl eines salzhaltigen Puffers zugegeben, um die Proteine zu präzipitieren. Nach 5 Minuten Ausfällen auf Eis wurde die Probe bei 13.000 UpM zentrifugiert, um viskose Pflanzenteile vom Lysat abzutrennen. Nun wurde der Überstand auf eine im Kit enthaltene QIAshredder spin-Säule pipettiert, durch deren Membran Zellrestbestandteile von der DNS-Lösung abgetrennt wurden. Das Lysat wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nun wurde ein halbes Volumenteil Bindepuffer und ein Volumenteil absolutes Ethanol zugegeben, um die Bindung an die Membran der Säule zu fördern, und durch Pipettieren gemischt. 650 µl dieser Lösung wurden auf die sog. DNeasy mini spin-Säule aufgetragen und für 1 Minute bei 8000 UpM zentrifugiert. Anschließend wurde dieser Schritt mit der verbleibenden Lösung wiederholt. Nun wurde die Membran zweimal mit 500µl Waschpuffer gereinigt, um Salze aus der Membran zu waschen. Beim ersten Waschen wurde bei 8000 UpM zentrifugiert, beim zweiten bei 13.000 UpM, um verbleibendes Ethanol aus der Membran zu entfernen und die Membran zu trocknen. Die an die Membran gebundene DNS wurde nun über zwei Elutionsschritte mit je 200 µl 65°C-heißen Elutionspuffer eluiert, indem nach Auftragen des Puffers nach 5 Minuten bei 8000 UpM zentrifugiert wurde.

Die Konzentration der über das Kit gewonnenen genomischen Karotten-DNS wurde durch Gelelektrophoresen mit  $\lambda$ -DNS bekannter Konzentration als Markerspur bestimmt.

### 3.12. Nachweis des Einbaus der Fremdgene in das Karottengenom durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mithilfe der PCR ist es möglich, spezifische DNS-Segmente von maximal 6 kb zu vervielfältigen. Der Zyklus von Denaturierung der DNS, Annealing, Amplifikation wird wiederholt (25 bis 30fach für den Nachweis einer bestimmten Sequenz, 35 bis 45fach bei Fingerprint-Analysen) durchlaufen, wobei jedesmal eine Verdopplung der Menge der nachzuweisenden DNS erfolgt. Durch Verwendung der hitzestabilen Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* genügt die einmalige Zugabe des Enzyms vor Beginn der PCR. Folglich wird jeder Schritt der Amplifikation durch Variation der

Inkubationstemperatur kontrolliert. Die Taq-Polymerase polymerisiert die DNS bei einer Optimaltemperatur zwischen 70°C und 74°C und bleibt auch nach der DNS-Denaturierungstemperatur von etwa 94°C aktiv.

Das verwendete Verfahren besteht aus drei Phasen, in denen zunächst die doppelsträngige DNS-Matrize durch Erhitzen auf etwa 94°C in zwei Einzelstränge gespalten wird, dann die artifiziiellen „Primer“-Oligonucleotide an die DNS-Einzelstränge hybridisieren und schließlich das 3'-Hydroxylende eines „Primer“-Oligonucleotids nach seiner Hybridisierung an einer DNS-Matrize durch die Taq-Polymerase bei 72°C komplementär verlängert wird. Die im ersten PCR-Zyklus entstehenden DNS-Doppelstränge werden im folgenden denaturiert und gehen in den nächsten Zyklus ein. So ist die Amplifikation von definierten DNS-Matrizen in einem kurzen Zeitraum möglich (NELSON, 1991, SAIKI et al., 1988).

Bei den hier vorliegenden Versuchen sollte prinzipiell in das Karottengenom jeder transgenen Pflanze das oben beschriebene Konstrukt mit den gekoppelten rol-Genen rolABC eingebaut worden sein. Um die Insertion der rol-Gen-Kombination zu prüfen, mußten PCRs für jedes einzelne Gen, d.h. rolA, B und C, durchgeführt werden. Jeder PCR-Ansatz (50µl) sah wie folgt aus :

- 5 µl 10xPCR-Puffer (Firma SIGMA)
- 1 µl 10 mM dOligonucleotid dATP (Firma SIGMA)
- 1 µl 10 mM dOligonucleotid dCTP (Firma SIGMA)
- 1 µl 10 mM dOligonucleotid dGTP (Firma SIGMA)
- 1 µl 10 mM dOligonucleotid dTTP (Firma SIGMA)
- 1 µl 10 µM „Primer“-Oligonucleotide 1 (synthetisiert von Firma MWG-BIOTECH)
- 1 µl 10 µM „Primer“-Oligonucleotide 2 (synthetisiert von Firma MWG-BIOTECH)
- 18,5µl ddH<sub>2</sub>O (autoklaviert)
- 20 µl DNS-Probe transgener Pflanzen (entsprechen 5-10 ng DNS)
- 0,5µl Taq-DNS-Polymerase (2,5 U) (Firma SIGMA)
- 50,0µl

Abhängig davon, welches Gen im jeweiligen PCR-Zyklus nachgewiesen werden sollte, wurden folgende Primer der Firma MWG-BIOTECH benutzt :

Zum Nachweis für *rolA* besaß der Primer 1 die Sequenz 5'-GAA CGT CCC GGT CGG GCT TG-3' und der Primer 2 die Sequenz 5'-CCG GAC TAA ACG TCG CCG GC-3', mit einer Annealing-Temperatur von 60,5°C. Die codierende Sequenz für *rolA*, d.h. der ORF 10, besitzt eine Größe von 302 bp, der hier nachzuweisende DNS-Bereich des *rolA*-Gens weist eine Größe von 193 bp auf (SINKAR et al., 1988).

Das *rolB*-Gen wurde mithilfe des Primers 1 mit der Sequenz 5'-GAG AGT CGC AGG GTT AGG TC-3' sowie des Primers 2 mit der Sequenz 5'-TCT CAC TCC AGC ATG GAG CC-3' mit einer Annealing-Temperatur von 56,4°C nachgewiesen. Die *rolB*-codierende Sequenz (ORF 11) besitzt eine Größe von 779 bp, der hier zu amplifizierende *rolB*-Gen-Abschnitt eine Größe von 666 bp (FURNER et al., 1986).

Für *rolC* wurden die Primer 5'-GAC AAG CAG CGA TGA GCT AG-3' und 5'-ATG CCT CAC CAA CTC ACC AG-3' mit einer Annealing-Temperatur von 54,4°C benutzt. Die codierende Sequenz für *rolC* (ORF 12) umfaßt einen Bereich von 539 bp, die hier zu amplifizierende *rolC*-Sequenz eine Größe von 463 bp (FURNER et al., 1986).

Der Ablauf jeder PCR im automatischen PCR-Gerät (Thermal Cycler, progene, von der Firma THERMO DUX) wurde in folgende zeitliche Abschnitte eingeteilt, wobei der Schritt 3 35mal durchlaufen wurde:

- |  |                                    |
|--|------------------------------------|
| 1. 40°C für 2 Minuten                  | Vorheizen des Thermoblocks         |
| 2. 95°C für 5 Minuten                  | Denaturierung vor dem Zyklusbeginn |
| 3.1. 95°C für 1 Minute                 | Denaturierung                      |
| 3.2. Annealing-Temperatur für 1 Minute | Annealing                          |
| 3.3. 72°C für 2 Minuten                | Extension                          |
| 4. 72°C für 5 Minuten                  | Einzelne, abschließende Extension  |
| 5. 4°C                                 | Lagerung bis zur Gelelektrophorese |

Nach Durchführung einer PCR wurde der Einbau des Fremdgens über eine anschließende Gelelektrophorese nachgewiesen (1,5%iges Agarosegel). War der Nachweis positiv, wurde die Probe zur weiteren Verwendung für den Southern Blot aufbewahrt.

### 3.13. Southern Blot

EDWIN SOUTHERN entwickelte mit dem nach ihm benannten Blotting-Verfahren eine Gel-Transfer-Technik für doppelsträngige DNS. Zunächst wird die DNS mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Die dabei entstehenden Fragmente werden durch eine Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Die DNS des Gels wird nun, über den durch die Kapillarkräfte erzeugten Pufferstrom, auf eine Nitrocellulose- oder Nylon-Membran übertragen, auf der die gesuchte Sequenz mithilfe einer radioaktiv oder nicht-radioaktiv markierten Hybridisierungssonde identifiziert werden kann (SOUTHERN, 1975).

Die Detektion erfolgte bei der vorliegenden Arbeit auf der Grundlage eines nicht-radioaktiven Kits der Firma BOEHRINGER über Digoxigenin-dUTP. Der Kit enthielt folgende, verwendete Reagenzien:

- Hexanucleotid-Gemisch : 50µl 10xkonzentriertes Hexanucleotid-Reaktions-Gemisch
- dNTP-Markierungs-Mischung: 50µl 10x konzentrierte dNTP-Mischung mit dATP, 1mMol/l, dCTP, 1mMol/l, dGTP, 1mMol/l, dTTP, 0,65 mMol/l, DIG-dUTP, 0,35 mMol/l, pH 7,5 (20°C)
- Klenow-Enzym: 25 µl Klenow-Enzym (2 U/µl)
- Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat: 200 µl polyklonale Schaf-Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (750 U/µl)
- NBT/BCIP: 1ml 10x konzentrierte Stammlösung von Nitroblau-Tetrazoliumsals und 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat in Dimethylformamid
- Blockierungsreagenz: 2 x je 50 g Pulver

#### 3.13.1. Gelbehandlung

Nach der Elektrophorese wurde das Gel vom Gelschlitten gelöst, an der linken oberen Ecke markiert und für 15 Minuten in 0,25M HCl geschwenkt, um die DNS zu depurinieren (dieser Vorgang bewirkte zusammen mit der Denaturierung eine Fragmentierung der zu diesem Zeitpunkt noch als Schmierfilm auf dem Gel vorliegenden DNS). Dabei verfärbte sich die Bromphenolblau-Bande gelb. Danach wurde das Gel zur Denaturierung (d.h. zur Gewinnung einzelsträngiger DNS) eine halbe Stunde in stark alkalischer Denaturierungslösung

geschwenkt und schließlich eine halbe Stunde in Neutralisierungslösung neutralisiert, um den zum Transfer nötigen pH von 8,0 zu erreichen. Die Bromphenol-Bande erhielt nun wieder eine blaue Farbe.

### 3.13.2. Aufbau des Southerntransfers

Der Southerntransfer erfolgte in Anlehnung an MANIATIS et al. (1982) in einem Puffertrog. Die Pufferbrücke bestand aus einem über einer Glasplatte ausgebreiteten Whatman-Papier (Whatman 3mm), das zu beiden Seiten in den Transferpuffer tauchte. Auf dieses Whatman-Papier wurde das Gel mit der oberen Seite nach unten gelegt und mit einem Glasstab vorsichtig abgerollt, um Luftblasen zu beseitigen. Dieser Aufbau diente als Pufferbrücke zur Aufrechterhaltung des für den Transfer notwendigen Kapillarstroms. Auf dieses Gel wurde eine genau passend zugeschnittene Nylonmembran (positiv geladen, von BOEHRINGER), die vorher nicht angefeuchtet werden mußte, luftblasenfrei abgerollt. Darüber wurden 3 Lagen Whatman-Papier in der Größe der Membran ausgebreitet und mit Nescofilmstreifen von allen 4 Seiten abgeklebt, um sicherzustellen, daß der Puffer von der Brücke nur durch das Gel und die Nylonmembran gesaugt wurde. Abschließend wurde ein Stapel Saugpapier, eine Glasscheibe und ein 1kg-Gewicht auf den Blot gelegt. Der Transfer lief über Nacht.

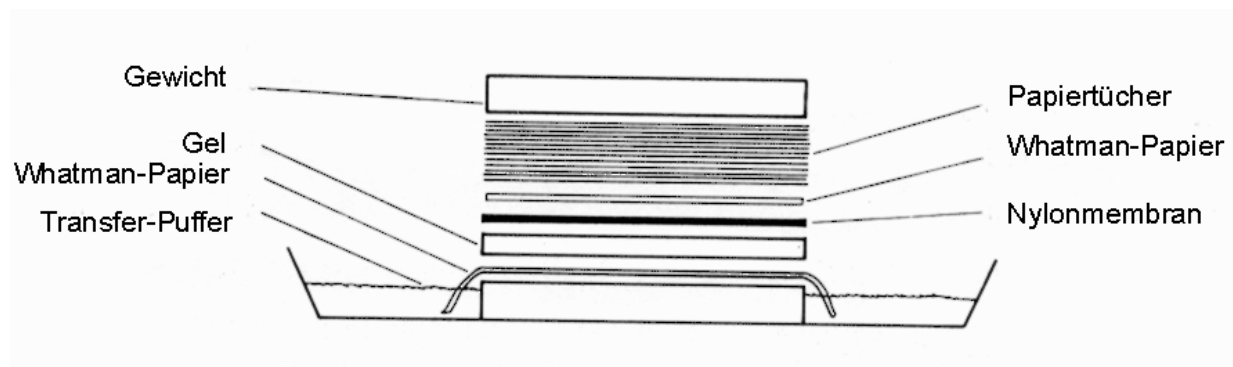


Abb. 7: Aufbau des Southerntransfers nach MANIATIS et al. (1982).

Das Gel wird auf ein Filterpapier gelegt. Eine Nylonmembran wird vorsichtig auf dem Gel ausgerollt und mit weiteren Schichten von Filterpapier und saugfähigem Papier bedeckt. Der Transferpuffer wird durch die Kapillarkräfte durch das Gel gesaugt und überträgt auf diese Weise die Nucleinsäure-Moleküle vom Gel auf die Membran.

3.13.3.           Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer für den Southern Blot

Lösungen und Puffer, die zusätzlich zu den mitgelieferten Reagenzien benötigt wurden, wurden – so weit nicht anders beschrieben – mit sterilem Aqua bidest. angesetzt.

**0,2M EDTA-Lösung** (ad 100ml Aqua dest.)

7,44 g                   EDTA

pH 8,0

**4M LiCl-Lösung** (ad 100ml Aqua dest.)

16,96 g                 LiCl

**TE-Puffer** (ad 100ml Aqua dest.)

157,6mg                Tris-HCl

37,22mg                EDTA

**0,25M HCl** (ad 1l Aqua dest.)

50ml                    5M HCl

**Denaturierungslösung** (ad 1l Aqua dest.)

0,6M (35,06g)         NaCl

0,4M (16,00g)         NaOH

**Neutralisierungslösung** (ad 1l Aqua dest.)

1M (58,44g)           NaCl

0,5M (54,00g)         TRIZMA-Base

pH 7,2

**SSC-Puffer (10fach)** (ad 1l ddH<sub>2</sub>O)

0,15M (44,12g)        Natriumcitrat

1,5M (87,66g)         NaCl

pH 7

**Maleinsäurepuffer** (ad 1l ddH<sub>2</sub>O)

0,1M (11,6g)      Maleinsäure  
 0,15M (8,77g)      NaCl  
 pH 7,5 (mit NaOH-Plätzchen eingestellt)

**Blockierungs-Stammlösung (10fach)**

10% Blockierungsreagenz (im Kit enthalten) in Maleinsäurepuffer durch Rühren bei 65°C gelöst.

**Blockierungslösung (1fach)**

Verdünnung der Stammlösung 1:10

**Standardhybridisierungspuffer**

5fach                      SSC-Puffer  
 0,1%                      N-Lauroylsarcosin  
 0,2%                      SDS  
 1%                        Blockierungslösung

**10%iges „SDS“** (ad 100ml ddH<sub>2</sub>O)

10g                      Natriumdodecylsulfat (SDS)

**Waschpuffer**

Maleinsäurepuffer  
 3% Tween 20

**Detektionspuffer** (ad 1l Aqua dest.)

0,1M (15,76g)      Tris-HCl  
 0,1M (5,84g)      NaCl  
 50mM (10,16g)      MgCl<sub>2</sub>  
 pH 9,5

**Farbsubstrat-Lösung**

10ml                      Detektionspuffer  
 200µl                    NBT/BCIP-Stammlösung (im Kit enthalten)

#### 3.13.4. Verdau der genomischen DNS der transgenen Karotten

Da für den Southern Blot genomische DNS-Mengen von 8-10 µg, entsprechen etwa 2 bis 4 g Pflanzenmaterial (ROGERS und BENDICH, 1988), nötig sind, diese aber aus einer einzelnen transgenen Karottenpflanze nicht gewonnen werden konnten, wurden Mischproben mehrerer Pflanzen der gleichen Versuchsglieder erstellt. Durchschnittlich mußten 30 bis 40 Blätter der transgenen Pflanzen verwendet werden. Das Alter der Pflanzen schwankte abhängig von der Transformation: Die transgenen Pflanzen der Transformation I (4 h Cokultur) waren 7-8 Monate, die der Transformation II (8 h Cokultur) 2-3 Monate und die der Transformation III (48 h Cokultur) etwa 6 Monate alt. Die Mischproben entstammten jeweils einem Transformationszeitpunkt. Sie wurden aus einzeln aufgearbeiteten Pflanzenproben (s. Kapitel 3.11.) gewonnen, die mithilfe der PCR auf das Vorhandensein der einzelnen rol-Gene geprüft worden waren. Konnte das jeweilige rol-Gen nachgewiesen werden, wurde die entsprechende Pflanzenprobe aufbewahrt und dann mit weiteren, rol-positiven Pflanzenproben des gleichen Transformationszeitpunktes und der gleichen Cokulturdauer gemischt. Die Mischprobe wurde gefällt und schließlich als eine Probe verdaut. Es wurden nur Pflanzenproben mit positivem Nachweis der rol-Gene verwendet, weil untersucht werden sollte, ob die vorhandenen rol-Gene in der Kombination rolABC oder separat (d.h. rolA, rolB bzw. rolC) und an welcher Stelle in das Pflanzengenom eingebaut worden waren.

Die DNS wurde in Anlehnung an HOLEFORS et al. (1998) mit drei Restriktionsendonukleasen (HindIII, EcoRI, EcoRV) verdaut (Schnittstellen s. Abb. 5). Die Restriktionsendonukleasen wurden so gewählt, daß die rol-Gen-Kombination auf der T-DNS in definierte Restriktionsfragmente aufgespalten wurde. Die rol-Gene A und B liegen demnach in einem Restriktionsfragment von 1300 bp vor und können abhängig von der gewählten Sonde separat nachgewiesen werden, rolC im Molekulargewichtsbereich von 1900 bp. Falls die gesamte Kombination in das Karottengenom inseriert worden war, mußten dann beim Southern Blot Banden mit dem durch die Restriktionsenzyme charakterisierten Molekulargewicht entstehen. Banden, die in anderen Molekulargewichtsbereichen der Restriktionsfragmente sichtbar waren, mußten demzufolge auf einen separaten Einbau der einzelnen rol-Gene an anderer Stelle in das Karottengenom schließen lassen.



Abhängig von der spezifischen Enzymaktivität wurden die Mengen des jeweiligen Enzyms (alle hier verwendeten Restriktionsenzyme von der Firma AMERSHAM LIFE SCIENCE) berechnet. Pro  $\mu\text{g}$  DNS wurde mit etwa 1-3 U Enzym gerechnet.

Da der Verdau nicht durch alle Enzyme gleichzeitig erfolgen konnte, wurde die DNS in zwei Ansätzen geschnitten. Zwar wäre der Einsatz eines CA-Puffers (CA= cuts all) denkbar gewesen, jedoch sollte ein Verdau von 100%, gewährleistet durch den spezifischen Puffer, erreicht werden (Firma AMERSHAM LIFE SCIENCE).

1. Schneideansatz : 200 $\mu\text{l}$  DNS in ddH<sub>2</sub>O gelöst (entsprechend 10  $\mu\text{g}$  DNS)  
 25 $\mu\text{l}$  Schneidepuffer M  
 22 $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O  
3 $\mu\text{l}$  HindIII (45 U)  
250 $\mu\text{l}$

Der Ansatz wurde kurz herunterzentrifugiert und bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Nach dem ersten Verdau mußte die DNS vom Enzym und vom Puffer gereinigt werden und wurde deshalb mit 1/10 Volumenteil 3M Natriumacetat (pH 6) und 2,5 Volumenteilen vorgekühltem (-20°C) absoluten Ethanol für 10 Minuten bei -80°C gefällt. Anschließend wurde bei 13.000 UpM für 15 Minuten zentrifugiert, das Pellet mit 70%igem Alkohol gewaschen, getrocknet und mit 200 $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Anschließend wurde der weitere Verdau vorgenommen.

2. Schneideansatz : 200 $\mu\text{l}$  DNS in ddH<sub>2</sub>O gelöst  
 25 $\mu\text{l}$  Schneidepuffer H  
 19 $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O  
 3 $\mu\text{l}$  EcoRI (45 U)  
3 $\mu\text{l}$  EcoRV (45 U)  
250 $\mu\text{l}$

Auch der zweite Verdau erfolgte für 2 Stunden bei 37°C. Die Probe wurde mit 1/10 Volumenteil 3 M Natriumacetat (pH 6) und 3 Volumenteile vorgekühltem (-20°C) absoluten Ethanol zum Präzipitieren versetzt. Nach 10minütiger Kühlung auf Eis wurde bei 13.000 UpM für 15 Minuten zentrifugiert, das Pellet gewaschen, getrocknet und in 50 $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O

gelöst. Für die Elektrophorese wurden die so vorbereiteten Proben mit 5µl Bromphenolblau versetzt.

### 3.13.5. Elektrophorese

Die verdauten DNS-Fragmente wurden anschließend in einer Elektrophorese aufgetrennt. Dazu wurde ein 1%iges Agarosegel ohne Ethidiumbromid, um Verunreinigungen zu vermeiden, gegossen und links und rechts neben den DNS-Proben Digoxigenin-markierter Marker (DNA-Längenstandards III, Firma BOEHRINGER) aufgetragen. Weil das Agarosegel ohne Ethidiumbromid hergestellt worden war, konnte nach der Elektrophorese keine Überprüfung des vollständigen Verdaus auf dem Transilluminator erfolgen. Bei den vorliegenden Bedingungen sollte dieser aber trotzdem erreicht worden sein.

Die Elektrophorese wurde mit 1fachem TBE-Puffer bei einer Spannung von 80V und maximaler Stromstärke für 15 Stunden in einer 4°C-Kühlkammer durchgeführt. Danach mußte das Gel für den Blot vorbereitet werden.

### 3.13.6. Kovalente Bindung der DNS an die Membran

Nach dem Abbau des Blots am nächsten Tag wurde die Membran vorsichtig vom Gel abgerollt, luftgetrocknet und für 3 Minuten auf der DNS-Seite auf dem Transilluminator mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt, um die Thymingruppen der DNS an die primären Aminogruppen der Membran zu binden („Crosslinking“). Auf diese Weise wird durch die kovalente Bindung der übertragenen DNS an die Membran verhindert, daß die DNS durch das in den Hybridisierungs- und Waschvorgängen vorhandene SDS von der Membran gelöst wird (CHURCH und GILBERT, 1984).

### 3.13.7. Herstellung der Sonde

Für die Herstellung der Sonde wurde das Plasmid pPCV 002 mit den rol-Genen ABC verwendet. Da im Southern Blot alle 3 rol-Gene nachzuweisen waren, mußten 3 Sonden, d.h. eine zum Nachweis von rolA, eine für rolB und eine dritte für rolC, hergestellt werden.

Es wurde zunächst eine Plasmidpräparation durchgeführt und ca.10 ng der erhaltenen Plasmid-DNS mit den Primern für einen Teil des rolA-Gens in einer PCR amplifiziert, so daß sich die Menge des gewünschten Templates erhöhte. Dieses Verfahren wurde ebenfalls für die Erstellung der Sonde für rolB und rolC angewendet. Der jeweilige PCR-Ansatz wurde vollständig in einer Elektrophorese aufgetrennt und die Bande, die in der Höhe des entsprechenden Gens lag, unter UV-Licht (366 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit einem Kit aufbereitet. Die so vorbehandelte Template-DNS wurde für rolA mit HindIII und für rolB mit EcoRV verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt und wie oben beschrieben aufbereitet.

#### 3.13.7.1. Aufbereitung der Sonden-DNS aus dem Gel

Nach dem Herausschneiden der gewünschten Bande auf dem Transilluminator (366 nm) wurde das Gelstück gewogen und die Reinigung der DNS mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit der Firma QIAGEN vorgenommen. Die Menge des QG-Puffers ergab sich aus dem Gewicht des Gelstücks, pro Gewichtsanteil Gel wurden 3 Volumenteile QG-Puffers zur Verflüssigung der Agarose und Bindung der DNS zugegeben. Dann wurde die Probe bei 50°C für 10 Minuten inkubiert. Um die Verflüssigung der Agarose zu beschleunigen, wurde die Probe alle 2 bis 3 Minuten leicht geschwenkt. Nach der vollständigen Verflüssigung des Gels wurde über die Farbe des QG-Puffers der richtige pH-Wert eingestellt. Nur bei einem pH unter 7,5 konnte eine effiziente Bindung der DNS an die QIAquick-Membran erreicht werden. War der pH-Wert korrekt, wurde ein Volumenteil Isopropanol zugegeben und die so behandelte Probe auf die sog. QIAquick-Säule aufgetragen, um die DNS an deren Membran zu binden. Nach einer Zentrifugation bei 13.000 UpM für 1 Minute wurde die abzentrifugierte Lösung verworfen und die Membran mit 750 µl PE-Puffer gewaschen, um Salze, Enzyme, nichtinkorporierte Nucleotide, Agarose und sonstige Verunreinigungen zu entfernen. Nun wurde das Eluat wiederum verworfen und die Säule bei 13.000 UpM für 1 Minute erneut zentrifugiert, um noch vorhandenes Ethanol aus dem PE-Puffer aus der Membran zu entfernen. Da die DNS-Elution stark abhängig von pH und Salzkonzentration ist und sich ein von pH 7,0 bis 8,5 als optimal erwiesen hat, wurde die Elution mit 50 µl des Puffers EB (10mM Tris-Cl, pH 8,5) bei 13.000 UpM für 1 Minute vorgenommen.

### 3.13.7.2. Random primed DNS-Markierung der Sonde mit Digoxigenin-dUTP

Für die Markierung und die Detektion wurde das „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ von der Firma BOEHRINGER verwendet. Das nicht-radioaktive System verwendet Digoxigenin (DIG), ein steroides Hapten, um die DNS für die Hybridisierung zu markieren.

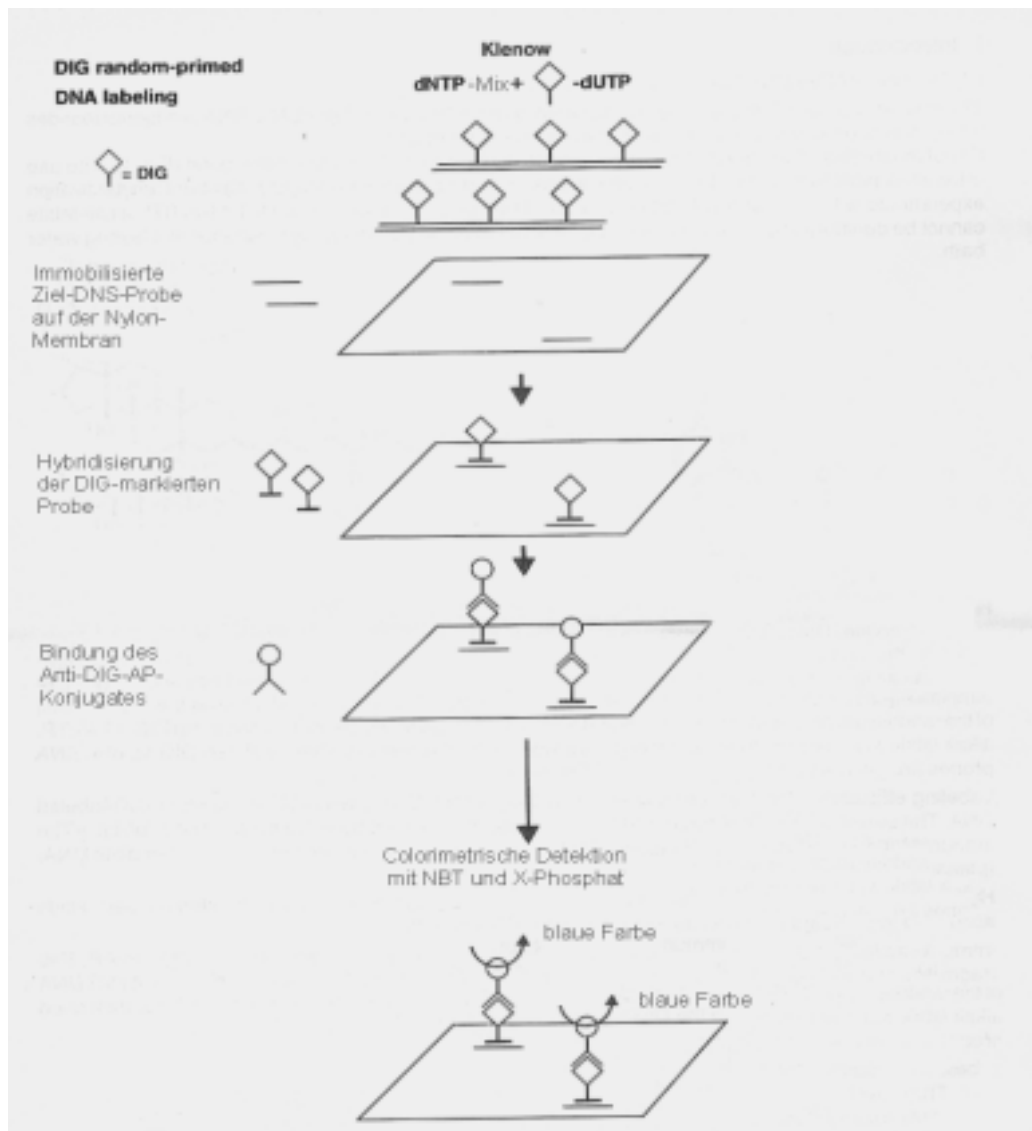


Abb. 8: DIG-Labeling und Detektion (BOEHRINGER)

Bei der Markierung wird DIG an dUTP über eine alkali-labile Esterbindung gekoppelt, so daß die DNS-Proben nicht durch Basen, sondern durch Erhitzen denaturiert werden müssen. Das Labeling der DNS (s. Abb. 8) erfolgt zufällig über die Hybridisierung von Oligonucleotiden an die denaturierte DNS. Der Komplementärstrang wird über das Klenow-Enzym synthetisiert, das zur Synthese die 3'OH-Termini der zufällig hybridisierten Oligonucleotide als Primer und eine Mischung von DIG-11-dUTP-markierten Oligonucleotiden benutzt. Auf diese Weise wird DIG-dUTP in den neu synthetisierten Strang eingebaut.

Die vorbereitete DNS aus der Sondenpräparation wurde so verdünnt, daß in 15 µl eine DNS-Menge von 3 µg vorlag. Die DNS wurde durch Kochen im Wasserbad für 10 Minuten denaturiert und anschließend schnell auf Eis abgekühlt. Auf Eis wurden zunächst 2µl Hexanucleotid-Mix, anschließend 2µl dNTP-Mix sowie 1µl Klenow-Enzym hinzupipettiert, durch kurzes Herunterzentrifugieren gemischt und bei 37°C für 20 Stunden inkubiert. Nun wurden 2µl einer 0,2M EDTA-Lösung, pH 8 hinzugegeben, um die Reaktion abzustoppen. Die DNS wurde durch Zugabe von 2,5µl 4M LiCl und 75µl vorgekühltem (-20°C) absoluten Ethanol von überschüssigen Nucleotiden gereinigt, um eine unspezifische Bindung der Nucleotide zu vermeiden, bei -80°C für 10 Minuten gefällt und danach bei 13.000 UpM für 15 Minuten zentrifugiert. Das entstehende DNS-Pellet wurde mit 50µl kaltem 70%igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert, getrocknet und in 50µl TE-Puffer gelöst. Die so markierte Sonde konnte nun im Weiteren für die Hybridisierung verwendet werden.

#### 3.13.8. Prähybridisierung

Um unspezifische Bindungen mit der Membran zu vermeiden, ist es notwendig, deren freie Bindungsstellen durch die im Kit vorhandene Blockierungslösung abzusättigen. Dies geschieht durch eine Prähybridisierung. Der Standardhybridisierungspuffer wurde auf die Hybridisierungstemperatur von 68°C im Hybridisierungsöfen (Firma HYBOND) angewärmt und zur Membran im Hybridisierungsbeutel hinzupipettiert (20ml/100cm<sup>2</sup>). Unter leichter Auf- und Abwärtsbewegung wurde die Membran 30 Minuten bei 68°C inkubiert.

#### 3.13.9. Hybridisierung

Zunächst wurde die DIG-markierte Sonde durch 5minütiges Kochen im Wasserbad denaturiert und auf Eis schnell heruntergekühlt. Die adäquate Menge an Sonde (5-25ng/ml Standardhybridisierungspuffer) wurde zum Standardhybridisierungspuffer (2,5ml/100cm<sup>2</sup>) hinzupipettiert und gut durch Pipettieren gemischt. Es war wichtig, eine Schaumbildung zu vermeiden, da diese zu verstärkter Hintergrundfärbung führen konnte.

Nach Vorbereitung der Sonde bzw. der Hybridisierungslösung wurde die Prähybridisierungslösung aus dem Hybridisierungsbeutel entfernt und die

Hybridisierungslösung hinzupipettiert. Unter leichtem Schwenken wurde die Membran für etwa 16 Stunden bei 68°C im Hybridisierungsofen (Firma HYBOND) hybridisiert.

Dabei hybridisierte die Sonde mit den komplementären Sequenzen auf der Membran, so daß die nachzuweisenden Gensequenzen im weiteren Verfahren durch Anfärbung sichtbar gemacht werden konnten.

#### 3.13.10 Posthybridisierung und Waschvorgänge

Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung abgegossen und die Membran zweimal für 5 Minuten in einer Lösung bestehend aus 2fachem SSC-Puffer und 0,1%igem SDS gewaschen. Danach erfolgten zwei Waschvorgänge für je 15 Minuten in einer Lösung aus 0,1fachem SSC-Puffer und 0,1%igem SDS bei 68°C unter ständigem Schwenken. Nach dem Waschen wurde die Membran aus dem Hybridisierungsbeutel entfernt und alle weiteren Detektionsvorgänge in einer Plastikbox vorgenommen.

#### 3.13.11. Immunologische Detektion und Färbung

Die Membran wurde einige Minuten lang mit Waschpuffer abgespült. Anschließend wurde sie für 30 Minuten in der sog. Blockierungslösung (1fach konzentriert) inkubiert. Währenddessen wurde das Anti-DIG-AP-Konjugat (eine Lösung, die Antikörper gegen DIG enthält) in einer Aktivität von 75 mU/ml zu 20 ml 1facher Blockierungslösung gegeben. Die Membran wurde nun für 30 Minuten in dieser Antikörper-Lösung inkubiert. Danach erfolgte ein zweimaliges Waschen für je 15 Minuten in je 100ml Waschpuffer. Die Membran mußte dann für 2-5 Minuten in 20 ml Detektionspuffer äquilibriert werden. Zur Farbreaktion wurde die Membran für etwa 16 Stunden in 10ml frisch angesetzter Farbsubstrat-Lösung im Dunkeln inkubiert. Es war wichtig, die Membran während der Farbentwicklung nicht zu bewegen. Wenn die gewünschte Färbung erreicht war, wurde die Membran für einige Minuten in 50 ml Aqua dest. gewaschen und so die Reaktion abgestoppt.

Die Membran wurde nun zur weiteren Auswertung fotografiert und kopiert.

### 3.14. Chemikalienliste

#### 3.14.1. Chemikalien für die Gewebekultur

Die verwendeten Chemikalien wiesen im Allgemeinen die Reinheitsstufe „pro Analysis“ auf.

Ammoniumsulfat: MERCK, 1217

Borsäure: MERCK, 165

Calciumchlorid ( $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ): MERCK, 2382

Caseinhydrolysat: FLUKA, 22090

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D): SERVA, 19410

Ethanol p.a.: MERCK, 983

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA): FLUKA, 03650

Kaliumjodid: MERCK

Kaliumnitrat: MERCK, 5061

Kupfersulfat ( $\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ): MERCK, 2489645

Magnesiumsulfat ( $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ): MERCK, 5882

Mangansulfat ( $\cdot \text{H}_2\text{O}$ ): MERCK, 5960

myo-Inosit (für die Mikrobiologie): MERCK, 4728

Natriumdihydrogenphosphat ( $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ): MERCK, 6345

Natriummolybdat ( $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ): FLUKA, 71756

Natriumsulfat ( $\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ): MERCK, 6648

Saccharose: MERCK, 8181

Zinksulfat ( $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ): MERCK, 8883

#### 3.14.2. Chemikalien für molekularbiologische Untersuchungen

Für diese Untersuchungen wurden weitestgehend reine Chemikalien (Chemikalien für die Molekularbiologie) verwendet.

Agarose: GIBCO BRL, 540-5510UA

Ampicillin: SIGMA, A-0166

Bactoagar: GIBCO BRL, 20001-020

Beef extract: SIGMA, B4888  
Bromphenolblau: SIGMA, B-5525  
Carbenicillin: SIGMA, c3416  
Cefotaxim: DUCHEFA, 56626C  
Ethanol p.a.: MERCK, 983  
Ethidiumbromid: SIGMA, E-1510  
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA): SIGMA, E-5134  
Glucose: MERCK, 8337  
Isopropanol: MERCK, 9634  
Kaliumacetat: SIGMA, P-3542  
Kanamycin: DUCHEFA, 509017  
Magnesiumchlorid ( $6\text{H}_2\text{O}$ ): MERCK, 63.25000  
NaOH: MERCK, C652962  
Natriumacetat: SIGMA, S-2889  
Natriumchlorid: MERCK, 12005  
Natriumdodecylsulfat (SDS): SERVA, 20760  
Reagenziensatz für den Southern Blot : DIG DNA Labeling and Detection Kit, BOEHRINGER Mannheim, 1093657  
Qiaquick Gel Extraction Kit (50): QIAGEN, 28704  
DNeasy Plant Minikit (50): QIAGEN, 69104  
Rifampicin: SIGMA, R7382  
Streptomycin: SIGMA, S-1277  
Ticarcillin: DUCHEFA, 56626C  
Tris-Base: SIGMA, T-5013  
Tris/HCL : SERVA, 37180  
Tween 20 : MERCK, S 9555080 930  
Yeast extract : GIBCO BRL, 200047-056

### 3.14.3. Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Längenmarker für molekularbiologische und gentechnologische Untersuchungen

Zum Ansetzen der Lösungen und Puffer wurde steriles Aqua bidest. verwendet. Die Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur aufbewahrt.



**Natriumacetat-Stammlösung:** Die Konzentration der Stammlösung betrug 3M, der pH-Wert wurde mit Essigsäure bzw. NaOH auf 6,0 eingestellt.

**Lambda DNA HindIII Digest:** 319 µg DNS/ml Stammkonzentration der Firma SIGMA: 23130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp, 2027 bp, 564 bp, 125 bp. Es wurde jeweils 1µg DNS/Spur auf dem Gel aufgetragen. Der Längenmarker wurde bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

**100 bp ladder plus marker:** 0,5 mg DNS/ml Stammkonzentration der Firma PEQLAB: 3000 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1200 bp, 1031 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp. Es wurde jeweils 1µg DNS/Spur auf dem Gel aufgetragen. Der Längenmarker wurde bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

**DNA-Längenstandards III, Digoxigenin-markiert:** 10 µg DNS/µl der Firma BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICA: 21226 bp, 5148 bp, 4973 bp, 4268 bp, 3530 bp, 2027 bp, 1904 bp, 1584 bp, 1375 bp, 947 bp, 831 bp, 564 bp, 125 bp. Es wurde 1 µg DNS/ Spur aufgetragen. Der Längenmarker wurde bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Zellzyklussynchronisation

Aus der Literatur (GOULD, 1984) ist bekannt, daß eine Annäherung an ein homogenes Zellmaterial am ehesten durch eine synchrone bzw. nicht zirkulierende Zellpopulation erreicht werden kann. Mithilfe des Hemmstoffes FdU wird die DNS-Replikation reversibel blockiert, so daß sich die Zellen der Suspension an der G<sub>1</sub>/S-Phase-Grenze ansammeln (BLASCHKE et al., 1978, KIBLER, 1978). Nach der Aufhebung des Arrests durch Thymidin beginnen die Zellen die nächste DNS-Replikationsphase synchron. Der Grad der Zellzyklussynchronisation, d.h. der prozentuale Anteil –bezogen auf die Gesamtheit der gemessenen Zellkerne– der in der G<sub>1</sub>-Phase verharrenden Zellen, und die Zellzyklusprogression wurde bei allen Suspensionen mithilfe der Bisbenzimidfärbung nachgewiesen. Die Zeitpunkte der Probenentnahme waren T(0), T(0,5), T(1), T(1,5), T(2), T(3), T(4) und T(6) nach Thymidinzugabe (s. Abb. 9-11).

Bei der Transformation I (4 h Cokultur) konnten etwa 60% der Zellen zum Zeitpunkt T(0) in der G<sub>1</sub>-Phase nachgewiesen werden. Nach etwa 90 Minuten befanden sich fast 50% der Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase. Nach 2 Stunden verringerte sich der Einfluß der Synchronisation immer mehr, so daß viele ähnliche Häufigkeiten zu verschiedenen Zellzyklusphasen im Histogramm sichtbar wurden. Nach etwa 6 Stunden lagen ungefähr 20% der Zellen wieder in der G<sub>1</sub>-Phase vor.

Die Synchronisationsrate der Suspension der Transformation II (8 h Cokultur) betrug etwas mehr als 60% zum Zeitpunkt T(0). Nach etwa 1 Stunde befanden sich 30% der Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase, deren Häufigkeit mit zunehmendem Zellzyklusablauf zunahm. Wie bei der Transformation I begann die Synchronität der Zellen abzunehmen und verschwand schließlich ganz.

Die Synchronisation der Suspension der Transformation III (48 h Cokultur) ergab eine Synchronität in der G<sub>1</sub>-Phase von etwas mehr als 60%. Nach 1,5 Stunden befanden sich fast 50% der Zellen in der S-Phase, jedoch war nach einer Zeitspanne von 2 Stunden der Einfluß der Synchronisation schon stark minimiert.

Obwohl methodisch eine höhere Synchronisationsrate von mehr als 80% in Vorversuchen erreicht werden konnte (s. Abb. 12), führten die hier angeführten Synchronisationsexperimente zu einer geringeren Synchronität der Zellsuspensionen.

#### 4.2. Gewebekultur

In Vorversuchen wurden die morphologischen Veränderungen, die durch rol-Gene in der Regel hervorgerufen werden, sowohl für einzelne rol-Gene als auch für die Kombination von rolABC geprüft. Da die größte Eindeutigkeit der Veränderung der Pflanze bei der Transformation mit rolABC beobachtet werden konnte, wurden danach alle Versuche mit dieser Kombination durchgeführt. Es wurde angenommen, daß so eine einfachere Bonitur der entstehenden Pflanzen durchzuführen wäre.

Bei allen Versuchen fanden makro- und mikroskopische Bonituren in allen Wachstumsstadien statt. Zunächst wurde alle 7 Tage bonitiert. Da die Embryonalentwicklung der Transformanten aber teilweise sehr verlangsamt vonstatten ging, wurden die Abschnitte etwas weiter (alle 14 Tage) gewählt. Im Folgenden sollen nur die Zeitpunkte mit deutlicher Entwicklungsprogression betrachtet werden. Deshalb soll auf den Entwicklungsstatus der Suspensionen zu den Zeitpunkten  $T_{14}$ ,  $T_{21}$ ,  $T_{42}$  bzw. bei der ersten Transformation auch  $T_{56}$  eingegangen werden.

Generell waren folgende Beobachtungen zu machen: Bei der ersten Transformation mit 4stündiger Cokultur verlief die Embryonalentwicklung der Suspension bis auf eine Ausnahme zum Zeitpunkt  $T(6)$  lediglich bis zum Torpedostadium und verharrte dort. Als auch nach Monaten der Kultur keine weitere Embryonalentwicklung festzustellen war, wurden die Suspensionen in neues  $B_5^-$ -Nährmedium, das mit 10 Volumen% frischer Kokosnußmilch versetzt war, überführt. Daraufhin kam es bei einigen Kulturen zu einer Weiterentwicklung zu Pflanzen, die im Weiteren beschrieben werden soll.

Die Embryonalentwicklung der 8 Stunden cokultierten Suspension verlief auch ohne Kokosnußmilch sehr rasch und vollständig, die der 48stündigen Cokultur –ebenfalls ohne Kokosnußmilch- vollständig, aber verlangsamt.

Die Bonituren erfolgten nach Einteilung der Suspension in die verschiedenen Phasen der somatischen Embryogenese. Zunächst beobachtet man zu Beginn der Embryonalentwicklung

die sog. PEMs (pro-embryogene Massen), d.h. Zellcluster aus embryogenen Zellen, nach deren Weiterentwicklung das globuläre Stadium, aus dem sich zunächst die Herz- und anschließend die Torpedoform ausbildet. Schließlich streckt sich der Torpedo und bildet einen sog. Embryoid aus, der morphologisch bereits einem reifen Embryo ähnelt. In der Folge wächst der Embryoid zu einem reifen Embryo, der bereits Kotyledonen und Primärwurzelbildung erkennen läßt, aus (GRIEB, 1991/2, NEUMANN, 1995).

Unter einem gestauchten Torpedo wird eine Torpedo-Form verstanden, die kürzer und dicker als ein normaler Torpedo vorliegt.

#### 4.2.1. Embryonalentwicklung der Transformation I (4 Stunden Cokultur)

Bonitur nach 14 Tagen der Kultur in hormonfreiem Medium:

In der untransformierten, unsynchronisierten Kontrolle fanden sich vorwiegend Torpedostadien und weiter entwickelte Pflänzchen, aber auch noch einige Herzformen.

Die Suspension der transformierten, unsynchronisierten Kontrolle wies sowohl Torpedostadien als auch einige Herzformen und Globuli auf.

Zeitpunkt T(0): Nur PEMs und Globuli waren erkennbar.

Zeitpunkt T(0,5): In der Suspension fanden sich PEMs und Globuli.

Zeitpunkt T(1): PEMs und Globuli hatten sich entwickelt.

Zeitpunkt T(1,5): Die Suspension wies PEMs und Globuli auf.

Zeitpunkt T(2): Vorwiegend Globuli, aber auch einige Herz- und Torpedoformen fanden sich in der Suspension.

Zeitpunkt T(3): Es konnten Globuli und gestauchte Torpedoformen beobachtet werden.

Zeitpunkt T(4): In der Suspension ließen sich PEMs und Globuli erkennen.

Zeitpunkt T(6): Es lagen vor allem Globuli, aber auch einige beginnende Herzstadien vor.

Bonitur nach 6 Wochen der Kultur in hormonfreiem Medium:

Aus der untransformierten, unsynchronisierten Kontrolle hatten sich mittlerweile größere Pflanzen entwickelt.

Die Suspension der transformierten, unsynchronisierten Kontrolle wies sowohl Torpedostadien als auch einige Herzformen und Globuli auf.

Zeitpunkt T(0): Nur PEMs und Globuli waren erkennbar.

Zeitpunkt T(0,5): In der Suspension fanden sich Globuli und Herzformen.

Zeitpunkt T(1): Globuli und einige Herzstadien hatten sich entwickelt.

Zeitpunkt T(1,5): Die Suspension wies Globuli auf.

Zeitpunkt T(2): Vorwiegend Globuli, aber auch einige Herz- und Torpedoformen fanden sich in der Suspension.

Zeitpunkt T(3): Es konnten gestauchte Herz- und Torpedoformen beobachtet werden.

Zeitpunkt T(4): In der Suspension ließen sich Globuli und Herzformen erkennen.

Zeitpunkt T(6): Es lagen vor allem Herz- und Torpedostadien vor.

Bonitur nach 2 Monaten der Kultur in hormonfreiem Medium (s. Abb. 13):

Die Suspension der transformierten, unsynchronisierten Kontrolle wies neben Globuli- und Herzformen Torpedostadien auf.

Zeitpunkt T(0): Einige Torpedostadien waren erkennbar, ebenfalls Globuli und Herzformen.

Zeitpunkt T(0,5): In der Suspension fanden sich einige Torpedostadien, vorwiegend jedoch Globuli und Herzformen.

Zeitpunkt T(1): Wenige gestauchte Torpedostadien hatten sich neben Globuli und Herzformen entwickelt.

Zeitpunkt T(1,5): Die Suspension wies außer Globuli und Herzformen einige Torpedos auf.

Zeitpunkt T(2): Einige Torpedoformen fanden sich in der Suspension, vor allem jedoch Globuli und Herzformen.

Zeitpunkt T(3): Es konnten gestauchte Torpedoformen sowie Globuli und Herzformen beobachtet werden.

Zeitpunkt T(4): In der Suspension ließen sich neben Globuli und Herzformen gestauchte Torpedoformen erkennen.

Zeitpunkt T(6): Die Torpedostadien hatten sich weiter zu Pflänzchen entwickelt.

#### 4.2.2. Embryonalentwicklung der Transformation II (8 Stunden Cokultur)

Bonitur nach 14 Tagen der Kultur in hormonfreiem Medium (s. Abb. 14):

In der untransformierten, unsynchronisierten Kontrolle fanden sich vorwiegend reife Embryonen.

Die Suspension der transformierten, unsynchronisierten Kontrolle wies fast ausschließlich Torpedostadien auf.

Zeitpunkt T(0): Zum größten Teil waren Torpedostadien erkennbar.

Zeitpunkt T(0,5): In der Suspension fanden sich vor allem Torpedos.

Zeitpunkt T(1): Vor allem Torpedostadien hatten sich entwickelt, auch einige herzförmige Stadien waren noch zu erkennen.

Zeitpunkt T(1,5): Die Suspension wies Torpedostadien auf.

Zeitpunkt T(2): Vorwiegend Torpedostadien, aber auch einige Herzformen fanden sich in der Suspension.

Zeitpunkt T(3): Es konnten Torpedoformen beobachtet werden.

Zeitpunkt T(4): In der Suspension ließen sich Torpedostadien erkennen.

Zeitpunkt T(6): Es lagen vor allem Torpedostadien vor.

Bonitur nach 21 Tagen Kultur in hormonfreiem Medium (s. Abb. 15):

In beiden Kontrollsuspensionen hatten sich vollständige Pflänzchen entwickelt.

Zeitpunkt T(0): Auch hier waren kleine Pflänzchen entstanden.

Zeitpunkt T(0,5): In der Suspension waren vor allem kleine Pflänzchen.

Zeitpunkt T(1): Es ließen sich sowohl kleine Pflänzchen als auch Embryoide beobachten.

Zeitpunkt T(1,5): In der Suspension waren vollständige Pflänzchen entwickelt.

Zeitpunkt T(2): Es fanden sich einige kleine Pflänzchen, vorwiegend aber Embryoide.

Zeitpunkt T(3): Vor allem wurden Pflänzchen beobachtet, aber auch einige Embryoide.

Zeitpunkt T(4): Es wurden Pflänzchen in der Suspension gebildet.

Zeitpunkt T(6): Einige Pflänzchen waren nachzuweisen, aber auch einige Embryoide.

#### 4.2.3. Embryonalentwicklung der Transformation III (48 Stunden Cokultur)

Bonitur nach 14 Tagen der Kultur in hormonfreiem Medium:

In der untransformierten, unsynchronisierten Kontrolle fanden sich vorwiegend Herzformen und Globuli.

Die Suspension der transformierten, unsynchronisierten Kontrolle wies sowohl Herzformen als auch Globuli auf.

Zeitpunkt T(0): Nur PEMs und Globuli waren erkennbar.

Zeitpunkt T(0,5): In der Suspension fanden sich PEMs und Globuli.

Zeitpunkt T(1): Globuli und Herzformen hatten sich entwickelt.

Zeitpunkt T(1,5): Die Suspension wies Globuli und Herzformen auf.

Zeitpunkt T(2): Vorwiegend Globuli, aber auch einige Herz- und Torpedoformen fanden sich in der Suspension.

Zeitpunkt T(3): Es konnten Globuli und Herzformen beobachtet werden.

Zeitpunkt T(4): In der Suspension ließen sich Globuli, Herz- und Torpedoformen erkennen.

Zeitpunkt T(6): Es lagen Globuli, Herz- und Torpedostadien vor.

Bonitur nach 21 Tagen der Kultur in hormonfreiem Medium:

In der untransformierten, unsynchronisierten Kontrolle fanden sich vorwiegend reife Embryonen und vollständige kleine Pflänzchen.

Die Suspension der transformierten, unsynchronisierten Kontrolle wies Torpedostadien auf.

Zeitpunkt T(0): Torpedostadien waren erkennbar.

Zeitpunkt T(0,5): In der Suspension fanden sich Globuli und Herzformen.

Zeitpunkt T(1): Herz- und Torpedoformen hatten sich entwickelt.

Zeitpunkt T(1,5): Die Suspension wies fast ausschließlich Torpedoformen auf.

Zeitpunkt T(2): Vorwiegend Torpedoformen fanden sich in der Suspension.

Zeitpunkt T(3): Es konnten Globuli, Herz- und Torpedoformen beobachtet werden.

Zeitpunkt T(4): In der Suspension ließen sich Globuli, Herz- und Torpedoformen erkennen.

Zeitpunkt T(6): Es lagen vor allem Herz- und Torpedostadien, aber auch noch einige Globuli vor.

Bonitur nach 6 Wochen der Kultur in hormonfreiem Medium:

In der untransformierten, unsynchronisierten Kontrolle fanden sich ausschließlich vollständige Pflänzchen.

Die Suspension der transformierten, unsynchronisierten Kontrolle wies reife Embryoide auf.

Zeitpunkt T(0): Reife Embryonen und einige vollständige Pflänzchen waren erkennbar.

Zeitpunkt T(0,5): In der Suspension fanden sich reife Embryonen und Embryoide.

Zeitpunkt T(1): Reife Embryonen und Embryoide hatten sich entwickelt.

Zeitpunkt T(1,5): Die Suspension wies reife Embryonen, Embryoide und vollständige Pflänzchen auf.

Zeitpunkt T(2): Es fanden sich reife Embryonen, Embryoide und vollständige Pflänzchen in der Suspension.

Zeitpunkt T(3): Es konnten reife Embryonen und Embryoide beobachtet werden.

Zeitpunkt T(4): In der Suspension ließen sich reife Embryonen, Embryoide und vollständige Pflänzchen erkennen.

Zeitpunkt T(6): Es lagen vor allem Embryoide vor.

Schon nach einer relativ kurzen Entwicklungsdauer konnten deutliche Unterschiede in den Entwicklungsstadien der unterschiedlichen Transformanten festgestellt werden. Die Kernfrage bei der Auswertung der Bonituren lag darin zu klären, weshalb nicht bei allen Transformationszeitpunkten und bei jeder Cokulturdauer Pflanzen entstehen konnten.

Besonders deutlich zeigen sich die Auswirkungen der Transformation bei der **Transformation I (4 h Cokultur)**. Wie bereits erwähnt, kam es bei den meisten Suspensionen zu keiner vollständigen Embryonalentwicklung. Lediglich zum Zeitpunkt T(6) bildeten sich Pflanzen aus. Jedoch konnte auch bei diesen Suspensionen eine Wachstumsretardierung beobachtet werden. Sogar die unsynchronisierte transformierte Kontrolle zeigte schwere Entwicklungsschäden, obwohl sie nach 2 Wochen in Kultur noch einen für die Transformanten normalen Entwicklungsverlauf genommen hatte. Allgemein betrachtet zeigten alle transformierten Suspensionen ein sehr langsames Fortschreiten der Embryonalentwicklung, die dann für fast alle Suspensionen mit dem Verharren in der Torpedo-Phase endete.

Wie aus der Literatur bekannt (STEWART et al., 1964), wurde das flüssige Endosperm der Kokosnuß in früheren Zeiten der Zell- und Gewebekultur als Initiator für die somatische



Embryogenese verwendet und den Suspensionskulturen zugesetzt. Obwohl die einzelnen Komponenten der Kokosnußmilch noch nicht vollständig analysiert werden konnten, lassen sich prinzipiell drei Fraktionen unterscheiden: ein Aminosäuregemisch, eine sog. Neutralfraktion aus Kohlenhydraten und anderen neutralen Substanzen, bei der besonders die Hexitole myo- und scyllo-Inosit sowie Sorbit einen wichtigen Stellenwert einnehmen, und eine sog. aktive Fraktion, die vorwiegend Cytokinine (2-Isopentenyladenin und Zeatin sowie deren Derivate) enthält, jedoch auch Auxine und Gibberelline aufweist (KRIKORIAN et al., 1990, LETHAM, 1978, STEWARD, 1985). Fernerhin können in geringerer Menge Proteingranula, Öltröpfchen sowie Nuclei nachgewiesen werden (VIJAYARAGHAVAN und PRABHAKAR, 1984).

Da neben den genannten Inhaltsstoffen auch phytohormonähnliche Substanzen, die noch nicht bis ins letzte Detail analysiert werden konnten, in der Kokosnußmilch enthalten sind, wird vermutet, daß auch diese einen positiven Effekt auf den Ablauf des Wachstums besitzen könnten. Deshalb wurde nach erfolgloser Cytokininapplikation nach etwa 3 Monaten die Zugabe von Kokosnußmilch in die Suspension eingesetzt, um eine potentielle Wachstumswirkung auf die arretierten Kulturen zu testen. Bei einigen Suspensionskulturen führte dies zur Weiterentwicklung und Ausbildung von Pflänzchen (Kulturen der Transformationszeitpunkte T(0), T(0,5), T(1,5), T(2) und T(4) sowie der unsynchronisierten, transformierten Kontrolle T(K) ), deren Entwicklung sehr verlangsamt war.

Bei der **Transformation II (8 h Cokultur)** –ohne Kokosnußmilchapplikation- zeigte sich jedoch eher ein positiver Einfluß der Transformation. Alle Kulturen entwickelten sich für Transformanten sehr schnell und vollständig und führten in jedem Fall zur Pflanzenausbildung. Die Transformation zeigte hier keinen makroskopisch sichtbaren Einfluß auf die Embryonalentwicklung.

Es muß davon ausgegangen werden, daß bei der **Transformation III (48 h Cokultur)** –ohne Kokosnußmilchapplikation- der Zellzyklus und damit auch die DNS-Replikationsphase mehrfach durchlaufen wurde und somit die Wahrscheinlichkeit besteht, daß die rol-Gene mehrfach oder in verschiedenen Zellzyklen inseriert wurden. Es muß also die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß die rol-Gene sowohl an verschiedener Stelle als auch zu verschiedenen, nicht mehr durch die Zellzyklussynchronisierung beeinflussbaren Zeiten in das Karottengenom eingebaut wurden. Zu allen Transformationszeitpunkten entwickelten sich Pflänzchen. Die Embryonalentwicklung der ersten zwei Wochen verlief fast parallel zur

unsynchronisierten transformierten Kontrolle. Ab der dritten Entwicklungswoche verlangsamte sich die Entwicklungsgeschwindigkeit jedoch im Vergleich zur unsynchronisierten, untransformierten Kontrolle. Trotz dieser Wachstumsretardierung scheint die Transformation keinen wesentlichen Schaden im Embryonalentwicklungsmuster der transformierten Suspensionskulturen hinterlassen zu haben, da alle Phasen durchlaufen werden konnten.

#### 4.2.4. Bonitur der transgenen Pflanzen

Der Entwicklungszustand aller Transformanten wurde ab dem 3. Monat nach Einbringen der Suspension in hormonfreies Medium bonitiert. Da es allerdings zu unterschiedlichen Entwicklungsverläufen – wahrscheinlich bedingt durch die Dauer der Cokultur – kam, konnten die Transformanten verschiedener Versuche nicht immer zu den gleichen Zeitpunkten bonitiert werden.

Allgemein betrachtet ergab die Transformation mit dem rol-Konstrukt deutliche Veränderungen der Morphologie, obwohl auch normal aussehende Pflanzen beobachtet werden konnten: Die Pflanzen waren in der Regel sehr klein, hatten zum großen Teil keine Fiederblätter, sondern hauptsächlich Blätter, die entweder rund und breit oder schmal und lanzettförmig erschienen und teilweise eine ausgeprägte, durch Anthocyane hervorgerufene, Färbung zeigten. Auch die Wurzelbildung variierte bei den Transformanten deutlich. Es wurden verschiedene Varianten mit z.T. starker oder minimierter Seitenwurzelbildung, langen oder sehr kurzen Adventivwurzeln oder sogar Pflanzen mit kaum erkennbarer Wurzelbildung beobachtet.

Da die Beurteilung der einzelnen Transformanten sehr mühsam war, wurde ein tabellarisches Bonitierungschema verwendet. Zunächst wurden alle Transformanten einzeln bonitiert (s. Tab. 1/1-1/6), anschließend in sog. Morphotypen eingeteilt und auf diese Weise katalogisiert (s. Tab. 2).

##### 4.2.4.1. Auswertung der Bonituren und Einteilung der Pflanzen in sog. „Morphotypen“

Für die Katalogisierung der entstandenen Phänotypen wurden alle verwertbaren Pflanzen und Fotos herangezogen. Nach Festlegung bestimmter Charakteristika in Bezug auf Blatt- und Wurzelbildung wurden exemplarisch 6 Morphotypen eingeteilt, die als Schema für die

weitere Beurteilung der einzelnen Transformanten herangezogen wurden (s. Tab. 1 und Abb. 16).

Der **Morphotyp 1** beschreibt die normale Karottenpflanze und ist charakterisiert durch Kotyledonen, Petiolen, Primär- und Seitenwurzelbildung.

Pflanzen des **Morphotyps 2** zeigen schmale Laubblätter und neben Primär- auch Adventivwurzelwachstum, jedoch keine Lateralwurzeln.

Der **Morphotyp 3** ist charakterisiert durch schmale, ungefiederte Blätter ohne Petiolen, die möglicherweise veränderte Kotyledonen sind, und Wurzelwachstum.

Bei Pflanzen des **Morphotyps 4** sind breite, ungefiederte Blätter ohne Petiolen, die durch Anthocyane violett bis braun gefärbt sind, und neben Primär- auch Adventivwurzeln zu beobachten.

Der **Morphotyp 5** besteht aus Pflanzen, die breite, ungefiederte Blätter ohne Anthocyan und keine Kotyledonen aufweisen. Ein vermehrtes Seitenwurzelwachstum ist zu beobachten.

Pflanzen des **Morphotyps 6** besitzen schmale, ungefiederte Blätter, die spiralförmig verdreht sind, und Wurzeln, weisen jedoch keine Kotyledonen auf.

Wie bereits in Kapitel 2.3. über die Wirkung der rol-Gene erwähnt, zeigen diese einen deutlichen Einfluß auf die Pflanzenmorphogenese. Diesen Einfluß bestätigen die vorliegenden Ergebnisse, die Ausprägung des „Ri-Phänotyps“ ist jedoch nicht so eindeutig wie erwartet. Bezugnehmend auf Tab. 3 können folgende Aussagen über das Auftreten der verschiedenen Morphotypen bei den drei durchgeführten Transformationen gemacht werden:

Betrachtet man die **Transformation I (4 h Cokultur)**, wird deutlich, daß nur bei den Transformanten, die ohne Kokosnußmilchzusatz zu Pflanzen gewachsen waren, normal aussehende Pflanzen (Morphotyp 1) entstanden waren, außerdem Pflanzen mit schmalen, ungefiederten, spiralig verdrehten Blättern und Adventivwurzelbildung (Morphotyp 6). Die Pflanzen, die erst nach Zugabe des flüssigen Kokosnußendosperms aus der Suspension wachsen konnten, besaßen bei allen Transformanten keine Kotyledonen und Fiederblätter. Die Pflänzchen der unsynchronisierten, transformierten Kontrolle T(K) besaßen lanzettförmige, ungefiederte hellgrüne Blätter und kurze, dünne Adventivwurzeln (Morphotyp 3). Zum Zeitpunkt T(0) transformierte Pflanzen besaßen entweder schmale, ungefiederte Blätter und Adventivwurzeln (Morphotyp 3) oder breite, ungefiederte Blätter und Seitenwurzeln (Morphotyp 5). Die Pflanzen des Transformationszeitpunktes T(0,5) zeigten schmale, ungefiederte, spiralig verdrehte Blätter und Adventivwurzeln, vergleichbar mit den

zu T(6) entstandenen Pflanzen mit dem Morphotyp 6. Die Suspension, die zu Zeitpunkt T(1) cokultiviert worden war, entwickelte keine Pflanzen. Die Pflanzen von T(1,5) entsprachen dem Morphotyp 4 mit breiten, ungefi ederten Blättern, die von Anthocyanen violett gefärbt waren, und Adventivwurzelbildung. Beim Zeitpunkt T(2) entstanden Pflanzen, die vergleichbar mit dem Zeitpunkt T(0) die Morphotypen 3 und 5 ausbildeten, d.h. schmale ungefi ederte Blätter mit Seitenwurzeln bzw. breite, ungefi ederte Blätter mit Adventivwurzeln, und fernerhin den Morphotyp 6 mit spiralig verdrehten Blättern und Adventivwurzelbildung. Die Suspension des Zeitpunktes T(3) entwickelte keine Pflanzen. Zum Transformationszeitpunkt T(4) entstanden Pflanzen der Morphotypen 3 und 5, d.h. Karottenpflanzen mit schmalen, ungefi ederten Blättern mit Adventivwurzeln bzw. mit breiten, ungefi ederten Blättern mit Seitenwurzelbildung.

Bei der **Transformation II mit 8 stündiger Cokulturzeit** konnten bei den Transformationszeitpunkten T(0) und (1) sowohl normale Pflanzen (Morphotyp 1) als auch Pflanzen mit schmalen ungefi ederten Blättern ohne Petiolen und mit Adventivwurzelwachstum (Morphotyp 3) und mit breiten ungefi ederten Blättern mit Seitenwurzeln (Morphotyp 5) bonitiert werden. Zum Zeitpunkt T(0,5) bildeten sich wie zu T(0) und (1) Pflanzen der Morphotypen 1, 3 und 5 aus sowie des Morphotyps 4, der breite ungefi ederte, anthocyangefärbte Blätter und Seitenwurzeln aufweist. T(1,5) und T(2) zeigten eine Pflanzenentwicklung mit Ausbildung der Morphotypen 3 und 5 mit entweder schmalen oder breiten ungefi ederten Blättern und Adventivwurzeln. Zum Cokulturzeitpunkt T(3) lassen sich normale Pflanzen (Morphotyp 1) sowie Pflanzen mit schmalen ungefi ederten Blättern und Adventivwurzeln (Morphotyp 3) beobachten. Normale Pflanzen (Morphotyp 1) und Pflanzen mit schmalen Fiederblättern (Morphotyp 2) konnten bei T(4) nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt T(6) entwickelten sich normale Pflanzen, solche mit schmalen ungefi ederten Blättern und Adventivwurzeln, mit schmalen, spiralig verdrehten Blättern und einige wenige Pflanzen mit breiten ungefi ederten Blättern (Morphotypen 1, 3, 6, 5).

Alle Pflanzen der **Transformation III ( 48 h Cokultur)** wiesen neben den veränderten Morphotypen auch normale Pflanzen (Morphotyp 1) auf. T(0) und T(0,5) zeigten zusätzlich Pflanzen des Morphotyps 4 und 5 mit breiten ungefi ederten Blättern mit und ohne Anthocyanbildung und Adventivwurzeln. Beim Transformationszeitpunkt T(1) konnten neben dem Morphotyp 1 die Typen 3, 4 und 5 beobachtet werden, die durch schmale ungefi ederte und breite ungefi ederte Blätter mit und ohne Anthocyane charakterisiert sind. T(1,5) zeigte

Pflanzen der Morphotypen 3, 5 und 6 (schmale und breite ungefiederte Blätter oder schmale, spiralig verdrehte Blätter), T(2) Pflanzen der Morphotypen 3 und 6 (schmale ungefiederte Blätter bzw. schmale spiralig verdrehte Blätter). Die Pflanzen der Transformationen T(3) bis T(6) bildeten neben dem bereits erwähnten Morphotyp 1 nur noch den Morphotyp 3 mit schmalen ungefiederten Blättern aus.

Bestimmte Morphotypen kristallisierten sich bei den verschiedenen Transformationszeitpunkten heraus. Der Morphotyp 2 war lediglich bei einer einzigen Transformation zu beobachten, andere Morphotypen traten sehr häufig auf (z.B. Typ 1, 3 und 5). Teilweise konnten bestimmte Morphotypen ab einer bestimmten Transformationszeit bei jeder zeitlich danach folgenden Transformante beobachtet werden. Bei der Transformation I fiel neben vielen weiteren Besonderheiten auf, daß nur bei den mit Kokosnußmilch behandelten Suspensionen keine normal aussehenden, sondern ausnahmslos in ihrer Morphologie stark veränderte Pflanzen auftraten.

Aufgrund des häufigen Auftretens somaklonaler Variationen in der Gewebekultur (ARNHOLDT-SCHMITT, 1993, WILHELM, 1999) mußte auch bei den durchgeführten Versuchen mit diesem Effekt gerechnet werden. Bei der Betrachtung der Ergebnisse könnten die auftretenden Morphotypen zwar mit der somaklonalen Variation in Zusammenhang gebracht werden, jedoch schien das Auftreten einer einzigen morphologischen Ausprägung in der untransformierten, unsynchronisierten Kontrolle dafür zu sprechen, daß die beobachtbaren Veränderungen in der Morphologie der Karottenpflanzen in erster Linie auf die Insertion der rol-Gene zurückzuführen waren. Dieser Punkt soll jedoch in der Diskussion detaillierter ausgeführt werden.

#### 4.2.4.2. Quantitative Auswertung des Auftretens bestimmter Morphotypen zu den verschiedenen Transformationszeitpunkten

In den Graphiken wurde die Häufigkeit des Auftretens der sechs Morphotypen in Zusammenhang mit dem Zeitpunkt der Transformation nach erneuter Anregung des Zellzyklus und in Abhängigkeit von der Cokulturdauer aufgetragen (s. Abb. 17-19 und Tab. 4).

Auch die Graphiken zur **Transformation I (4 h Cokultur)** konnten zeigen, daß bestimmte Morphotypen nur bei einigen Transformationszeitpunkten auftraten.

In den Graphiken wurde die Häufigkeit des Auftretens der sechs Morphotypen in Zusammenhang mit dem Zeitpunkt der Transformation nach erneuter Anregung des Zellzyklus und in Abhängigkeit von der Cokulturdauer aufgetragen.

Die Transformationszeitpunkte T(1) und T(3) führten nicht zur Ausbildung von Pflanzen. Der Vollständigkeit halber wurden diese Zeitpunkte trotzdem in der Graphik abgebildet, jedoch immer mit einem Auftreten von 0%.

Das Auftreten des **Morphotyps 1**, d.h. der normal aussehenden Pflanzen, konnte lediglich in der Kultur des Transformationszeitpunktes T(6), die als einzige nicht mit Kokosnußmilch behandelt worden war, mit einer Häufigkeit bei der Bonitur von 50% beobachtet werden.

Der **Morphotyp 2** trat in keiner der Kulturen auf.

Das Häufigkeitsprofil des **Morphotyps 3** wies einen Peak von 50% der bonitierten Pflanzen zum Zeitpunkt T(0) auf, sank dann zu den Zeitpunkten T(0,5) und T(1,5) auf 0% ab, um dann auf 33,3% zum Zeitpunkt T(2) und weiter auf 50% zum Zeitpunkt T(4) anzusteigen. Zum Zeitpunkt T(6) konnte eine Häufigkeit von 0% des Morphotyps 3 festgestellt werden. Außerdem konnte das Auftreten des Morphotyps 3 bei der unsynchronisierten, transformierten Kontrolle T(K) beobachtet werden.

Der **Morphotyp 4** trat zu den Zeitpunkten T(0,5) und T(1,5) mit einer maximalen Häufigkeit von 100% auf, zu den Zeitpunkten T(0), T(2), T(4) und T(6) überhaupt nicht.

Bei der Betrachtung des **Morphotyps 5** ergibt sich ein ähnliches Bild, jedoch mit drei Peaks. Die Auftrittshäufigkeit lag zum Zeitpunkt T(0) bei 50% der bonitierten Pflanzen, 33,3% zum Zeitpunkt T(2) und 50% zum Zeitpunkt T(4). T(0,5), T(1,5) und T(6) entwickelten diesen Morphotyp nicht.

Wiederum punktuell konnte der **Morphotyp 6** beobachtet werden, der zum Zeitpunkt T(2) mit einer Häufigkeit von 33,3% der bonitierten Pflanzen und zum Zeitpunkt T(6) mit 50% vorlag. Zu den Zeitpunkten T(0), T(0,5), T(1,5) und T(4) konnten keine Pflanzen dieses Morphotyps gefunden werden.

Bei manchen Morphotypen konnte eine gewisse Präferenz in der Ausprägungshäufigkeit beobachtet werden. So wurden die Morphotypen 3 und 5 immer zum gleichen Zeitpunkt mit der gleichen Häufigkeit an den bonitierten Pflanzen ausgebildet. Der Morphotyp 2 fand bei

dieser Transformation überhaupt keine Ausprägung, der Morphotyp 6 nur in den Kokosnußmilch-unbehandelten Kulturen. Den Morphotyp 4 betreffend konnte ein alternierendes Muster mit der Ausbildung der Morphotypen 3 und 5 nachgewiesen werden. Möglicherweise verschob sich das Ausprägungsmuster des Morphotyps 6, das den Morphotypen 3 und 5 ähnelte, nach hinten. Insofern könnte bei der Transformation I während der Zellzyklusprogression von einer gewissen Hierarchie der Ausprägung der einzelnen Morphotypen gesprochen werden.

Bei der **Transformation II (8 h Cokultur)** konnte ein anderer Verlauf der Häufigkeitskurven festgestellt werden, da zu jedem Transformationszeitpunkt Pflanzen ausgebildet worden waren.

Die Häufigkeit der Ausprägung des **Morphotyps 1** nahm zunächst von T(0) mit 25% der bonitierten Pflanzen über 10% zu den Zeitpunkten T(0,5) und T(1) auf 0% an T(1,5) und T(2) ab, um dann wieder ab T(3) auf 20% bis zum Maximalwert an T(4) (50%) anzusteigen. Die Häufigkeit des Morphotyps 1 der bonitierten Pflanzen an T(6) sank dann auf 20% ab. Die transformierte, unsynchronisierte Kontrolle war mit einer Häufigkeit von 50% des Morphotyps 1 vertreten.

Nur bei der Transformation II konnte das Auftreten des **Morphotyps 2** beobachtet werden, und dies auch nur sehr punktuell zum Zeitpunkt T(4), an dem 50% der bonitierten Pflanzen diesem Morphotyp entsprachen.

Der **Morphotyp 3** dagegen folgte ähnlich wie in der Transformation I einem ähnlichen Verlauf wie der Morphotyp 5. Er war zu fast allen Transformationszeitpunkten (außer zu T(4)) vorhanden und zeigte zumeist eine hohe Auftretenshäufigkeit. Zum Zeitpunkt T(0) konnten 50% der bonitierten Pflanzen dem Morphotyp 3 zugeordnet werden, an T(0,5) 30%, an T(1) 45%, an T(1,5) und T(3) ein Maximum von 80% sowie an T(2) 50%. Nach dem Absinken auf 0% an T(4) erhöhte sich die Morphotyp-3-Ausprägung auf 35%.

Ähnlich wie der Morphotyp 2 wurde der **Morphotyp 4** nur zu einem Zeitpunkt (T(0,5)) mit 30% der bonitierten Pflanzen beobachtet.

Wie bereits angesprochen, nahm auch die Häufigkeitsausprägung des **Morphotyps 5** einen wellenartigen Verlauf an. Nach einer Häufigkeit von 25% zum Zeitpunkt T(0) und 30% an T(0,5) stieg die Menge der Pflanzen auf 45% an T(1) an, um dann zum Zeitpunkt T(1,5) auf 20% abzusinken. An T(2) erreichte die Morphotyp 5-Häufigkeit ein weiteres Maximum mit 50%, fiel jedoch an T(3) und T(4) wieder auf 0% ab. An T(6) konnte ein leichter Anstieg auf 10% beobachtet werden.

Die Merkmalsausprägung des **Morphotyps 6** wurde nur zum Zeitpunkt T(6) beobachtet. Hier konnten etwa 35% der bonitierten Pflanzen dem Morphotyp 6 zugeordnet werden, 10% dem Morphotyp 5, 35% dem Morphotyp 3 und die restlichen 20% dem Morphotyp 1.

Auch bei der Transformation II wurden einige Morphotypen nur zu bestimmten Applikationszeitpunkten im Zellzyklus ausgebildet. Morphotyp 2, 4 und 6 zeigten nur einen Peak zu alternierenden Zeitpunkten in der Häufigkeitskurve, wobei der Morphotyp 2 zum Zeitpunkt T(4), der Morphotyp 4 an T(0,5) und der Morphotyp 6 an T(6) auftrat.

Im Gegensatz dazu war der Morphotyp 3 fast zu allen Transformationszeitpunkten in hohem Maße vertreten und schwankte um den Mittelwert von 50%.

Ebenfalls um einen Häufigkeitsmittelwert von 25% schwankende Kurven lagen bei Morphotyp 1 und 5 vor.

Es könnte demzufolge bei der Transformation II (8 h Cokultur) von Präferenzen in der Ausprägung der Morphotypen 2, 4 und 6 zu den bereits definierten Zeitpunkten des Zellzyklus gesprochen werden, die Morphotypen 1, 3 und 5 zeigen hingegen ein durchgehendes Auftrittsmuster im Zellzyklus.

Auch bei der **Transformation III (48 h Cokultur)** entwickelten sich zu jedem Transformationszeitpunkt Pflanzen.

Die Häufigkeit des **Morphotyps 1** bei allen bonitierten Pflanzen stieg zunächst von T(0) mit 30% auf 45% an T(0,5), sank dann auf 20% an T(1) und 10% an T(1,5) und stieg danach von 20% an T(2) und 25% an T(3) auf das Maximum mit 50% Häufigkeit zum Zeitpunkt T(4). An T(6) verringerte sich der Wert auf 10%. Die transformierte, unsynchronisierte Kontrolle zeigte bei 50% der Pflanzen den Morphotyp 1.

Der **Morphotyp 2** konnte zu keinem Zeitpunkt der Transformation II beobachtet werden.

Der **Morphotyp 3** wurde jedoch bei allen Transformationszeitpunkten außer an T(0,5) und auch nicht bei der transformierten, unsynchronisierten Kontrolle (T(K)) ausgebildet. Nach dem Absinken der Morphotyp 3-Häufigkeit von T(0) mit 10% auf 0% zum Zeitpunkt T(0,5) verlief die Häufigkeitskurve nur noch ansteigend. Zu den Zeitpunkten T(1), T(1,5) und T(2) wurden 40% der bonitierten Pflanzen dieser morphologischen Ausprägung zugeordnet. An T(3) lagen bereits 75% der Pflanzen im Morphotyp 3 vor, an T(4) nur noch 50%, jedoch an T(6) das Maximum mit 90%.

Der **Morphotyp 4** war ähnlich bei der Transformation II nur zu wenigen Zeitpunkten ausgeprägt, nämlich lediglich an T(0) mit 30%, T(0,5) mit 10% und T(1) mit 20%, also im



frühen Bereich der DNS-Replikationsphase. Ab dem Zeitpunkt T(1,5) trat der Morphotyp 4 nicht mehr auf.

Auf einen gewissen Zeitraum beschränkt war ebenfalls die Ausbildung des **Morphotyps 5**. Auch hier traten Pflanzen mit diesem Morphotyp zu den Zeitpunkten T(0) (30%), T(0,5) (45%), T(1) (30%) und T(1,5) (10%) auf, ab dem Zeitpunkt T(2) jedoch nicht mehr. Die transformierte, unsynchronisierte Kontrolle erreichte den Maximalwert mit 50% der Häufigkeit der bonitierten Pflanzen und zeigte somit eine gegenläufige Auftrittshäufigkeit wie Morphotyp 3.

Der **Morphotyp 6** konnte nur zu zwei Zeitpunkten beobachtet werden. Zu beiden Zeitpunkten (T(1,5) und T(2)) betrug die Häufigkeit 40%. Auch die transformierte, unsynchronisierte Kontrolle bildete keine Pflanzen dieses Morphotyps aus.

Auch bei der Betrachtung der Transformation III konnte festgestellt werden, daß die Ausbildung der Morphotypen gewissen Regelmäßigkeiten im Rahmen der Zellzyklusprogression folgte. Wie bereits beschrieben, waren die Morphotypen 4 und 5 in der mittleren und der Morphotyp 6 in der späten S-Phase anzusiedeln, die Morphotypen 1 und 3 konnten durchgehend angetroffen werden, ein besonders hohes Auftreten konnte jedoch ab der G<sub>2</sub>-Phase beobachtet werden.

Zusammenfassend kann also aus den obigen Ergebnissen gefolgert werden, daß sowohl die Cokulturzeit als auch das Stadium, in dem sich der Zellzyklus zur Transformation befand, einen Einfluß auf die Ausprägung der Morphologie der Karottenpflanzen besitzen. Die Übergänge zwischen den verschiedenen Morphotypen verlaufen zwar zum Teil fließend, sind aber trotzdem gewissen Zeitpunkten zuzuordnen.

Jedoch schien nicht nur der Zeitpunkt der Transformation im Rahmen der Aufhebung der Zellzyklussynchronisation eine Rolle bei der morphologischen Ausprägung der Pflanzen eine Rolle zu spielen, sondern ebenfalls die Dauer der Cokultur mit *Agrobacterium tumefaciens*. Die Veränderungen der Pflanzenmorphologie lassen auf Veränderungen im Phytohormonstatus, im besonderen im Gibberellinhaushalt, schließen. Die Morphotypen 2 und 6 könnten mit einer erhöhten Gibberellinaktivität in Verbindung gebracht werden, da Spritzungen von Karotten mit GA<sub>3</sub> vergleichbare morphologische Veränderungen zeigen (ARNHOLDT-SCHMITT, 1993b). Das Erscheinungsbild der Morphotypen 3 und 5 könnte auf eine Störung des Gibberellinsystems hindeuten. Andere Alterationen könnten auch durch Veränderungen im Auxinhaushalt erklärt werden. Genauer soll auf diese Thematik in der Diskussion eingegangen werden.

Im Rahmen dieser Bonituren stellte sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der Ausbildung eines bestimmten Morphotyps und der Insertion aller oder einzelner rol-Gene ins Karottengenom besteht. Unter diesem Aspekt mußte eine Überprüfung des Einbaus der Fremdgene in das Karottengenom über molekularbiologische Methoden erfolgen.

#### 4.3. Molekularbiologie

##### 4.3.1. PCR-Auswertungen

Obwohl das Konstrukt, das in das Karottengenom inseriert werden sollte, die Kombination der rol-Gene ABC enthielt, wurde nach einer Anzahl von PCR-Untersuchungen deutlich, daß nicht in jeder transformierten Pflanze rolABC *in toto* nachzuweisen war (Tab. 5 und 6 und Abb. 20ff.).

Möglicherweise könnte die verminderte Insertion von rolABC durch die Hypothese einer präferentiellen Integration einzelner rol-Gene in Abhängigkeit bestimmter Transformationszeitpunkte oder die Vorstellung von spezifischen Amplifikationen einzelner rol-Gene während der längeren Cokulturdauer bei Transformation II und III erklärt werden.

Bei der Betrachtung der durchgeführten PCR-Untersuchungen an transgenen Pflanzen der **Transformation I (4 h Cokultur)** wurde deutlich, daß zu jedem Zeitpunkt die Kombination rolABC inseriert worden war. Die Transformanten der Zeitpunkte T(0), T(0,5), T(1,5) und T(2) stammten aus Suspensionskulturen, zu deren Medium Kokosnußmilch hinzugefügt worden war. Zu den Transformationszeitpunkten T(0), d.h. Zugabe von *Agrobacterium tumefaciens* gleichzeitig mit der Thymidin-Gabe, und T(0,5) konnte bei praktisch jeder untersuchten Probe (einzige Ausnahme ein negativer Nachweis bei rolB zum Zeitpunkt T(0) ) die Kombination von rolABC nachgewiesen werden. Allerdings konnten bei T(0) die Morphotypen 3 und 5, bei T(0,5) jedoch nur der Morphotyp 4 beobachtet werden. Zum Zeitpunkt T(1,5) kann insgesamt betrachtet auch von einem ständigen Auftreten aller drei rol-Gene gesprochen werden, jedoch im Durchschnitt nur bei 75% der untersuchten Transformanten. Einige der untersuchten Proben führten nicht zum Nachweis der rol-Gene A und B. Trotzdem kann davon ausgegangen werden, daß die rol-Gen-Kombination in den meisten Transformanten inseriert wurde. Der einzige auftretende Morphotyp war hier Morphotyp 4. Zum Zeitpunkt T(2) wurden rolA und rolC ständig inseriert, rolB in etwa 50%

der untersuchten Transformanten. Es ließ sich eine Drittelung des Morphotypenauftretens mit den Morphotypen 3, 4 und 5 beobachten, obwohl nicht in jedem Fall die vollständige rol-Gen-Kombination inseriert worden war (wie z.B. bei T(0) mit dem Auftreten von Morphotyp 3 und 5). Die Transformanten des Zeitpunktes T(6) waren die einzigen dieser Transformationsreihe, die ohne Kokosnußmilchzugabe eine Pflanzenentwicklung zeigten. Die Kombination rolABC war in etwa 75% der untersuchten Transformanten, das rolC-Gen in jeder untersuchten Probe positiv nachzuweisen, die Morphotypen waren 1 und 6. Bei allen Transformanten konnten auch einzelne rol-Kombinationen, wie z.B. rolAB oder rolAC inseriert worden sein. Diese dürften allerdings bei der Transformation I eine eher untergeordnete Rolle spielen, weil -wie bereits gesagt- zu jedem Transformationszeitpunkt rolABC nachweisbar war. Obwohl davon ausgegangen werden kann, daß in jeder Transformante die rolABC-Kombination inseriert wurde, traten trotzdem unterschiedliche Morphotypen auf. Dies führte zu der Annahme, daß auch neben dem Transformationszeitpunkt die Cokultivationsdauer eine Rolle bei der Ausbildung der Pflanzen gespielt haben muß.

Bei der **Transformation II (8 h Cokultur)** ließ sich bis auf den Transformationszeitpunkt T(4) bei jeder Transformante der Morphotyp 3 nachweisen, obwohl der Einbau der rol-Gene variabel erfolgte.

Zum Transformationszeitpunkt T(0), bei dem das *Agrobacterium tumefaciens* gleichzeitig mit Thymidin zur Karottensuspension gegeben worden war, wurde lediglich rolA bei allen untersuchten Transformanten inseriert und nachgewiesen. Der Nachweis für rolB war nur für 33% der Pflanzen positiv, in 66% der Transformanten konnte das Gen nicht nachgewiesen werden. Das rolC-Gen wurde positiv in etwa 40% der untersuchten Pflanzenproben getestet, in 60% der untersuchten Transformanten war es nicht nachweisbar. Demzufolge wurde vorwiegend rolA eingebaut, die Kombinationen rolAB und rolAC sowie rolBC waren im gleichen Maße wahrscheinlich. Trotz der möglichen unterschiedlichen Kombinationen traten die Morphotypen 1, 3 und 5 auf.

Transformanten des Zeitpunktes T(0,5) waren sowohl normal aussehende (Morphotyp 1) als auch veränderte Pflanzen mit Ausbildung der Morphotypen 3, 4 und 5, bei denen nur rolA immer in das Karottengenom inseriert war, rolB und rolC dagegen in keiner untersuchten Probe positiv nachzuweisen waren.

Zum Transformationszeitpunkt T(1) wurde wiederum nur das rolA-Gen mit einer Häufigkeit von 50% in den untersuchten Proben nachgewiesen, rolB und rolC mit einer Häufigkeit von

etwa 40%. Die Insertion der Kombinationen rolABC, rolAB, rolAC und rolBC ist demnach denkbar. Es waren die Morphotypen 1, 3 und 5 zu beobachten.

Beim Transformationszeitpunkt T(1,5) war nur das rolA-Gen in jeder Probe positiv nachzuweisen, rolB und rolC konnten in keiner der untersuchten Proben positiv getestet werden. Hier konnten jedoch nur die Morphotypen 3 und 5 beobachtet werden.

Ebenfalls bei T(2) konnten die Morphotypen 3 und 5 nachgewiesen werden, ebenfalls mit ständiger Insertion von rolA bzw. mit dem positiven Nachweis aller untersuchten Proben. Das rolB-Gen wurde mit einer Häufigkeit von unter 50%, rolC mit etwa 40% nachgewiesen. Somit wäre vorwiegend rolA oder rolB allein in das Karottengenom inseriert worden, und die Kombination rolAC in geringerem Maße als rolAB.

Pflanzen vom Zeitpunkt T(3) zeigten die Morphotypen 1 und 3. Das rolA-Gen wurde mit 50% in den untersuchten Proben nachgewiesen, rolB mit einer Häufigkeit von 30%, rolC zu 50%. Die Kombination rolAC wäre demnach präferiert.

T(4) brachte die Morphotypen 1 und 2 bei Nachweis von rolA und rolC in allen untersuchten Proben, rolB konnte in keiner Probe nachgewiesen werden. Die einzige mögliche Kombination ist also rolAC, ein einzelner Einbau ist jedoch auch möglich.

Zum Zeitpunkt T(6) entstanden Pflanzen der Morphotypen 1, 3 und 6. Wie bei den anderen Transformationen wurde auch hier rolA immer nachgewiesen, rolB mit einer Häufigkeit von 40% und rolC von 20%. Vorwiegend könnte also rolA inseriert worden sein, gefolgt von rolAB, rolABC, rolAC und rolBC.

Die **Transformation III (48 h Cokultur)** führte zu Transformanten, die trotz unterschiedlichem Einbau der rol-Gene von T(1) bis T(6) zunächst immer die Morphotypen 1 und 3 aufwiesen.

Zum Zeitpunkt T(0) wurde rolA in 75% der untersuchten Proben inseriert und positiv nachgewiesen, rolB mit einer Häufigkeit von 50% und rolC von 40%. Die Morphotypen 4 und 5 waren neben Morphotyp 1 nachweisbar.

Bei T(0,5) konnten rolA (positiver Nachweis des Gens in ca. 90% der untersuchten Proben) und rolB (100% positiver Nachweis) als ständig inseriert beobachtet werden, rolC wurde in keinem Fall positiv nachgewiesen. Demzufolge konnte nur die Kombination rolAB auftreten oder rolA oder rolB. Die Morphotypen 1, 4 und 5 entsprachen denen von T(0).

An T(1) wurden 75% der untersuchten Pflanzenproben für rolA und 60% für rolB positiv getestet. Das rolC-Gen konnte in den untersuchten Proben mit einer Häufigkeit von 33%

nachgewiesen werden. Vorwiegend könnte also rolAB inseriert worden sein, in geringerem Maße rolABC, rolAC und rolBC. Die beobachteten Morphotypen waren 1, 3, 4 und 5.

In den Transformanten von T(1,5) konnte rolA immer positiv nachgewiesen werden, rolB in 75% der untersuchten Proben. Das rolC-Gen wurde in keinem Fall positiv nachgewiesen. Denkbar ist also nur die Insertion der Kombination rolAB oder ein Einbau der einzelnen Gene. Die Pflanzen entsprachen den Morphotypen 1, 3, 5 und 6.

Zum Zeitpunkt T(2) wurden rolA in 50% der Analysen, rolB in etwa 70% positiv nachgewiesen, rolC dagegen lediglich mit einer Häufigkeit von 25%. Vorwiegend könnte rolAB eingebaut worden sein, gefolgt von rolBC und rolAC. Die auftretenden Morphotypen waren 1, 3 und 6.

An T(3) wurde ein positiver Nachweis rolA für 66% der untersuchten Proben festgestellt, für rolB eine Häufigkeit von 50%, rolC konnte nicht nachgewiesen werden. Die einzige Kombinationsmöglichkeit für den Einbau ins Karottengenom wäre also rolAB. Die Pflanzen wurden durch die Morphotypen 1 und 3 charakterisiert.

T(4) wies einen positiven Nachweis von rolA zu 66% auf, rolB und C wurden nicht positiv nachgewiesen. Wie bei T(3) konnten die Morphotypen 1 und 3 beobachtet werden.

Zum Transformationszeitpunkt T(6) wurde rolA so gut wie immer (in etwa 80% der untersuchten Proben) positiv nachgewiesen, rolB mit einer Häufigkeit von etwa 40%, rolC mit einer Häufigkeit von 50% in den untersuchten Pflanzenproben. Die Kombination rolABC könnte vorwiegend inseriert worden sein, aber auch rolAB, rolAC oder rolBC. Die gleiche Morphologie wie bei T(4) ist auch hier mit den Morphotypen 1 und 3 zu beobachten.

Betrachtet man diese Ergebnisse, stellt sich die Frage, von welchen molekularbiologischen Faktoren die Ausbildung der genannten Morphotypen abhängt. Auch bei der Insertion unterschiedlicher Gene kann es zur Ausbildung des gleichen Morphotyps kommen. Im Folgenden soll versucht werden, die Ausbildung der Morphotypen auf bestimmte rol-Gen-Kombinationen oder einzelne rol-Gene zu deduzieren, die bereits im Literaturüberblick angesprochen wurden. Unter anderem können nach Literaturangaben die folgenden rol-bedingten Effekte beobachtet werden:

Das **rolA-Gen** führt zu einer verminderten GA<sub>1</sub>-Konzentration in den Blättern, die möglicherweise über Sekundäreffekte zu dem beobachtbaren kleinen Wuchs der Pflanzen führt (DEHIO et al., 1993).

Für die Wurzelinduktion ist vermutlich **rolB** verantwortlich. Außerdem können auch abgerundete Blätter und kurze Stiele beobachtet werden (SCHMÜLLING et al., 1993).

Das **rolC-Gen** führt zu einem verlangsamten Pflanzenwachstum, lanzettförmigen Blättern und zur Stimulation des Adventivwurzelswachstums (ESTRUCH et al., 1991a und 1991c, SCHMÜLLING et al., 1993).

Wie oben ausgeführt, ist bei allen Pflanzen ein kleiner Wuchs zu beobachten. Da auch zu allen Zeitpunkten aller Transformationen **rolA** eingebaut wurde, scheint sich demgemäß die rolA-Wirkung morphologisch manifestiert zu haben. Eine Zuordnung des rolA-Effektes zu einem bestimmten Morphotyp ist aber nicht möglich.

Betrachtet man eine der **rolB**-Wirkungen, so können die abgerundeten Blätter bei den Morphotypen 4 und 5 auf einen Effekt von rolB zurückgeführt werden. Die Wurzelinduktion konnte jedoch in keinem Fall wie in der Literatur beschrieben beobachtet werden. Problematisch ist jedoch, daß diese Morphotypen auch ohne Einbau des rolB-Gens auftreten.

Das **rolC-Gen** könnte auch bei den Morphotypen 3 und 6 eine Rolle gespielt haben, da hier schmale bzw. lanzettförmige Blätter vorliegen. Die Pflanzen sind alle klein, deshalb könnte der wachstumshemmende Einfluß von rolC wirksam geworden sein, möglicherweise synergistisch mit rolA.

Der Einfluß der Antibiotika-Gabe auf die Größe der Transformanten konnte insofern vernachlässigt werden, als daß die Pflanzen, die den Morphotyp 1 ausbildeten, die gleiche Größe wie die Kontrollpflanzen erreichten, obwohl sie auf einem Selektionsmedium mit Antibiotika wuchsen.

Nur zu einem Transformationszeitpunkt konnte der Morphotyp 2 beobachtet werden, bei dem eine Insertion von rolA und rolC nachzuweisen war. Ein gewisses Adventivwurzelswachstum ist zwar zu verzeichnen, jedoch keine signifikante Steigerung. Die schmalen Fiederblättern könnten vielleicht auf eine durch rolA- und rolC-induzierte Modulation des Gibberellinmetabolismus zurückgeführt werden.

Die normal aussehenden Pflanzen könnten durch eine Insertion in nicht transkriptionsfähiges Heterochromatin oder durch Silencing der inserierten Gene entstanden sein. Das Auftreten von transgenen Pflanzen, die trotz ihrer Transformation mit rol-Genen keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu untransformierten Pflanzen aufweisen, wird auch in der

Literatur beschrieben, besonders in Verbindung mit dem eigenen Promotor (KURIOKA et al., 1992).

Um weiteren Aufschluß über die Insertion der Fremdgene zu bekommen, wurden Southern Blots mit Pflanzenproben durchgeführt, die Abweichungen im Einbau der einzelnen rol-Gene aufwiesen. Es wurde angenommen, daß der Nicht-Einbau der rol-Gene möglicherweise auf eine präferentielle mehrfache Insertion zu bestimmten Zeitpunkten des Zellzyklus und daraus folgend zu einer verminderten Insertion zu anderen Zeiten zurückzuführen wäre.

#### 4.3.2. Southern Blots

Die Proben der transgenen Pflanzen wurden aufbereitet (s. Kapitel 3) und mit den Restriktionsenzymen EcoRI, EcoRV und HindIII verdaut (nach HOLEFORS et al., 1998). Für den Nachweis von rolA und rolB (abhängig von der verwendeten Sonde) im Southern Blot sollte bei vollständigem Einbau der rol-Kombination je eine Bande für das entsprechende rol-Gen im Molekulargewichtsbereich von etwa 1300 bp beobachtbar sein, für rolC eine Bande im Molekulargewichtsbereich von etwa 1900 bp. Die durchgeführten Southern Blots sind im Genaueren in Tab. 7 und 8 und Abb. 29 dargestellt. Die Auswertung der Southern Blots ergab in den meisten Fällen nicht die Banden im erwarteten Molekulargewichtsbereich, der durch die Restriktionsschnittstellen definiert worden war. Dieses Ergebnis soll in der Diskussion (Kapitel 5) genauer ausgeführt werden. An dieser Stelle sollen lediglich die beobachteten Banden beschrieben werden.

Bei der **Transformation I (4 h Cokultur)** wurde für **rolA** ein Southern Blot mit Pflanzenmaterial der Zeitpunkte T(0), T(2) und T(6) mit positivem Ergebnis durchgeführt, für **rolB** zu den Zeiten T(0), T(0,5), T(1,5) und T(2) und für **rolC** zum Zeitpunkt T(1,5), T(2) und T(6).

Für die **Transformation II (8 h Cokultur)** wurden positive Southern Blots für die rol-Gene B und C durchgeführt, **rolB** an T(1), T(2), T(3) und T(6) und **rolC** an T(0), T(1), T(2) und T(3).

Die **Transformation III (48 h Cokultur)** ergab Southern Blots für rolB und rolC, **rolB** zu den Zeitpunkten (0,5), T(1) und T(2), **rolC** an T(0).

Die Molekulargewichtsangaben der durch den Verdau entstandenen DNS-Fragmente wurden mithilfe eines mitgelaufenen Markers abgeschätzt. Die Ergebnisse stellen sich wie folgt dar:

Bei der Betrachtung des **Blots Nummer 1 der Transformation I (4 h Cokultur)** mit dem Nachweis von **rolA** konnte das **rolA**-Gen mit einer Kopie in der Probe vom Zeitpunkt **T(0)** im oberen Molekulargewichtsbereich von etwa 7.000 bp nachgewiesen werden (Slot 2). Die Probe von **T(2)** fand sich bei etwa 750 bp (Slot 3), die von **T(6)** bei 22 kbp (Slot 4). Keine der beobachtbaren Banden befand sich im erwarteten Molekulargewichtsbereich von 1300 bp. Die Probe aus Slot 4 wurde zwar verdaut, lief jedoch nicht während der Elektrophorese (s. Abb. 29/1).

Im **Blot 2 (Transformation I (4 h Cokultur))** konnte das **rolB**-Gen mit dem Nachweis von einer Kopie an **T(0)** etwa im Molekulargewichtsbereich von 850 bp (Slot 2), an **T(0,5)** bei etwa 690 bp (Slot 3), an **T(1,5)** bei etwa 1.400 bp (Slot 4), an **T(2)** bei etwa 720 bp (Slot 5), beobachtet werden. Nur die Bande des Applikationszeitpunktes **T(1,5)** entsprach dem Molekulargewichtsbereich der Restriktionsschnittstellen von 1300 bp. Alle anderen Banden für das **rolB**-Gen wurden nur in kurzen Restriktionsfragmenten nachgewiesen (s. Abb. 29/1). Denkbar wäre in diesem Zusammenhang auch ein Einbau eines unvollständigen Gens.

Der **Blot 3** für die **Transformation III (48 h Cokultur)** wies **rolB** mit einer Kopie zu den Zeiten **T(0,5)** bei etwa 6.000 bp (Slot 2), **T(1)** bei etwa 1.950 bp (Slot 3), und an **T(2)** bei ungefähr 3.500 bp (Slot 4) nach. Hier erschien **rolB** im Vergleich zu Blot 2 in größeren Fragmenten (s. Abb. 29/2), die nicht den erwarteten Restriktionsschnittstellen (im Molekulargewichtsbereich von 1300 bp) entsprachen.

Im **Blot 4** mit Pflanzenproben der **Transformation I (4 h Cokultur)** ließ sich eine Bande von **rolC** an **T(1,5)** bei etwa 1.950 bp (Slot 2) erkennen, die von **T(2)** bei ungefähr 650 bp (Slot 3), die von **T(6)** bei ca. 1.000 bp (Slot 4) (s. Abb. 29/2). Nur die Bande des Zeitpunktes **T(1,5)** befand sich im erwarteten Molekulargewichtsbereich der Restriktionsfragmente von 1900 bp.

Der **Blot 5** verifizierte **rolC** bei den Proben der **Transformation II (8 h Cokultur)** (Slot 2-5) als einzelne Bande, d.h. als einfach vorliegende **rol**-Kopie im Pflanzengenom. Zum Zeitpunkt **T(0)** lag die Bande im Bereich von 1.200 bp (Slot 2), an **T(1)** bei ca. 1.950 bp (Slot 3), an **T(2)** bei ungefähr 900 bp (Slot 4) und zum Zeitpunkt **T(3)** bei ca. 1.800 bp (Slot 5). Die fünfte



Probe im Blot (Slot 6) stammte aus der **Transformation III (48 h Cokultur)** und wies **rolC** in zwei Banden nach. Die Banden liegen im Bereich von 25 kbp und 10 kbp. Vermutlich wurde die Probe in Slot 6 trotz ausreichender Inkubationszeit nicht vollständig verdaut (s. Abb. 29/3). Lediglich die Proben der Slots 3 und 5 entsprechen den durch die Restriktionsenzyme definierten Molekulargewichtsbereichen der Restriktionsfragmente von 1900 bp.

Im **Blot 6** wurden Proben der **Transformation II (8 h Cokultur)** zum Nachweis von **rolB** aufgetragen. Die Probe vom Transformationszeitpunkt **T(1)** ergab zwei Banden und damit zwei eingebaute Kopien im Pflanzengenom in Fragmenten mit dem Molekulargewicht von etwa 1.200 bp und etwa 1.100 bp (Slot 2). Der Nachweis von **rolB** an **T(2)** erfolgte mit einer Bande im Bereich von 1.950 bp (Slot 3), an **T(3)** bei etwa 1.700 bp (Slot 4). Die vierte Probe (Slot 5) von **T(6)** wies zwei Banden auf, eine schwächere im sehr hohen Molekulargewichtsbereich von 25 kbp, eine stärkere bei etwa 1.300 bp. Vermutlich wurde die Probe in Slot 5 trotz ausreichender Inkubationszeit nicht vollständig verdaut (s. Abb. 29/3). Nur die Probe in Slot 3 und die Probe im niedrigeren Molekulargewichtsbereich des Slots 5 entsprechen den erwarteten Banden des Verdaus durch die Restriktionsenzyme (Molekulargewicht von 1300 bp).

Da die beobachtbaren Banden der einzelnen Southern Blots nur zu einem Teil den vorher berechneten entsprachen, ist eine generelle Auswertung schwer zu vollziehen.

Da **rolA** nur in einem Blot nachgewiesen werden konnte, aber nicht in besonders hoher Kopienzahl oder in ähnlichen Fragmenten, ist eine Aussage schwer.

Bei Blot 2 und 6 konnte das **rolB**-Gen in Fragmenten mit einem geringeren Molekulargewichtsbereich nachgewiesen werden, beim Blot 3 jedoch eher im höheren MG-Bereich. Es ist schwierig, Schlußfolgerungen aus dieser Beobachtung zu ziehen.

In Blot 4 und 5 wurde **rolC** nachgewiesen, bei allen Blots eher im mittleren bis kleineren Molekulargewichtsbereich. Möglicherweise kann von einer präferentiellen, genspezifischen Integration in diese Regionen gesprochen werden.

## 5. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei der Ausbildung von transgenen Pflanzen und deren morphologischen Veränderungen eine Korrelation zwischen Zeitpunkt und Länge der Cokultur mit *Agrobacterium tumefaciens* in Bezug auf die Synchronisation des Zellzyklus und dessen Progression zu belegen. Die Realisation einer gezielten Insertion von Fremd-DNS in das Karotten-Genom sollte durch die Synchronisation des Zellzyklus und die punktuelle Zugabe der Fremdgene erreicht werden. Diese wurden in und nach der DNS-Replikationsphase in Form von *Agrobacterium tumefaciens* appliziert. Da an den speziellen Transformations-Zeitpunkten nur spezifische Replikationsstartpunkte aktiv sind, könnte der Einbau von Fremd-DNS präferentiell an diesen Sequenzen in spezifische Chromosomenloci erfolgen und eine gewisse Veränderung der Pflanzenmorphologie hervorrufen. Diese Veränderung sollte durch die Verwendung der rol-Gen-Kombination ABC unter Kontrolle der eigenen Promotoren besonders signifikant für die makroskopische Bonitur erfolgen.

Wie aus der Literatur bekannt, erfolgt der Einbau von exogen inserierter DNS in ein Pflanzengenom zufällig und fast völlig ungerichtet in die sich replizierende Pflanzen-DNS vorwiegend während der S-Phase des Zellzyklus (DEROLES und GARDNER, 1988, PETIT et al., 1986, VERGUNST und HOOYKAAS, 1998, VILLEMONT et al., 1997, WALLROTH et al., 1986). Dabei werden hierarchisch bestimmte Replikationsmuster abgerufen, nach denen Strukturgene relativ früh, andere Chromosomensequenzen spät repliziert werden (MCQUEEN et al., 1998). Es ist jedoch nicht vollständig erforscht, welche Faktoren auf die Replikationsstartpunkte wirken und unter welchen Umständen Replikationsgabeln geöffnet werden können (CRAIG und BICKMORE, 1993, LIMA-DE-FARIA und JAWORSKA, 1968, OSTASHEVSKY, 1998, STUBBLEFIELD, 1975).

Bei der Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse scheint die Zellzyklussynchronisation mit FdU und das gesteuerte Fortschreiten des Zellzyklus mit externer Anregung der S-Phase durch Thymidin eine entscheidende Rolle für die Transformation der Karottensuspensionen gespielt zu haben.

Die Synchronisationsschemata der Zellkerne der verschiedenen Karotten-Suspensionen weisen für alle drei Transformationen bzw. Cokulturen mit *Agrobacterium tumefaciens* eine signifikante Gleichmäßigkeit auf (s. Abb. 9-11): Die Synchronisationsrate erreichte zum Zeitpunkt  $T(0)$ , d.h. der Zeitpunkt der Zugabe des Thymidins zur Anregung der S-Phase nach

dem G<sub>1</sub>-Phasen-Arrest, in allen Fällen etwa 60%, bei der Transformation II (8 h Cokultur) und III (48 h Cokultur) sogar mehr. Die Synchronisation der Suspension für die Transformation I (4 h Cokultur) erfolgte –vielleicht wegen weniger vorhandenen teilungsfähigen Zellen– nicht mit der gleichen Signifikanz wie bei den anderen beiden Transformationen, kann jedoch sicherlich als ausreichend und aussagekräftig genug für das Auflaufen eines großen Prozentsatzes von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase bewertet werden. Bei den Suspensionen für die Transformationen II (8 h Cokultur) und III (48 h Cokultur) konnte jeweils praktisch nur ein einziger Peak im Synchronisationsschema gemessen werden, im Unterschied zu einem großen und einem deutlich kleineren Peak bei der Transformation I (4 h Cokultur).

Betrachtet man den Verlauf der Graphiken, so kann nach Anregung des Zellzyklus ein langsames Fortschreiten der Zellen aus der G<sub>1</sub>- in die S-Phase beobachtet werden. Zunächst erfolgt die Progression noch relativ koordiniert und viele Zellen erreichen offenbar gleichzeitig die G<sub>2</sub>-Phase.

Bei der Anregung des Zellzyklus kommt es dann zur gleichzeitigen Öffnung vieler Replikationsgabeln, die an verschiedenen Stellen des Pflanzen-Genoms lokalisiert sind (OSTASHEVSKY, 1998). Durch die Synchronisierung der Zellen wird zwar deren Zellzyklus an einem bestimmten Punkt gestoppt und dann wieder angeregt, es kann jedoch über die Synchronisierung kein Einfluß auf die Aktivierung der verschiedenen Replikationsstartpunkte genommen werden. Auch die Effizienz der verschiedenen Replikationsstartpunkte schwankt und ist während der Zellzyklusprogression Veränderungen unterworfen (THOMAS, 1984, UMEK et al., 1989).

Somit muß auch bei dieser Art der Transformation mit verschiedenen morphologischen Ausprägungen der zu erwartenden transgenen Pflanzen gerechnet werden, die der Insertion in die spezifischen, zu diesem Zeitpunkt aktiven Replikationsgabeln entsprechen.

Je größer der Zeitraum nach der Anregung der S-Phase wird, desto mehr beginnt sich die Synchronisation zu verlieren, es entstehen immer mehr kleinere, parallel vorliegende Peaks mit Zellkernen unterschiedlicher Fluoreszenz und demzufolge mit variierendem DNS-Gehalt. Nach 2 Stunden kann kaum mehr von einer Synchronisation der Suspensionen gesprochen werden.

Bei allen diesen Aussagen muß jedoch berücksichtigt werden, daß die Messung der Zellkerne immer nur einen Teil der Gesamt-Suspension zum Inhalt hat (s. Kapitel 3.6.). Es stellt sich die Frage, inwieweit die gemessenen Zellkerne charakteristisch für den wirklichen Zustand der Suspensionen sind, in besonderem Maße dann, wenn eine große Streuung der Werte vorliegt.

Da es mit unseren Analysen methodisch nicht möglich war, mehr als die gemessenen Kerne zu bearbeiten, müssen die erhaltenen Werte möglicherweise mit Vorsicht betrachtet werden, können aber, besonders bei den ersten Zeitpunkten nach Zellzyklusanregung, als Maßstab für die erfolgreiche Zellzyklussynchronisation gewertet werden. Da die vorliegenden Versuchsreihe in erster Linie auf die gezielte Anregung der S-Phase ausgelegt war, kann der Verlust der Synchronisation während der nachfolgenden Phasen unter Umständen etwas in den Hintergrund rücken.

Diese Beobachtung spielt sicherlich eine große Rolle für die durchgeführten Cokulturen. Wurden die Agrobakterien zu einem späteren Zeitpunkt als 2 Stunden nach der Zellzyklusanregung zu der Suspension zugegeben, lagen die *Daucus carota*-Zellen nicht mehr im gleichen molekularbiologischen Zustand vor, da sich einige noch in der S-Phase, andere schon in der G<sub>2</sub>-Phase befanden. Damit veränderte sich auch der Zustand der aktiven Replikationsstartpunkte.

Traf ein *Agrobacterium* bei der Transformation der Pflanzen-DNS auf eine Zelle, die sich noch in der S-Phase befand, hatte dies sicherlich andere Konsequenzen für die Insertion der bakteriellen T-DNS als die Transformation bei einer Zelle im Übergang von der S- zur G<sub>2</sub>-Phase, da zu diesen Zeitpunkten andere Replikationsstartpunkte abgelesen wurden. Eine Transformation in der frühen Phase, in der die Strukturgene mit ihren „housekeeping“-Funktionen repliziert werden (MCQUEEN et al., 1998), kann möglicherweise zu schwereren Störungen in der Pflanzenmorphologie führen, weil eben explizit die Gene, die für den normalen Metabolismus benötigt werden, durch eine Insertion von Fremd-DNS-Sequenzen empfindlich beeinflusst werden könnten. Eine Insertion exogener DNS in der späten S-Phase hätte vielleicht gar keine Konsequenzen für den Stoffwechsel der entstehenden transgenen Pflanze, weil in diesem Zeitraum keine lebensnotwendigen Gene mehr repliziert werden, sondern vermehrt Heterochromatin-Sequenzen (OSTASHEVSKY, 1998).

Jede Art von Gewebekultur und im Besonderen der Cokultur-Vorgang mit *Agrobacterium tumefaciens* stellt einen bedeutsamen Streßfaktor für die Pflanzenzellen dar. Es ist durchaus denkbar, daß diese, exogen ausgelösten Streßsituationen *per se* eine Veränderung des Pflanzenstoffwechsels bewirken könnten. Möglicherweise könnte es zu einer Veränderung der Länge bestimmter Zellzyklus-Phasen oder zu einer temporären Verschiebung der Zellzyklus-Kontrollpunkte kommen. Diese könnten sich dann wiederum durch vermehrte Amplifikationen außerhalb der S-Phase bemerkbar machen oder sich auf die Replikation der S-Phase-unabhängige Organellen und die Insertion der Fremd-DNS in diese DNS-Sequenzen

auswirken. Den Nachweis, daß Amplifikationen auch außerhalb der S-Phase auftreten, und die Existenz eines S-Phase-unabhängigen Chromatins wurden bereits von einigen Forschergruppen diskutiert und zum Teil erbracht. Die räumliche Verteilung der Gene während der Interphase könnte eine größere Rolle als angenommen spielen und auf die Organisation von Replikations-, Transkriptions- und Processing-Faktoren einwirken. Diese könnten durch ein Zusammenwirken mit anderen Zellzyklus-Faktoren wie z.B. „licensing factors“ eine DNS-Replikation auch außerhalb der S-Phase induzieren (ALTHEIM und SCHULTZ, 1998, ARNHOLDT-SCHMITT, 1993a, CARMO-FONSECA et al., 1996).

Bezieht man sich auf DNS-Amplifikationen außerhalb der S-Phase, stellt die Mitose-Phase aus verschiedenen Gründen einen besonderen Punkt im Zellzyklus dar. Besonders interessant ist die hierbei Auflösung der Kernmembran. Theoretisch wäre denkbar, daß ein Fremd-Gen, das zum Zeitpunkt der Mitose in das Pflanzengenom gelangt, in der Nucleus-Region verbleibt und während der nächsten DNS-Replikation in DNS-Sequenzen der Pflanze inseriert wird (LOYTER et al., 1982, OKADA et al., 1986). Auf diese Art und Weise könnte Fremd-DNS im Nucleus-Bereich akkumulieren und die Wahrscheinlichkeit der Insertion in das Empfänger-Genom durch die hohe exogene DNS-Konzentration erhöhen. So könnte sichergestellt werden, daß die Fremd-DNS gleichzeitig an unterschiedlichen Replikationsstartpunkten abgelesen würde und ihre Gene mit höherer Wahrscheinlichkeit in transkriptionsfähiges Chromatin inseriert würden. Somit sollte ein Mehrfacheinbau der Fremd-DNS nachweisbar sein. Auch die Cokulturdauer ist von gewisser Bedeutung für den Transformationsvorgang. Es wurden insgesamt drei unterschiedlich lange Cokultur-Zeiten gewählt, nämlich 4, 8 und 48 Stunden.

Die vierstündige Cokultur sollte sicherstellen, daß der Zellzyklus maximal einmal in seiner vollen Dauer durchlaufen wurde und nicht die Möglichkeit einer mehrfachen Transformation in aufeinander folgenden Zellzyklen bestand. Obwohl die Karottensuspension zu Beginn der Versuchsreihe eine normale Entwicklung aufwies, wurde nach etwa 3 Wochen Kulturdauer deutlich, daß die Karottenzellen durch die Transformation in der Art und Weise gestört worden waren, daß sie sich nicht nach dem Verlauf der charakteristischen somatischen Embryogenese und deren Stadien bis zur Jungpflanze entwickelten, sondern im Torpedostadium zum Stillstand kamen. Die Torpedostadien wiesen auch leichte Deformationen auf, die ebenfalls auf die Transformation zurückgeführt wurden. Erst nach Zugabe von Kokosnußmilch konnte eine Weiterentwicklung der Torpedoformen beobachtet werden. Nur zu einem einzigen Transformationszeitpunkt verlief die Embryonalentwicklung

ohne Kokosnußmilch vollständig. Dieses Phänomen soll später noch detaillierter diskutiert werden. Möglicherweise führte die vierstündige Cokultur mit *Agrobacterium tumefaciens* zu einer so großen Streßsituation in der Karottensuspension, daß es –vergleichbar mit dem Zustand bei einer Mutation (SHIRAHIGE et al., 1998)- zum Verlust der Replikationsreihenfolge innerhalb der Replikationsstartstellen kam. Diese führte möglicherweise dazu, daß die „housekeeping“-Gene nicht wie gewöhnlich früh, sondern erst spät repliziert wurden und vielleicht auch Gene für die Embryonalentwicklung in irgendeiner Weise in Mitleidenschaft gezogen wurden. Es wäre denkbar, daß auf diese oder ähnliche Weise die Embryonalentwicklung im Torpedostadium zum Stillstand kam. Die Entwicklung der Pflanzen zum Zeitpunkt T(6) wäre insofern erklärbar, daß die erste S-Phase bereits abgeschlossen war und die Schädigung des Karottengenoms im Hinblick auf die Embryonalentwicklung bei späterer Transformation z.B. in der G<sub>2</sub>-Phase geringer ausfiel oder daß Repair-Enzyme die DNS-Schäden ausgleichen konnten (ALBERTS et al., 1994, SO und DOWNEY, 1988).

Die Cokulturdauer von 8 Stunden wurde gewählt, als im Versuchsverlauf Entwicklungsprobleme in der vierstündigen Kultur auftraten. Auch die achtstündige Kultur konnte zu den meisten Transformationszeitpunkten eine einmalige Transformation des Karottengenoms sicherstellen, nur bei den Zeitpunkten T(4) und T(6) könnte die Möglichkeit der Transformation in zwei S-Phase gegeben sein, da bei der Untersuchung von Zellzyklen in Suspensionskulturen mit Kinetin für die S-Phase eine Dauer von etwa 2 Stunden beobachtet werden konnte (FROESE, 1993).

Der Zeitpunkt von 48 Stunden Cokultur wurde deshalb gewählt, um zu beobachten, ob die Erhöhung der Transformationschancen zu einer multiplen Integration der rol-Gene in das Karottengenom führte. Diese Annahme bestätigte sich jedoch nicht und wird bei der Diskussion der Ergebnisse des Southern Blots erneut aufgegriffen.

Eine weitere denkbare Hypothese für die unterschiedlich durchlaufenen Embryonalentwicklungen der einzelnen Transformationen wäre die unterschiedliche Aktivität der Promotoren im Verlauf der Embryonalentwicklung: Da die rol-Gene fast ausschließlich nicht in der Kombination rolABC inseriert worden waren, könnte einer dieser Promotoren bereits im Torpedostadium aktiv geworden sein und deshalb in den Kulturen der Transformation I, bei denen keine Pflanzenentwicklung beobachtbar war, bereits in diesem frühen Stadium die rol-Genexpression initiiert haben. Diese könnte dann den sichtbar negativen Einfluß auf die Embryonalentwicklung nach sich gezogen und ein weiteres Wachstum der Kultur verhindert haben. Möglicherweise hat sich diese frühe

Promotorwirkung auf die Morphogenese in der Form ausgewirkt, daß bei vielen der aufgetretenen Transformanten nicht die bei einer normalen Karottenpflanze vorkommenden Blätterformen ausgebildet wurden: Es waren Laub- und Fiederblätter zu beobachten, jedoch konnten Kotyledonen nicht eindeutig bestimmt werden. Die verschiedenen Formen der Laubblätter waren sehr ungewöhnlich für Karottenpflanzen. Außerdem konnten keine Petiolen- und in den seltensten Fällen eine Hypokotyl-Bildung bei den Transformanten beobachtet werden. Denkbar ist, daß der Grundstein für diese Morphogenese durch die Aktivität des jeweiligen rol-Gen-Promotors mit nachfolgender Expression der rol-Gene in der frühen Embryonalphase gelegt wurde. Möglicherweise könnte auch die Aktivität des veränderten pg5-Promotors des Plasmids pPCV 002 einen Einfluß auf die Embryonalentwicklung genommen haben: Der mit einer T-DNS-Sequenz verknüpfte und somit veränderte pg5-Promotor codiert für das Gen 5 der T-DNS, das zur Gruppe der Octopin-Ti-Plasmid-Gene gehört und vermutlich zusammen mit Genprodukten anderer T-DNS-Gene für Enzyme eines spezifischen Auxinsynthesewegs codiert. Die Promotor-Aktivität ist gewebe- und entwicklungsstadienspezifisch und kann besonders in Calli und meristematischen Geweben bzw. in Geweben mit einer hohen internen Auxinkonzentration bei gleichzeitig niedriger Cytokininkonzentration beobachtet werden (KONCZ und SCHELL, 1986). Da der pg5-Promotor an der Bordersequenz der T-DNS lokalisiert ist, ist es denkbar, daß die flankierende Pflanzen-DNS einen Einfluß auf die Promotor-Aktivität ausüben könnte. Wäre der Promotor aktiv, könnte seine Aktivität möglicherweise die Embryonalentwicklung der transgenen Kulturen mitinduzieren. Wäre der Promotor dagegen inhibiert, beispielsweise durch Positionseffekte mit der umgebenden Pflanzen-DNS, könnte dies zum Verharren in der Torpedophase führen.

Nicht in jedem Fall führt die Transformation von Pflanzenzellen mit *Agrobacterium tumefaciens* zu transgenen Pflanzen. Ist die Pflanzenzelle nicht kompetent für die Aufnahme der T-DNS, kommt es zu keiner Veränderung des Pflanzengenoms. Man hat beobachtet, daß es nur dann möglich ist, T-DNS in das Empfänger-Genom einzuschleusen, wenn die Zelle eine Verletzung aufweist und daraufhin zur Wundheilung die Zellteilungsblockade aufgehoben wird. Bei dieser Reaktion ist es wichtig, daß die T-DNS vor oder während der ersten Zellteilungen in das Pflanzengenom eingeschleust wird (STEINBIß, 1995). Danach ist die Zelle nicht mehr transformationskompetent.

In der Gewebekultur ist dieses Phänomen eher ein geringerer Problemfaktor. Da durch das Schütteln der Suspensionen rein technisch immer kleine Zellverletzungen auftreten, ist also immer ein gewisser Zellenanteil kompetent, um transformiert zu werden. Es ist jedoch nicht sicher, ob sich alle diese Zellen zum Zeitpunkt der S-Phase in einer transformationsfähigen Situation befinden. Man kann jedoch davon ausgehen, daß auch bei den vorliegenden Versuchen der Anteil hoch genug ist, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen.

Häufig wird die T-DNS innerhalb regulatorischer Einheiten in das Pflanzengenom inseriert (GOLDSBOROUGH und BEVAN, 1991, TOPPING et al., 1991). Es besteht also mit jeder Insertion die Möglichkeit, daß für die Pflanze wichtige Stoffwechsel- und Regulationsvorgänge durch die Transformation beeinflusst werden. Verwendet man den 35S-Promoter des Blumenkohlmosaik-Virus, kann sogar durch die Transformation eine Aktivierung der pflanzlichen Regulator-Gene, die der T-DNS benachbart lokalisiert sind, erfolgen (HAYASHI et al., 1992).

Die Entwicklung der transgenen Pflanzen erfolgte über die somatische Embryogenese. Unter „somatischer Embryogenese“ versteht man nach WINKLER (1908) die Entwicklung somatischer Zellen (z.B. aus Blatt-, Petiolen-, Hypokotyl- oder Wurzelexplantaten) zu Embryonen, die in ihrem Ablauf der zygotischen Embryogenese stark ähnelt und zu normalen, vermehrungsfähigen Pflanzen führt. Die somatische Embryogenese stellt eine Embryobildung ohne Befruchtung dar (MAHESHWARI, 1979, NEUMANN, 1995, TOONEN und DE VRIES, 1996).

Man unterscheidet vier verschiedene Formen der Embryobildung ohne Befruchtung :

Bei der ersten Form, der **gametophytischen Apomixis** teilt sich die Megasporen-Mutterzelle in normalen, meiotischen Furchungsteilungen und ein haploider Embryosack wird ausgebildet. Der neue Embryo kann sich danach entweder aus der Eizelle entwickeln (**haploide Parthenogenese**) oder aus einer anderen Zelle des Gametophyten (**haploide Apogamie**). Die sich entwickelnden Pflanzen sind in der Regel steril.

Bei der zweiten Form der Apomixis kann der Embryosack entweder aus einer Zelle des Archesporiums gebildet werden (sog. **generative Aposporie**) oder aus einer anderen Zelle des Nucellus (**somatische Aposporie**). Es kommt zu keiner Chromosomenreduktion und alle Nuclei des Embryosacks liegen diploid –infolge einer defekten Meiose der Embryosackmutterzelle oder des Verdrängens des ursprünglich haploiden durch einen adventiv entstandenen diploiden Embryosack- vor. Diese Entwicklung läßt darauf schließen,



daß zusätzlich zur Embryosackmutterzelle auch einige andere Zellen der Samenanlage eine somatische Kompetenz besitzen. Vor Ausbildung des Embryos ist zunächst ein verstärktes Plasmawachstum von ursprünglich vakuolisierten Zellen, ausgehend von den Zellen des Nucellus oder der Integumente, zu beobachten. Es gibt keinen Hinweis darauf, daß die genannte Embryogenese-Kompetenz in allen Zellen des Nucellus vorliegt, sondern es wird vermutet, daß diese auf einige einzelne Zellen beschränkt ist.

Die Pflanze bildet bei der dritten Form der Apomixis, der sog. „**Adventivembryonie**“, Embryonen direkt aus somatischen Zellen der Samenanlage.

Bei der vierten Form bilden sich anstelle von Blüten **vegetative Organe** aus, die sich häufig bereits entwickeln, während sie noch an der Pflanze lokalisiert sind. Diese Art der Apomixis tritt jedoch eher selten auf (MAHESHWARI, 1979, NEUMANN, 1995, SITTE et al., 1998, TOONEN und DE VRIES, 1996).

Viele Pflanzen, wie *Kalanchoe*, *Hypericum*, *Euphorbia*, *Dactylis glomerata* und *Daucus carota*, können sich unter besonderen Bedingungen, wie beispielsweise der Gewebekultur, über die somatische Embryogenese vermehren (FOSKET, 1997).

Eines der Hauptstudienobjekte für die somatische Embryogenese ist die Karotte (*Daucus carota*). Werden Karottenzellsuspensionen in einer Nährlösung mit Mineralien, Saccharose und dem synthetischen Auxin 2,4-D kultiviert, beobachtet man eine aktive Zellproliferation, die zu einer Bildung undifferenzierten Gewebes, dem Kallus, führt. Wird dann die Zellsuspension in eine Nährlösung ohne Phytohormone überführt, wachsen einige, kompetente (embryogene) Zellen in sehr organisierter Art und Weise weiter. Als Stimulus für die Einleitung der somatischen Embryogenese können auch Veränderungen des pH-Wertes, Hitzeschock u.ä. dienen. Nur eine relativ geringe Zahl von Zellen erweist sich in der Realität als kompetent, in die somatische Embryogenese einzutreten. Die kompetenten Zellen bilden nach einer gewissen Zeit Zellcluster. Diese entwickeln sich über die Ausbildung einer Polarität weiter zu sphärischen Proembryonen. Es lassen sich im weiteren Fortgang der Entwicklung die Stadien der zygotischen Embryogenese (Globuli, Herzform, Torpedoform) nachweisen. Es ist ebenfalls möglich, eine Karottenzellsuspension in einem Nährmedium mit IES in Kultur zu nehmen, die auch zu einer Embryobildung führt.

Zellen, die erst kurze Zeit kultiviert worden sind, zeigen eine sehr hohe Rate somatischer Embryonen. Es scheint jedoch, daß diese Signale möglicherweise nach einer sehr langen Kulturdauer verloren gehen können und die Zellen dadurch die Kompetenz zur somatischen

Embryogenese verlieren (FOSKET, 1997, HEMLEBEN, 1990, MAHESHWARI, 1979, NAGL, 1976, NEUMANN, 1995, WANG UND CUMING, 1996).

Die somatische Embryogenese wird in zwei Formen eingeteilt : Die direkte und die indirekte somatische Embryogenese.

Die Pflanzen bei der direkten somatischen Embryogenese entwickeln sich ohne vorherige Kallusbildung aus einzelnen Zellen, die beispielsweise aus der Petiole, dem Hypokotyl oder dem Blatt stammen können. Vermutlich wird eine parenchymatische Zelle direkt in eine embryogene Zelle umgewandelt. Diese Art der somatischen Embryogenese tritt jedoch nur bei wenigen Pflanzenarten auf, wie zum Beispiel bei *Cichorium spp.*, *Daucus carota*, *Ranunculus sceleratus*, *Trifolium repens* und *rubens* und *Dactylis glomerata* (MAHESHWARI, 1979, NAGL, 1976, NEUMANN, 1995, WANG und CUMING, 1996).

Bei *Cichorium spp.* entstehen die meisten somatischen Embryonen aus vollständig differenzierten Mesophyllzellen und bestimmten anderen parenchymatischen Zellen. Fünf Tage nach Induktion der somatischen Embryogenese sind bereits Zellen erkennbar, die einen Verlust von Plastiden und einen vergrößerten Nucleus, der von einer großen Vakuole umgeben ist, besitzen. Diese Veränderungen werden auf Kallose-Ablagerungen auch in neugebildeten Zellwänden der embryogenen Zellen zurückgeführt. Bis zum späten globulären Stadium kann keine Polarisierung oder Ausbildung eines Suspensors beobachtet werden. Die gleiche Entwicklung weisen Zellen von *Trifolium repens* auf (DUBOIS et al., 1991, MASHESWARAN und WILLIAMS, 1985, WANG und CUMING, 1996).

Mesophyllzellen aus Blättern von Monokotyledonen wie z.B. *Dactylis glomerata* teilen sich vier Tage nach der Induktion der somatischen Embryogenese (TRIGANO, 1989).

Bei *Ranunculus sceleratus* stammen die somatischen Embryonen meist aus epidermalen Zellen, die nach einer symmetrischen Zellteilung zu einem embryogenen zweizelligen Cluster führt (KONAR et al., 1972).

Die Entwicklung somatischer Embryonen an der Oberfläche zygotischer Embryonen ist häufig zu beobachten. Man erklärt dieses Phänomen damit, daß die Zellen des zygotischen Embryos als jung und totipotent betrachtet werden (WANG und CUMING, 1996).

Forschungen zur „indirekten somatischen Embryogenese“ wurden bereits 1959 von REINERT an Zellen von *Daucus carota* durchgeführt. Er stellte die Hypothese auf, daß sich somatische Embryonen möglicherweise aus einer einzigen kompetenten Zelle, die sich vielfach geteilt

hat, entwickelt haben können. Weitere Forschungen zeigten, daß freie Zellen, die sich aus einem Kallusverbund gelöst hatten, und einzelne Zellen aus Suspensionskulturen die somatische Embryogenese durchführen können (BACKS-HÜSEMANN UND REINERT, 1970, KATO UND TAKEUCHI, 1963, NOMURA UND KOMAMINE, 1985).

Bei Monokotyledonen erfolgt die indirekte somatische Embryogenese über ein gewisses Schema : Die Zellen, die sich zu somatischen Embryonen entwickeln, sind zumeist an der Peripherie des Kallus lokalisiert. Sie sind reich an Cytoplasma und bilden eine dicke Zellwand, bevor sie in eine Reihe von internen Furchungsteilungen übergehen. Manche Monokotyledonen bilden dabei eine Suspensor-ähnliche Struktur aus, z.B. *Avena sativa* und *Pennisetum americanum* (VASIL UND VASIL, 1982, WANG UND CUMING, 1996).

Die Teilungsebene der dikotylen *Daucus carota* ist bei ihrer ersten Teilung in der somatischen Embryogenese variabel. Sie ist häufig asymmetrisch, kann aber auch symmetrisch verlaufen. Nach einer asymmetrischen Teilung ähnelt die weitere Entwicklung des somatischen Embryos stark dem der zygotischen Embryogenese. Im Falle einer symmetrischen Teilung verläuft die Entwicklung ähnlich der apikalen Zelle der geteilten Zygote (BACKS-HÜSEMANN UND REINERT, 1970, GUZZO et al., 1994, TOONEN et al., 1994).

Der Ablauf der Embryogenese und der Einfluß verschiedener Gene auf die Embryonalentwicklung wurden in erster Linie auf der Basis von Mutanten-Experimenten erforscht. Mutanten können mithilfe verschiedener Verfahren erzeugt werden. Einige Beispiele dafür sind chemische Mutagenese, Röntgenstrahlung und T-DNS-Insertionsmutagenese. Als Versuchssystem wird häufig *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) verwendet, da ihre Embryogenese sehr schnell abläuft und bereits nach kurzer Zeit Mutationen auch morphologisch sichtbar werden (STEINBIß, 1995, WANG UND CUMING, 1996).

Im folgenden sollen nun einige Mutanten, die durch Samen-Transformation mithilfe von *Agrobacterium* erstellt wurden, näher erläutert werden :

1. FASS-Mutanten zeigen eine veränderte Pflanzenform bei einer Wachstumsretardierung und eine extreme Kompression entlang der Achse der Pflanzenorgane (d.h. eine Stauchung der gesamten Pflanze). Betrachtet man die Embryogenese dieser Mutanten, wird deutlich, daß zunächst alle Zellmuster-elemente an der richtigen Stelle entspringen,

danach die Ebene der Zellteilung während der Embryogenese jedoch von der des Wildtyps abweicht. Es kommt zu einer unregelmäßigen Orientierung der Zellwände, so daß unterschiedlich große Zellen – auch innerhalb des gleichen Gewebes - entstehen. Vermutlich beeinflußt die Mutation bereits die erste Teilung der Zygote (MAYER et al., 1991, TORRES-RUIZ und JÜRGENS, 1994).

2. KNOPF-Mutanten besitzen ebenfalls eine veränderte Pflanzenform mit Wachstumsretardierung und Stauchung der Pflanze. Außerdem kann ein verminderter Chlorophyllgehalt in den Kotyledonen beobachtet werden. Die Zellwände sind zwar in normaler Weise orientiert, sie verlängern sich aber während des Wachstums abweichend vom Wildtyp. Es ist aber nicht bekannt, ob sich diese Mutation schon vor Erreichen des Herzform-Stadiums manifestiert (MAYER et al., 1991, TORRES-RUIZ und JÜRGENS, 1994).
3. ENANO-Mutanten zeigen bei einer signifikanten Wachstumsretardierung eine Veränderung der Pflanzenform bei vermindertem Chlorophyllgehalt der Kotyledonen (MAYER et al., 1991, TORRES-RUIZ und JÜRGENS, 1994).
4. EMB-Mutanten weisen Defekte in der Embryogenese auf, da das EMB-Gen wahrscheinlich für die Entwicklungsprogramme der Embryogenese und der Morphogenese nötig ist. Das EMB10-Genprodukt ist während der ersten Spanne der Embryogenese für die Polarität des sich entwickelnden Embryos notwendig. Später ist dieses für die korrekte Ausrichtung des Sproßapikalmeristems und zur Promotion der Zellelongation notwendig. Der EMB30-Mutant (entspricht dem GNOM-Mutanten) weist im ausgereiften Stadium eine veränderte Embryoform mit verschmolzenen Kotyledonen und ohne Wurzeln auf. Es kommt also durch die Mutation zu einer Zerstörung der apikalen und basalen Abschnitte der sich entwickelnden Pflanze durch eine allgemeine Veränderung des Zellteilungsmusters während der Embryogenese. Es kommt zum Verlust der Kontrolle der Zelle über die Zellgröße und –form. Möglicherweise spielt in diesem Zusammenhang auch die Inhibierung des polaren Auxintransports eine Rolle (MAYER et al., 1991 und 1993, MEINKE, 1985 und 1994).

Aus den Beispielen wird deutlich, daß eine Vielfalt von Genen und Genprodukten an der Embryogenese beteiligt sind. Der Verlauf der somatischen Embryogenese kann demnach auf viele Arten beeinflußt werden.

Deduzierend kann gefolgert werden, daß bei der fehlerhaften Embryonalentwicklung der Transformation I (4 h Cokultur) ebenfalls ein Gendefekt vorliegen könnte, der zumindest in

den Fällen des kompletten Fehlens von Embryonen sehr gravierend sein muß. Bei den Transformationszeitpunkten T(1) und T(3) waren die Veränderungen der Genstruktur vermutlich so schwerwiegend, daß keine weitere Embryonalentwicklung erfolgen konnte. Möglicherweise wurden die Chromosomen-Loci der „housekeeping“-Gene durch die T-DNS-Insertion und die Streßsituation der nur kurz andauernden Cokultur von 4 Stunden mit anschließender Antibiotika-Behandlung so stark in Mitleidenschaft gezogen, daß eine normale, weitergehende Embryonalentwicklung ausgeschlossen war. Auch die Zugabe von Kokosnußmilch, die bei den anderen Transformationszeitpunkten mit zwischenzeitigem Stillstand während des Torpedo-Stadiums eine Weiterentwicklung zu Embryonen und Pflanzen bewirkte, zeigte bei diesen Suspensionen keinen Effekt. Dies läßt auf eine schwere Schädigung des gesamten Metabolismus oder auf Wirkungen von Produkten der rol-Gene schließen und nicht nur auf Störungen, die durch die Insertion der Fremd-DNS hervorgerufen wurden.

Bei den anderen Karotten-Suspensionskulturen der Transformation I (4 h Cokultur) konnte die Applikation von Kokosnußmilch einen positiven Einfluß auf die Weiterentwicklung der Torpedo-Formen nehmen. Es gibt keine plausible Erklärung dafür, daß die Kokosnußmilchgabe nur bei Kulturen einiger Transformationszeitpunkte zum Fortschreiten der Embryonalentwicklung führte. Es bleibt ebenfalls die Frage zu klären, auf welche Weise die Kokosnußmilch in den Zellmetabolismus eingreift, um eine Art Befreiung aus dem arettierten Embryonalzustand zu erreichen. Die Kokosnußmilch-Wirkung scheint im Überschreiten eines „Schwellenwertes“ oder einer bestimmten Grenze für den Eintritt in das nächste Embryonalstadium zu liegen. Da die Kokosnußmilch promovierend auf die Induktion einiger Enzyme wirken kann (beispielsweise der Phenylalanin-Ammonium-Lyase bei *Phaseolus vulgaris* (BEVAN und NORTHCOTE, 1979), könnte dieser „Schwellenwert“ in diesem Fall in der Aktivierung eines Enzyms, das für die Weiterentwicklung nötig ist, liegen.

Bei der Betrachtung der Bonituren der transgenen Karottenpflanzen (s. Tab. 1 und 3) wird der Einfluß der inserierten T-DNS mit den rol-Genen ABC auf die Morphologie und den Phänotyp deutlich.

Da in der Gewebekultur bereits die Inkulturnahme eine große Streßsituation für die pflanzlichen Zellen darstellt, auf die sie mit Endopolyploidien oder der sog. „Somaklonalen Variation“ reagieren, ist es in diesem Zusammenhang wichtig, die durch die Fremdgene

hervorgerufenen morphologischen Veränderungen klar von denen abzugrenzen, die lediglich auf die Kulturbedingungen zurückzuführen sind.

Somatische Polyploidien entstehen in der Regel in der Gewebekultur durch Restitutionszyklen. Nach NAGL (1976) wird bei einem Restitutionszyklus der Zellzyklus vor Vollendung der Karyokinese abgebrochen und somit das Auftreten der somatischen Polyploidie bedingt. Man beobachtet eine Verdopplung der DNS bzw. der Chromosomen, die jedoch alle in einem Kern verbleiben. Das Hauptcharakteristikum des Restitutionszyklus ist der Eintritt des Kerns in eine anfänglich normale Mitose, die zu einem bestimmten Zeitpunkt blockiert wird und den Übergang der Chromosomen in die Interphase zur Folge hat (NAGL, 1976).

Sowohl *in vivo* bei Pflanzen und Tieren sowie *in vitro* in Gewebekulturen können diese verkürzten Zellzyklen beobachtet werden, die sich morphologisch auf verschiedenste Weise bemerkbar machen (BAYLISS und GOULD, 1974, BUTCHER et al., 1975, HESSE, 1970, NAGL, 1962).

Neben den Endopolyploidie-Bildungen stellt die „Somaklonale Variation“ ebenfalls ein Problem in der Gewebekultur dar. Unter „Somaklonaler Variation“ versteht man nach LARKIN und SCOWCROFT (1981) in der Gewebekultur die Veränderungen von morphologischen Charakteristika wie Wachstumsrate, Farbe, Stabilität und Regenerationsfähigkeit, von physiologischen und auch genetischen Merkmalen nach wiederholter Subkultur. Dies zieht die Vermutung nach sich, daß sich in der Zellkultur keine identischen Zellen des gleichen Genotyps befindet, obwohl die gesamte Kultur aus einer Zelle gewonnen werden kann, und daß sich unter dem Selektionsdruck unterschiedliche Zellvariationen entwickeln (COLLIN und EDWARDS, 1998, WILHELM, 1999). Die Häufigkeit einzelner Genmutationen variiert stark in Abhängigkeit des Pflanzenmaterials (ARNHOLDT-SCHMITT, 1995, EVANS et al., 1984).

Man geht davon aus, daß Pflanzen ein genetisches Mosaik, das durch die Bildung von somatischen Mutationen im Meristem und Kambium entsteht, darstellen. Wenn diese Mutationen für die Pflanze nicht letal sind und kontinuierlich in sich teilenden Zellen des Meristems und Kambiums exprimiert werden, kann dies zu einer permanenten Modifikation der Zellteilung, -differenzierung und schließlich der Organogenese führen. Abhängig von der Art des kultivierten Gewebes ist die Variationsbreite der einzelnen Explantate unterschiedlich hoch (KARP und BRIGHT, 1985).

Neue Variationen können in der Gewebekultur sogar schon durch die bloße Inkulturnahme beobachtet werden. Ein wesentlicher Faktor ist in diesem Zusammenhang die Wahl des Kultur-Mediums und der zugesetzten Phytohormone. Nährlösungen mit einem hohen Anteil an 2,4-D scheinen die morphologische Abnormalitäten zu promovieren. Man geht jedoch davon aus, daß die genetischen Veränderungen bereits während der ersten Zellteilungen im Explantat erscheinen. Die Veränderung des Genoms ist allerdings auch in großem Maße von der jeweiligen Pflanzenart abhängig (KARP und BRIGHT, 1985).

Alle morphologischen und cytologischen Abnormalitäten sind die Folge von Veränderungen der Genomstruktur wie etwa Imbalancen des internen Nucleotid-Pools. Sie reichen von DNS-Fragmentationen, Chromosomenbrüchen, über die Aktivierung von Transposons bis hin zur Geninaktivierung durch Methylierung (KARP und BRIGHT 1985, LARKIN und SCROWCROFT, 1981, MCCLINTOCK, 1984).

Berücksichtigt man die Veränderungen, die durch die „Somaklonale Variation“ hervorgerufen werden, können diese jedoch von den durch die Transformation morphologisch veränderten Karottenpflanzen abgegrenzt werden: Bereits bei Inkulturnahme der unsynchronisierten, untransformierten Kontrollen konnte bei jeder durchgeführten Kontrolle nur ein Morphotyp von Karottenpflanzen (Morphotyp 1) nachgewiesen werden. Es wurde keinerlei Variation in der Morphologie, auch bei längerer Gewebekultur, beobachtet. In den transformierten Kulturen konnten fast auch immer Karottenpflanzen bonitiert werden, die das Aussehen normaler, unveränderter Karottenpflanzen hatten. Entweder waren diese Pflanzen nicht transformiert worden und hatten trotz des starken Selektionsdruckes keine somaklonale Variation entwickelt, das Gen wurde durch „silencing“ reguliert oder nicht genügend exprimiert, um eine morphologische Veränderung auszulösen. Diesen letzten Aspekt konnten auch KURIOKA et al. beobachten (1992).

Fernerhin war der molekulare Nachweis der rol-Gene bei den stark in der Morphologie veränderten Karottenpflanzen positiv, wenn auch teilweise nicht für alle rol-Gene. Hätte es sich bei den Karotten um nicht-transformierte, sondern lediglich durch somaklonale Variation mutierte Pflanzen gehandelt, hätte der Nachweis für die Existenz der rol-Gene immer negativ ausfallen müssen. Dies ist jedoch nicht der Fall.

Somit kann die phänotypische Ausprägung der Pflanzen vermutlich auf die Insertion der rol-Gene zurückgeführt werden.

Im Laufe der Bonituren konnten sechs Morphotypen charakterisiert werden (s. Tab. 2 und Abb. 16). Ihre detaillierte Beschreibung soll verdeutlichen, daß die aufgetretenen, morphologischen Änderungen vor allem auf die Integration der rol-Gen-Kombination zurückzuführen sind:

Der **Morphotyp 1** ist durch ein Aussehen gekennzeichnet, das einer untransformierten Karottenpflanze der Gattung *Daucus carota* L. *Rotin* entspricht. Die Karottenpflanzen weisen eine sattgrüne Farbe, Fiederblätter, Kotyledonen und eine durchschnittliche Bewurzelung auf. Transformierte Pflanzen, die diesem Morphotyp 1 entsprechen und die rol-Gene in sich tragen, zeigen vermutlich nur eine geringe Expression der inserierten Gene. Denkbar wäre auch der Einbau in eine Art von transientem Heterochromatin oder in eine Heterochromatin-Sequenz, die die inserierten Gene nicht häufig exprimiert, oder der Verlust der Promotor-Sequenz.

Der **Morphotyp 2** weist schmale, oft etiolierte Fiederblätter und eine normale Wurzelbildung auf. Die Größe der Pflanze ist vergleichbar mit einer normalen Karottenpflanze des Morphotyps 1. Der Einfluß der rol-Gene läßt sich insofern nachweisen, als daß besonders rolC bei Expression in den Gibberellinsäure-Haushalt der Pflanzen eingreift. Die Pflanzen des Morphotyps 2 ähneln zwar eher Pflanzen, die mit GA3 behandelt wurden (ARNHOLDT-SCHMITT, 1993a), d.h. die eine Erhöhung der Gibberellinaktivität aufweisen, im Unterschied zu der in der Literatur zitierten Down-Regulation des GA-Metabolismus bei Tabak und Pappeln (NILSSON et al., 1993). Da jedoch das rolC-Gen noch nicht explizit in Karotten unter der Fragestellung der Gibberellinsäure-Veränderung in der transgenen Pflanze untersucht worden ist, kann bis zu anderen Ergebnissen davon ausgegangen werden, daß das rolC-Gen in der Karotte Gegenteiliges, d.h. eine Aktivierung des GA-Metabolismus, bewirken könnte.

Der **Morphotyp 3** ist durch schmale, grüne, ungefiederte Blätter, keine Petiolen, keine Fiederblätter, aber normales oder verstärktes Wurzelwachstum charakterisiert. Nicht nur am untypischen Aussehen, sondern auch am Zwergenwuchs der Pflanzen wird der Einfluß der rol-Gene (rolA und rolC) deutlich. Die zum Teil eher hellgrüne Farbe der Blätter scheint eine rolC-Wirkung zu sein, ebenso der kleine Wuchs, der sich durch Veränderungen des Cytokinin-Haushaltes erklären könnte (ESTRUCH et al., 1991a und 1991c, SCHMÜLLING et al., 1988, SCORZA et al., 1994).



Der **Morphotyp 4** mit breiten ungefiederten, zum Teil abgerundeten Blättern mit einem hohen Anthocyan-Gehalt und mit normaler oder geringer Adventivwurzelbildung läßt von der Blattform her betrachtet auf die Wirkung des rolB-Gens schließen. Dieses bewirkt Veränderungen im Auxinmetabolismus, durch die die Auxinsensitivität der Gewebe verstärkt wird (FILIPPINI et al., 1994). In der Regel folgt daraus ein vermehrtes Adventivwurzelwachstum, das jedoch im Allgemeinen bei dieser Versuchsreihe nicht beobachtet werden konnte. Möglicherweise genügte die Expression der rol-Gene nicht, um die Pflanzenentwicklung in dieser Form zu manipulieren. Bei den Transformanten, die diesen Morphotyp zeigten, konnte das rolB-Gen bis auf eine Ausnahme (Transformation II (8 h Cokultur) T(0,5)) immer nachgewiesen werden.

Der **Morphotyp 5** ähnelt dem Morphotyp 4 bezüglich der Blattmorphologie, die ebenfalls breite, ungefiederte, häufig hellgrün durchscheinende Blätter zeigt. Neben einer schwachen Adventivwurzelbildung ist eine normale, zum Teil verstärkte Seitenwurzelbildung zu beobachten. Die verstärkte Seitenwurzelbildung würde auf eine leichte Ausprägung des „Ri-Phänotyps“ und damit auf das Zusammenwirken der gesamten rol-Gen-Kombination ABC hinweisen. Die abgerundeten Blätter könnten auf eine rolB-Wirkung zurückgeführt werden und der kleine Wuchs auf rolA und C.

Der **Morphotyp 6** weist mit seinen in sich verdrehten, spiralförmigen und meist sattgrünen Blättern eine Besonderheit auf. Die Drehung der Blätter, die sehr schmal sind, weist wiederum auf eine erhöhte GA-Aktivität hin. Allerdings kann auch eine verstärktes Induktion des Adventivwurzelwachstums, möglicherweise zurückzuführen auf rolA- und rolB-Wirkungen, beobachtet werden (ESTRUCH et al., 1991b, SCHMÜLLING et al., 1988 und 1989).

Bei der Deduktion der einzelnen Morphotypen wird also deutlich, daß die morphologischen Veränderungen der transgenen Pflanzen zum größten, wenn nicht gesamten Teil durch die Insertion der rol-Gene und deren Wirkung verursacht wurden.

Immer, wenn über Insertion von Fremd-DNS-Sequenzen diskutiert wird, muß auch der Aspekt der DNS-Methylierung bzw. des „gene silencing“ angesprochen werden. Wie bereits erwähnt, erkennt die Pflanze die Integration fremder DNS und schützt sich durch Methylierungen und andere Mechanismen vor negativen Konsequenzen, die durch die Expression der exogenen DNS resultieren könnten (FINNEGAN et al. 1993). Es ist also

denkbar, daß einige erwartete morphologische Ausprägungen des Ri-Phänotyps deshalb bei den transgenen Pflanzen nicht charakteristisch ausgebildet waren, weil die Expression der rol-Gene durch eine Methylierung vermindert wurde.

Prinzipiell gesehen ist der Methylierungsgrad des Pflanzengenoms eng an den Differenzierungsstatus des betrachteten Gewebes gebunden. Meristematische Gewebe zeigen zumeist ein hohes Methylierungsniveau, das als genomischer Indikator für den dedifferenzierten Zustand interpretiert werden kann. Während verschiedener Entwicklungsphasen sind Demethylierungen im Gewebe vorherrschend, die vermutlich wesentlich für die Differenzierung des Genoms sind. *De novo*-Methylierungen treten auch während der Gewebekultur auf und können den Differenzierungs-Status von Karotten-Geweben in der Kultur beeinflussen. Es wird diskutiert, daß durch die *de novo*-Methylierungen eine De-Differenzierung erreicht wird, die vorher determinierte Zellprogramme aufhebt (ARNHOLDT-SCHMITT, 1993b, ARNHOLDT-SCHMITT et al., 1995). Veränderungen im Methylierungsmuster und differentielle Replikation sind nach ARNHOLDT-SCHMITT (1995) Teil der normalen Zellphysiologie von sich teilenden Zellen.

Es könnte somit in die Diskussion über den Mechanismus der Wirkung der Kokosnußmilch einbezogen werden, ob diese möglicherweise eine Veränderung des Methylierungsstatus der Karottensuspension der Transformation I (4 h Cokultur) im Verlauf der Inkulturnahme bewirkte, die dazu führte, daß sich aus den Embryonalstadien Pflanzen entwickelten.

Eine andere Variante des „gene silencing“ wäre der Einbau der rol-Gene in invertierten Kopien in das Pflanzengenom, die keine Gen-Aktivität zeigen. Diese wären dann auch mit den, für diese Versuchsreihe zur Verfügung stehenden Methoden nicht mehr analysierbar, obwohl eine Insertion stattgefunden hat (DE BLOCK und DE BROUWER, 1991, DE NEVE et al., 1997, GREVELDING et al., 1993, JORGENSEN et al., 1987).

Bei der Untersuchung der Karottenpflanzen wurde klar, daß nicht in jeder Pflanze die gesamte Kombination rolABC integriert worden war (s. Tab. 5 und 6). Dies ist kein überraschendes Ergebnis, da auch in der Literatur häufig darauf hingewiesen wird, daß die T-DNS unvollständig oder zersplittert in das Pflanzengenom inseriert wird (CASTLE et al., 1993, DEROLE und GARDNER, 1988, SPIELMANN und SIMPSON, 1986). Auch nach erfolgter vollständiger Integration der T-DNS im Pflanzengenom kann es nachträglich durch interne

Umstrukturierungen zu Deletionen oder Veränderungen bereits inserierter T-DNS-Sequenzen kommen. Dabei sind häufig repetitive Sequenzen betroffen (MEYER, 1995). Möglich wäre jedoch auch ein Abbau von Teilen der T-DNS im Nucleus-Bereich vor der Integration ins Karottengenom durch im Kern aktive Nucleasen. Bereits eine Interaktion von exogener DNS mit der Akzeptorzelle kann, wie etwa in Mäuse-Spermien, zu einer Aktivierung von Nucleasen im Kern führen, die neben dem Abbau der noch nicht inserierten Fremd-DNS ebenfalls Umstrukturierungen der bereits inserierten exogenen Sequenzen bewirken können (MAGNANO et al., 1998). Nucleasen wirken spezifisch gegen DNS und RNS, wobei einzelsträngige Nucleinsäuren in höherem Maße hydrolysiert werden als doppelsträngige (NEUBERT und GOTTLIEB, 1990), wie beispielsweise bei der Gersten-Nuclease. Diese hydrolysiert die Nucleinsäuren primär endolytisch (BROWN und HO, 1987), so daß der Verlust einzelner Gensequenzen inmitten des Konstrukts erklärbar wäre. Die durch die Exzision betroffene Sequenz könnte dann durch eine Ligase oder Polymerase repariert werden (Oleykowski et al., 1999).

Das Konstrukt des Plasmids pPCV 002 mit rolABC enthält die rol-Gene nicht direkt hintereinander lokalisiert, sondern die einzelnen Abschnitte (A, B und C) sind durch Basensequenzen verbunden, die nicht für das rol-Gen codieren. Es wäre im Rahmen der beschriebenen Umlagerungen innerhalb des Karottengenoms also denkbar, daß gerade diese flankierenden Sequenzen ein Ziel der internen Strukturänderung sein könnten. Dies stünde im Zusammenhang mit dem Ergebnis der Southern Blots (s. Abb. 29), in denen die Insertion einzelner rol-Gene in verschiedenen Restriktionsfragmenten mit unterschiedlichen Molekulargewichten nachgewiesen werden konnte. Nur zu einem Applikationszeitpunkt (T(2) bei der Transformation I (4h Cokultur)) wurden alle drei rol-Gene im gleichen Molekulargewichtsbereich der Restriktionsfragmente (etwa 700 bp) eingebaut. Alle anderen Proben ergaben keine zusammenhängende Insertion der rol-Gen-Kombination ABC. Diese wäre jedoch bei einer „normalen“ Insertion ohne Umlagerungen zu erwarten gewesen. Möglicherweise war das Konstrukt rolABC zwar ursprünglich vollständig integriert worden, wurde jedoch im Laufe der Zeit durch interne Umlagerungsvorgänge auseinander gerissen. Vielleicht führten diese Umlagerungen auch dazu, daß die integrierte Sequenz der rol-Gene durch pflanzliche Sequenzen unterbrochen wurde. Beobachtungen von internen Umlagerungen und Umstrukturierungen sind in der bereits schon erwähnten Literatur beschrieben (CASTLE et al., 1993, DEROLES und GARDNER, 1988, MEYER, 1995, SPIELMANN und SIMPSON, 1986). Ein weiteres Problem bei der Auswertung der Southern Blots war das Auftreten von Restriktionsfragmenten in nicht durch die Restriktionsenzyme definierten

Bereichen der T-DNS. Eine Erklärungsmöglichkeit bestände darin, daß die rol-Gene –wie oben erwähnt- nicht in der Kombination rolABC in das Karottengenom inseriert worden und auf diese Weise die definierten Restriktionsschnittstellen nicht mehr wirksam waren, weil die einzelnen rol-Gene in Bereiche des Karottengenoms eingebaut wurden, die keine Schnittstellen bzw. Schnittstellen in anderen Molekulargewichtsbereichen für die gewählten Enzyme aufwiesen. Diese Hypothese wird durch die Molekulargewichtsbereiche der beobachtbaren Banden unterstützt, die bei Proben des gleichen Applikationszeitpunktes (mit Ausnahme des Zeitpunktes T(2) der Transformation I (4 h Cokultur)) in unterschiedlichen Molekulargewichtsbereichen anzusiedeln sind. Eine weitere Möglichkeit, die nicht erwarteten Restriktionsfragmente zu interpretieren, wäre die der Methylierung der vorgegebenen Schnittstellen. Weil die verwendeten Restriktionsendonukleasen methylierte Erkennungssequenzen nicht mehr schneiden konnten, kam es möglicherweise zu den veränderten Größen der Restriktionsfragmente, die nun durch die Lage der Schnittstellen im Karottengenom (und nicht mehr der T-DNS) charakterisiert wurden. Eine Methylierung bestimmter Fremdgen-Sequenzen ist häufig zu beobachten und stellt einen Schutzmechanismus der Pflanze dar (FINNEGAN et al., 1998). MATZKE et al. (1994) konnten feststellen, daß eine Homologie der Fremd-DNS mit bestimmten Loci des Pflanzengenoms zu Interaktionen führen kann, die häufig eine Methylierung der exogenen Sequenzen bewirkt. Von diesen Modifikationen ist auch die Promotorregion betroffen. Geht man davon aus, daß nur etwa 30% der Insertionen mithilfe von *Agrobacterium tumefaciens* zu einfachen, aktiven Kopien der Fremd-DNS im Pflanzengenom führen (DEROLES und GARDNER, 1988), kann davon ausgegangen werden, daß ein großer Teil der Fremdgene in anderer Form vorliegt. Dies könnte auch die veränderten Restriktionsschnittstellen beinhalten. Daß nicht alle Pflanzenproben gleichmäßig von diesen Methylierungsvorgängen beeinflusst wurden, scheint keine Ausnahme zu sein, da auch in der Literatur Hinweise auf große Unregelmäßigkeiten in den Methylierungsmustern einzelner Pflanzen (hier: Tabak), sogar solchen mit gleichem transgenem Genotyp, gegeben werden. Das gleiche Konstrukt kann in manchen Pflanzen stabil in bestimmte Insertionsloci eingebaut werden und instabil in andere, in denen es durch verschiedene Interaktionen modifiziert wird (NEUHUBER et al., 1994).

Wie aus den Abbildungen des Southern Blots zu erkennen ist (s. Abb. 29), war der Verdau der DNS nicht immer so erfolgreich verlaufen wie angenommen. Demzufolge könnten die nicht erwarteten Banden auf einen verminderten Restriktionsverdau zurückgeführt werden. Allerdings käme diese Hypothese nur für einige Banden in Betracht, am wahrscheinlichsten

wäre sie für den Blot 2, Slot 4 bei 1400 bp (Abb. 29/1), falls der Verdau nur mit HindIII und EcoRV vollständig erfolgte. Es könnte somit ein kombinierter Einbau von rolB und rolC (rolA wurde nicht untersucht) bei der Transformation I (4 h Cokultur) zum Transformationszeitpunkt T(1,5) erfolgt sein. Die anderen Banden in höheren Molekulargewichtsbereichen von 3500 bis 10.000 bp (s. Blot 1, Slot 2 (s. Abb. 29/1), Blot 3, Slot 2 und 4 (Abb. 29/2), Blot 5, Slot 6 (s. Abb. 29/3)) lassen sich dagegen schwer den Schnittstellen innerhalb des Plasmids zuordnen. Es ist deshalb ebenso denkbar, daß ein rol-Gen im Rahmen der bereits erwähnten Umstrukturierungen der Pflanzen-DNS separat in diese höhermolekularen Bereiche des Karottengenoms inseriert worden war. Falls tatsächlich ein verminderter Restriktionsverdau vorliegen sollte, würde dieser jedoch nichts an der Beobachtung ändern, daß die rol-Gene in der Regel nicht als Kombination in das Pflanzengenom inseriert worden waren, weil die untersuchten rol-Gene eines bestimmten Transformationszeitpunktes in zum Teil stark differierenden, nicht erwarteten Molekulargewichtsbereichen auftraten. Wären die rol-Gene in Kombination integriert worden und wäre ein verminderter Restriktionsverdau erfolgt, hätten sich die rol-Gene zumindest in ähnlichen Restriktionsfragmenten befinden müssen. Dies ist anhand der Southern Blots jedoch nicht nachweisbar. Außerdem befanden sich viele der auftretenden Banden in einem wesentlich geringeren Molekulargewichtsbereich als dem durch die Restriktionsenzyme vorgegebenen.

Vergleicht man die Molekulargewichte der Banden der einzelnen rol-Gene innerhalb der unterschiedlichen Transformationszeitpunkte, stimmen auch diese nicht überein. Es scheint also ein uneinheitlicher Einbau der rol-Gene in das Karottengenom erfolgt zu sein. Für weitere Untersuchungen wäre es vermutlich von Vorteil, in Southern Blots die gesamte, nicht geschnittene rol-Gen-Kombination im Pflanzengenom nachzuweisen, um die genannten Schwierigkeiten zu umgehen.

Neben den genannten Modifikationsmöglichkeiten für Restriktionsschnittstellen in einer bestimmten DNS-Sequenz soll nun auch Transposon-bedingte Veränderungen betrachtet werden: Bei Versuchen mit Transposons, die in eine bestimmte Region des Promotors inseriert wurden, konnte festgestellt werden, daß die Transposon-Exzision zu schwerwiegenden DNS-Veränderungen mit Deletionen, invertierten Duplikationen und Inversionen führte. Diese beeinflussten einen Bereich von etwa 430 Nukleotiden (FRANK et al., 1997, JACKSON et al., 1999, KLOECKENER-GRUISSEM und FREELING, 1995). Transponierbare Elemente oder springende Gene sind häufig zu beobachten und führen auch in nicht transgenen Systemen zu Mutationen (WIENAND und SAEDLER, 1987). Es ist also

durchaus denkbar, daß die Insertion der rol-Gene in die Nähe von transponierbaren Elementen Veränderungen in den rol-Gen-Sequenzen nach sich gezogen hat. Damit könnten auch die Deletion des rolB-Gens erklärt werden, das in manchen Proben nicht nachzuweisen war, obwohl rolA und rolC vorhanden waren.

Bei den genannten Deletionsvorgängen könnte auch der jeweilige Promotor für die Kontrolle eines einzelnen rol-Gens verloren gegangen sein. Aus der Literatur (LINDSEY et al., 1993, TOPPING et al., 1991, TOPPING et al., 1994, VON BODMAN et al., 1995, WEI et al., 1997) ist jedoch bekannt, daß auch promotorlose Gene im Pflanzengenom (z.B. bei *Arabidopsis thaliana*, Tabak oder Kartoffeln) durch native Pflanzenpromotoren transkribiert werden können. Die Möglichkeit, daß separat inserierte rol-Gene auch ohne Vorhandensein ihres eigenen Promotors exprimiert werden und zu den beobachtbaren morphologischen Veränderungen der Karottenpflanzen führen könnten, wäre somit ebenfalls erklärbar.

Bei der Betrachtung der transgenen Pflanzen zu den entsprechenden Transformationszeitpunkten kann eine deutliche Zuordnung eines bestimmten Morphotyps zu einer bestimmten Transformationszeit nicht vorgenommen werden (s. Abb. 17-19).

Das Schema der Transformation I (4 h Cokultur) weist zwar zu Beginn der Transformation in der S-Phase ein punktuell Auftreten des Morphotyps 4 auf, jedoch können der Morphotyp 3 und 5 bereits zum Zeitpunkt T(0) parallel auftretend beobachtet werden. Die Ausbildung unterschiedlicher Morphotypen zum gleichen Transformationszeitpunkt läßt sich jedoch recht einfach durch die gleichzeitige Öffnung mehrerer Replikationsstartpunkte erklären. Die rol-Gene wurden demzufolge zwar zur gleichen Zeit, aber an unterschiedlichen Loci inseriert, was zu einer differierenden Morphologie führte. Setzte sich ein Morphotyp zu einem bestimmten Transformationszeitpunkt durch, kann vermutlich davon ausgegangen werden, daß diese Integration die stabilste bzw. am stärksten exprimierte war.

Die Transformationen II (8 h Cokultur) und III (48 h Cokultur) zeigen einen etwas anderen Verlauf des Auftretens der verschiedenen Morphotypen. Es könnte möglicherweise von einem phasenweise Auftreten einzelner Morphotypen zu bestimmten Transformationszeitpunkten gesprochen werden.

Bei der Transformation II (8 h Cokultur) ist beispielsweise der Morphotyp 1 zunächst zum Zeitpunkt T(0) mit 25% Auftrittshäufigkeit vertreten, die dann weiter sinkt, schließlich ganz verschwindet und dann ab dem Zeitpunkt T(3) zum Maximum an T(4) ansteigt, danach wieder abfällt. Einen ähnlichen Verlauf nimmt die Auftrittshäufigkeit des Morphotyps 5.

Vergleichbare Graphiken erhält man bei der Transformation III (48 h Cokultur) für die Morphotypen 1, 3, 4 und 5.

Möglicherweise kann dieses phasenweise Auftreten der einzelnen Morphotypen als eine Art von präferentieller Ausprägung des Phänotyps gewertet werden. Obwohl theoretisch weit mehr als die beobachteten sechs Morphotypen durch eine Transformation denkbar wären, konnten sich nur diese in allen Transformationen behaupten. Die sechs morphologischen Transformanten haben also aufgrund ihres Genotyps dem starken Selektionsdruck der Gewebekultur standgehalten, so daß davon ausgegangen werden kann, daß sie eine besonders stabile Insertion der rol-Gene an präferentiellen Loci enthalten müssen. Es ist jedoch problematisch, diese Ergebnisse zu interpretieren, da vergleichbare Untersuchungen mit Transformationszeitpunkten abhängig von der Synchronisation des Zellzyklus noch nicht in der aktuellen Literatur angesprochen werden.

Betrachtet man den Verlauf des Zellzyklus bzw. seiner erneuten Anregung bei der Transformation I (4 h Cokultur), kann eine gewisse zeitliche Abfolge des Auftretens der einzelnen Morphotypen charakterisiert werden: Zunächst werden die Morphotypen 3, 4 und 5 nach Zellzyklusanregung ausgebildet, wobei der **Morphotyp 4** nach mehr als 1,5 Stunden nicht mehr ausgeprägt wird. Die Insertion der rol-Gene, die zur Ausprägung des Morphotyps 4 führte, konnte in Fragmenten mit niedrigem Molekulargewichtsbereich der Restriktionsfragmente beobachtet werden.

Pflanzen des **Morphotyps 5** entstanden bis zum Transformationszeitpunkt T(2), dabei wurden die rol-Gene in der Regel in Restriktionsfragmente mit niedrigem und mittlerem Molekulargewichtsbereich inseriert.

Eine Entwicklung von Pflanzen des **Morphotyps 3** konnte bis 4 Stunden nach Zellzyklusanregung beobachtet werden. Da das rolB-Gen vermutlich einen großen Einfluß auf die Entstehung des Morphotyps 3 hat, muß davon ausgegangen werden, daß es spätestens 4 Stunden nach Zellzyklusanregung in das Pflanzengenom inseriert worden war. Dabei werden offensichtlich Fragmente mit einem niedrigen Molekulargewicht bevorzugt.

Der **Morphotyp 6** konnte erstmals 2 Stunden nach Zellzyklusanregung beobachtet werden, auch Pflanzen des Transformationszeitpunktes T(6) zeigten dessen Charakteristika. Die Insertion von rolA erfolgte in DNS-Fragmente mit kleinem bis mittlerem Molekulargewichtsbereich der Restriktionsfragmente, die von rolC in solche mit niedrigem Molekulargewichtsbereich der Restriktionsfragmente.

Erstmals zum Zeitpunkt T(6) wurde der **Morphotyp 1** ausgeprägt, vermutlich wird der Einbau in mittlere Molekulargewichtsbereich der Restriktionsfragmente bevorzugt.

Die angegebenen Molekulargewichtsbereiche der Restriktionsfragmente sind zwar durch Erkennungssequenzen und damit durch die Wahl der Restriktionsenzyme definiert und stellen nicht unbedingt ein Spiegelbild der DNS-Struktur im Karottengenom dar, können aber innerhalb dieser Versuchsreihe als Marker für die Insertion der rol-Gene in die pflanzliche DNS verwendet werden. Auch wenn die durchgeführten Analysen nur als tendenziell anzusehen sind, scheint jedoch die Ausbildung eines gewissen Morphotyps von der Insertion eines oder mehrerer rol-Gene in einem eingrenzbaren Molekulargewichtsbereich der Restriktionsfragmente mitbestimmt zu sein. Dabei kommt offensichtlich auch dem Transformationszeitpunkt eine Bedeutung zu, da bestimmte rol-Gene einen definierten Morphotyp nicht zu allen Transformationszeitpunkten induzieren. Demzufolge muß die Zellzyklussynchronisation und die anschließende Wiederanregung des Zellzyklus eine Rolle bei der Insertion der Fremd-DNS in das Karottengenom gespielt haben.

Es muß davon ausgegangen werden, daß die zu verschiedenen Zeiten des Zellzyklus geöffneten Replikationsstartpunkte einen großen Einfluß auf die Insertion des jeweiligen rol-Gens in einen bestimmten Molekulargewichtsbereich der Restriktionsfragmente aufweisen. Dabei kommt der Größe des ORF des jeweiligen rol-Gens vermutlich nur eine untergeordnete Bedeutung zu, da die einzelnen Morphotypen durch die verschiedensten rol-Gen-Kombinationen hervorgerufen werden können und keine eindeutige Präferenz eines rol-Gens in einem bestimmten Molekulargewichtsbereich der Restriktionsfragmente beobachtbar ist.

Betrachtet man die Morphotypen 3, 4 und 5, die sich in ihrer morphologischen Ausprägung zum Teil stark voneinander unterscheiden, wobei Morphotyp 3 schmale, ungefiederte Blätter, der Morphotyp 4 breite, ungefiederte, Anthocyan-gefärbte Blätter und der Morphotyp 5 breite, ungefiederte, grüne Blätter aufweist, läßt sich anhand der Southern Blots nachweisen, daß alle diese Morphotypen zur etwa gleichen Zeit im Zellzyklus transformiert wurden und jeweils eine Insertion der rol-Gene im niedrigen bis mittleren Molekulargewichtsbereich der Restriktionsfragmente zeigen. Daraus kann gefolgert werden, daß für die Ausprägung eines definierten Morphotyps nicht nur ein gewisser Molekulargewichtsbereich der Restriktionsfragmente notwendig ist, sondern ein expliziter Locus im Karottengenom, in den die Insertion der rol-Gene erfolgt sein sollte.



Ähnlich verhält es sich mit dem Auftreten des Morphotyps 6, allerdings scheint in diesem Fall die gemeinsame Insertion von rolB und rolC im gleichen Molekulargewichtsbereich der Restriktionsfragmente wichtig zu sein.

Wie bereits angesprochen, ist die Kombination von rol-Genen wesentlich potenter in der Ausbildung eines bestimmten Phänotyps als das alleinige Auftreten eines rol-Gens (SCHMÜLLING et al., 1989, SPENA et al., 1987). Da sowohl rolB als auch rolC einen Einfluß auf den Phytohormonmetabolismus der Karottenpflanze ausüben sollten, der sich auch in der morphologische Ausprägung dieses Morphotyps zeigt, bestünde die Möglichkeit, daß gerade in den angesprochenen Molekulargewichtsbereichen der Restriktionsfragmente Auxin- oder Cytokininstoffwechsel-codierende Gene lokalisiert sein könnten, bei denen es durch die Insertion zu einer verstärkten Transkription kommen könnte.

Der Morphotyp 1, der vorwiegend in Transformationen mit längerer Cokulturdauer auftritt, ist durch eine normale, morphologische Ausprägung gekennzeichnet. Da der Einbau der rol-Gene vor allem in einem mittleren Molekulargewichtsbereich der Restriktionsfragmente erfolgte, könnte dieser durch die Transkription anderer Replikationsstartpunkte im weiteren Verlauf des Zellzyklus bzw. im Eintritt in weitere Zellzyklen begründet sein. Denkbar sind ebenfalls Umstrukturierungen in der bereits transformierten, flankierenden Karotten-DNS in den folgenden Zellzyklen oder durch erneute Insertion der Fremd-DNS in das Pflanzengenom. Offensichtlich hat hier die Insertion keinen Einfluß auf die Morphologie, weil entweder keine codierenden Sequenzen durch die Transformation in Mitleidenschaft gezogen wurden oder in diesen Bereichen ausgeprägte „Silencing“-Mechanismen zum Zuge kamen.

Es bleibt zu klären, warum und inwieweit die verwendeten rol-Gene zu bestimmten Zeitpunkten des Zellzyklus in spezifische DNS-Regionen der Pflanzen-DNS inseriert wurden. Die Betrachtung der Southern Blots zeigt die Tendenz auf, daß in gewisser Weise bestimmte Molekulargewichtsbereiche der Insertionsloci für die Ausbildung eines Morphotyps verantwortlich sein können, daß aber in erster Linie die Replikationsstartstellen, die im Verlauf des Zellzyklus abgelesen werden, für die Ausprägung der Pflanze von Wichtigkeit sind.

Abschließend kann festgestellt werden, daß zwar mit der Zellzyklussynchronisation und anschließender Transformation aufgrund der unterschiedlichsten Faktoren keine direkte

Steuerung der Insertion von Fremd-Genen erreicht werden konnte, daß diese Methode jedoch Anlaß für die Hypothese bietet, daß innerhalb des Zellzyklus bestimmte Loci für Fremd-Gen-Integrationen präferentiell genutzt werden können.

## 6. Zusammenfassung

1. Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin festzustellen, ob über eine Synchronisierung des Zellzyklus eine gerichtete Insertion von Fremd-DNS-Sequenzen in ein Empfängergenom (hier *Daucus carota*) mithilfe von *Agrobacterium tumefaciens* nachweisbar ist. Da eine Insertion auch außerhalb der DNS-Synthese-Phase vorstellbar ist, soll der Einfluß verschiedener Transformationszeitpunkte im Verlauf des Zellzyklus (in Stunden nach dessen erneuter Anregung mit Thymidin angegeben) auf den Einbau der Fremd-DNS geklärt werden. Durch die Verwendung eines Plasmid-Konstrukts unter der Kontrolle der eigenen Promotoren, das eine Kombination von rol-Genen (rolABC) beinhaltet, soll ein morphologischer Marker geschaffen werden, der eine frühe visuelle Selektion und Bonitur der durch die Transformation bedingten Veränderungen der Phytomorphologie erlaubt.
2. Die Synchronisierung des Zellzyklus (durchgeführt mit FdU und Thymidin) erreicht im Durchschnitt eine Rate von ca. 60% der Zellen.
3. Abhängig von der Dauer der Cokulturzeit der *Daucus*-Suspensionen mit *Agrobacterium tumefaciens*, d.h. 4 Stunden bei der Transformation I, 8 Stunden bei der Transformation II, 48 Stunden bei der Transformation III, können Unterschiede in der Embryonalentwicklung festgestellt werden: Bei der Transformation I (4 h Cokultur) kann nur zum Transformationszeitpunkt T(6) eine vollständige Embryonalentwicklung beobachtet werden. Zu allen anderen Transformationszeitpunkten arretiert die Entwicklung im Torpedo-Stadium. Eine Kokosnußmilch-Applikation kann lediglich bei einigen Suspensionen der Transformationszeitpunkte T(0), T(0,5), T(1,5), T(2) und T(4) sowie der unsynchronisierten, transformierten Kontrolle T(K) eine Weiterentwicklung induzieren. Zu den Transformationszeitpunkten T(1) und T(3) bilden sich keine Pflanzen aus.  
Die Embryonalstadien der Transformation II (8 h Cokultur) werden rasch und vollständig zu allen Transformationszeitpunkten durchlaufen.  
Auch bei allen Suspensionen der Transformation III (48 h Cokultur) erfolgt eine vollständige, wenn auch verzögerte Embryonalentwicklung.

4. Die Bonitur der transgenen Pflanzen erfolgt nach einem morphologischen Bonitierungs-Schema, in dem sechs sog. „Morphotypen“ unterschieden werden. Diese sind wie folgt charakterisiert:
  - Morphotyp 1: Die Morphologie entspricht einer normalen, untransformierten Karottenpflanze mit Kotyledonen, Hypokotyl, Petiolen und normalem Wurzelwachstum.
  - Morphotyp 2: Ähnlich wie Morphotyp 1, jedoch mit schmalen Laubblättern und ohne Lateralwurzeln.
  - Morphotyp 3: Diese Pflanzen besitzen keine Petiolen, sondern lediglich schmale, ungefiederte Blätter. Eine Wurzelbildung kann beobachtet werden.
  - Morphotyp 4: Diese Pflanzen besitzen ebenfalls keine Kotyledonen, sondern breite, häufig durch Anthocyane gefärbte Blätter und neben Primär- auch Adventivwurzeln.
  - Morphotyp 5: Ähnlich wie Morphotyp 4 mit breiten grünen Blättern ohne Anthocyanbildung, ohne Kotyledonen und mit vermehrten Seitenwurzeln.
  - Morphotyp 6: Diese Pflanzen besitzen schmale, ungefiederte Blätter, die spiralförmig verdreht sind, und Wurzeln, weisen jedoch keine Kotyledonen auf.
  
5. Eine eindeutige Abstufung des Auftretens bestimmter Morphotypen zu definierten Transformationszeitpunkten oder abhängig von der Cokulturdauer kann nicht gegeben werden. Manche Morphotypen (Morphotyp 1, 3 und 5) treten jedoch nach einzelnen Transformationszeitpunkten häufiger auf als andere (Morphotypen 2, 4 und 6). Der Morphotyp 2 kann nur ein einziges Mal (bei der Transformation II (8 h Cokultur) zum Transformationszeitpunkt T(4)) beobachtet werden.
  
6. Die Durchführung von molekularbiologischen Methoden zum Nachweis der Insertion der rol-Gene in das Pflanzengenom (PCR) ergibt, daß die ursprüngliche rol-Gen-Kombination rolABC nicht in jeder transgenen Pflanzen *in toto* nachweisbar ist. Häufig können nur einzelne rol-Gene oder Zweier-Kombinationen nachgewiesen werden.
  
7. Bezogen auf das Auftreten der sechs Morphotypen kann jedoch nicht deduziert werden, daß eine spezifische rol-Gen-Kombination die Ausbildung eines

bestimmten Morphotyps nach sich zieht. Auch die Insertion verschiedener rol-Gen-Kombinationen führt zur gleichen morphologischen Ausprägung.

8. Bei der Betrachtung der durchgeführten Southern Blots kann nur eine tendenzielle Aussage gemacht werden. Es ist zu beobachten, daß die meisten auftretenden Banden nicht den erwarteten Restriktionsfragmenten eines bestimmten Molekulargewichtsbereiches entsprechen. Deshalb wird angenommen, daß diese Veränderungen auf Methylierung und interne Umstrukturierungen der rol-Gen-Sequenzen zurückzuführen sind. Es kann bei der Auswertung der Southern Blots keine signifikante Auswirkung der Anzahl der eingebauten rol-Gene in das Pflanzengenom auf die Morphologie festgestellt werden. Unabhängig vom Ort und der Häufigkeit des Einbaus werden gleiche Morphotypen beobachtet, eine Tendenz der Insertion in mittlere bis niedrige Molekulargewichtsbereiche der Restriktionsfragmente ist jedoch zu verzeichnen.
  
9. Abschließend kann davon ausgegangen werden, daß eine gezielte Einflußnahme auf die gerichtete Insertion von Fremd-DNS durch eine Zellzyklussynchronisierung nicht in vollem Maße möglich ist. Es muß jedoch über die Zellzyklussynchronisierung und die variable Cokulturdauer eine gewisse Steuerungsfunktion vorhanden sein, die zur Ausbildung von sechs, und nicht beliebig vielen, Pflanzenformen führt. Diese Hypothese wird bei der Betrachtung der Embryonalentwicklung insofern unterstützt, daß auch die Cokulturdauer bereits in diesen frühen Entwicklungsstadien eine noch näher zu determinierende Wirkung besitzt.

## 7. Literaturverzeichnis

Albertini, A.M., Hofer, M., Calos, M.P., and Miller, J.H. (1982): On the formation of spontaneous deletions: the importance of short sequence homologies in the generation of large deletions, *Cell*, Vol. 29, pp. 319-328

Alberts, B.M. (1985): Protein machines mediate the basic genetic processes, *Trends Genet.*, Vol. 1, pp. 26-30

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. (1994): *Molecular Biology of the Cell*, Third Edition, Garland Publishers, New York & London

Allen, G.C., Hall, G.E.Jr., Childs, L.C., Weissinger, A.K., Spiker, S., Thompson, W.F. (1993): Scaffold attachment regions increase reporter gene expression in stably transformed plant cells, *Plant Cell*, Vol. 5, pp. 603-613

Altabella, T., Angel, E. et al. (1995): Effect of the rol genes from *Agrobacterium rhizogenes* on polyamine metabolism in tobacco roots, *Physiologia Plantarum* 95, pp. 479-485

Altamura, M.M., Archiletti, T., Capone, I., and Costantino, P. (1991): Histological analysis of the expression of *Agrobacterium rhizogenes* rolB-GUS gene fusions in transgenic tobacco, *New Phytol.*, Vol. 118, pp. 69-78

Altheim, B.A., and Schultz, M.C. (1998): Metaphase activation of replication-independent chromatin assembly in budding yeast, *Yeast Genetics and Molecular Biology*, Abstracts

Ambros, P.F., Matzke, A.J.M. and Matzke, M.A. (1986): Localization of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in plant chromosomes by in situ hybridization, *The EMBO Journal*, Vol. 5, No. 9, pp. 2073-2077

Amiel, A., Litmanovitch, T., Lishner, M., Mor, A., Gaber, E., Tangi, I., Fejgin, M., and Avivi, L. (1998): Temporal differences in replication timing of homologous loci in malignant cells derived from CML and lymphoma patients, *Genes Chromosomes Cancer*, Vol. 22 (3), pp. 225-231

Amselem, J., and Tepfer, M. (1992): Molecular basis for novel root phenotypes induced by *Agrobacterium rhizogenes* A4 on cucumber, *Plant Mol. Biol.*, Vol. 19, pp. 421-432

Anderson, R.A., and Eliason, S.L. (1986): Recombination of homologous DNA fragments transfected into mammalian cells occurs predominantly by terminal pairing, *Mol. Cell Biol.*, Vol. 6, pp. 3246-3252

Anderson, R.A., Kato, S., and Camerini-Oterno, R.D. (1984): A pattern of partially homologous recombination in mouse L cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 81, pp. 206-210

Aniello, F., Locascio, A., Fucci, L., Geraci, G., and Branno, M. (1996): Isolation of cDNA clones encoding DNA methyltransferase of sea urchin *P. lividus*: expression during embryo development, *Gene*, Vol. 178, pp. 57-61

Arnholdt-Schmitt, B. (1993a): Hormonsensitivität und genomische DNS-Variabilität in ihrem Bezug zur Ertragsbildung bei *Daucus carota L. ssp. Sativus*, Ein Beitrag zur Zellbiologie pflanzlichen Wachstums, Habilitationsschrift, Giessen

Arnholdt-Schmitt, B. (1993b): Rapid changes in amplification and methylation pattern of genomic DNA in cultured carrot root explants (*Daucus carota L.*), *Theor.Appl.Genet.*, Vol. 85, pp. 793-800

Arnholdt-Schmitt, B. (1995): Physiological aspects of genomic variability in tissue culture. II. Growth phase-dependent quantitative variability of repetitive BstNI fragments primary cultures of *Daucus carota L.*, *Theor.Appl.Genet.*, Vol. 91, pp. 816-823

Arnholdt-Schmitt, B., Herterich, S., and Neumann, K.-H. (1995): Physiological aspects of genomic variability in tissue culture. I. Growth phase-dependent differential DNA methylation of the carrot genome (*Daucus carota L.*) during primary culture, *Theor.Appl.Genet.*, Vol. 91, pp. 809-815

Backs-Hüsemann, D. und Reinert, J. (1970): Embryobildung durch isolierte Einzelzellen aus Gewebekultur von *Daucus carota*, *Protoplasma*, Vol. 70, pp. 49-60

Barlow, P.W., and Sherman, M.I. (1972): The biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: Studies on polyploidy, *J.Embryol.Exptl.Morphol.*, Vol.27, pp. 447-465

Bayliss, M.W., and Gould, A.R. (1974): Studies on the growth in culture of plant cells. 18. Nuclear cytology of *Acer pseudoplatanus* suspension cultures, *J.Exptl.Bot.*, Vol. 25, pp. 772-783

Beermann, W. (1962): Riesenchromosomen, *Protoplasmatologia VI/D*, Springer Verlag, Wien

Belyaev, N.D., Houben, A., Baranczewski, P., and Schubert, I. (1997): Histone H4 acetylation in plant heterochromatin is altered during the cell cycle, *Chromosoma*, Vol. 106(3), pp. 193-197

Bennetzen, J.L. (1996): The contributions of retroelements to plant genome organization, function and evolution, *Trends Microbiol.*, Vol. 4, pp. 347-353

Bernacchia, G., Primo, A., Giorgetti, L., Pitto, L., and Cella, R. (1998): Carrot DNA-methyltransferase is encoded by two classes of genes with differing patterns of expression, *Plant Journal*, Vol. 13 (3), pp. 317-329

Bestor, T.H. (1992): Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain, *The EMBO Journal*, Vol. 11, pp. 2611-2617

Bestor, T.H., and Tycko, B. (1996): Creation of genomic methylation patterns, *Nat. Genet.*, Vol. 12, pp. 380-389

Bevan, M., and Northcote, D.H. (1979): The loss of morphogenetic potential and induction of phenylalanine ammonia-lyase in suspension cultures of *Phaseolus vulgaris*, *J.Cell Sci.*, Vol. 39, pp. 339-353

Bianchi, M.E., and Radding, C.M. (1983): Insertions, deletions and mismatches in heteroduplex DNA made by RecA protein, *Cell*, Vol. 35, pp. 511-520

Bier, K. (1959): Quantitative Untersuchungen über die Variabilität der Nährzellkernstruktur und ihre Beeinflussung durch die Temperatur, *Chromosoma*, Vol. 10, pp. 619-653



Billen, D. (1968): Methylation of the bacterial chromosome: an event at the replication point, *J. Mol. Biol.*, Vol. 31, pp. 477-486

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acid Res.*, Vol. 7, pp. 1513ff.

Blaschke, J.R., Forche, E., and Neumann, K.-H. (1978): Investigations on the cell cycle of haploid and diploid tissue cultures of *Datura innoxia* Mill. and its synchronisation, *Planta*, Vol. 144, pp. 7-12

Blumenfeld, M., and Forrest, H.S. (1972): Differential under-replication of satellite DNAs during *Drosophila* development, *Nature New Biol.*, Vol. 239, pp. 170-172

Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D., Lacoux, J., Fliniaux, M., and Jacquin-Dubreuil, A. (2000): Tropane alkaloid production ba hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing rol A, B, C genes only, *J. Biotechnol.*, Vol. 81(2-3), pp. 151-158

Bonifer, C., Hecht, A., Saueressig, H., Winter, D.M., Sippel, A.E. (1991): Dynamic chromatin: the regulatory domain organization of eukaryotic gene loci, *J. Cell Biochem.*, Vol. 47, pp. 99-108

Bonifer, C., Vidal, M., Grosveld, F., Sippel, A.E. (1990): Tissue-specific and position-independent expression of the complete gene domain for chicken lysozyme in transgenic mice, *The EMBO Journal*, Vol. 9, pp. 2843-2848

Boyer, H.W., and Roulland-Dussoix, D. (1969): A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *E. coli*, *J. Mol. Biol.*, Vol. 41, pp. 459-472

Breyne, P., Gheysen, G., Jacobs, A., Van Montagu, M., and Depicker, A. (1992a): Effect of T-DNA configuration on transgene expression, *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 236, pp. 389-396

Breyne, P., Van Montagu, M., Depicker, A., and Gheysen, G. (1992b): Characterisation of a plant scaffold attachment region in a DNA fragment that normalizes transgene expression in tobacco, *The Plant Cell*, Vol. 4, pp. 463-471

Britten, R.J., and Davidson, E.H. (1969): Gene regulation for higher cells: A theory, *Science*, Vol. 165, pp. 349-357

Brooks, A.L., Griffith, W.C., Johnson, N.F., Finch, G.L., and Cuddihy, R.G. (1989): The induction of chromosome damage in CHO cells by beryllium and radiation given alone and in combination, *Radiat.Res.*, Vol. 120 (3), pp. 494-507

Brown, D.D., and Blackler, A.W. (1972): Gene amplification proceeds by a chromosome copy mechanism, *J.Mol.Biol.*, Vol. 63, pp. 75-84

Brown, D.D., and Dawid, I. (1968): Specific gene amplification in oocytes, *Science*, Vol. 160, pp. 272-280

Brown, P.H., and Ho, T.H. (1987): Biochemical properties and hormonal regulation of barley nuclease, *Eur.J.Biochem.*, Vol. 168(2), pp. 357-364

Brown, S.W. (1966): Heterochromatin, *Science*, Vol. 151, pp. 417-425

Burn, J.E., Bagnall, D.J., Metzger, J.D., Dennis, E.S., and Peacock, W.J. (1993): DNA methylation, vernalization and the initiation of flowering, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 90, pp. 287-291

Butcher, D.N., Sogoke, A.K., and Tommerup, I.C. (1975): Changes in ploidy and nuclear DNA levels in cells from normal, crown-gall and habituated cultures of *Helianthus annuus* L., *Protoplasma*, Vol. 86, pp. 295-308

Buzek, J., Ebert, I., Ruffini-Castiglione, M., Siroky, J., Vyskot, B., and Greilhuber, J. (1998a): Structure and DNA methylation pattern of partially heterochromatinised endosperm nuclei in *Gagea lutea* (*Liliaceae*), *Planta*, Vol. 204(4), pp. 506-514

Buzek, J., Riha, K., Siroky, J., Ebert, I., Greilhuber, J., and Vyskot, B. (1998b): Histone H4 underacetylation in plant facultative heterochromatin, *Biol.Chem.*, Vol. 379(10), pp. 1235-1241

Byfield, J.E. (1972): Are the genes controlling cytokinesis late replicating and located on the X chromosome ? *Rev.Europ.Etud.Clin.Biol.*, Vol. 17, pp. 14-19

Camilleri, C., and Jouanin, L. (1991): The TR-DNA region carrying the auxin synthesis genes of the *Agrobacterium rhizogenes* agropine-type plasmid pRiA4: nucleotide sequence analysis and introduction into tobacco plants, *Mol.Plant Microbe Intract.*, Vol. 4(2), pp. 155-162

Capone, I., Spano, L., Cardarelli, M. et al. (1989): Induction and growth properties of carrot roots with different complements of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA, *Plant Mol. Biol.*, Vol. 13, pp. 385-391

Cardarelli, M., Mariotti, D., Pomponi, M., Spanó, L., Capone, I., and Costantino, P. (1987): *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype, *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 209, pp. 475-480

Cardarelli, M., Spanó, L., De Paolis, A., Mauro, M.L., Vitali, G., and Costantino, P. (1985): Identification of the genetic locus responsible for non-polar root induction by *Agrobacterium rhizogenes* 1855, *Plant Mol. Biol.*, Vol. 5, pp. 385-391

Carmo-Fonseca, M., Cunha, C., Custodio, N., Carvalho, C., Jordan, P., Ferreira, J., and Parreira, L. (1996): The topography of chromosomes and genes in the nucleus, *Exp. Cell Res.*, Vol. 229 (2), pp. 247-252

Castle, L.A., Errampelli, D., Atherton, T.L., Franzmann, L.H., Yoon, E.S., and Meinke, D.W. (1993): Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in *Arabidopsis*, *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 241, pp. 504-514

Cavalier-Smith, T. (1985): Genetic and epigenetic control of the plant cell cycle. In: Bryant, J.A., and Francis, D. (eds.): *The cell division cycle in plants*, Seminar Series – Society for Exp. Botany, Cambridge University Press, Cambridge, Vol. 26, pp. 179-197

Chase, J.W., and Williams, K.R. (1986): Single stranded DNA binding proteins required for DNA replication, *Annu.Rev.Biochem.*, Vol. 55, pp. 103-136

Cheng, L.A., Collyer, T., and Hardy, C.F.J. (1999): Cell cycle regulation of DNA replication initiator factor Dbf4p, *Mol.Cell.Biol.*, Vol. 19(6), pp. 4270-4278

Cheng, X.D., Kumar, S., Posfai, J., Pflugrath, J.W., and Roberts, R.J. (1993): Crystal structure of the HhaI DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine, *Cell*, Vol. 74, pp. 299-307

Chevalier, S., and Chevalier, N. (1997): How is a cycle of DNA replication initiated in eukaryotes?, *Medicine Science*, Vol. 13 (11), pp. AR1-AR8

Church, G., and Gilbert, W. (1984): Genomic sequencing, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, Vol. 81, pp. 991-995

Collin, H.A., and Edwards, S. (1998): *Plant Cell Culture*, BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford

Cooke, D. E., and Webb, K. J. (1997): Stability of CaMV 35S-GUS genes expression in (Bird's foot trefoil) hairy root cultures under different growth conditions, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 47, pp. 163-168

Costantino, P., Capone, I., Cardarelli, M., De Poalis, A., Mauro, M.L., and Trovato, M. (1994): Bacterial plant oncogenes: the rol genes' saga, *Genetica*, Vol. 94, pp. 203-211

Craig, J.M., and Bickmore, W.A. (1993): Chromosome bands – flavours to savours, *Bioessays*, Vol. 15, pp. 349-354

Crippa, M., and Tocchini-Valentini, G.P. (1971): Synthesis of amplified DNA that codes for rRNA, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, Vol. 68, pp. 2769-2773

Czeika, G. (1956): Strukturänderungen endopolyploider Ruhekerne in Zusammenhang mit wechselnder Bündelung der Tochterchromosomen und karyologisch-anatomische Untersuchungen an Sukkulente, *Österr. Bot.Z.*, Vol. 103, pp. 536-566

D'Amato, F. (1964): Endopolyploidy as a factor in plant tissue development, *Caryologia*, Vol. 17, pp. 41-52

Das, O.P., Levi-Minzi, S., Koury, M., Benner, M., and Messing, J. (1990): A somatic gene rearrangement contributing to genetic diversity in maize, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 87, pp. 7809-7813

De Block, M., and De Brouwer, D. (1991): Two T-DNAs co-transformed into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium tumefaciens* infection are mainly integrated at the same locus, *Theor.Appl.Gen.*, Vol. 82, pp. 257-263

De Block, M., Herrera-Estrella, L., Van Montagu, M., Schell, J., and Zambryski, P. (1984): Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny, *The EMBO Journal*, Vol. 3, No.8, pp. 1681-1689

De Cleene, M., and De Ley, J. (1976): The host range of crown-gall, *Bot. Rev.*, Vol. 42, pp. 389-466

De Neve, M., De Buck, S., Jacobs, A., Van Montagu, M., and Depicker, A. (1997): T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from ligation of separate T-DNAs, *The Plant Journal*, Vol. 11, pp. 15-29

Dehio, C., Grossmann, K. Schell, J., and Schmülling, T. (1993): Phenotype and hormonal status of transgenic tobacco plants overexpressing the rolA gene of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA, *Plant Mol. Biol.*, Vol. 23, pp. 1199-1210

Dennis, E.S., Finnegan, E.J., Bilodeau, P., Chaudhury, A., Genger, R. et al. (1996): Vernalization and the initiation of flowering, *Sem. Cell Dev. Biol.*, Vol. 7, pp. 441-448

Depicker, A., Herman, L., Jacobs, A., Schell, J., and Van Montagu, M. (1985): Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNAs and their relevance to the *Agrobacterium/plant cell* interaction, *Mol.Gen.Genet.*, Vol. 201, pp. 477-484

Deroles, S.C., and Gardner, R.C. (1988): Analysis of the T-DNA structure in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation, *Plant Mol. Biol.*, Vol. 11, pp. 365-377

Dressler, D., and Potter, H. (1982): Molecular mechanism in genetic recombination, *Annu. Rev. Biochem.*, Vol. 51, pp. 727-761

Drumm, A., and Nagl, W. (1982): Loss of DNA and euchromatic senescing leaf cells of *Allium*, *Mech.Ageing Dev.*, Vol. 28(2), pp. 103-110

Dubois, T., Tuedrira, M., Dubois, J. and Vasseur, J. (1991): Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*: a histological and SEM study of early stages, *Protoplasma*, Vol. 162, pp. 120-127

Dührssen, E., Lanzendorfer, M., and Neumann, K.-H. (1984): Comparative Investigations on DNA Organization of Some Varieties of *Daucus carota* L., *Z.Pflanzenphysiol.*, Vol. 113, pp. 223-229

Dührssen, E., and Neumann, K.-H. (1980): Characterization of Satellite-DNA of *Daucus carota* L., *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, Vol. 100 (5), pp. 447-454

Elkind, Y., Nir, B., and Nadler-Hassar, T. (1995): Quantitative analysis of the transgene variability among primary tobacco transformants, *Transgenic Research*, Vol. 4, pp. 30-38

Elliston, K., and Messing, J. (1988): The molecular architecture of plant genes: A phylogenetic perspective. In: Kahl, G. (ed.): *The Architecture of Eukaryotic Genes*, Verlag Chemie, Weinheim

Estruch, J.J., Chriqui, D., Grossmann, K., Schell, J., and Spena, A. (1991a): The plant oncogene rolC is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates, *The EMBO Journal*, Vol. 10, pp. 2889-2895

Estruch, J.J., Schell, J., and Spena, A. (1991b): The protein encoded by the rolB plant oncogene hydrolyses indole glucoside, *The EMBO Journal*, Vol. 10, pp. 3125-3128

Estruch, J.J., Parets-Soler, A., Schmülling, T., and Spena, A. (1991c): Cytosolic localisation in transgenic plants of the rolC peptide from *Agrobacterium rhizogenes*, *Plant Mol. Biol.*, Vol. 17, pp. 547-550

Evans, D.A., Sharp, W.R., and Medina-Filho, H.P. (1984): Somaclonal and gametoclonal variation, *Am. J. Bot.*, Vol. 71, pp. 759-774

Faul, T., Staib, C., Nanda, I., Schmid, M., and Grummt, F. (1999): Identification and characterization of mouse homologue to yeast *Cdc7* protein and chromosomal localization of the cognate mouse gene *Cdc71*, *Chromosoma*, Vol. 108, pp. 26-31

Feldmann, K.A. (1992): T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: seed infection/transformation. In: Koncz, C., Chua, N.H., and Schell, J. (eds.): *Methods in Arabidopsis Research*, World Scientific, Singapore, pp. 274-289

Filippini, F., Lo Schiavo, F., Terzi, M., Costantino, P., and Trovato, M. (1994): The plant oncogene *rolB* alters binding of auxin to plant membranes, *Plant Cell Physiology*, Vol. 35, pp. 767-771

Finnegan, E.J., Brettell, R.I.S., and Dennis, E.S. (1993): The role of DNA methylation in the regulation of plant gene expression. In: Jost, J.-P., and Saluz, H.P. (eds.): *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 218-261

Finnegan, E.J., and Dennis, E.S. (1993): Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*, *Nucleic Acid Res.*, Vol. 21, pp. 2383-2388

Finnegan, E.J., Genger, R.K., Peacock, W.J., and Dennis, E.S. (1998): DNA methylation in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, Vol. 49, pp. 223-247

Finnegan, E.J., Peacock, W.J., and Dennis, E.S. (1996): Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 93, pp. 8449-8454

Fladung, M., Ballvora, A., and Schmülling, T. (1993): Constitutive or light-regulated expression of the *rol C* gene in transgenic potato plants has different effects on yield attributes and tuber carbohydrate composition, *Plant Mol. Biol.* 23, pp.749-757

Flavell, R.B., Bennett, M.D., Smith, J.B., Smith, D.B. (1974): Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants, *Biochem.Genet.*, Vol. 12, pp. 257-269

Fosket, D. E. (1997): *Plant Growth and Development – A Molecular Approach*, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto

Fox, D.P. (1970): A non-doubling DNA series in somatic tissues of the locusts *Schistocerca gregaria* (FORSKAL) and *Locusta migratoria* (LINN), *Chromosoma*, Vol. 29, pp. 448-461

Fox, D.P. (1971): The replicative status of heterochromatic and euchromatic DNA in two somatic tissues of *Dermestes maculatus* (Dermestidae, Coleoptera), *Chromosoma*, Vol. 33, pp. 183-195

Frank, M.J., Liu, D., Tsay, Y.F., Ustach, C., and Crawford, N.M. (1997): Tag1 is an autonomous transposable element that shows somatic excision in both *Arabidopsis* and tobacco, *Plant Cell*, Vol. 9(19), pp. 1745-1756

Froese, C. (1993): *Der Einfluß von Kinetin auf Wachstum, Zelldifferenzierung und Proteinsynthesemuster bei zellzyklussynchronisierten Suspensionskulturen der Karotte (Daucus carota L.)*, Dissertation, Gießen

Gall, J.G. (1973): Repetitive DNA in *Drosophila*. In: Hamkalo, B.A., and Papaconstantinou, J. (eds.): *Molecular Cytogenetics*, Plenum Publ. Comp., New York, pp. 59-74

Gall, J.G., and Pardue, M.I. (1971): Nucleic acid hybridization in cytological preparations, *Meth.Enzymol.*, Vol. 21D, pp. 470-480

Gamborg, O.L., Miller, R.A., and Ojima, K. (1968): Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cultures, *Expl. Cell Res.*, Vol. 50, pp. 151-158

Ganal, M., Lapitan, N., and Tanksley, S.D. (1988): A molecular and cytogenetic survey of major repeated DNA sequences in tomato (*Lycopersicon esculentum*), *Mol.Gen.Genet.*, Vol. 213, pp. 262-268



Gartler, S.M., Goldstein, L., Tyler-Freer, S.E., and Hansen, R.S. (1999): The timing of XIST replication: dominance of the domain, *Hum.Mol.Genet.*, Vol. 8 (6), pp. 1085-1089

Gaudin, V., Vrain, T., and Jouanin, L. (1994): Bacterial genes modifying hormonal balances in plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol. 32, pp. 11-29

Gheysen, G., Angenon, G., and Van Montagu, M. (1998): *Agrobacterium*-mediated Plant Transformation: a Scientifically Intriguing Story with Significant Applications, *Transgenic Plant Research*, pp. 1-31

Gheysen, G., Herman, L. Breyne, P. Van Montagu, M., and Depicker, A. (1990): Cloning and sequence analysis of truncated T-DNA inserts from *Nicotiana tabacum*, *Gene*, Vol. 94, pp. 155-163

Gheysen, G., Van Montagu, M., and Zambryski, P. (1987): Integration of *Agrobacterium tumefaciens* transfer DNA (T-DNA) involves rearrangements of target plant DNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 84, pp. 6169-6173

Gheysen, G., Villarroel, R., and Van Montagu, M. (1991): Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration, *Genes and Development*, Vol. 5, pp. 287-297

Glick, B.R. und Pasternak, J.J. (1995): *Molekulare Biotechnologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Goldsborough, A., and Bevan, M. (1991): New patterns of gene activity in plants detected using an *Agrobacterium* vector, *Plant Mol. Biol.* Vol. 16, pp. 263-269

Gould, A.R. (1984): Control of the cell cycle in cultured plant cells, *Crit. Rev. Plant. Sci.*, Vol.1 (4), pp. 315-344

Grevelding, C., Fantes, V., Kemper, E., Schell, J., and Masterson, R. (1993): Single-copy T-DNA insertions in *Arabidopsis* are the predominant form of integration in root-derived transgenics, whereas multiple insertions are found in leaf-disks, *Plant Mol. Biol.*, Vol. 23, pp. 847-860

Grieb, B. (1991/2): Untersuchungen zur Induktion der Kompetenz zur somatischen Embryogenese in Karottenpetiolenexplantaten (*Daucus carota* L.) – Histologie und Proteinsynthesemuster, Mauraun Verlag, Frankfurt/Main

Grierson, D., and Covey, S. (1988): Plant Molecular Biology, Blackie, Glasgow and London, 2<sup>nd</sup> Edition

Gruenbaum, Y., Naveh-Many, T., Cedar, H., and Razin, A. (1981): Sequence specificity of methylation in higher plant DNA, *Nature*, Vol. 292, pp. 860-862

Guilley, H., Dudley, R.K., Jonard, G., Balazs, E., and Richards, K.B. (1982): Transcription of cauliflower mosaic virus DNA; Detection of promoter sequences and characterization of transcripts, *Cell*, Vol. 30, pp. 763-773

Guivarch, A., Carneiro, M., Vilaine, F. et al. (1996): Tissue-specific expression of the rolA gene mediates morphological changes in transgenic tobacco, *Plant Mol. Biol.* 30, pp. 125-134

Gurdon, J.B., and Melton, A.D. (1981): Gene Transfer in Amphibian Eggs and Oocytes, *Annu.Rev.Genet.*, Vol. 15, pp. 189-218

Guzzo, F., Baldan, B., Mariani, P., Loschiavo, F., and Terzi, M. (1994): Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L., *J. Exp. Bot.*, Vol. 45, pp. 1427-1432

Hansen, G., Das, A., and Chilton, M.D. (1994): Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, Vol. 91(16), pp. 7603-7607

Harbers, E. (1964): Die Nucleinsäuren, Thieme-Verlag, Stuttgart

Hayashi, H., Czaja, I., Lubenow, H., Schell, J., and Walden, R. (1992): Activation of a plant gene by T-DNA tagging: auxin-independent growth in vitro, *Science*, Vol. 258, pp. 1350-1353

Heitz, E. (1929): Heterochromatin, Chromozentren, Chromomeren, *Ber.Deutsch.Bot.Ges.*, Vol. 47, pp. 274-284

Hemleben, V. (1990): Molekularbiologie der Pflanzen, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Hennig, W. (1972): Highly repetitive DNA sequences in the genome of *Drosophila hydei*. I. Preferential localisation in the X chromosome heterochromatin, J.Mol.Biol., Vol. 71, pp. 407-417

Herman, L., Jacobs, A., Van Montagu, M., and Depicker, A. (1990): Plant chromosome/ marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integration events, Mol. Gen. Genet., Vol. 224, pp. 248-256

Herrera-Estrella, A., Chen, Z., Van Montagu, M., and Wang, K. (1988): VirD proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are required for the formation of a covalent DNA-protein complex at the 5'-terminus of T-strand molecules, The EMBO Journal, Vol. 7, pp. 4055-4062

Herrera-Estrella, A., Van Montagu, M., and Wang, K. (1990): A bacterial peptide acting as a plant nuclear targeting signal: the amino-terminal portion of *Agrobacterium* VirD2 protein directs a  $\beta$ -galactosidase fusion protein into tobacco nuclei, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, Vol. 87, pp. 9534-9537

Hesse, M. (1970): Cytologische Untersuchungen an Nematodengallen, Österr.Bot.Z., Vol. 118, pp. 517-541

Hiei, Y., Komari, T., and Kubo, T. (1997): Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, Plant Mol.Biol., Vol. 35(1-2), pp. 205-218

Hobbs, S.L.A., Kpodar, P., and DeLong, M.O.C. (1990): The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants, Plant Mol. Biol., Vol. 15, pp. 851-864

Hohn, B. (1992): Exploration of *Agrobacterium tumefaciens*. In: Russo, E. (ed.): Molecular Genetics of Differentiation, Springer Verlag, Berlin

Holefors, A., Xue, Z.-T., and Welander, M. (1998): Transformation of the apple rootstock M26 with the rolA gene and its influence on growth, Plant Science, Vol. 136, pp. 69-78

Hooykaas, P.J.J., and Schilperoort, R.A. (1992): *Agrobacterium* and plant genetic engineering, *Plant Mol.Biol.*, Vol. 19, pp. 15-38

Imani, J. (1999): In Situ- Nachweis der Auxinverteilung in kultivierten Petiolenexplantaten von transgenen Karottenpflanzen während der Induktion der somatischen Embryogenese bei *Daucus carota* L., Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen

Ingle, J., Pearson, G.G., and Sinclair, J. (1973): Species distribution and properties of nuclear satellite DNA in higher plants, *Nat.New.Biol.*, Vol. 242, pp. 193-197

Ingle, J., and Timmis, J.N. (1975): A role for differential replication of DNA in development. In: Markham, R. et al. (eds.): *Modification of the Information Content of Plant Cells*, North Holland /Amer. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, pp. 37-52

Jackson, D.A., Dickinson, P., and Cook, P.R. (1990): The size of chromatin loops in HeLa cells, *The EMBO Journal*, Vol. 9(2), pp. 567-571

Jackson, R.W., Athanassopoulos, E., Tsiamis, G., Mansfield, J.W., Sesma, A., Arnold, D.L., Gibbon, M.J., Murillo, J., Taylor, J.D., and Vivian, A. (1999): Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola*, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, Vol. 96(19), pp. 10875-10880

Jefferson, R.A. (1987): Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system, *Plant Mol.Biol.Rep.*, Vol. 5, pp. 387-405

Jenns, S.M., and Bryant, J.A. (1978): Correlation between desoxyribonuclease activity and DNA replication in the embryogenic axes of germinating peas (*Pisum sativum* L.), *Planta*, Vol. 138, pp. 99-103

Jonsen, J.D.G., Gilbert, D.E., Grady, K.L., and Jorgensen, R.A. (1987): T-DNA structure and gene expression in petunia plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives, *Mol.Gen.Genet.*, Vol. 207, pp. 478-485

Joos, H., Inzé, D., Caplan, A., Sormann, M., Van Montagu, M., and Schell, J. (1983): Genetic analysis of T-DNA transcripts in nopaline crown galls, *Cell*, Vol. 32, pp. 1057-1067

Jorgensen, R. (1990): Altered gene expression in plants due to trans-interactions between homologous genes, *Trends Biotech.*, Vol. 8, pp. 340-344

Jorgensen, R., Snyder, C., and Jones, J.D.G. (1987): T-DNA is organized predominantly in inverted repeat structures in plants transformed with *Agrobacterium tumefaciens* C58 derivatives, *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 207, pp. 471-477

Jost, J.-P., and Saluz, H.P. (eds.) (1993): DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

Kaendler, C., Fladung, M., and Uhrig, H. (1996): Production and identification of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *S. papita* by using the rolC gene as a morphological selectable marker, *Theor. Appl. Genet.* 92, pp. 455-462

Kakutani, T., Jeddloh, J., and Richards, E.J. (1995): Characterization of an *Arabidopsis thaliana* DNA hypomethylation mutant, *Nucleic Acid Res.*, Vol. 23, pp. 130-137

Karp, A., and Bright, S.W.J. (1985): On the causes and origins of somaclonal variation. In: Mifflin, B.J. (ed.): Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology, Vol. 2, Oxford University Press, pp. 199-234

Kato, H., and Takeuchi, M. (1963): Morphogenesis in vitro starting from single cells of carrot root, *Plant Cell Physiol.*, Vol. 4, pp. 243-245

Kibler, R. (1978): Untersuchungen zum Einfluß des Ploidieniveaus auf Wachstum, Differenzierung und Alkaloidsyntheseleistungen von *Datura innoxia* Zellsuspensionskulturen, Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen

Kimura, H., Ishihara, G., and Tajima, S. (1996): Isolation and expression of *Xenopus laevis* DNA methyltransferase cDNA, *J. Biochem.*, Vol. 120, pp. 1182-1189

Kleinig, H. und Sitte, P. (1986): Zellbiologie, Fischer-Verlag, Stuttgart

Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R.J., and Cheng, X.D. (1994): HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix, *Cell*, Vol. 76, pp. 357-369

Kloeckener-Gruissem, B., and Freeling, M. (1995): Transposon-induced promoter scrambling: a mechanism for the evolution of new alleles, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, Vol. 92(6), pp. 1836-1840

Konar, R.N., Thomas, E., and Strett, H.E. (1972): Origin and structure of embryoids arising from epidermal cells of the stem *Ranunculus scleratus* L., *Cell Sci.*, Vol. 11, pp. 77-93

Koncz, C., Langridge, W.H.R., Olsson, O., Schell, J., and Szalay, A.A. (1990): Bacterial and firefly luciferase genes in transgenic plants: Advantages and disadvantages of a reporter gene, *Developmental Genetics*, Vol. 11, pp. 224-232

Koncz, C. et al. (1989): High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, Vol. 86, pp. 8467-8471

Koncz, C., Németh, K., Rédei, G.P., and Schell, J. (1992): T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*, *Plant Mol. Biol.*, Vol. 20, pp. 963-976

Koncz, C., and Schell, J. (1986): The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector, *Mol. Gen.Genet.*, Vol. 204, pp. 383-396

Körber, H., Strizhov, N., Staiger, D. et al. (1991): T-DNA gene 5 of *Agrobacterium* modulates auxin response by autoregulated synthesis of a growth hormone antagonist in plants, *The EMBO Journal*, Vol. 10, pp. 3983-3991

Kornberg, A. (1988a): DNA replication, *J.Biol.Chem.*, Vol. 263, pp. 1-4

Kornberg, A. (1988b): DNA replication, *Trends Biochem.Sci.*, Vol. 9, pp. 122-124

Kovarik, A., Koukalova, B., Holy, A., and Bezdek, M. (1994): Sequence-specific hypomethylation of the tobacco genome induced with dihydroxypropyladenine, ethionine and 5-azacytidine, *FEBS Lett.*, Vol. 353, pp. 309-311

Krikorian, A.D., Kelly, K. und Smith, D.L. (1990): Hormones in Tissue Culture and Micro-Propagation. In: Davies, P. (ed.): Plant hormones and their role in plant growth and development, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 593-602

Kurioka, Y., Suzuki, Y., Kamada, H., and Harada, H. (1992): Promotion of flowering and morphological alterations in *Atropa belladonna* transformed with CaMV 35S-rolC chimeric gene of the Ri plasmid, Plant Cell Rep., Vol. 12, pp. 1-6

Laird, C.D. (1973): DNA of *Drosophila* chromosomes, Annu.Rev.Genet., Vol. 7, pp. 177-204

Lakhotia, S.C. (1974): EM autoradiographic studies on polytene nuclei of *Drosophila melanogaster*. III. Localisation of non-replicating chromatin in the chromocentre heterochromatin, Chromosoma, Vol. 46, pp. 145-159

Lark, K. (1968): Studies on the in vivo methylation of DNA in *Escherichia coli* 15T, J.Mol. Biol., Vol. 31, pp. 389-399

Larkin, P.J., and Scrowfold, W.R. (1981): Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement, Theor. Appl. Genet., Vol. 60, pp. 197-214

Laskey, R.A., Fairman, M.P., and Blow, J.J. (1989): S phase of the cell cycle, Science, Vol. 240, pp. 609-614

Leach, F., and Aoyagi, K. (1991): Promoter analysis of the highly expressed rolC and roLD root-inducing genes of *Agrobacterium rhizogenes*: enhancer and tissue-specific DNA determinants are dissociated, Plant Sci., Vol. 79, pp. 69-76

Lepke, M., Putter, V., Staib, C., Kneissl, M., Berger, C., Hoehn, K., Nanda, I., Schmid, M., and Grummt, F. (1999): Identification, characterization and chromosomal localization of the cognate human and murine DBF4 genes, Mol.Gen.Genet., Vol. 262, pp. 220-229

Letham, D.S. (1978): Cytokinins. In: Letham, D.S., Goodwin, P.B. und Higgins, T.J.V. (eds.): Phytohormones and Related Compounds – A Comprehensive Treatise, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, Oxford, New York, S. 205 ff.

Lima-de-Faria, A., and Jaworska, H. (1968): Late DNA synthesis in heterochromatin, *Nature*, Vol. 217, pp. 138-142

Lindsey, K., Wei, W., Clarke, M.C., McArdle, H.F., Rooke, L.M., and Topping, J.F. (1993): Tagging genomic sequences that direct transgene expression by activation of a promoter trap in plants, *Transgenic Res.*, Vol. 2(1), pp. 33-47

Liu, C.N., Li, X.Q., and Gelvin, S.B. (1992): Multiple copies of *virG* enhance the transient transformation of celery, carrot and rice tissues by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Mol.Biol.*, Vol. 20(6), pp. 1071-1087

Loeb, L.A., and Kunkel, T.A. (1982): Fidelity of DNA synthesis, *Annu.Rev.Biochem.*, Vol. 51, pp. 429-457

Lopez-Girona, A., Mondesert, O., Leatherwood, J., and Russell, P. (1998): Negative regulation of Cdc18 DNA replication protein by Cdc2, *Mol.Biol.Cell*, Vol. 9 (1), pp. 63-73

LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S., Terzi, M. (1989): DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variation as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs, *Theor.Appl.Genet.*, Vol. 77, pp. 325-331

Loyter, A., Scangos, G.A., and Ruddle, F.H. (1982): Mechanisms of DNA uptake by mammalian cells: Fate of exogenously added DNA monitored by the use of fluorescent dyes, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, Vol. 79, pp. 422-426

Maessen, G.D.F. (1997): Genomic stability and stability of expression in genetically modified plants, *Acta Bot.Nederl.*, Vol. 46, pp. 3-24

Magnano, A.R., Giordano, R., Moscufo, N., Baccetti, B., and Spadafora, C. (1998): Sperm/DNA interaction: integration of foreign DNA sequences in the mouse sperm genome, *J.Reprod.Immunol.*, Vol. 41(1-2), pp. 187-196



Maheswaran, G., and Williams, E.G. (1985): Origin and development of somatic embryoids formed directly on immature embryos of *Trifolium repens* in vitro, *Ann. Bot.*, Vol. 56, pp. 619-630

Maheshwari, P. (1979): *An Introduction to the Embryology of Angiosperms*, TATA McGraw-Hill Publishing Company Ltd., New Delhi

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982): *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, 14<sup>th</sup> printing, CSH Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor

Mariotti, D., Fontana, G.S., Santini, L., and Costantino, P. (1989): Evaluation under field conditions of the morphological alterations („hairy root phenotype“) induced on *Nicotiana tabacum* by different Ri plasmid T-DNA genes, *J. Genet. Breed.*, Vol. 43, pp. 157-164

Marvo, S.L., King, S.R., and Jaskunas, S.R. (1983): Role of short regions of homology in intermolecular illegitimate recombination events, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, Vol. 80, pp. 2451-2456

Matousek, J., Rakousky, S., Nemcova, B. (1987): Occurrence of sugar non-specific nuclease in tobacco callus: changes of nuclease activity during callus growth and plant regeneration, *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, Vol. 8, pp. 61-71

Matsumoto, S., Ito, Y., Hosoi, T., Takashi, Y., and Machida, Y. (1990): Integration of *Agrobacterium* T-DNA into a tobacco chromosome: possible involvement of DNA homology between T-DNA and plant DNA, *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 224, pp. 309-316

Matzke, M.A., and Matzke, A.J.M. (1998): Gene silencing in plants: relevance for genome evolution and the acquisition of genomic methylation patterns. In: *Ciba Foundation Symposium 214, Epigenetics*

Matzke, A.J.M., Neuhuber, F., Park, Y.-D., Ambros, P.F., and Matzke, M.A. (1994): Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes, *Mol.Gen.Genet.*, Vol. 244, pp. 219-229

Maurel, C., Barbier-Brygoo, H., Spena, A., Tempé, J., and Guern, J. (1991): Single rol genes from *A. rhizogenes* T<sub>L</sub>-DNA alter some of the cellular responses to auxin in *Nicotiana tabacum*, *Plant Physiol.*, Vol. 97, pp. 212-216

Maurel, C., Leblanc, N., Barbier-Brygoo, H., Perrot-Rechenmann, C., Bouvier-Durand, and Guern, J. (1994): Alterations of auxin perception in rolB-transformed tobacco protoplasts, *Plant Physiol.*, Vol. 105, pp. 1209-1215

Mayer, U., Büttner, G., and Jürgens, G. (1993): Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies on the role of the GNOM gene, *Development*, Vol. 117, pp. 149-162

Mayer, U., Torres-Ruiz, R.A., Berleth, T., Miséra, S., and Jürgens, G. (1991): Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo, *Nature*, Vol. 353, pp. 402-407

Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, C., Nawrath, C. et al. (1991): T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants, *The EMBO Journal*, Vol. 10, pp. 697-704

McClintock, B. (1951): Chromosome organisation and genic expression, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, Vol. 16, pp. 13-47

McClintock, B. (1984): The significance of responses of the genome to challenge, *Science*, Vol. 226, pp. 792-801

McInnes, E., Morgan, A.J., Mulligan, B.J., and Dave, M.R. (1991): Phenotypic Effects of Isolated pRiA4 TL-DNA rol Genes in the Presence of Intact TR-DNA in Transgenic Plants of *Solanum dulcamara* L., *J.Exp.Bot.*, Vol. 42 (243), pp. 1279-1286

McQueen, H.A., Siriaco, G., and Bird, A.P. (1998): Chicken chromosomes are hyperacetylated, early replicating, and gene rich, *Genome Research*, Vol. 8 (6), pp. 621-630

Meinke, D.W. (1985): Embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*: analysis of mutants with a wide range of lethal phases, *Theor. Appl. Genet.*, vol. 69, pp. 543-552

Meinke, D.W. (1994): Seed development in *Arabidopsis thaliana*. In: Meyerowitz, E.M. and Somerville, C.R. (1994): *Arabidopsis*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp. 253-295

Meinke, D.W., Franzmann, L.H., Nickle, T.C. and Yeung, E.C. (1994): Leafy cotyledon mutants of *Arabidopsis*, *Plant Cell*, Vol. 6, pp. 1049-1064

Mengoli, M., Ghelli, A., Chiqui, D., and Bagni, N. (1992): Growth kinetics, polyamine pattern and biosynthesis in hairy root lines of *Nicotiana tabacum*, *Physiol. Plant*, Vol. 85, pp. 697-703

Messeguer, R., Ganal, M.W., Steffens, J.C., and Tanksley, S.D. (1991): Characterization of the level, target sites and inheritance of cytosine methylation in tomato nuclear DNA, *Plant Mol. Biol.*, Vol. 16, pp. 753-770

Meyer, P. (1995): *Gene Silencing in Higher Plants and Related Phenomena in Other Eukaryotes*, Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 197, Springer Verlag, Berlin

Meyer, P., and Heidmann, I. (1994): Epigenetic variants of a transgenic petunia line show hypermethylation in transgene DNA: an indication for specific recognition of foreign DNA in transgenic plants, *Mol.Gen.Genet.*, Vol. 243, pp. 390-399

Miller, J.H. (1972): *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 466 f.

Miyake, S., Saito, I., Kobayashi, H., and Yamashita, S. (1996): Identification of two *Xenopus laevis* genes, xMCM2 and xCDC46, with sequence homology to MCM genes involved in DNA replication, *Gene*, Vol. 175, pp. 71-75

Müller, A.J., Mendel, R.R., Schiemann, J., Simoens, C., and Inzé, D. (1987): High meiotic stability of a foreign gene introduced into tobacco by *Agrobacterium*-mediated transformation, *Mol. Gen.Genet.*, Vol. 207, pp. 171-175

Muzi-Falconi, M., Brown, G.W., and Kelly, T.J. (1996): *cdc18+* regulates initiation of DNA replication in *Schizosaccharomyces pombe*, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol. 93, pp. 1566-1570

Muzi-Falconi, M., and Kelly, T.J. (1995): Orp1, a member of the Cdc18/Cdc6 family of the S-phase regulators, is homologous to a component of the origin recognition complex, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Vol. 92 (26), pp. 12475-12479

Nagl, W. (1962): 4096-Plodie und „Riesenchromosomen“ im Suspensor von *Phaeseolus coccineus*, Naturwiss., Vol. 49, pp. 261+262

Nagl, W. (1972): Evidence of DNA amplification in the orchid *Cymbidium* in vitro, Cytobios, Vol. 5, pp. 145-154

Nagl, W. (1976): Zellkern und Zellzyklen – Molekularbiologie, Organisation und Entwicklungsphysiologie der Desoxyribonucleinsäure und des Chromatins, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

Nagl, W. (1992): Replication, Prog.Bot., Vol. 51, pp. 173-180

Nagl, W. und Rücker, W. (1972): Beziehungen zwischen Morphogenese und nuklearem DNS-Gehalt bei aseptischen Kulturen von *Cymbidium* nach Wuchsstoffbehandlung, Z.Pflanzenphysiol., Vol. 67, pp. 120-134

Nagl, W., and Rücker, W. (1974): Shift of DNA replication from diploid to polyploid cells in cytokinin-controlled differentiation, Cytobios, Vol. 10, pp. 137-144

Nelson, D.L. (1991): Applications of polymerase chain reaction methods in genome mapping, Curr. Opin. Genet. Dev., Vol. 1, pp. 62-68

Neubert, T.A., and Gottlieb, M. (1990): An inducible 3'-nucleotidase/nuclease from the trypanosomatid *Crithidia luciliae*. Purification and characterization, J.Biol.Chem., Vol. 265(13), pp. 7236-7242

Neuhuber, F., Park, Y.-D., Matzke, A.J.M., and Matzke, M.A. (1994): Susceptibility of transgene loci to homology-dependent gene silencing, Mol.Gen.Genet., Vol. 244, pp. 230-241

Neumann, K.H. (1995): Pflanzliche Zell- und Gewebekulturen, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

Neumann, K.-H. und Grieb, B. (1992): Somatische Embryogenese bei höheren Pflanzen: Grundlagen und praktische Anwendung. Biotechnologische und physiologische Aspekte der pflanzlichen Zell- und Gewebekulturen, Wiss. Zeitschrift der Humboldt-Universität zu Berlin, Reihe Mathematik-Naturwissenschaften, Vol. 41/3, pp. 63-80

Nicholl, D.S.T. (1995): Gentechnische Methoden, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Nilsson, O., Little, C.H.A., Sandberg, G., and Olsson, O. (1996): Expression of two heterologous promoters, *Agrobacterium rhizogenes* *rolC* and cauliflower mosaic virus 35S, in the stem of transgenic hybrid aspen plants during the annual cycle of growth and dormancy, Plant Mol.Biol., Vol. 31, pp. 887-895

Nilsson, O., Moritz, T., Imbault, N., Sandberg, G., and Olsson, O. (1993): Hormonal characterization of transgenic tobacco plants expressing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA, Plant Physiol., Vol. 102, pp. 363-371

Nilsson, O., and Olsson, O. (1997): Getting to the root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes* *rol* genes in the formation of hairy roots, Physiologia Plantarum, Vol. 100:3, pp. 463-473

Nilsson, O., Tuominen, H., Sundberg, B., and Olsson, O. (1997): Getting to the root: The *Agrobacterium rhizogenes* *rolB* and *rolC* promoters are expressed in pericycle cells competent to serve as root initials in transgenic hybrid aspen, Physiologia Plantarum, Vol. 100:3, pp. 456-462

Nomura, K., and Komamine, A. (1985): Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture, Plant Physiol., Vol. 79, pp. 988-991

Oakeley, E.J., and Jost, J.-P. (1996): Nonsymmetrical cytosine methylation in tobacco pollen DNA, Plant Mol. Biol., Vol. 31, pp. 927-930

Offringa, R., de Groot, M.J.A., Haagsmann, H.J. et al. (1990): Extrachromosomal homologous recombination and gene targeting in plant cells after *Agrobacterium* mediated transformation, *The EMBO Journal*, Vol. 9, pp.3077-3084

Okada, K., Takebe, I., and Nagata, T. (1986): Expression and integration of genes introduced into highly synchronized plant protoplasts, *Mol.Gen.Genet.*, Vol. 205, pp. 398-403

Oleykowski, C.A., Bronson Mullins, C.R., Chang, D.W., and Yeung, A.T. (1999): Incision at nucleotide insertions/deletions and base pair mismatches by the SP nuclease of spinach, *Biochemistry*, Vol. 38(7), pp. 2200-2205

Olszewska, M.J., Maszewski, J., Bilecka, A. (1990): DNA replication in relation to S phase duration in six angiosperms annual species, *Cytologia*, Vol. 55, pp. 31-35

Ooms, G., Bains, A., Burrell, M., Karp, A., Twell, D., and Wilcox, E. (1985): Genetic manipulation in cultivars of oilseed rape (*Brassica napus*) using *Agrobacterium*, *Theor.Appl.Genet.*, Vol. 71, pp. 325-329

Ooms, G., Bossen, M.E., Burrell, M.M., and Karp, A. (1986): Genetic manipulation in potato with *Agrobacterium rhizogenes*, *Potato Res.*, Vol. 29, pp. 367-379

Ostashevsky, J. (1998): A polymer model for the structural organization of chromatin loops and minibands in interphase chromosomes, *Mol.Biol.Cell*, Vol. 9 (11), pp. 3031-3040

Otten, L., De Greve, H., Hernalsteens, J.-P., Van Montagu, M., Schieder, O., Straub, J., and Schell, J. (1981): Mendelian transmission of gene introduced into plants by the Ti plasmids of *A. tumefaciens*, *Mol.Gen.Genet.*, Vol. 183, pp. 209-213

Park, J.S., Wang, M., Park, S.J., and Lee, S.H. (1999): Zinc finger of replication protein A, a non-DNA binding element, regulates its DNA binding activity through redox, *J.Biol.Chem.*, Vol. 274 (41), pp. 29075-29080

Paszkowski, J. (1994): *Homologous Recombination and Gene Silencing in Plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London

Pauler, B., Imani, J., Neumann, K.-H. (1998) : Praktikum biochemischer, radiobiochemischer und gentechnischer Methoden, Studienskripte, Shaker Verlag, Aachen

Pearson, G.C., Timmis, J.N., and Ingle, J. (1974): The differential replication of DNA during plant development, *Chromosoma*, Vol. 45, pp. 281-294

Petit, A., Berkaloff, A., and Tempé, J. (1986): Multiple transformation of plant cells by *Agrobacterium* may be responsible for the complex organization of T-DNA in crown gall and hairy root, *Mol.Gen.Genet.*, Vol. 202, pp. 388-393

Porsch, P., Jahnke, A., and Düring, K. (1998): A plant transformation vector with a minimal T-DNA, II. Irregular integration patterns of the T-DNA in the plant genome, *Plant Mol. Biol.*, Vol. 37, pp. 581-585

Potrykus, I., Paszkowski, J., Saul, M.W., Petruska, J., and Shillito, R.D. (1985): Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer, *Mol.Gen.Genet.*, Vol. 199, pp. 169-177

Pradhan, S., and Adams, R.L.P. (1995): Distinct CG and CNG DNA methyltransferases in *Pisum sativum*, *Plant J.*, Vol. 7, pp. 471-481

Reinisch, K.M., Chen, L. Verdine, G.L., and Lipscomb, W.N. (1995): The crystal structure of HaeIII methyltransferase covalently complexed to DNA: an extrahelical cytosine and rearranged base pairing, *Cell*, Vol. 82, pp. 143-153

Risseuw, E., Franke-van Dijk, M.E.I., and Hooykaas, P.J.J. (1997): Gene targeting and instability of *Agrobacterium* T-DNA loci in the plant genome, *The Plant Journal*, Vol. 11, pp. 717-728

Rogers, S.O., and Bendich, A.J. (1988): Extraction of DNA from plant tissues. In: Gelvin, S:B., and Schilperoort, R.A. (eds.): *Biological Manual*, Kluwer Academic Publications, Dordrecht, pp. A6/1-A6/10

Ronemus, M.J., Galbiati, M., Ticknor, C., Chen, J.C., and Dellaporta, S.L. (1996): Demethylation-induced developmental pleiotropy in *Arabidopsis*, *Science*, Vol. 273, pp. 654-657

Rossi, L., Hohn, B. and Tinland, B. (1993): The VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* carries nuclear localization signals important for transfer of T-DNA to plants, *Mol.Gen.Genet.*, Vol. 239, pp. 345-353

Rudkin, G.T. (1969): Non-replicating DNA in *Drosophila*, *Genetics Suppl.*, Vol. 61, pp. 227-238

Ryoji, M., and Worcel, A. (1985): Structure of the Two Distinct Types of Minichromosomes that Are Assembled on DNA injected in *Xenopus* Oocytes, *Cell*, Vol. 40, pp. 923-932

Sabelli, P.A., Burgess, S.R., Kush, A.K., Young, M.R., and Shewry, P.R. (1996): cDNA cloning and characterisation of a maize homologue of the MCM proteins required for the initiation of DNA replication, *Mol.Gen.Genet.*, Vol. 252, pp. 125-136

Sahi, S.V., Chilton, M.-D., Chilton, W.S. (1990): Corn metabolites affect growth and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*, *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*, Vol. 87, pp. 3879-3883

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, Vol. 239, pp. 487-491

San Miguel, P., Tikhonov, A., Jin, Y.-K., Motchoulskaia, N. et al. (1996): Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome, *Science*, Vol. 274, pp. 765-768

Schäfer, A., and Neumann, K.-H. (1978): The influence of gibberellic acid on reassociation kinetics of DNA of *Daucus carota* L., *Planta*, Vol. 143, pp. 1-4

Schäfer, F., Grieb, B., and Neumann, K.-H. (1988): Morphogenetic and histological events during embryogenesis in intact carrot plantlets (*Daucus carota* L.) in various nutrient media, *Bot.Acta*, Vol. 101, pp. 362-365



Schlichtinger, F. (1956): Karyologische Untersuchungen an endopolyploiden Chromozentrenkernen von *Gibbaeum heathii* im Zusammenhang mit der Differenzierung, Österr.Bot.Z., Vol. 103, pp. 485-528

Schmülling, T., Fladung, M., Grossmann, K., and Schell, J. (1993): Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single rol genes of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA, Plant J., Vol. 3., pp. 371-382

Schmülling, T., and Röhrig, H. (1995): Gene silencing in transgenic tobacco hybrids: frequency of the event and the visualization of somatic inactivation pattern, Mol. Gen. Genet., Vol. 249, pp. 375-390

Schmülling, T., Schell, J., and Spena, A. (1988): Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development, The EMBO Journal, Vol. 7 No. 9, pp. 2621-2629

Schmülling, T., Schell, J., and Spena, A. (1989): Promoters of the rolA, -B and -C genes of *Agrobacterium rhizogenes* are differentially regulated in transgenic plants, Plant Cell, Vol. 1, pp. 665-670

Schultz, R.M., Davis, W., Stein, P., and Svoboda, P. (1999): Reprogramming of gene expression during preimplantation development, Journal of Experimental Zoology, Vol. 285 (3), pp. 276-282

Scorza, R., Zimmerman, T.W., Cordts, J.M., Footen, K.J., and Ravelonandro, M. (1994): Horticultural characteristics of transgenic tobacco expressing the rolC gene from *Agrobacterium rhizogenes*, J.Amer.Soc.Hort.Sci., Vol. 199, pp. 1091-1098

Selker, E. (1990): Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*, Annu.Rev.Genet., Vol. 24, pp. 579-613

Serino, G., Clerot, D., Brevet, J., Costantino, P., and Cardarelli, M. (1994): rol genes of *Agrobacterium rhizogenes* cucumopine strain: sequence, effects and pattern of expression, Plant Mol. Biol., Vol. 26, pp. 415-422

Seyffert, W., Gassen, H.G., Hess, O., Jäckle, H. und Fischbach, K.-F. (Hrsg.) (1998): Seyffert – Lehrbuch der Genetik, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm

Sherman, D.A., and Forsburg, S.L. (1998): *Schizosaccharomyces pombe* Mcm3p, an essential nuclear protein, associates tightly with Nda4p (Mcm5p), Nucleic Acid Res., Vol. 26, pp. 3955-3960

Shirahige, K., Hori, Y., Shiraishi, K., Yamashita, M., Takahashi, K., Obuse, C., Tsurimoto, T., and Yoshikawa, H. (1998): Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression, Nature, Vol. 395 (6702), pp. 618-621

Sinkar, V., Pythoud, F., White, F., Nester, E., and Gordon, M. (1988): rolA locus of the Ri plasmid directs developmental abnormalities in transgenic plants, Genes Dev., Vol. 2, pp. 688-697

Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. und Bresinsky, A. (1998): Strasburger – Lehrbuch der Botanik, 34. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm

Sluder, G. (1989): Centrosomes and the cell cycle, J. Cell Sci. Supplement, Vol. 12, pp. 253-275

So, A.G., and Downey, K.M. (1988): Mammalian DNA polymerases  $\alpha$  and  $\delta$ : current status in DNA replication, Biochemistry, Vol. 27, pp. 4591-4595

Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, J.Mol.Biol., Vol. 98, pp. 503-517

Spanier, K., Schell, J., and Schreier, P.H. (1989): A functional analysis of T-DNA gene 6b: the fine tuning of cytokinin effects on shoot development, Mol.Gen.Genet., Vol. 219, pp. 209-216

Spanó, L., Mariotti, D., Cardarelli, M., Branca, C., and Costantino, P. (1988): Morphogenesis and auxin sensitivity of transgenic tobacco with different complements of Ri T-DNA, Plant Physiol., Vol. 87, pp. 479-483

Spena, A., Schmülling, T., Koncz, C., and Schell, J. (1987): Independent and synergistic activity of rol A, B and C loci in stimulating abnormal growth in plants, *The EMBO Journal*, Vol. 6 No. 13, pp. 3891-3899

Spielmann, A., and Simpson, R.B. (1986): T-DNA structure in transgenic tobacco plants with multiple independent integration sites, *Mol. Gen. Genet.*, Vol. 205, pp. 34-41

Stachel, S., Timmermann, B., and Zambryski, P. (1986): Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells, *Nature*, Vol. 322, pp. 706-712

Stahl, L.E., Jacobs, A., and Binns, A.N. (1998): The conjugal intermediate plasmid RSF1010 inhibits *Agrobacterium tumefaciens* virulence and VirB-dependent export of VirE2, *J.Bacteriol.*, Vol. 180(15), pp. 3933-3939

Steinbiß, H.-H. (1995): *Transgene Pflanzen*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

Sterner, J.M., DewKnight, S., Musahl, C., Kornbluth, S., and Horowitz, J.M. (1998): Negative regulation of DNA replication by the retinoblastoma protein is mediated by its association with MCM7, *Mol.Cell.Biol.*, Vol. 18, pp. 2748-2757

Steward, F.C. (1968): *Growth and organization in plants. Structure, development, metabolism, physiology*, Addison-Wesley Series in Life Science, Reading, Mass.

Steward, F.C. (1985): From metabolism and osmotic work to totipotency and morphogenesis: A study of limitations versus multiple interactions. In: Neumann, K.-H., Barz, W., Reinhard, E.(eds.): *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 1-11

Steward, F.C., Caplin, S.M., and Millar, F.K. (1952): Investigations on growth and metabolism of plant cells, I. New techniques for the investigations of metabolism, nutrition and growth in undifferentiated cells, *Ann.Bot.N.S.*, Vol. 16 (1), pp. 57-77

Strukenberg, P.T., Studwell-Vaughan, P.S., and O'Donnell, M. (1991): Mechanism of the silencing of the sliding beta-clamp of DNA polymerase III holoenzyme, *J.Biol.Chem.*, Vol. 266(17), pp. 11328-11334

Stubblefield, E. (1975): Analysis of the replication pattern of Chinese hamster chromosomes using 5-bromo-deoxyuridine suppression of 33258 Hoechst fluorescence, *Chromosoma*, Vol. 53, pp. 209-221

Sun, L.-Y., Monneuse, M.-O., Martin-Tanguy, J., and Tepfer, D. (1991): Changes in flowering and the accumulation of polyamines and hydroxycinnamic acid-polyamine conjugates in tobacco plants transformed by the *rolA* locus from the Ri T<sub>L</sub>-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*, *Plant Sci.*, Vol. 80, pp. 145-156

Sunderland, N., Collins, G.B., and Dunwell, J.M. (1974): The role of nuclear fusion in pollen embryogenesis of *Datura innoxia* MILL, *Planta*, Vol. 117, pp. 227-241

Tanaka, N. (1997): Strategies for the production of secondary metabolites by pRi-transformed regenerants, *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, Vol. 3(3), pp. 128-137

Tepfer, D. (1984): Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype, *Cell*, Vol. 37, pp. 959-967

Thomas, C.M. (1984): Genetic evidence for the direction of transcription of the *trfA* gene of broad host range plasmid RK2J, *Gen. Microbiol.*, Vol. 130, pp. 1641-1650

Thommes, P., and Hubscher, U. (1990): Eukaryotic DNA replication. Enzymes and proteins acting at the fork, *Eur.J.Biochem.*, Vol. 194 (3), pp. 699-712

Tinland, B., Koukolikova-Nicola, Z., Hall, M.N., and Hohn, B. (1992): The T-DNA linked VirD2 protein contains two distinct functional nuclear localization signal, *Proc.Natl.Acad. Sci. USA*, Vol. 89, pp. 7442-7446

Tinland, B., Rohfritsch, O., Michler, P., and Otten, L. (1990): *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA gene 6b stimulates rol-induced root formation, permits growth at high auxin concentrations and increases root size, *Mol.Gen.Genet.*, Vol. 223, pp. 1-10

Toonen, M.A.J., and de Vries, S.C. (1996): Initiation of somatic embryos from single cells. In Wang and Cuming: *Embryogenesis – The generation of a plant*, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, pp. 173-190

Toonen, M.A.J., Hendriks, T., Schmidt, E.D.L., Verhoeven, H.A., van Kammern, A., and de Vries, S.C. (1994): Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking, *Planta*, Vol. 194, pp. 565-572

Topping, J.F., Agyeman, F., Henricot, B., and Lindsey, K. (1994): Identification of molecular markers of embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* by promoter trapping, *Plant Journal*, Vol. 5(6), pp. 895-903

Topping, J.F., Wei, W., and Lindsey, K. (1991): Functional tagging of regulatory elements in the plant genome, *Development*, Vol. 112, pp. 1009-1019

Torres-Ruiz, R.A., and Jürgens, G. (1994): Mutations in the FASS gene uncouple pattern formation and morphogenesis in *Arabidopsis* development, *Development*, Vol. 120, pp. 2967-2978

Trigano, R.N., Gray, D.J., Conger, B.V., and McDaniel, K.J. (1989): Origin of direct somatic embryos from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata*, *Bot. Gaz.*, Vol. 150, pp. 72-77

Trovato, M., Mauro, M.L., Costantino, P., and Altamura, M.M. (1997): The gene rolD from *Agrobacterium rhizogenes* is developmentally regulated in transgenic tobacco, *Protoplasma*, Vol., pp.

Uga, H., Matsunaga, F., and Wada, C. (1999): Regulation of DNA replication by iterons: an interaction between the ori2 and incC regions mediated by RepE-bound iterons inhibits DNA replication of mini-F plasmid in *Escherichia coli*, *The EMBO Journal*, Vol. 18, pp. 3856-3867

Umek R.M., Linskens, M.H., Kowalski, D., and Huberman, J.A. (1989): New beginnings in studies of eukaryotic DNA replication origins, *Biochim.Biophys.Acta*, Vol. 1007 (1), pp. 1-14

Van Altvorst, A.C., Bino, R.J., Van Dijk, A.J., Lamers, A.M.J., Lindhout, W.H., Van der Mark, F., and Dons, J.J.M. (1992): Effects of the introduction of *Agrobacterium rhizogenes* rol genes on tomato plant and flower development, *Plant Sci.*, Vol. 83, pp. 77-85

Van der Salm, T.P.M., Hänisch ten Cate, C., and Dons, H. (1997): Prospects for application of rol genes for crop improvement, Department of Developmental Biology, Centre for Plant Breeding and Reproduction Research, Wageningen

Van der Salm, T.P.M., Van der Torn, C.J.G., Hänisch ten Cate, Ch.H., Van der Krieken, W.M., and Dons, J.J.M. (1996): The effect of exogeneous auxin and rol genes on root formation in *Rosa hybrida* L. „Moneyway“, *Plant Growth Reg.*, Vol. 19, pp. 123-131

Van Oostveldt, P., and van Parijs, R. (1972): Reiterated nucleotide sequences in DNA of dividing and elongating plant cells, *Arch.Intern.Physiol.Biochim.*, Vol. 80, pp. 416-418

Vansuyt, G., Vilaine, F., Tepfer, M., and Rossignol, M. (1992): rolA modulates the sensitivity to auxin of the proton translocation catalyzed by the plasma membrane H(+)-ATPase in transformed tobacco, *FEBS Lett.*, Vol. 298(1), pp. 89-92

Vasil, V., and Vasil. I.K. (1982): The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. I. in cultured immature embryos, *Bot. Gaz.*, Vol. 143, pp. 454-465

Vergunst, A.C., and Hooykaas, P.J.J. (1998): Cre/lox-mediated site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* by transient expression of cre, *Plant Mol. Biol.*, Vol. 38, pp. 393-406

Vijayachandra, K., Palanichelvam, K., and Veluthambi, K. (1995): Rice scutellum induces *Agrobacterium tumefaciens* vir genes and T-strand generation, *Plant Mol.Biol.*, Vol. 29(1), pp. 125-133

Vijayaraghavan, M.R. und Prabhakar, K. (1984): The Endosperm. In: Johri, B.M. (ed.): Embryology of Angiosperms, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio, pp. 319-376

Vilaine, F., Charbonnier, C., and Casse-Delbart, F. (1987): Further insight concerning the TL region of the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* strain A4: Transfer of a 1,9 kb fragment is sufficient to induce transformed roots on tobacco leaf fragments, Mol.Gen. Genet., Vol. 210, pp. 111-115

Voet, D. und Voet, J.G. (1992): Biochemie, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

Vogel, A.M., and Das, A. (1992): Mutational analysis of *Agrobacterium tumefaciens* virD2: Tyrosine 29 is essential for endonuclease activity, J. Bacteriol., Vol. 174, pp. 303-308

Von Bodman, S.B., Domier, L.L., and Farrand, S.K. (1995): Expression of multiple eukaryotic genes from a single promoter in *Nicotiana*, Biotechnology (NY), Vol. 13(6), pp. 587-591

Vongs, A., Kakutani, T., Martienssen, R.A., and Richards, E.J. (1993): *Arabidopsis thaliana* DNA methylation deficient mutants, Science, Vol. 260, pp. 1926-1928

Walden, R., and Schell, J. (1990): Techniques in plant molecular biology – progress and problems, Eur. J. Biochem., Vol. 192, pp. 563-576

Wallroth, M., Gerats, A.G.M., Rogers, S.G., Fraley, R.T., and Horsch, R.B. (1986): Chromosomal localization of foreign genes in *Petunia hybrida*, Mol.Gen.Genet., Vol. 202, pp. 6-15

Wang, K., Stachel, S.E., Timmermann, B., Van Montagu, M., and Zambryski, P. (1987): Site-specific nick in the T-DNA border sequence is a result of *Agrobacterium* vir gene expression, Science, Vol. 235, pp. 587-591

Wang, L.H., Heinlein, M., and Kunze, R. (1996): Methylation pattern of activator transposase binding sites in maize endosperm, Plant Cell, Vol. 8, pp. 747-758

Wang, T.L. and Cuming, A. (1996): Embryogenesis – The generation of a plant, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford

Wang, Y., Zhou, X.Y., Wang, H., Wang, H.Y., Huq, M.S., and Iliakis, G. (1999): Roles of replication protein A and DNA-dependent protein kinase in the regulation of DNA replication following DNA damage, *J.Biol.Chem.*, Vol. 274, pp. 22060-22064

Ward, J.E., Dale, E.M., and Binns, A.N. (1991): Activity of the *Agrobacterium* T-DNA transfer machinery is affected by virB gene products, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 88, pp. 9350-9354

Waterborg, J.H., Shall, S. (1985): The organisation of replicons. In: Bryant, J.A., and Francis, D. (eds.): *The cell-division cycle in plants*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 15-35

Weber, S., Zarhloul, K., and Friedt, W. (2001): Modification of Oilseed Quality by Genetic Transformation, *Progress in Botany*, Vol. 62, pp. 140-174

Wei, W., Twell, D., and Lindsey, K. (1997): A novel nucleic acid helicase gene identified by promoter trapping in *Arabidopsis*, *Plant Journal*, Vol. 11(6), pp. 1307-1314

Wienand, U., and Saedler, H. (1987): Plant transposable elements: Unique structures for gene tagging and gene cloning. In: Hohn, T., and Schell, J. (eds.): *Plant Infectious Agents*, Springer Verlag, Wien, New York, pp. 205-227

Wigler, M., Levy, D., and Perucho, M. (1981): The somatic replication of DNA methylation, *Cell*, Vol. 24, pp. 11792-11796

Wilhelm, E. (1999): Tissue culture of broad-leafed forest tree species with special emphasis on plant microbes interactions, *Habilitationsschrift vorgelegt an der Universität Wien*

Willmitzer, L. (1988): The use of transgenic plants to study plant gene expression, *Trends in Genetics*, Vol. 4, pp. 13-18



Winans, S.C. (1990): Transcriptional induction of an *Agrobacterium* regulatory gene at tandem promoters by plant-released phenolic compounds, phosphate starvation, and acidic growth media, *J. Bacteriol.*, Vol. 172, pp. 2433-2438

Winans, S.C. (1991): Two way signalling in *Agrobacterium*-plant interactions, *Microbiol. Revue*, Vol. 56, pp. 12-31

Winkler, H. (1908): *Über Parthenogenesis und Apogamie im Pflanzenreiche*, Fischer-Verlag, Jena

Woodcock, D.M., and Sibatani, A. (1975): Differential variations in the DNA of *Drosophila melanogaster* during development, *Chromosoma*, Vol. 50, pp. 147-173

Yanofsky, M.F., Porter, S.G., Young, C. et al. (1986): The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* encodes a site-specific endonuclease, *Cell*, Vol. 47, pp. 471-477

Yen, R. W.-C., Vertino, P.M. et al. (1992): Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase, *Nucleic Acid Res.*, Vol. 20, pp. 2287-2291

Yeshaya, J., Shalgi, R., Shohat, M., and Avivi, L. (1998): Replication timing of the various FMR1 alleles detected by FISH: inferences regarding their transcriptional status, *Hum.Genet.*, Vol. 102 (1), pp. 6-14

Zambryski, P. C. (1992): Chronicals from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, Vol. 43, pp. 465-490

Zhang, J., Boone, L., Kocz, R., Zhang, C., Binns, A.N., and Lynn, D.G. (2000): At the maize/*Agrobacterium* interface: natural factors limiting host transformation, *Chem.Biol.*, Vol. 7(8), pp. 611-621

Zhang, J., Xu, R.J., Elliott, M.C., and Chen, D.F. (1997b): *Agrobacterium*-mediated transformation of elite indica and japonica rice cultivars, *Mol.Biotechnol.*, Vol. 8(3), pp. 223-231

Zhang, Z., MacAlpine, D.M., and Kapler, G.M. (1997a): Developmental regulation of DNA replication: Replication fork barriers and programmed gene amplification in *Tetrahymena thermophila*, *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 17 (10), pp. 6147-6156

## 8. Anhang: Tabellen und Abbildungen

**Tab. 1/1: Bonitierungstabelle aller transgenen Karottenpflanzen**

**Transformation I (4h-Cokultur)**

Bonitiert wurden alle transgenen Karottenpflanzen, bei der Transformation I (4 h Cokultur) wurden bei bestimmten Transformationszeitpunkten erst nach Kokosmilchzugabe Pflanzen entwickelt. Die Abkürzung "lanz." in der Tabelle steht für lanzettförmig, "+" steht für "vorhanden", "-" für "nicht vorhanden", die Angaben in Klammern "(")" weisen auf ein Auftreten der morphologischen Ausprägung des Pflanzenteils in weniger als 50% der Versuchspflanzen hin. Die Angaben "T()" beziehen sich auf den Applikationszeitpunkt des *Agrobact. tum.* in Stunden nach Anregung des Zellzyklus, T(0) entspricht der Zugabe gleichzeitig mit 2'-Desoxy-Thymidin, T(0,5) entspricht der *Agrobacterium*-Applikation 30 min. nach Anregung des Zellzyklus durch 2'-Desoxy-Thymidin etc. Bei der Transformation I wurde zu allen Kulturen außer zum Zeitpunkt T(6) Kokosnußmilch zum Kulturmedium zugesetzt. T(K) = unsynchronisierte, transformierte Kontrolle.

| Transf.-<br>Zeitpunkt | Blätter   |             |            |              |          | Blattfärbung | Petiolen | Hypokotyl | Wurzeln       |               |
|-----------------------|-----------|-------------|------------|--------------|----------|--------------|----------|-----------|---------------|---------------|
|                       | gefiedert | ungefiedert | breit/rund | schmal/lanz. | verdreht | Anthocyan    | Petiolen | Hypokotyl | Primärwurzeln | Seitenwurzeln |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | +        | (+)          | -        | +         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | +        | (+)          | -        | +         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | +        | (+)          | -        | +         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | +        | (+)          | -        | -         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | +        | (+)          | -        | -         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | +        | (+)          | -        | -         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | +        | (+)          | -        | -         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | +        | (+)          | -        | -         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | +        | (+)          | -        | -         | +             | -             |
| T(K)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(0)                  | -         | +           | +          | +            | +        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(0)                  | -         | +           | +          | +            | +        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(0)                  | -         | +           | +          | +            | +        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(0)                  | -         | +           | +          | +            | +        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(0,5)                | -         | +           | +          | -            | -        | +            | -        | -         | +             | -             |
| T(0,5)                | -         | +           | +          | -            | -        | +            | -        | -         | +             | -             |
| T(0,5)                | -         | +           | +          | -            | -        | +            | -        | -         | +             | -             |
| T(0,5)                | -         | +           | +          | -            | -        | +            | -        | -         | +             | -             |
| T(1,5)                | (+)       | +           | +          | -            | +        | +            | -        | -         | +             | -             |
| T(1,5)                | (+)       | +           | +          | -            | +        | +            | -        | -         | +             | -             |
| T(1,5)                | (+)       | +           | +          | -            | +        | +            | -        | -         | +             | -             |
| T(1,5)                | (+)       | +           | +          | -            | +        | +            | -        | -         | +             | -             |
| T(2)                  | -         | +           | +          | +            | +        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(2)                  | -         | +           | +          | +            | +        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(2)                  | -         | +           | +          | +            | +        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(2)                  | -         | +           | +          | +            | +        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(4)                  | -         | +           | +          | +            | +        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(4)                  | -         | +           | +          | +            | +        | -            | -        | -         | +             | -             |

**Tab. 1/2: Bonitierungstabelle aller transgenen Karottenpflanzen**

**Transformation II (8h-Cokultur)**

Bonitiert wurden alle transgenen Karottenpflanzen. Die Abkürzung "lanz." in der Tabelle steht für lanzettförmig, "+" steht für "vorhanden", "-" für "nicht vorhanden", die Angaben in Klammern "(")" weisen auf ein Auftreten der morphologischen Ausprägung des Pflanzenteils in weniger als 50% der Versuchspflanzen hin. T(K) beschreibt die unsynchronisierte, transformierte Kontrolle. Die Angaben "T()" beziehen sich auf den Applikationszeitpunkt des *Agrobact. tum.* in Stunden nach Anregung des Zellzyklus, T(0) entspricht der Zugabe gleichzeitig mit 2'-Desoxi-Thymidin, T(0,5) entspricht der *Agrobacterium*-Applikation 30 min. nach Anregung des Zellzyklus durch 2'-Desoxi-Thymidin etc.

| Transf.-<br>Zeitpunkt | Blätter   |             |            |              |          | Blattfärbung | Petiolen | Hypokotyl | Wurzeln       |               |
|-----------------------|-----------|-------------|------------|--------------|----------|--------------|----------|-----------|---------------|---------------|
|                       | gefiedert | ungefiedert | breit/rund | schmal/lanz. | verdreht | Anthocyan    | Petiolen | Hypokotyl | Primärwurzeln | Seitenwurzeln |
| T(K)                  | (+)       | (+)         | (+)        | (+)          | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(K)                  | (+)       | (+)         | (+)        | (+)          | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(K)                  | (+)       | (+)         | (+)        | (+)          | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(K)                  | +         | -           | -          | -            | -        | -            | +        | +         | +             | -             |
| T(0)                  | +         | -           | +          | -            | -        | -            | +        | -         | +             | -             |
| T(0)                  | +         | -           | +          | -            | -        | -            | +        | -         | +             | -             |
| T(0)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(0)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(0,5)                | -         | +           | +          | +            | -        | +            | -        | -         | +             | -             |
| T(0,5)                | -         | +           | +          | +            | -        | +            | -        | -         | +             | -             |
| T(0,5)                | -         | +           | +          | +            | -        | +            | -        | -         | +             | -             |
| T(0,5)                | -         | +           | +          | +            | -        | +            | -        | -         | +             | -             |
| T(1)                  | -         | +           | +          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(1)                  | -         | +           | +          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(1)                  | -         | +           | +          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(1)                  | -         | +           | +          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(1)                  | -         | +           | +          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(1)                  | -         | +           | +          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(1)                  | -         | +           | +          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(1)                  | -         | +           | +          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(1,5)                | -         | +           | -          | +            | -        | (+)          | -        | -         | +             | -             |
| T(1,5)                | -         | +           | -          | +            | -        | (+)          | -        | -         | +             | -             |
| T(1,5)                | -         | +           | -          | +            | -        | (+)          | -        | -         | +             | -             |
| T(1,5)                | -         | +           | -          | +            | -        | (+)          | -        | -         | +             | -             |
| T(1,5)                | -         | +           | -          | +            | -        | (+)          | -        | -         | +             | -             |
| T(1,5)                | -         | +           | -          | +            | -        | (+)          | -        | -         | +             | -             |
| T(1,5)                | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |

**Tab. 1/3: Bonitierungstabelle aller transgenen Karottenpflanzen**

**Transformation II (8h-Cokultur)**

Bonitiert wurden alle transgenen Karottenpflanzen. Die Abkürzung "lanz." in der Tabelle steht für lanzettförmig, "+" steht für "vorhanden", "-" für "nicht vorhanden", die Angaben in Klammern "()" weisen auf ein Auftreten der morphologischen Ausprägung des Pflanzenteils in weniger als 50% der Versuchspflanzen hin. T(K) beschreibt die unsynchronisierte, transformierte Kontrolle. Die Angaben "T()" beziehen sich auf den Applikationszeitpunkt des *Agrobact. tum.* in Stunden nach Anregung des Zellzyklus, T(0) entspricht der Zugabe gleichzeitig mit 2'-Desoxy-Thymidin, T(0,5) entspricht der *Agrobacterium*-Applikation 30 min. nach Anregung des Zellzyklus durch 2'-Desoxy-Thymidin etc.

| Transf.-<br>Zeitpunkt | Blätter   |             |            |              |          | Blattfärbung | Petiolen | Hypokotyl | Wurzeln       |               |
|-----------------------|-----------|-------------|------------|--------------|----------|--------------|----------|-----------|---------------|---------------|
|                       | gefiedert | ungefiedert | breit/rund | schmal/lanz. | verdreht | Anthocyan    | Petiolen | Hypokotyl | Primärwurzeln | Seitenwurzeln |
| T(2)                  | -         | +           | +          | +            | -        | -            | -        | -         | (+)           | -             |
| T(2)                  | -         | +           | +          | +            | -        | -            | -        | -         | (+)           | -             |
| T(2)                  | -         | -           | -          | -            | -        | -            | -        | -         | (-)           | -             |
| T(3)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(3)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(3)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(3)                  | -         | -           | -          | -            | -        | -            | -        | -         | (-)           | -             |
| T(3)                  | -         | -           | -          | -            | -        | -            | -        | -         | (-)           | -             |
| T(4)                  | -         | -           | -          | -            | -        | -            | -        | -         | (-)           | -             |
| T(4)                  | -         | -           | -          | -            | -        | -            | -        | -         | (-)           | -             |
| T(4)                  | +         | -           | -          | -            | -        | -            | +        | +         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | +        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | +        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |

**Tab. 1/4: Bonitierungstabelle aller transgenen Karottenpflanzen**

**Transformation III (48h-Cokultur)**

Bonitiert wurden alle transgenen Karottenpflanzen. Die Abkürzung "lanz." in der Tabelle steht für lanzettförmig, "+" steht für "vorhanden", "-" für "nicht vorhanden", die Angaben in Klammern "(")" weisen auf ein Auftreten der morphologischen Ausprägung des Pflanzenteils in weniger als 50% der Versuchspflanzen hin. T(K) beschreibt die unsynchronisierte, transformierte Kontrolle. Die Angaben "T()" beziehen sich auf den Applikationszeitpunkt des *Agrobact. tum.* in Stunden nach Anregung des Zellzyklus, T(0) entspricht der Zugabe gleichzeitig mit 2'-Desoxi-Thymidin, T(0,5) entspricht der *Agrobacterium*-Applikation 30 min. nach Anregung des Zellzyklus durch 2'-Desoxi-Thymidin etc.

Doppeltes Auftreten von "+" oder "-" (d.h. "++" bzw. "--") beschreibt eine sehr starke Ausprägung der entsprechenden Morphologie des Pflanzenteils.

| Transf.-<br>Zeitpunkt | Blätter   |             |            |              |          | Blattfärbung | Petiolen | Hypokotyl | Wurzeln       |               |
|-----------------------|-----------|-------------|------------|--------------|----------|--------------|----------|-----------|---------------|---------------|
|                       | gefiedert | ungefiedert | breit/rund | schmal/lanz. | verdreht | Anthocyan    | Petiolen | Hypokotyl | Primärwurzeln | Seitenwurzeln |
| T(0)                  | -         | +           | +          | -            | -        | (+)          | -        | -         | +             | (+)           |
| T(0)                  | -         | +           | +          | -            | -        | (+)          | -        | -         | +             | +             |
| T(0)                  | -         | +           | +          | -            | -        | (+)          | -        | -         | +             | (+)           |
| T(0)                  | -         | +           | -          | +            | -        | +            | -        | -         | +             | (+)           |
| T(0)                  | -         | +           | +          | -            | -        | (+)          | -        | -         | +             | (+)           |
| T(0)                  | -         | +           | +          | -            | -        | (+)          | -        | -         | +             | -             |
| T(0)                  | -         | +           | +          | -            | -        | (+)          | -        | -         | +             | -             |
| T(0,5)                | -         | +           | +          | -            | (+)      | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(0,5)                | -         | +           | +          | -            | (+)      | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(0,5)                | -         | +           | +          | -            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(0,5)                | -         | +           | +          | -            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(1)                  | -         | +           | +          | -            | -        | -            | -        | -         | +             | ++            |
| T(1)                  | -         | +           | +          | -            | -        | -            | -        | -         | +             | +             |
| T(1)                  | -         | +           | +          | -            | -        | -            | -        | -         | +             | ++            |
| T(1)                  | -         | +           | +          | -            | -        | -            | -        | -         | +             | ++            |
| T(1)                  | -         | +           | +          | +            | -        | +            | -        | -         | +             | ++            |
| T(1)                  | -         | +           | -          | +            | -        | +            | -        | -         | +             | +             |
| T(1)                  | -         | +           | +          | +            | -        | +            | -        | -         | +             | -             |
| T(1)                  | -         | +           | -          | +            | +        | +            | -        | -         | +             | (++)          |
| T(1)                  | -         | +           | -          | +            | +        | +            | -        | -         | +             | (++)          |
| T(1)                  | -         | +           | -          | +            | +        | +            | -        | -         | +             | (++)          |
| T(1)                  | -         | +           | -          | +            | +        | +            | -        | -         | +             | (++)          |
| T(1)                  | -         | +           | -          | +            | +        | +            | -        | -         | +             | (++)          |
| T(1)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(1)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | (++)          |
| T(1)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | (++)          |
| T(1)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(1)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | (++)          |

**Tab. 1/5: Bonitierungstabelle aller transgenen Karottenpflanzen**

**Transformation III (48h-Cokultur)**

Bonitiert wurden alle transgenen Karottenpflanzen. Die Abkürzung "lanz." in der Tabelle steht für lanzettförmig, "+" steht für "vorhanden", "-" für "nicht vorhanden", die Angaben in Klammern "(")" weisen auf ein Auftreten der morphologischen Ausprägung des Pflanzenteils in weniger als 50% der Versuchspflanzen hin. T(K) beschreibt die unsynchronisierte, transformierte Kontrolle. Die Angaben "T()" beziehen sich auf den Applikationszeitpunkt des *Agrobact. tum.* in Stunden nach Anregung des Zellzyklus, T(0) entspricht der Zugabe gleichzeitig mit 2'-Desoxy-Thymidin, T(0,5) entspricht der *Agrobacterium*-Applikation 30 min. nach Anregung des Zellzyklus durch 2'-Desoxy-Thymidin etc.

Doppeltes Auftreten von "+" oder "-" (d.h. "++" bzw. "--") beschreibt eine sehr starke Ausprägung der entsprechenden Morphologie des Pflanzenteils.

| Transf.-<br>Zeitpunkt | Blätter   |             |            |              |          | Blattfärbung | Petiolen | Hypokotyl | Wurzeln       |               |
|-----------------------|-----------|-------------|------------|--------------|----------|--------------|----------|-----------|---------------|---------------|
|                       | gefiedert | ungefiedert | breit/rund | schmal/lanz. | verdreht | Anthocyan    | Petiolen | Hypokotyl | Primärwurzeln | Seitenwurzeln |
| T(1,5)                | -         | +           | -          | +            | +        | +            | -        | -         | +             | (++)          |
| T(1,5)                | -         | +           | -          | +            | +        | +            | -        | -         | +             | (++)          |
| T(1,5)                | -         | +           | +          | -            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(1,5)                | -         | +           | -          | +            | +        | +            | -        | -         | +             | (++)          |
| T(1,5)                | -         | +           | -          | +            | +        | +            | -        | -         | +             | -             |
| T(1,5)                | -         | +           | -          | +            | +        | +            | -        | -         | +             | (++) (-)      |
| T(1,5)                | -         | +           | -          | +            | -        | +            | -        | -         | +             | ++            |
| T(1,5)                | -         | +           | -          | +            | -        | +            | -        | -         | +             | ++            |
| T(2)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(2)                  | +         | -           | -          | -            | -        | -            | +        | +         | +             | -             |
| T(2)                  | -         | +           | +          | -            | +        | (+)          | -        | -         | +             | -             |
| T(3)                  | +         | -           | -          | -            | -        | -            | +        | +         | +             | (+)           |
| T(3)                  | +         | -           | -          | -            | -        | -            | +        | +         | +             | (+)           |
| T(3)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(3)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(3)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(3)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(3)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(3)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | (++)          |
| T(4)                  | +         | -           | -          | -            | -        | -            | +        | +         | +             | -             |



**Tab. 1/6: Bonitierungstabelle aller transgenen Karottenpflanzen**

**Transformation III (48h-Cokultur)**

Bonitiert wurden alle transgenen Karottenpflanzen. Die Abkürzung "lanz." in der Tabelle steht für lanzettförmig, "+" steht für "vorhanden", "-" für "nicht vorhanden", die Angaben in Klammern "(")" weisen auf ein Auftreten der morphologischen Ausprägung des Pflanzenteils in weniger als 50% der Versuchspflanzen hin. T(K) beschreibt die unsynchronisierte, transformierte Kontrolle. Die Angaben "T()" beziehen sich auf den Applikationszeitpunkt des *Agrobact. tum.* in Stunden nach Anregung des Zellzyklus, T(0) entspricht der Zugabe gleichzeitig mit 2'-Desoxy-Thymidin, T(0,5) entspricht der *Agrobacterium*-Applikation 30 min. nach Anregung des Zellzyklus durch 2'-Desoxy-Thymidin etc.

| Transf.-<br>Zeitpunkt | Blätter   |             |            |              |          | Blattfärbung | Petiolen | Hypokotyl | Wurzeln       |               |
|-----------------------|-----------|-------------|------------|--------------|----------|--------------|----------|-----------|---------------|---------------|
|                       | gefiedert | ungefiedert | breit/rund | schmal/lanz. | verdreht | Anthocyan    | Petiolen | Hypokotyl | Primärwurzeln | Seitenwurzeln |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | -        | (+)          | -        | -         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | -        | +            | -        | -         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | -        | (+)          | -        | -         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | -        | (+)          | -        | -         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |
| T(6)                  | -         | +           | -          | +            | -        | -            | -        | -         | +             | -             |

**Tab. 2: Morphotypen und ihre Charakteristika**

Die Morphotypen wurden nach den Boniturdaten erstellt. "+" entspricht dem positiven Nachweis, "-" bedeutet "nicht beobachtbar".

| Morphotyp | Blätter                      |                               |                       | Fiederblätter         |                       | Blattfärbung | Petiolen | Wurzeln       |               |
|-----------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|----------|---------------|---------------|
|           | breite, ungefiederte Blätter | schmale, ungefiederte Blätter | spiralförmige Blätter | normale Fiederblätter | schmale Fiederblätter | Anthocyan    |          | Primärwurzeln | Seitenwurzeln |
| 1         | -                            | -                             | -                     | +                     | -                     | -            | +        | +             | +             |
| 2         | -                            | -                             | -                     | -                     | +                     | -            | -        | +             | -             |
| 3         | -                            | +                             | -                     | -                     | -                     | -            | -        | +             | -             |
| 4         | +                            | -                             | -                     | -                     | -                     | +            | -        | +             | -             |
| 5         | +                            | -                             | -                     | -                     | -                     | -            | -        | +             | +             |
| 6         | -                            | -                             | +                     | -                     | -                     | -            | -        | +             | -             |

### Tab. 3/1: Zusammenfassung der Boniturergebnisse aller transgenen Pflanzen als Morphotypenkatalogisierung

Das Auftreten des jeweiligen Morphotyps wird in Zusammenhang mit allen Transformationszeitpunkten im Verlauf der Zellzyklusprogression angegeben. **K** beschreibt die untransformierte, unsynchronisierte Kontrolle, **T(K)** die transformierte, unsynchronisierte Kontrolle. Der positive "+" und negative "-" Nachweis des Morphotyps der verschiedenen Transformationen erfolgte nach den Boniturergebnissen. Die Abkürzung "n.v." (=nicht vorhanden) bei der Transformation I (4 h Cokultur) bedeutet, daß zu den entsprechenden Transformationszeitpunkten T(1) und T(3) keine transgenen Pflanzen aus der Suspension entstanden waren.

| Transformation I<br>( 4 h Cokultur )  | Transformations-<br>zeit-<br>punkt | Morphotyp 1 | Morphotyp 2 | Morphotyp 3 | Morphotyp 4 | Morphotyp 5 | Morphotyp 6 |
|---------------------------------------|------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| MIT<br>Kokosnußmilch-<br>applikation  | T(K)                               | -           | -           | +           | -           | -           | -           |
|                                       | 0 h                                | -           | -           | +           | -           | +           | -           |
|                                       | 0,5 h                              | -           | -           | -           | +           | -           | -           |
|                                       | 1 h                                | n.v.        | n.v.        | n.v.        | n.v.        | n.v.        | n.v.        |
|                                       | 1,5 h                              | -           | -           | -           | +           | -           | -           |
|                                       | 2 h                                | -           | -           | +           | -           | +           | +           |
|                                       | 3 h                                | n.v.        | n.v.        | n.v.        | n.v.        | n.v.        | n.v.        |
|                                       | 4 h                                | -           | -           | +           | -           | +           | -           |
| OHNE<br>Kokosnußmilch-<br>applikation | K                                  | +           | -           | -           | -           | -           | -           |
|                                       | 6 h                                | +           | -           | -           | -           | -           | +           |

**Tab. 3/2: Zusammenfassung der Boniturergebnisse aller transgenen Pflanzen als Morphotypenkatalogisierung**

**K** beschreibt die untransformierte, unsynchronisierte Kontrolle, **T(K)** die transformierte, unsynchronisierte Kontrolle. Der positive "+" und negative "-" Nachweis des Morphotyps der verschiedenen Transformationen erfolgte nach den Boniturergebnissen.

| Transformation II<br>( 8 h Cokultur )   | Transformations-zeitpunkt | Morphotyp 1 | Morphotyp 2 | Morphotyp 3 | Morphotyp 4 | Morphotyp 5 | Morphotyp 6 |
|---|---------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|   | K                         | +           | -           | -           | -           | -           | -           |
|   | T(K)                      | +           | -           | +           | -           | +           | -           |
|   | 0 h                       | +           | -           | +           | -           | +           | -           |
|   | 0,5 h                     | +           | -           | +           | +           | +           | -           |
|   | 1 h                       | +           | -           | +           | -           | +           | -           |
|   | 1,5 h                     | -           | -           | +           | -           | +           | -           |
|   | 2 h                       | -           | -           | +           | -           | +           | -           |
|   | 3 h                       | +           | -           | +           | -           | -           | -           |
|   | 4 h                       | +           | +           | -           | -           | -           | -           |
|   | 6 h                       | +           | -           | +           | -           | -           | +           |
| Transformation III<br>( 48 h Cokultur ) | Transformations-zeitpunkt | Morphotyp 1 | Morphotyp 2 | Morphotyp 3 | Morphotyp 4 | Morphotyp 5 | Morphotyp 6 |
|   | K                         | +           | -           | -           | -           | -           | -           |
|   | T(K)                      | +           | -           | -           | -           | +           | -           |
|   | 0 h                       | +           | -           | -           | +           | +           | -           |
|   | 0,5 h                     | +           | -           | -           | +           | +           | -           |
|   | 1 h                       | +           | -           | +           | +           | +           | -           |
|   | 1,5 h                     | +           | -           | +           | -           | +           | +           |
|   | 2 h                       | +           | -           | +           | -           | -           | +           |
|   | 3 h                       | +           | -           | +           | -           | -           | -           |
|   | 4 h                       | +           | -           | +           | -           | -           | -           |
|   | 6 h                       | +           | -           | +           | -           | -           | -           |

**Tab. 4: Quantitative Auswertung aller transgenen Pflanzen nach Morphotypen**

Abhängig von der jeweiligen Transformations- bzw. Cokulturdauer wurden in den vorhandenen Gläsern alle transgenen Pflanzen im Hinblick auf die Häufigkeit des Auftretens (in Prozent) nach Morphotypen bonitiert. Bei der **Transformation I** (4 h Cokultur) kam es bei den Zeitpunkten T(1) und T(3) nicht zur Entwicklung von Pflanzen, nur zum Zeitpunkt T(6) der Transformation I wurde **keine** Kokosnußmilch appliziert. **T(K)** beschreibt die unsynchronisierte, transformierte Kontrolle.

| Transformation                 | Zeitpunkt der Transformation | Auftreten des Morphotyps 1 in % | Auftreten des Morphotyps 2 in % | Auftreten des Morphotyps 3 in % | Auftreten des Morphotyps 4 in % | Auftreten des Morphotyps 5 in % | Auftreten des Morphotyps 6 in % | Anzahl der bonitierten Gläsern |
|--------------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| <b>I</b><br>( 4 h Cokultur)    | T(K)                         | 0                               | 0                               | 100                             | 0                               | 0                               | 0                               | 1                              |
|                                | T (0)                        | 0                               | 0                               | 50                              | 0                               | 50                              | 0                               | 4                              |
|                                | T (0,5)                      | 0                               | 0                               | 0                               | 100                             | 0                               | 0                               | 4                              |
|                                | T (1)                        | 0                               | 0                               | 0                               | 0                               | 0                               | 0                               | 0                              |
|                                | T (1,5)                      | 0                               | 0                               | 0                               | 100                             | 0                               | 0                               | 4                              |
|                                | T (2)                        | 0                               | 0                               | 33,3                            | 0                               | 33,3                            | 33,3                            | 4                              |
|                                | T (3)                        | 0                               | 0                               | 0                               | 0                               | 0                               | 0                               | 0                              |
|                                | T (4)                        | 0                               | 0                               | 50                              | 0                               | 50                              | 0                               | 2                              |
|                                | T (6)                        | 50                              | 0                               | 0                               | 0                               | 0                               | 50                              | 9                              |
| <b>II</b><br>( 8 h Cokultur)   | T(K)                         | 50                              | 0                               | 25                              | 0                               | 25                              | 0                               | 5                              |
|                                | T (0)                        | 25                              | 0                               | 50                              | 0                               | 25                              | 0                               | 4                              |
|                                | T (0,5)                      | 10                              | 0                               | 30                              | 30                              | 30                              | 0                               | 4                              |
|                                | T (1)                        | 10                              | 0                               | 45                              | 0                               | 45                              | 0                               | 7                              |
|                                | T (1,5)                      | 0                               | 0                               | 80                              | 0                               | 20                              | 0                               | 6                              |
|                                | T (2)                        | 0                               | 0                               | 50                              | 0                               | 50                              | 0                               | 4                              |
|                                | T (3)                        | 20                              | 0                               | 80                              | 0                               | 0                               | 0                               | 5                              |
|                                | T (4)                        | 50                              | 50                              | 0                               | 0                               | 0                               | 0                               | 3                              |
|                                | T (6)                        | 20                              | 0                               | 35                              | 0                               | 10                              | 35                              | 4                              |
| <b>III</b><br>( 48 h Cokultur) | T(K)                         | 50                              | 0                               | 0                               | 0                               | 50                              | 0                               | 4                              |
|                                | T (0)                        | 30                              | 0                               | 10                              | 30                              | 30                              | 0                               | 8                              |
|                                | T (0,5)                      | 45                              | 0                               | 0                               | 10                              | 45                              | 0                               | 4                              |
|                                | T (1)                        | 20                              | 0                               | 40                              | 20                              | 30                              | 0                               | 15                             |
|                                | T (1,5)                      | 10                              | 0                               | 40                              | 0                               | 10                              | 40                              | 9                              |
|                                | T (2)                        | 20                              | 0                               | 40                              | 0                               | 0                               | 40                              | 3                              |
|                                | T (3)                        | 25                              | 0                               | 75                              | 0                               | 0                               | 0                               | 8                              |
|                                | T (4)                        | 50                              | 0                               | 50                              | 0                               | 0                               | 0                               | 1                              |
|                                | T (6)                        | 10                              | 0                               | 90                              | 0                               | 0                               | 0                               | 11                             |

**Tab. 5: Auswertung aller durchgeführten PCR-Untersuchungen an aufbereiteten, transgenen Pflanzenproben**

Aufgelistet sind die Proben nach den einzelnen Transformationen mit ihren unterschiedlichen Cokulturdauern. Bei der Transformation I sind alle Proben angegeben, die Pflanzen erbrachten. Die Morphotypen der Transformation I (4 h Cokultur) zum Zeitpunkt T(4) waren zu gering entwickelt, um Analysen durchzuführen.

| rol ABC I (4h-Cokultur)<br>Zeitpunkt der Transformation<br>nach Zellzyklusanregung<br>in Stunden    | rol A-Gen    |                  | rol B-Gen    |                  | rol C-Gen    |                  |
|---|--------------|------------------|--------------|------------------|--------------|------------------|
|   | Gesamtproben | Nachweis positiv | Gesamtproben | Nachweis positiv | Gesamtproben | Nachweis positiv |
| T(0)  | 3            | 3                | 3            | 2                | 3            | 3                |
| T(0,5)  | 3            | 3                | 3            | 3                | 3            | 3                |
| T(1,5)  | 9            | 6                | 4            | 3                | 3            | 3                |
| T(2)  | 6            | 5                | 5            | 2                | 4            | 4                |
| T(6)  | 10           | 8                | 8            | 6                | 7            | 7                |
| rol ABC II (8h-Cokultur)<br>Zeitpunkt der Transformation<br>nach Zellzyklusanregung<br>in Stunden   | rol A-Gen    |                  | rol B-Gen    |                  | rol C-Gen    |                  |
|   | Gesamtproben | Nachweis positiv | Gesamtproben | Nachweis positiv | Gesamtproben | Nachweis positiv |
| T(0)  | 3            | 3                | 6            | 2                | 7            | 3                |
| T(0,5)  | 3            | 3                | 3            | 0                | 3            | 0                |
| T(1)  | 4            | 2                | 7            | 3                | 7            | 3                |
| T(1,5)  | 3            | 3                | 3            | 0                | 3            | 0                |
| T(2)  | 3            | 3                | 6            | 3                | 7            | 3                |
| T(3)  | 4            | 2                | 10           | 3                | 10           | 5                |
| T(4)  | 3            | 3                | 3            | 0                | 3            | 3                |
| T(6)  | 4            | 4                | 5            | 2                | 5            | 1                |
| rol ABC III (48h-Cokultur)<br>Zeitpunkt der Transformation<br>nach Zellzyklusanregung<br>in Stunden | rol A-Gen    |                  | rol B-Gen    |                  | rol C-Gen    |                  |
|   | Gesamtproben | Nachweis positiv | Gesamtproben | Nachweis positiv | Gesamtproben | Nachweis positiv |
| T(0)  | 6            | 4                | 8            | 4                | 5            | 2                |
| T(0,5)  | 8            | 7                | 8            | 8                | 3            | 0                |
| T(1)  | 8            | 6                | 10           | 6                | 6            | 2                |
| T(1,5)  | 5            | 5                | 6            | 4                | 3            | 0                |
| T(2)  | 4            | 2                | 7            | 5                | 4            | 1                |
| T(3)  | 3            | 2                | 4            | 2                | 4            | 0                |
| T(4)  | 3            | 2                | 3            | 0                | 3            | 0                |
| T(6)  | 6            | 5                | 7            | 3                | 4            | 2                |

**Tab. 6: Gesamt-Auswertung der PCR-Ergebnisse aller rol-Gene bei allen verfügbaren transgenen Pflanzenproben**

Bezugnehmend auf Tab. 5 wird hier das zusammenfassende Ergebnis der PCR-Auswertung dargestellt. Bei der Transformation I (4 h Cokultur) werden einige Transformationszeitpunkte mit **"n.v." (=nicht vorhanden)** bezeichnet, da zu diesen Zeiten keine Pflanzenentwicklung stattgefunden hatte (T(1) und T(3)). Der Transformationszeitpunkt T(4) der Transformation I (4 h Cokultur) wird mit **"n.d." (=nicht durchgeführt)** angeführt, da zu wenig Pflanzenmaterial zur Durchführung vorhanden war. Der insgesamt betrachtete **positiv durchgeführte Nachweis** des entsprechenden rol-Gens wird mit **"+"**, der **negative** mit **"-"** kommentiert. Ergebnisse in Klammern ( ) weisen auf ein Auftreten **unter 50%** hin (s. Text). Die Transformation II wurde mit einer Cokulturdauer von 8 Stunden, die Transformation III mit 48 Stunden durchgeführt.

|                    | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt |
|--------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| <b>rol A</b>       | <b>T(0)</b>                        | <b>T(0,5)</b>                      | <b>T(1)</b>                        | <b>T(1,5)</b>                      | <b>T(2)</b>                        | <b>T(3)</b>                        | <b>T(4)</b>                        | <b>T(6)</b>                        |
| Transformation I   | +                                  | +                                  | n.v.                               | +                                  | +                                  | n.v.                               | n.d.                               | +                                  |
| Transformation II  | +                                  | +                                  | +                                  | +                                  | +                                  | +                                  | +                                  | +                                  |
| Transformation III | +                                  | +                                  | +                                  | +                                  | +                                  | +                                  | +                                  | +                                  |
|                    | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt |
| <b>rol B</b>       | <b>T(0)</b>                        | <b>T(0,5)</b>                      | <b>T(1)</b>                        | <b>T(1,5)</b>                      | <b>T(2)</b>                        | <b>T(3)</b>                        | <b>T(4)</b>                        | <b>T(6)</b>                        |
| Transformation I   | +                                  | +                                  | n.v.                               | +                                  | +                                  | n.v.                               | n.d.                               | +                                  |
| Transformation II  | -                                  | -                                  | +                                  | -                                  | +                                  | (+)                                | -                                  | -                                  |
| Transformation III | (+)                                | +                                  | +                                  | (+)                                | +                                  | (+)                                | -                                  | (+)                                |
|                    | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt | Trans-<br>formations-<br>zeitpunkt |
| <b>rol C</b>       | <b>T(0)</b>                        | <b>T(0,5)</b>                      | <b>T(1)</b>                        | <b>T(1,5)</b>                      | <b>T(2)</b>                        | <b>T(3)</b>                        | <b>T(4)</b>                        | <b>T(6)</b>                        |
| Transformation I   | +                                  | +                                  | n.v.                               | +                                  | +                                  | n.v.                               | n.d.                               | +                                  |
| Transformation II  | (+)                                | -                                  | (+)                                | -                                  | (+)                                | (+)                                | +                                  | -                                  |
| Transformation III | (+)                                | -                                  | (-)                                | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | +                                  |

**Tab. 7: Schema der durchgeführten Southern Blots**

Die aufgetragenen, verdauten DNS-Proben der transgenen Pflanzen waren Mischproben verschiedener Pflanzen des gleichen Transformationszeitpunktes eines Gläschens, da die einzelnen Pflanzen eine zu geringe DNS-Menge erbracht hatten.

| Nummer des durchgeführten Blots | DNS-Proben der transgenen Pflanzen der Transformation       | Nachweis des Gens | Slot 1 | Slot 2  | Slot 3 | Slot 4 | Slot 5 | Slot 6 | Slot 7 |
|---------------------------------|---|-------------------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1                               | I ( 4 h Cokultur) Slot 2-4                                  | rol A             | Marker | T(0)    | T(2)   | T(6)   | Marker |        |        |
| 2                               | I ( 4 h Cokultur) Slot 2-5                                  | rol B             | Marker | T(0)    | T(0,5) | T(1,5) | T(2)   | Marker |        |
| 3                               | III ( 48 h Cokultur) Slot 2-4                               | rol B             | Marker | T (0,5) | T(1)   | T(2)   | Marker |        |        |
| 4                               | I ( 4 h Cokultur) Slot 2-4                                  | rol C             | Marker | T (1,5) | T(2)   | T(6)   | Marker |        |        |
| 5                               | II ( 8 h Cokultur) Slot 2-5/<br>III ( 48 h Cokultur) Slot 6 | rol C             | Marker | T(0)    | T(1)   | T(2)   | T(3)   | T(0)   | Marker |
| 6                               | II ( 8 h Cokultur) Slot 2-5                                 | rol B             | Marker | T(1)    | T(2)   | T(3)   | T(6)   | Marker |        |



**Tab. 8/1: Übersicht über die durchgeführten Southern Blots und die MG-Bereiche der detektierten Banden in Bezug auf die Transformationsbedingungen**

Die aufgetragenen Pflanzen-DNS-Proben waren Mischproben verschiedener Pflanzen der gleichen Morphotypen des entsprechenden Transformationszeitpunktes. Das Auftreten mehrerer Banden bei einem Transformationszeitpunkt wird durch Schrägstriche (/) in der MG-Angabe berücksichtigt, "n.d." bedeutet "nicht durchgeführt".

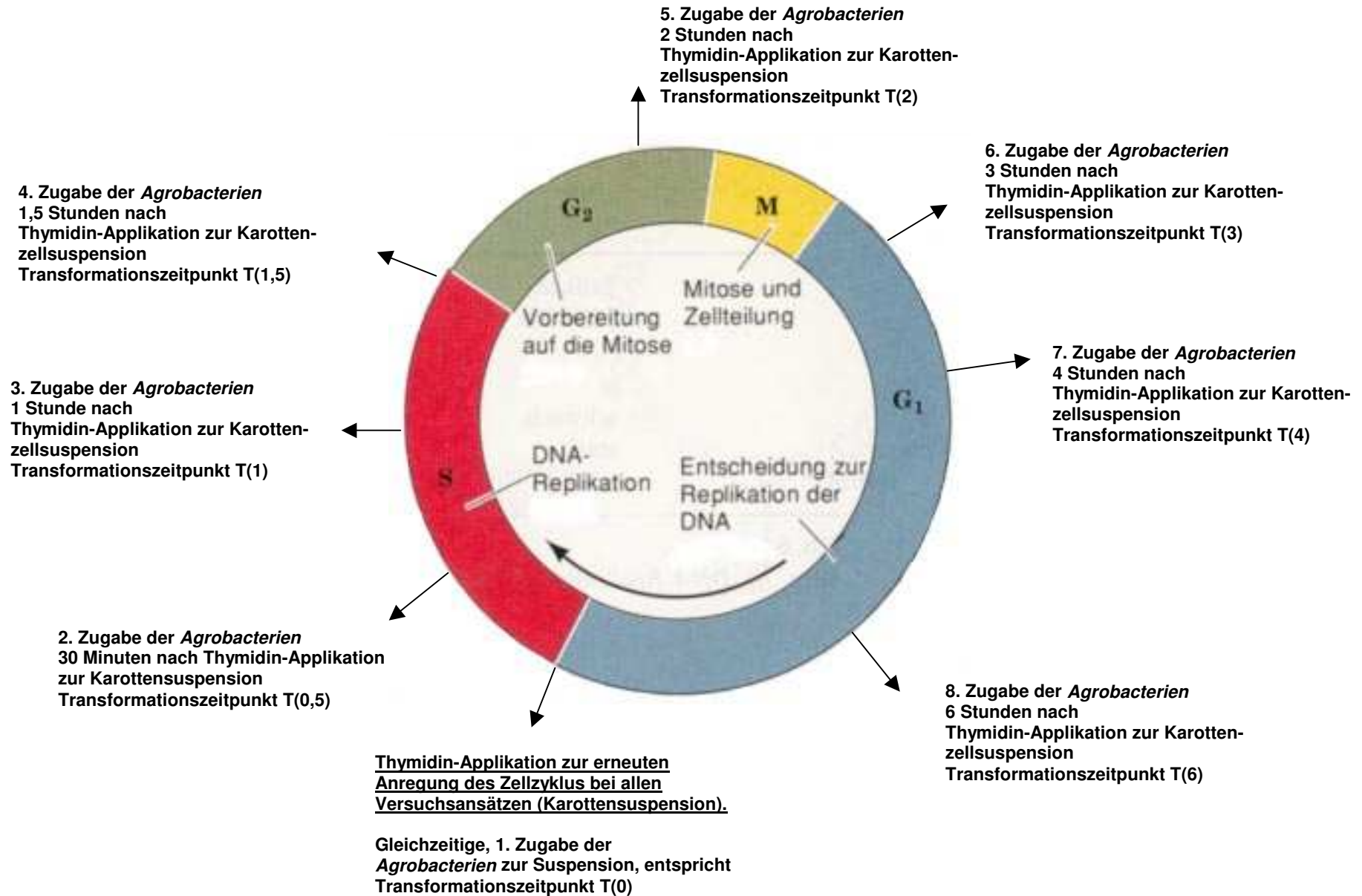
| Transformation                  | rol-Gen  | Transformationszeitpunkt |        |             |        |            |         |      |               |
|---------------------------------|----------|--------------------------|--------|-------------|--------|------------|---------|------|---------------|
|                                 |          | T(0)                     | T(0,5) | T(1)        | T(1,5) | T(2)       | T(3)    | T(4) | T(6)          |
| I (4h Cokultur)                 | <b>A</b> |                          |        |             |        |            |         |      |               |
| <b>MG der Banden</b>            |          | 7.000                    | n.d.   | n.d.        | n.d.   | 750        | n.d.    | n.d. | 22.000        |
| <b>aufgetretene Morphotypen</b> |          | 3 und 5                  |        |             |        | 3, 5 und 6 |         |      | 1 und 6       |
| I (4h Cokultur)                 | <b>B</b> |                          |        |             |        |            |         |      |               |
| <b>MG der Banden</b>            |          | 850                      | 690    | n.d.        | 1.400  | 720        | n.d.    | n.d. | n.d.          |
| <b>aufgetretene Morphotypen</b> |          | 3 und 5                  | 4      |             | 4      | 3, 5 und 6 |         |      |               |
| I (4h Cokultur)                 | <b>C</b> |                          |        |             |        |            |         |      |               |
| <b>MG der Banden</b>            |          | n.d.                     | n.d.   | n.d.        | 1.950  | 650        | n.d.    | n.d. | 1.000         |
| <b>aufgetretene Morphotypen</b> |          |                          |        |             | 4      | 3, 5 und 6 |         |      | 1 und 6       |
| II (8 h Cokultur)               | <b>A</b> |                          |        |             |        |            |         |      |               |
| <b>MG der Banden</b>            |          | n.d.                     | n.d.   | n.d.        | n.d.   | n.d.       | n.d.    | n.d. | n.d.          |
| II (8 h Cokultur)               | <b>B</b> |                          |        |             |        |            |         |      |               |
| <b>MG der Banden</b>            |          | n.d.                     | n.d.   | 1.200/1.100 | n.d.   | 1.950      | 1.700   | n.d. | 25.000/1.300  |
| <b>aufgetretene Morphotypen</b> |          |                          |        | 1, 3 und 5  |        | 3 und 5    | 1 und 3 |      | 1, 3, 5 und 6 |

**Tab. 8/2: Übersicht über die durchgeführten Southern Blots und die MG-Bereiche der detektierten Banden in Bezug auf die Transformationsbedingungen**

Die aufgetragenen Pflanzen-DNS-Proben waren Mischproben verschiedener Pflanzen der gleichen Morphotypen des entsprechenden Transformationszeitpunktes. Das Auftreten mehrerer Banden bei einem Transformationszeitpunkt wird durch Schrägstriche (/) in der MG-Angabe berücksichtigt, "n.d." bedeutet "nicht durchgeführt".

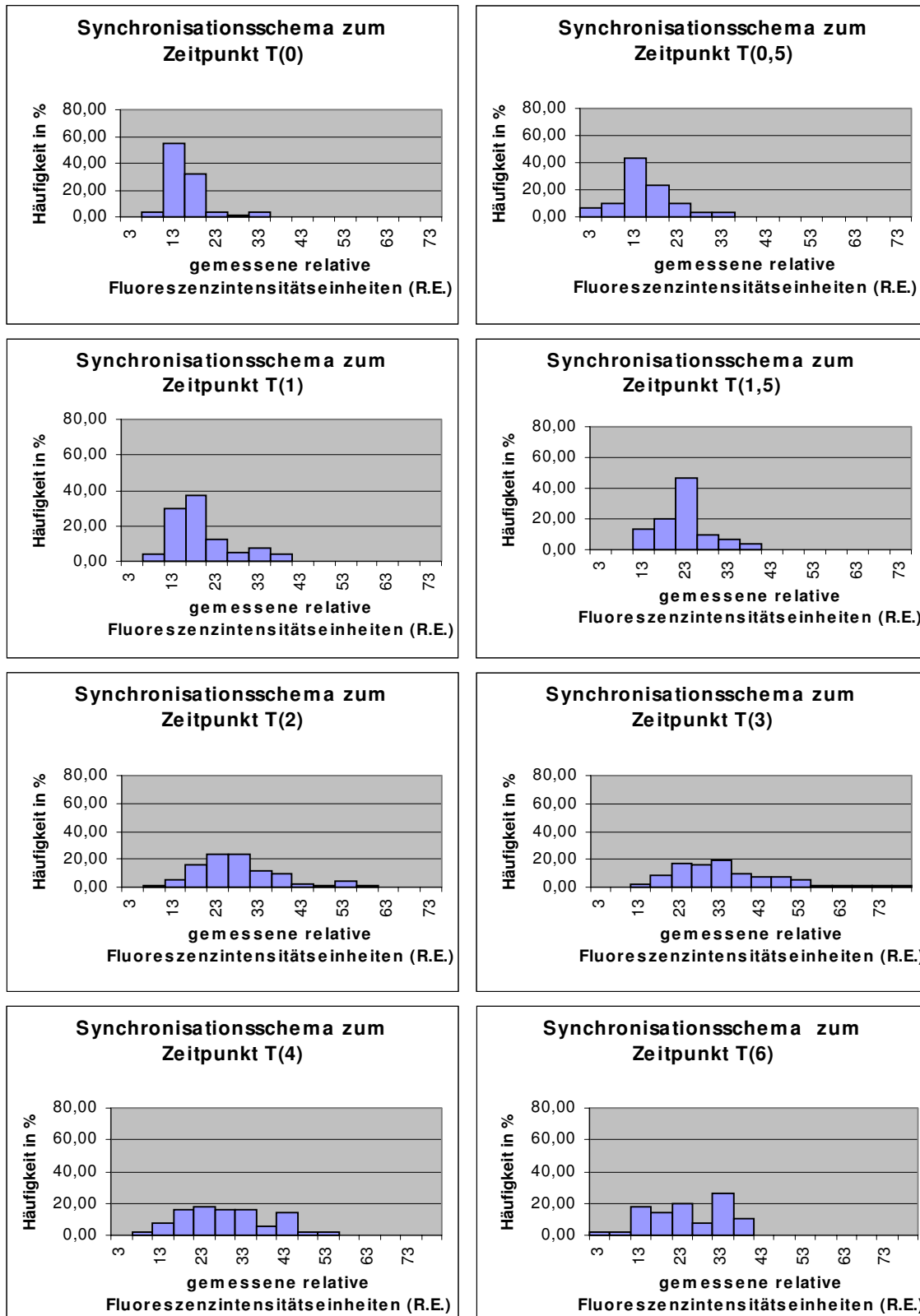
| Transformation                  | rol-Gen  | Transformationszeitpunkt |            |               |        |            |         |      |      |
|---------------------------------|----------|--------------------------|------------|---------------|--------|------------|---------|------|------|
|                                 |          | T(0)                     | T(0,5)     | T(1)          | T(1,5) | T(2)       | T(3)    | T(4) | T(6) |
| <b>II (8 h Cokultur)</b>        | <b>C</b> |                          |            |               |        |            |         |      |      |
| <b>MG der Banden</b>            |          | 1.200                    | n.d.       | 1.950         | n.d.   | 900        | 1.800   | n.d. | n.d. |
| <b>aufgetretene Morphotypen</b> |          | 1, 3 und 5               |            | 1, 3 und 5    |        | 3 und 5    | 1 und 3 |      |      |
| <b>III (48 h Cokultur)</b>      | <b>A</b> |                          |            |               |        |            |         |      |      |
| <b>MG der Banden</b>            |          | n.d.                     | n.d.       | n.d.          | n.d.   | n.d.       | n.d.    | n.d. | n.d. |
| <b>III (48 h Cokultur)</b>      | <b>B</b> |                          |            |               |        |            |         |      |      |
| <b>MG der Banden</b>            |          | n.d.                     | 6.000      | 1.950         | n.d.   | 3.500      | n.d.    | n.d. | n.d. |
| <b>aufgetretene Morphotypen</b> |          |                          | 1, 4 und 5 | 1, 3, 4 und 5 |        | 1, 3 und 6 |         |      |      |
| <b>III (48 h Cokultur)</b>      | <b>C</b> |                          |            |               |        |            |         |      |      |
| <b>MG der Banden</b>            |          | 25.000/10.000            | n.d.       | n.d.          | n.d.   | n.d.       | n.d.    | n.d. | n.d. |
| <b>aufgetretene Morphotypen</b> |          | 1, 3, 4 und 5            |            |               |        |            |         |      |      |

**Abb. 6: Thymidin-Applikation und *Agrobacterium*-Zugabe innerhalb des Zellzyklus nach 24stündiger FdU-Wirkung**



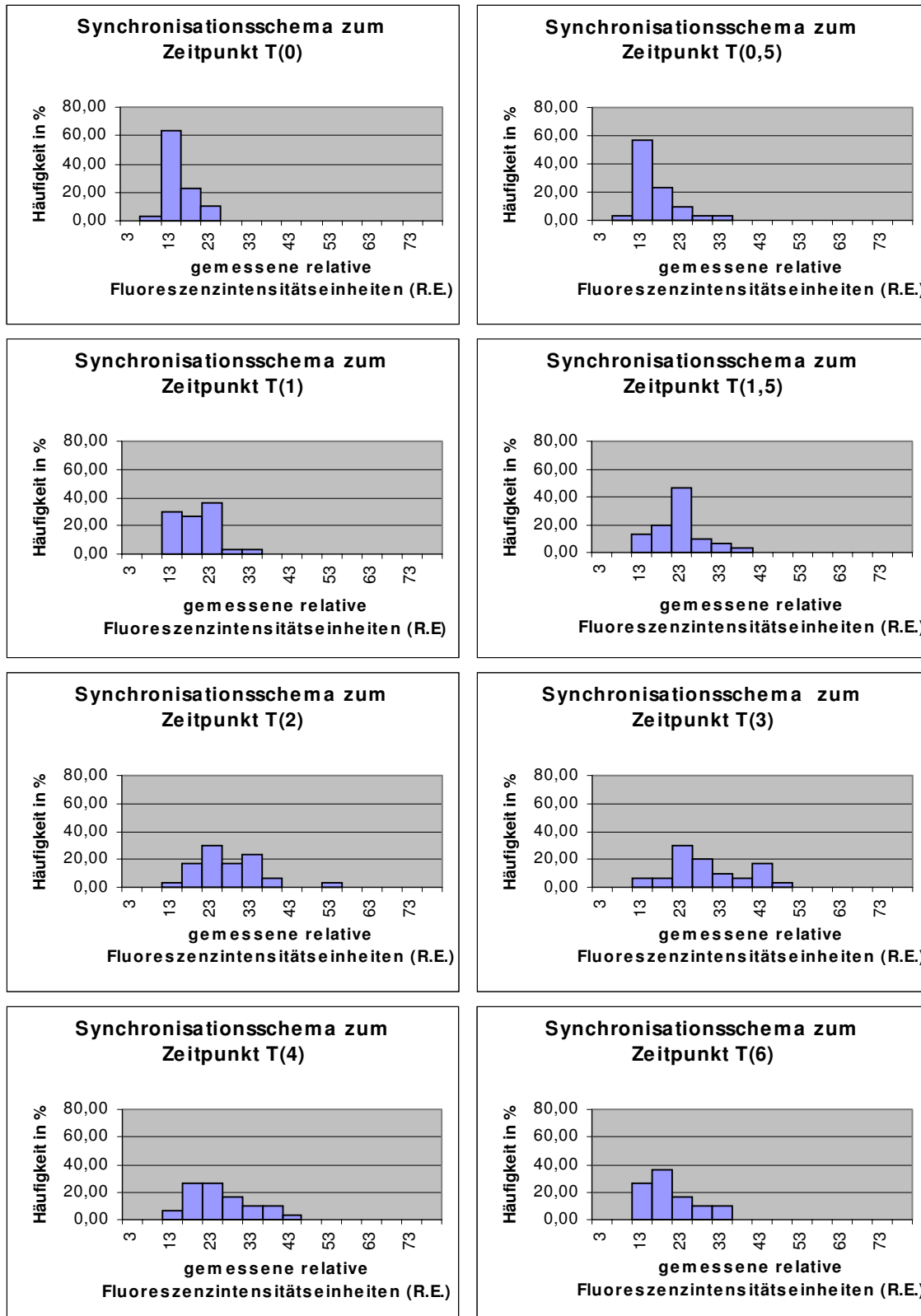
## Abb. 9: Synchronisationsschemata der Bisbenzimid-Messung der *Daucus carota*-Kerne der Suspensionen der Transformation I (4 h Cokultur)

Auf der **Abszisse** wurden die **bereinigten, relativen Fluoreszenzintensitätseinheiten** der gemessenen *Daucus carota*-Kerne bei der Bisbenzimid-Messung aufgetragen, auf der **Ordinate** ihre **Häufigkeit in %** zu den jeweils angegebenen **Zeitpunkten T** nach Anregung des Zellzyklus.



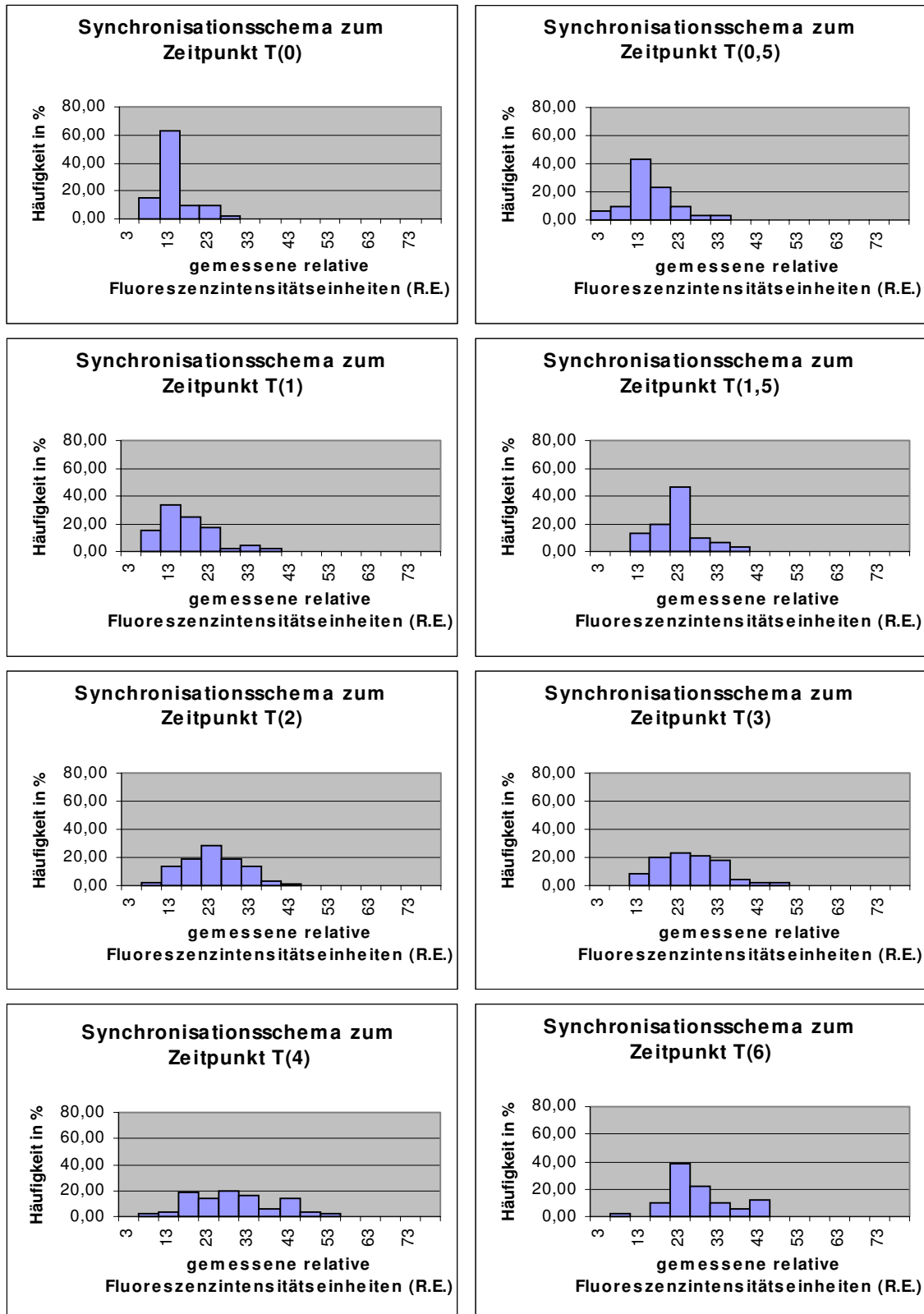
## Abb. 10: Synchronisationsschemata der Bisbenzimid-Messung der *Daucus carota*-Kerne der Suspensionen der Transformation II (8 h Cokultur)

Auf der **Abszisse** wurden die **bereinigten, relativen Fluoreszenzintensitätseinheiten** der gemessenen *Daucus carota*-Kerne bei der Bisbenzimid-Messung aufgetragen, auf der **Ordinate** ihre **Häufigkeit in %** zu den jeweils angegebenen **Zeitpunkten T** nach Anregung des Zellzyklus.



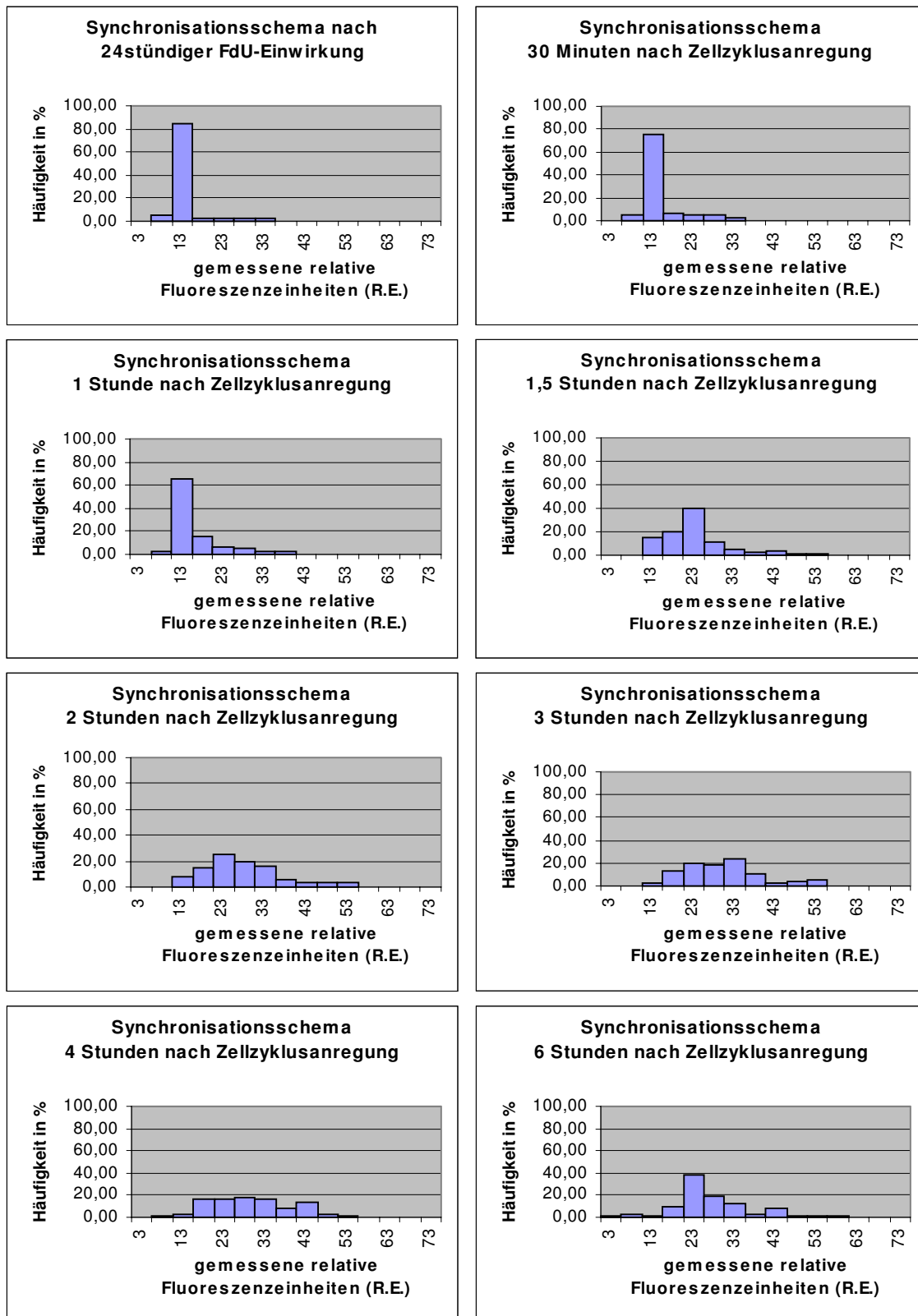
## Abb. 11: Synchronisationsschemata der Bisbenzimid-Messung der *Daucus carota*-Kerne der Suspensionen der Transformation III (48 h Cokultur)

Auf der **Abszisse** wurden die **bereinigten, relativen Fluoreszenzintensitätseinheiten** der gemessenen *Daucus carota*-Kerne bei der Bisbenzimid-Messung aufgetragen, auf der **Ordinate** ihre **Häufigkeit in %** zu den jeweils angegebenen **Zeitpunkten T** nach Anregung des Zellzyklus.

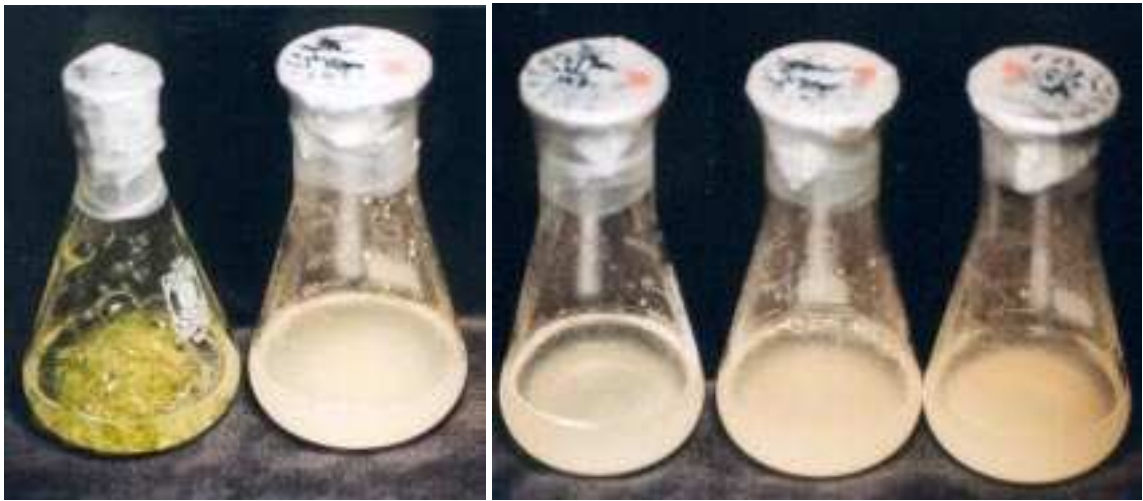


## Abb. 12: Synchronisationsschemata der Bisbenzimid-Messung der *Daucus carota*-Kerne einer $B_5^+$ -Suspension

Auf der **Abszisse** wurden die **bereinigten, relativen Fluoreszenzintensitätseinheiten** der gemessenen *Daucus carota*-Kerne bei der Bisbenzimid-Messung aufgetragen, auf der **Ordinate** ihre **Häufigkeit in %** zu den jeweils angegebenen **Zeitpunkten T** nach Anregung des Zellzyklus.



**Abb. 13: Suspensionskulturen der verschiedenen Zeitpunkte der Transformation I (4 h Cokultur) nach 77 Tagen Kultur im Vergleich**



nichttrans-  
formierte  
Kontrolle

transformierte,  
unsynchroni-  
sierte Kontrolle

T(0)

T(0,5)

T(1)



unsyn-  
chronisierte,  
transformierte  
Kontrolle

T(1,5)

T(2)

T(3)

T(4)

T(6)



**Abb.14: Suspensionskulturen der verschiedenen Zeitpunkte der Transformation II (8 h Cokultur) nach 14 Tagen Kultur im Vergleich**



**transfor-  
mierte, un-  
synchroni-  
sierte  
Kontrolle**

**T(0)**

**T(0,5)**

**T(1)**

**T(1,5)**

**T(2)**

**T(3)**

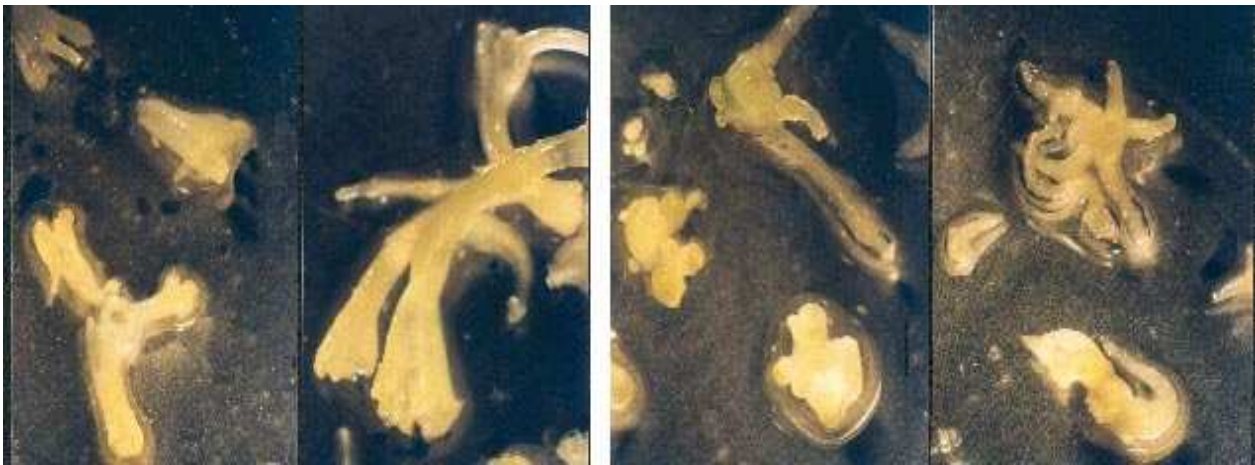


**transformierte,  
unsynchroni-  
sierte Kontrolle**

**T(4)**

**T(6)**

**Abb.15: Embryonalstadien der verschiedenen Transformationszeitpunkte der Transformation II (8 h Cokultur) nach 21 Tagen Kultur im Vergleich**



**transformierte, unsynchronisierte Kontrolle**

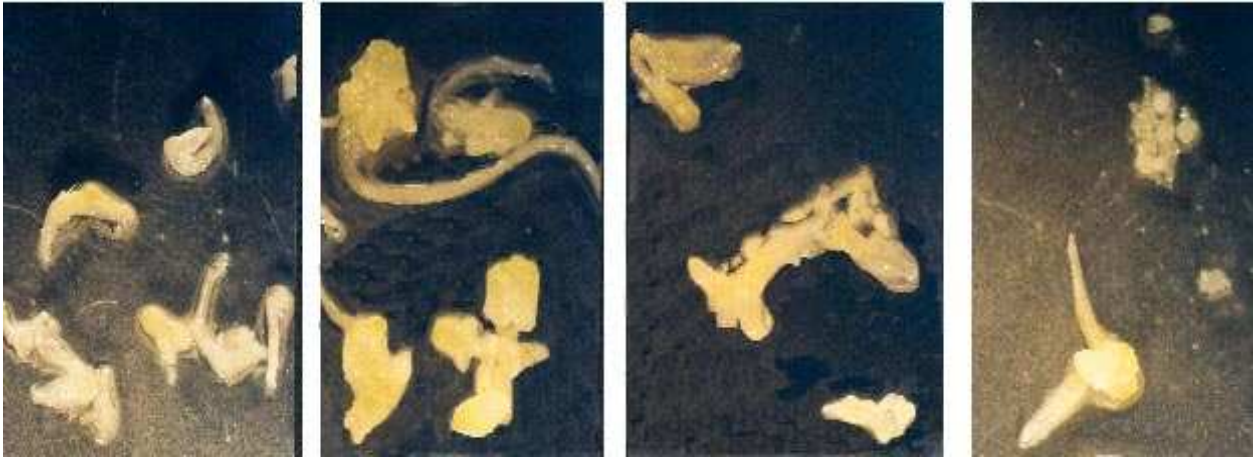
**T(0)**



**T(0,5)**

**T(1)**

**T(1,5)**



**T(2)**

**T(3)**

**T(4)**

**T(6)**

## Abb. 16: Einteilung der Morphotypen



**Morphotyp 1**

- besitzt Kotyledonen, Hypokotyl, Petiolen, normales Wurzelwachstum



**Morphotyp 2**

- ähnlich wie Morphotyp 1
- jedoch mit schmalen, etiolierten Laubblättern
- Bewurzelung



**Morphotyp 3**

- schmale Blätter ohne Petiolen
- Bewurzelung



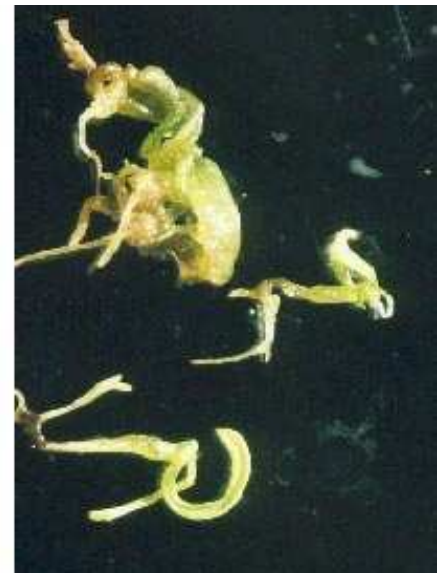
**Morphotyp 4**

- breite, häufig mit Anthocyan gefärbte Blätter ohne Petiolen, Bewurzelung



**Morphotyp 5**

- ähnlich wie Morphotyp 4
- breite, grüne Blätter ohne Anthocyanbildung
- keine Kotyledonen
- Primär- und Seitenwurzeln



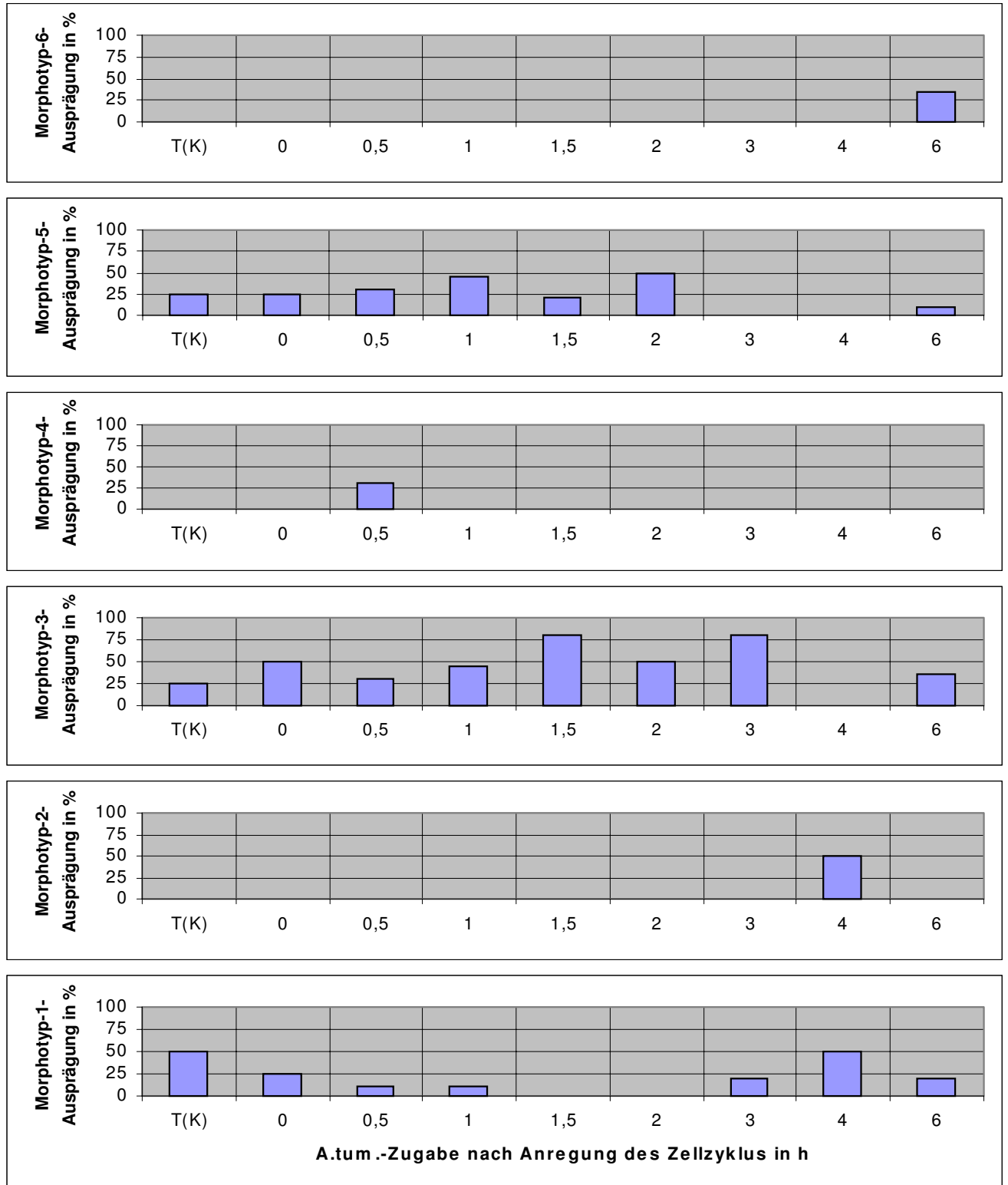
**Morphotyp 6**

- sehr kleine Pflanzen
- keine Kotyledonen
- in sich verdrehte, spiralförmige Blätter
- Bewurzelung



## Abb. 18: Auftreten der verschiedenen Morphotypen nach Zellzyklusanregung bei der Transformation II (8 h Cokultur)

Auf der **Abzisse** wurde der **Transformationszeitpunkt in Stunden (h)** nach Anregung des Zellzyklus mit Thymidin aufgetragen, auf der **Ordinate** die **Häufigkeit des Auftretens** des entsprechenden Morphotyps (1 - 6), ausgedrückt in % der bonitierten Pflanzen des jeweiligen Transformationszeitpunktes T. **T(K)** beschreibt die transformierte, unsynchronisierte Kontrolle. Die Bonitur wurde nach einer Kulturdauer von 10 Wochen vorgenommen. Am Fuße der Abbildung wurde zur Orientierung die jeweilige **Phase des Zellzyklus** während der Transformation aufgetragen (nach FROESE, 1993).



Phase im Zellzyklus

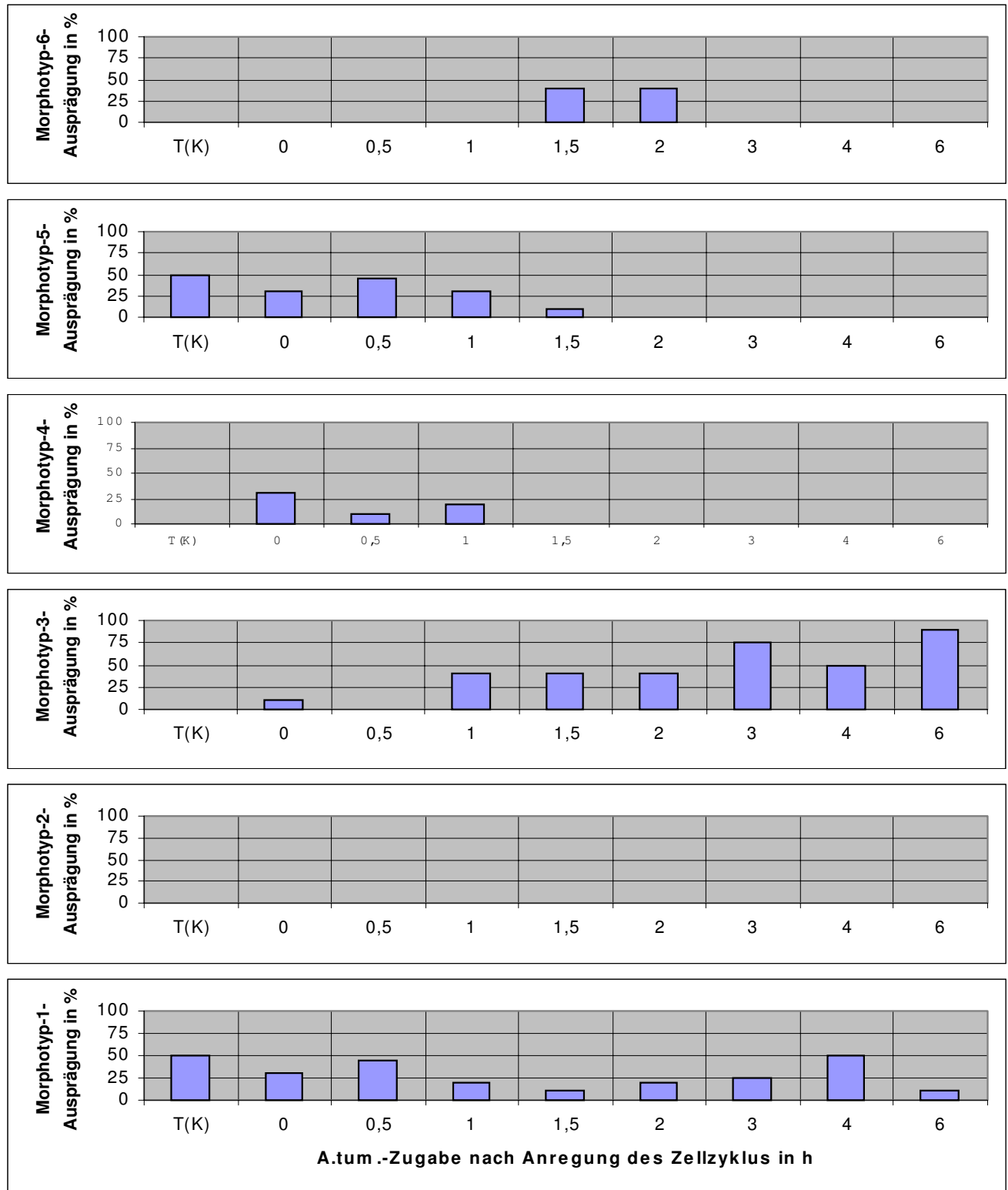
S-

G<sub>2</sub>-/ M-

G<sub>1</sub>-Phase

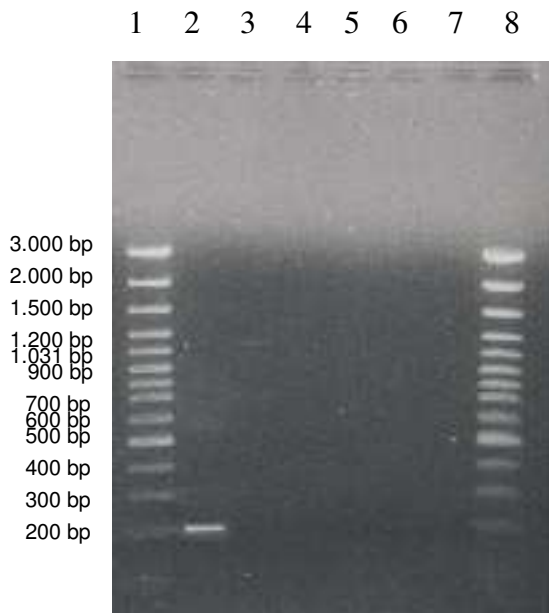
## Abb. 19: Auftreten der verschiedenen Morphotypen nach Zellzyklusanregung bei der Transformation III (48 h Cokultur)

Auf der **Abzisse** wurde der **Transformationszeitpunkt in Stunden (h)** nach Anregung des Zellzyklus mit Thymidin aufgetragen, auf der **Ordinate** die **Häufigkeit des Auftretens** des entsprechenden Morphotyps (1 - 6), ausgedrückt in % der bonitierten Pflanzen des jeweiligen Transformationszeitpunktes T. **T(K)** beschreibt die transformierte, unsynchronisierte Kontrolle. Die Bonitur wurde nach einer Kulturdauer von 25 Wochen vorgenommen. Am Fuße der Abbildung wurde zur Orientierung die jeweilige **Phase des Zellzyklus** während der Transformation aufgetragen (nach FROESE, 1993).

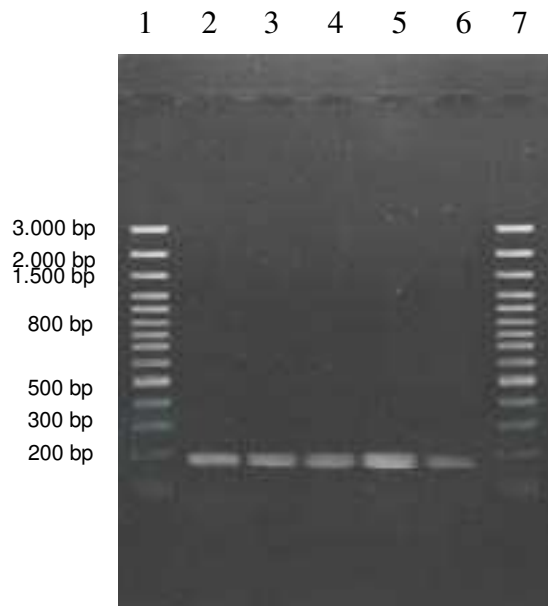


Phase im Zellzyklus S- G<sub>2</sub>-/ M- G<sub>1</sub>-Phase ➔

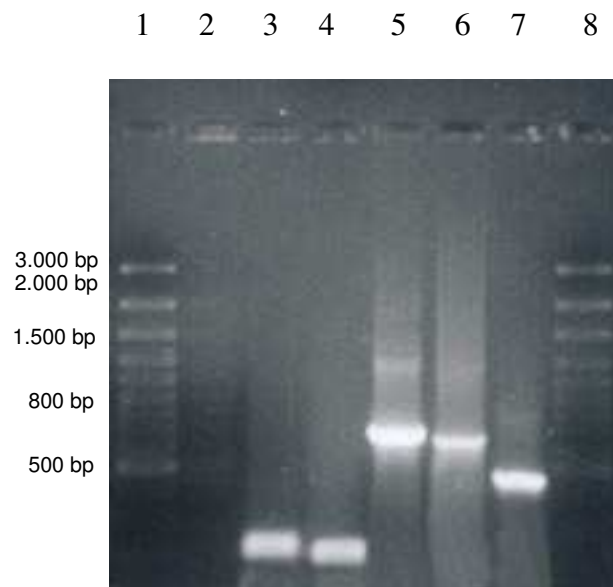
**Abb. 20: Ausgewählte Elektrophoresen der PCR-Nachweise des rolA-Gens (bei einer Größe der amplifizierten rolA-Sequenz von 193 bp) der Transformation I (4 h Cokultur) sowie der Plasmidpräparation**



Slot 1: 100 bp-Marker  
 Slot 2: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0,5)  
 Slot 3: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1,5)  
 Slot 4: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1,5)  
 Slot 5: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1,5)  
 Slot 6: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(2)  
 Slot 7: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(2)  
 Slot 8: 100 bp-Marker

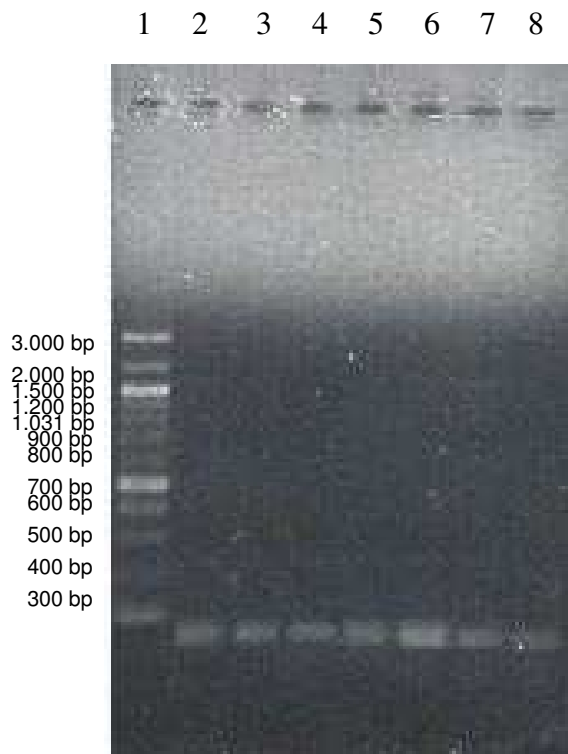


Slot 1: 100 bp-Marker  
 Slot 2: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0,5)  
 Slot 3: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1,5)  
 Slot 4: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(2)  
 Slot 5: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(6)  
 Slot 6: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(6)  
 Slot 7: 100 bp-Marker

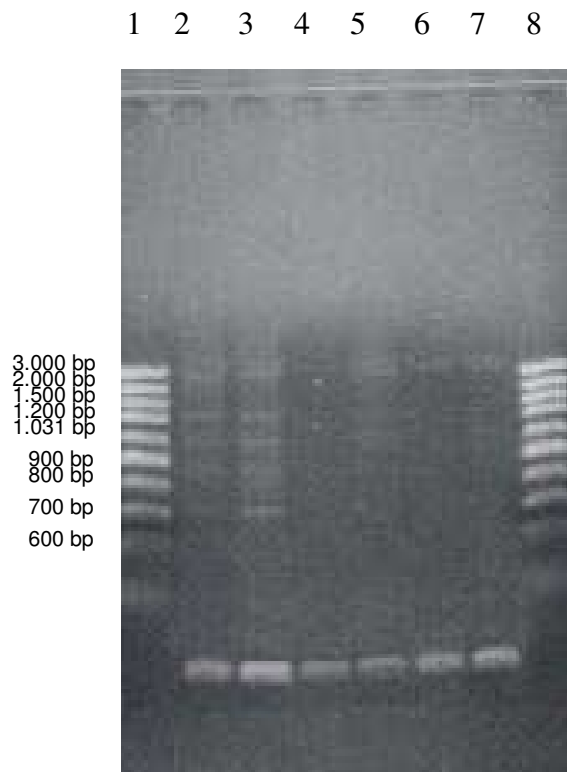


Slot 1: 100bp-Marker  
 Slot 2: genomische Karotten-DNS-Probe  
 Slot 3: Plasmid-DNS-rolA  
 Slot 4: Plasmid-DNS-rolA  
 Slot 5: Plasmid-DNS-rolB  
 Slot 6: Plasmid-DNS-rolB  
 Slot 7: Plasmid-DNS-rolC  
 Slot 8: 100 bp-Marker

**Abb. 21: Ausgewählte Elektrophoresen der PCR-Nachweise des rolA-Gens (bei einer Größe der amplifizierten rolA-Sequenz von 193 bp) der Transformation II (8 h Cokultur)**



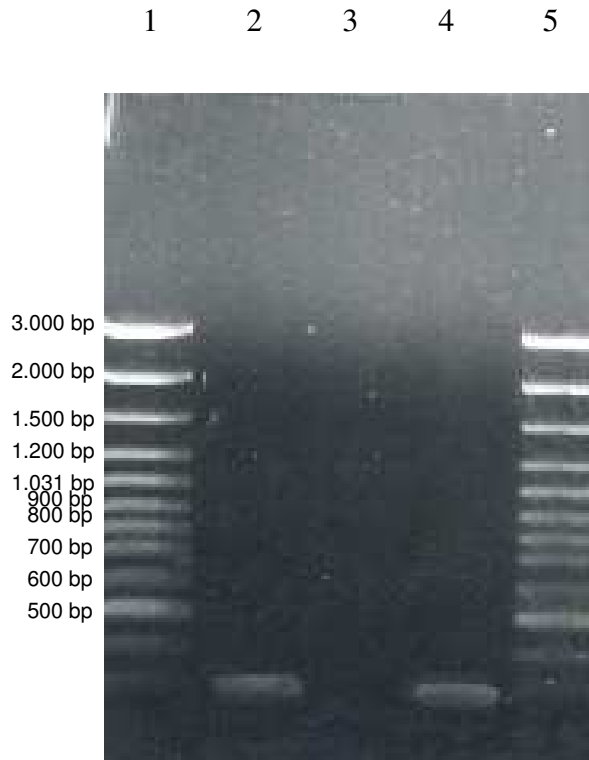
Slot 1: 100 bp-Marker  
 Slot 2: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0)  
 Slot 3: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0,5)  
 Slot 4: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0,5)  
 Slot 5: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1,5)  
 Slot 6: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1,5)  
 Slot 7: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(2)  
 Slot 8: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(6)



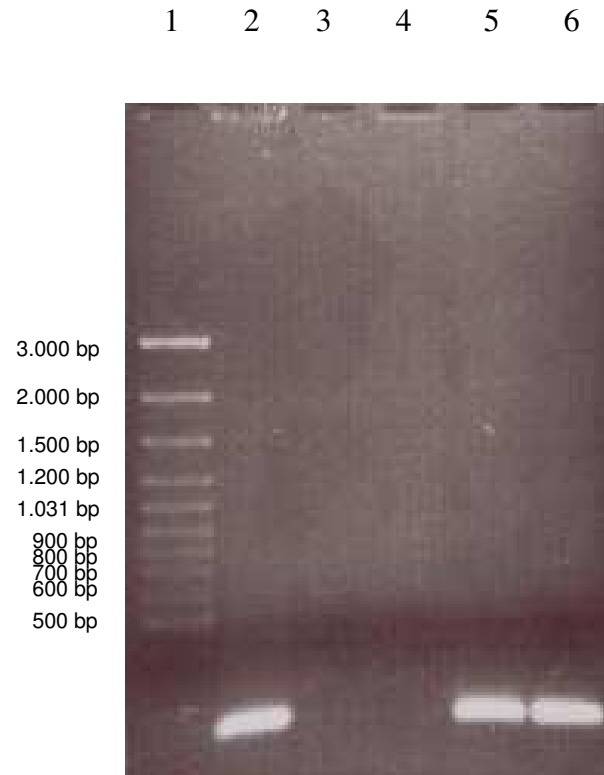
Slot 1: 100bp-Marker  
 Slot 2: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1)  
 Slot 3: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(3)  
 Slot 4: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(4)  
 Slot 5: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(4)  
 Slot 6: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(6)  
 Slot 7: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(6)  
 Slot 8: 100bp-Marker



**Abb. 22: Ausgewählte Elektrophoresen der PCR-Nachweise des rolA-Gens (bei einer Größe der amplifizierten rolA-Sequenz von 193 bp) der Transformation III (48 h Cokultur)**

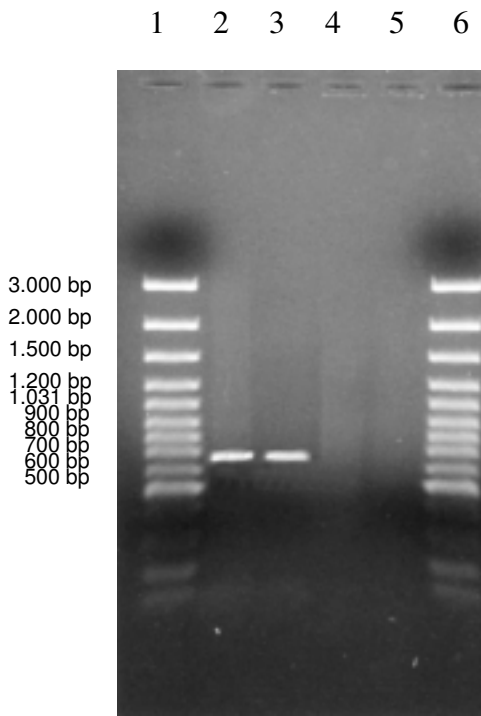


Slot 1: 100 bp-Marker  
 Slot 2: Pflanzen-DNA-Probe zum Zeitpunkt T(0)  
 Slot 3: Pflanzen-DNA-Probe zum Zeitpunkt T(0,5)  
 Slot 4: Pflanzen-DNA-Probe zum Zeitpunkt T(3)  
 Slot 5: 100 bp-Marker

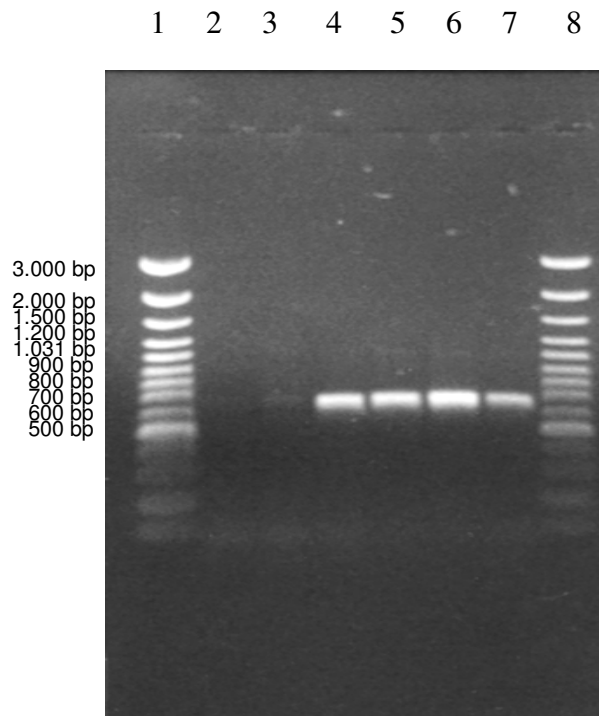


Slot 1: 100 bp-Marker  
 Slot 2: Pflanzen-DNA-Probe zum Zeitpunkt T(1)  
 Slot 3: Pflanzen-DNA-Probe zum Zeitpunkt T(0)  
 Slot 4: Pflanzen-DNA-Probe zum Zeitpunkt T(3)  
 Slot 5: Pflanzen-DNA-Probe zum Zeitpunkt T(0,5)  
 Slot 6: Pflanzen-DNA-Probe zum Zeitpunkt T(4)

**Abb. 23: Ausgewählte Elektrophoresen der PCR-Nachweise des rolB- Gens (bei einer Größe der amplifizierten rolB-Sequenz von 666 bp) der Transformation I (4 h Cokultur)**

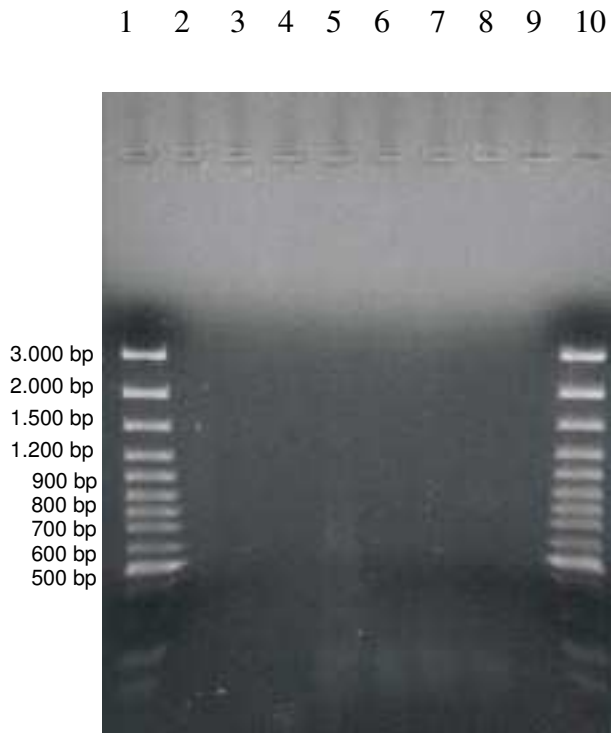


Slot 1: 100 bp-Marker  
 Slot 2: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(2)  
 Slot 3: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1,5)  
 Slot 4: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(6)  
 Slot 5: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(6)  
 Slot 6: 100 bp-Marker

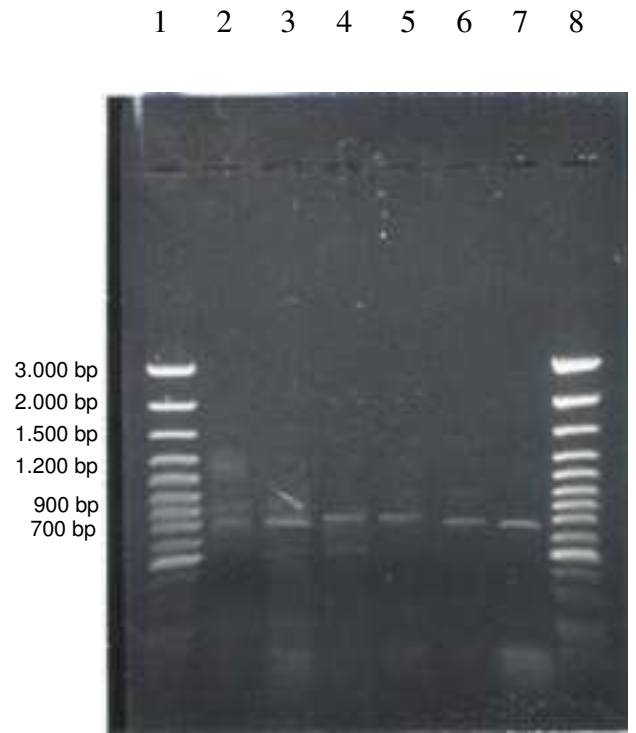


Slot 1: 100 bp-Marker  
 Slot 2: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(2)  
 Slot 3: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(2)  
 Slot 4: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(6)  
 Slot 5: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(6)  
 Slot 6: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(6)  
 Slot 7: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(6)  
 Slot 8: 100 bp-Marker

**Abb. 24: Ausgewählte Elektrophoresen der PCR-Nachweise des rolB-Gens (bei einer Größe der amplifizierten rolB-Sequenz von 666 bp) der Transformation II (8 h Cokultur)**

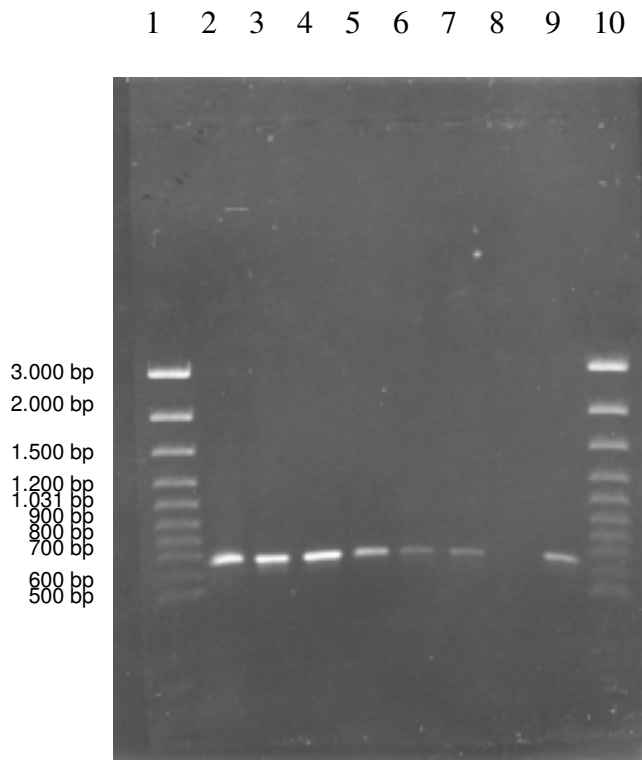


Slot 1: 100 bp-Marker  
Slot 2: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0)  
Slot 3: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1)  
Slot 4: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0)  
Slot 5: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1)  
Slot 6: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(2)  
Slot 7: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(3)  
Slot 8: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(6)  
Slot 9: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(6)  
Slot 10: 100 bp-Marker

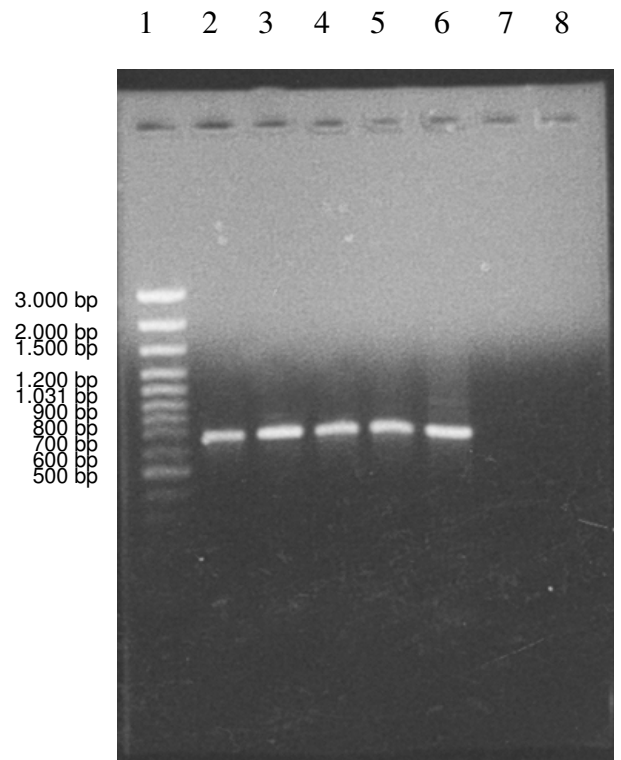


Slot 1: 100 bp-Marker  
Slot 2: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(2)  
Slot 3: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0)  
Slot 4: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0)  
Slot 5: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(3)  
Slot 6: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1)  
Slot 7: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(2)  
Slot 8: 100 bp-Marker

**Abb. 25: Ausgewählte Elektrophoresen der PCR-Nachweise des rolB-Gens (bei einer Größe der amplifizierten rolB-Sequenz von 666 bp) der Transformation III (48 h Cokultur)**

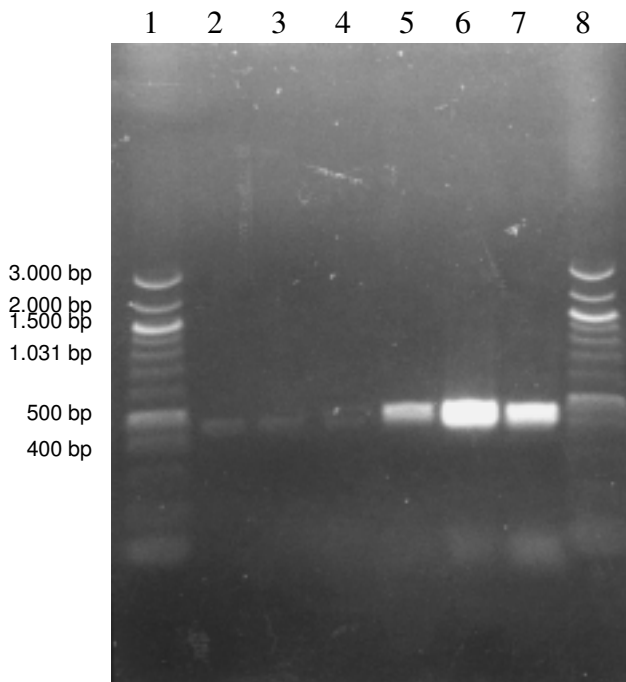


Slot 1: 100 bp-Marker  
 Slot 2: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0)  
 Slot 3: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0,5)  
 Slot 4: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0,5)  
 Slot 5: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1)  
 Slot 6: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0)  
 Slot 7: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1)  
 Slot 8: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1,5)  
 Slot 9: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1,5)  
 Slot 10: 100 bp-Marker

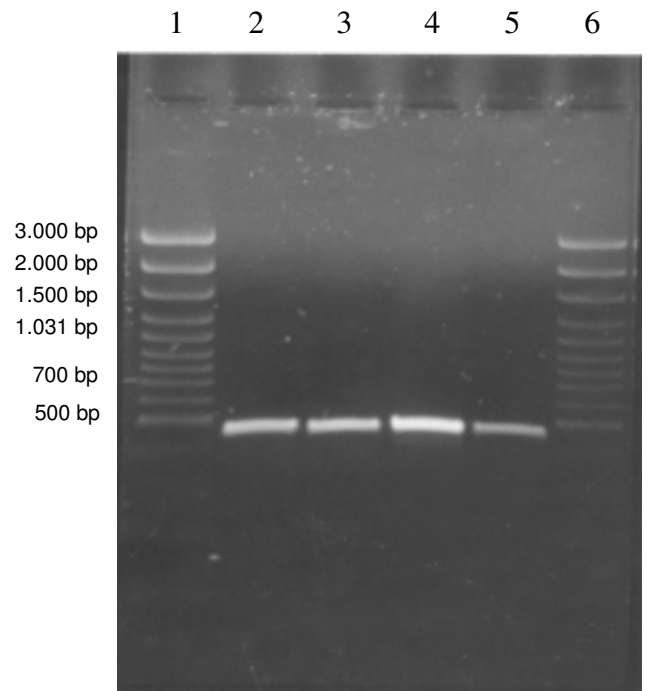


Slot 1: 100 bp-Marker  
 Slot 2: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1)  
 Slot 3: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0,5)  
 Slot 4: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(3)  
 Slot 5: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(6)  
 Slot 6: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(6)  
 Slot 7: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(4)  
 Slot 8: Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(4)

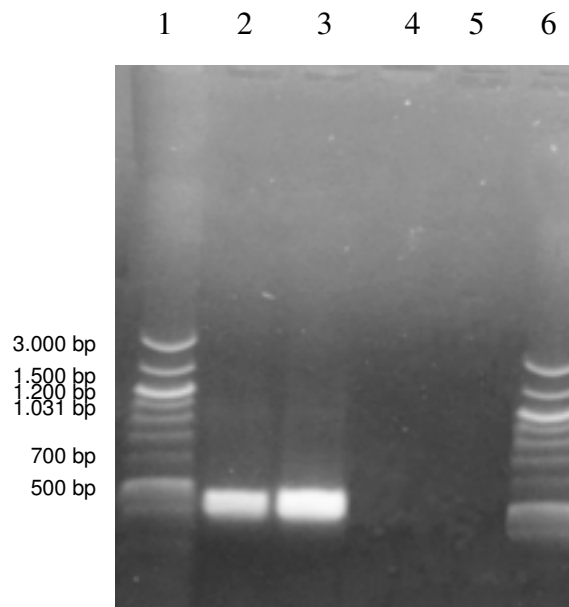
**Abb. 26: Ausgewählte Elektrophoresen der PCR-Nachweise des rolC-Gens (bei einer Größe der amplifizierten rolC-Sequenz von 463 bp) der Transformation I (4 h Cokultur)**



Slot 1: 100 bp-Marker  
Slot 2: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T (1,5)  
Slot 3: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T (1,5)  
Slot 4: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(2)  
Slot 5: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(6)  
Slot 6: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(6)  
Slot 7: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(2)  
Slot 8: 100 bp-Marker

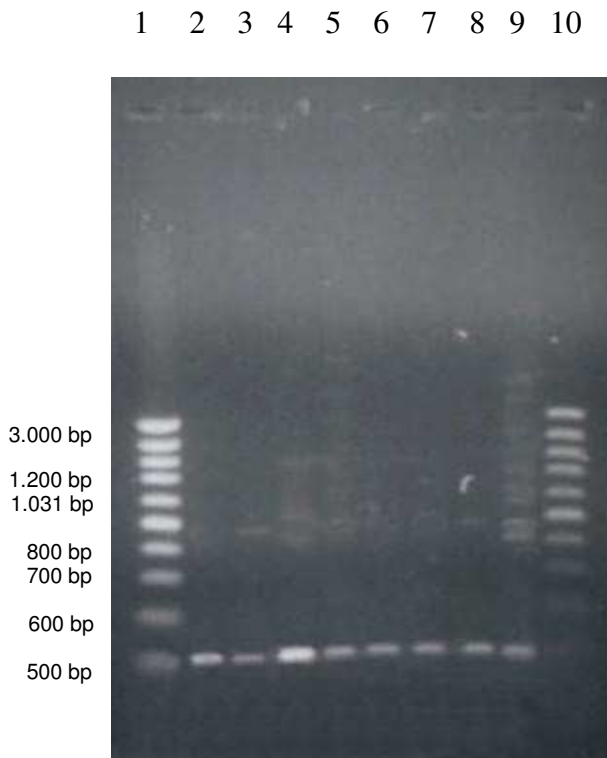


Slot 1: 100 bp-Marker  
Slot 2: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(6)  
Slot 3: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T (6)  
Slot 4: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(6)  
Slot 5: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(6)  
Slot 6: 100 bp-Marker

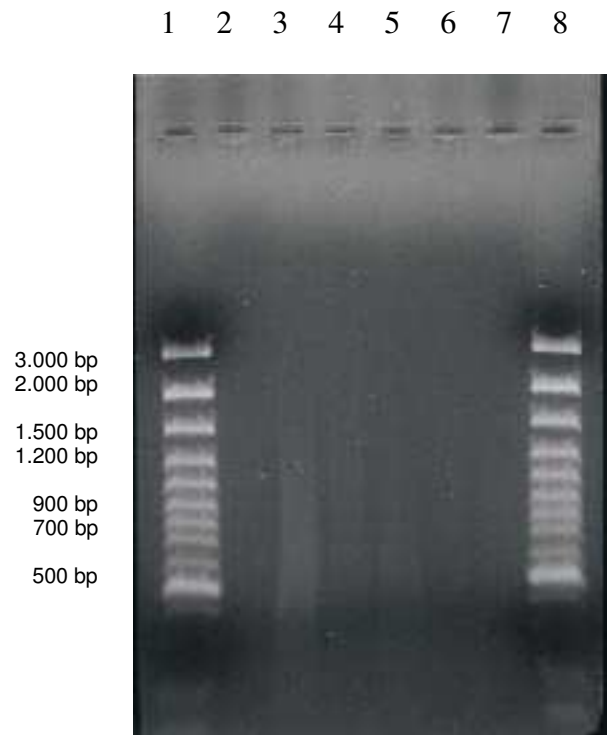


Slot 1: 100 bp-Marker  
Slot 2: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(0)  
Slot 3: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt (6)  
Slot 4: leer  
Slot 5: leer  
Slot 6: 100 bp-Marker

**Abb. 27: Ausgewählte Elektrophoresen der PCR-Nachweise des rolC-Gens (bei einer Größe der amplifizierten rolC-Sequenz von 463 bp) der Transformation II (8 h Cokultur)**

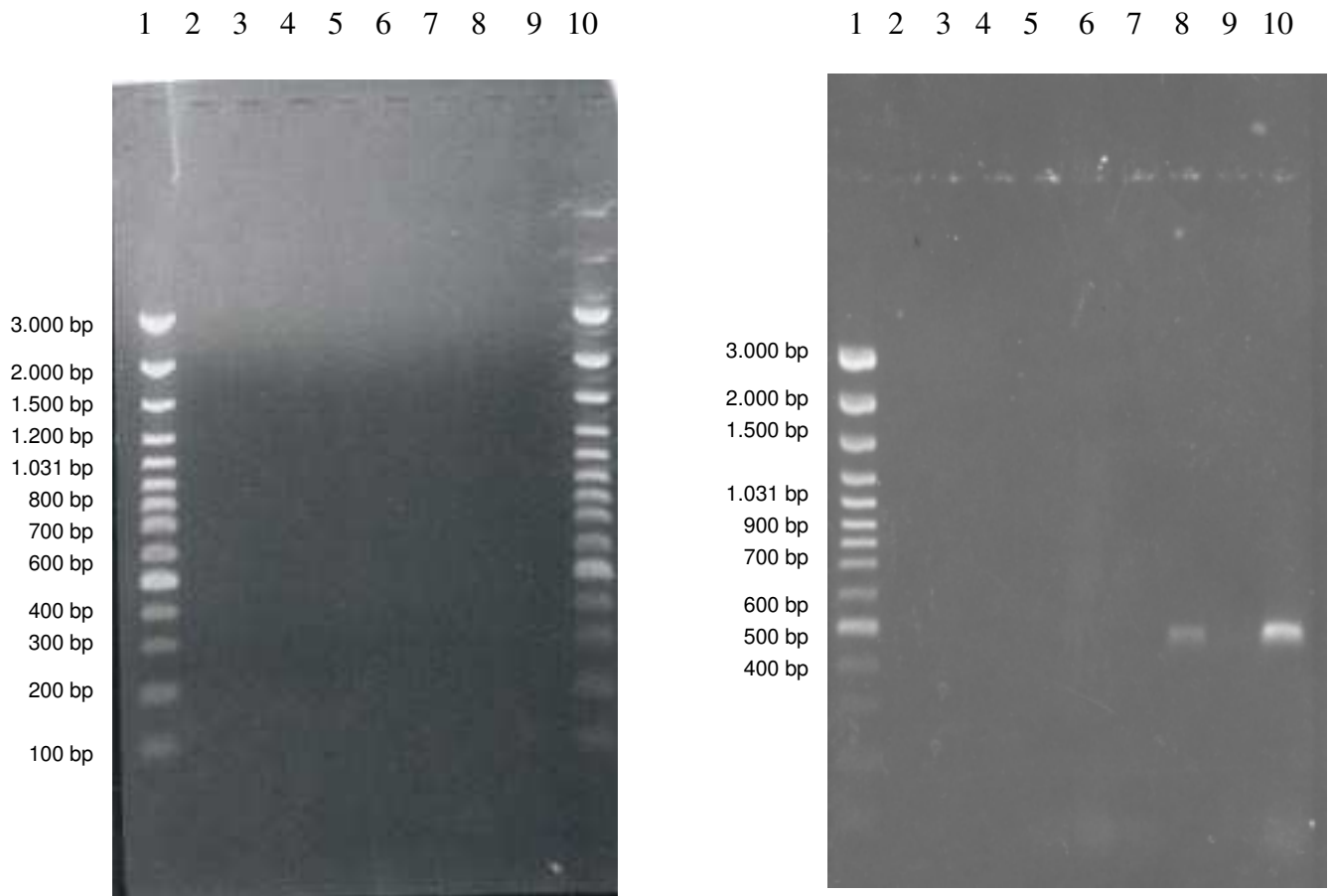


Slot 1: 100 bp-Marker  
 Slot 2: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(0)  
 Slot 3: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(3)  
 Slot 4: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(6)  
 Slot 5: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(3)  
 Slot 6: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(3)  
 Slot 7: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(4)  
 Slot 8: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(6)  
 Slot 9: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(3)  
 Slot 10: 100 bp-Marker



Slot 1: 100 bp-Marker  
 Slot 2: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(6)  
 Slot 3: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(0)  
 Slot 4: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(1)  
 Slot 5: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(2)  
 Slot 6: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(3)  
 Slot 7: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(6)  
 Slot 8: 100 bp-Marker

**Abb. 28: Ausgewählte Elektrophoresen der PCR-Nachweise des rolC-Gens (bei einer Größe der amplifizierten rolC-Sequenz von 463 bp) der Transformation III (48 h Cokultur)**

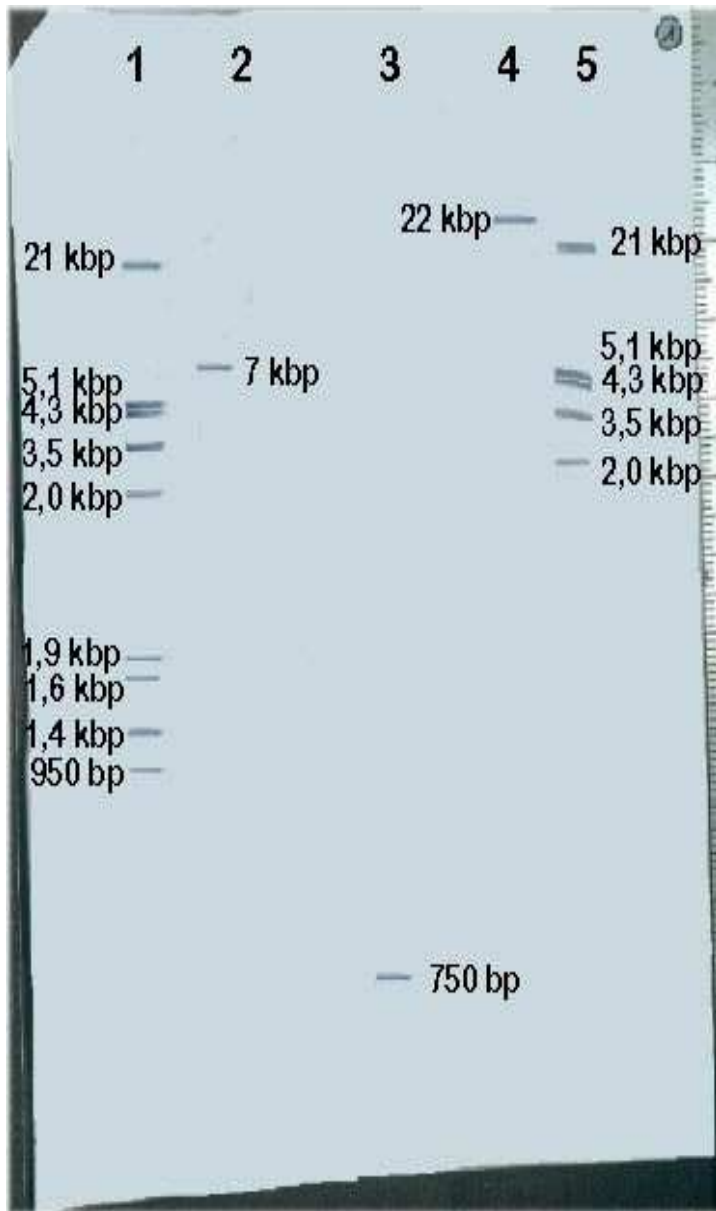


Slot 1: 100 bp-Marker  
 Slot 2: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(0)  
 Slot 3: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(2)  
 Slot 4: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(2)  
 Slot 5: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(2)  
 Slot 6: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(3)  
 Slot 7: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(0)  
 Slot 8: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(1)  
 Slot 9: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(3)  
 Slot 10: 100 bp-Marker

Slot 1: 100 bp-Marker  
 Slot 2: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(1,5)  
 Slot 3: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(1,5)  
 Slot 4: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(1,5)  
 Slot 5: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(4)  
 Slot 6: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(4)  
 Slot 7: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(4)  
 Slot 8: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(6)  
 Slot 9: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(6)  
 Slot 10: Pflanzen-DNS-Probe vom Zeitpunkt T(6)

## Abb. 29/1: Southern Blots ausgesuchter Pflanzenproben

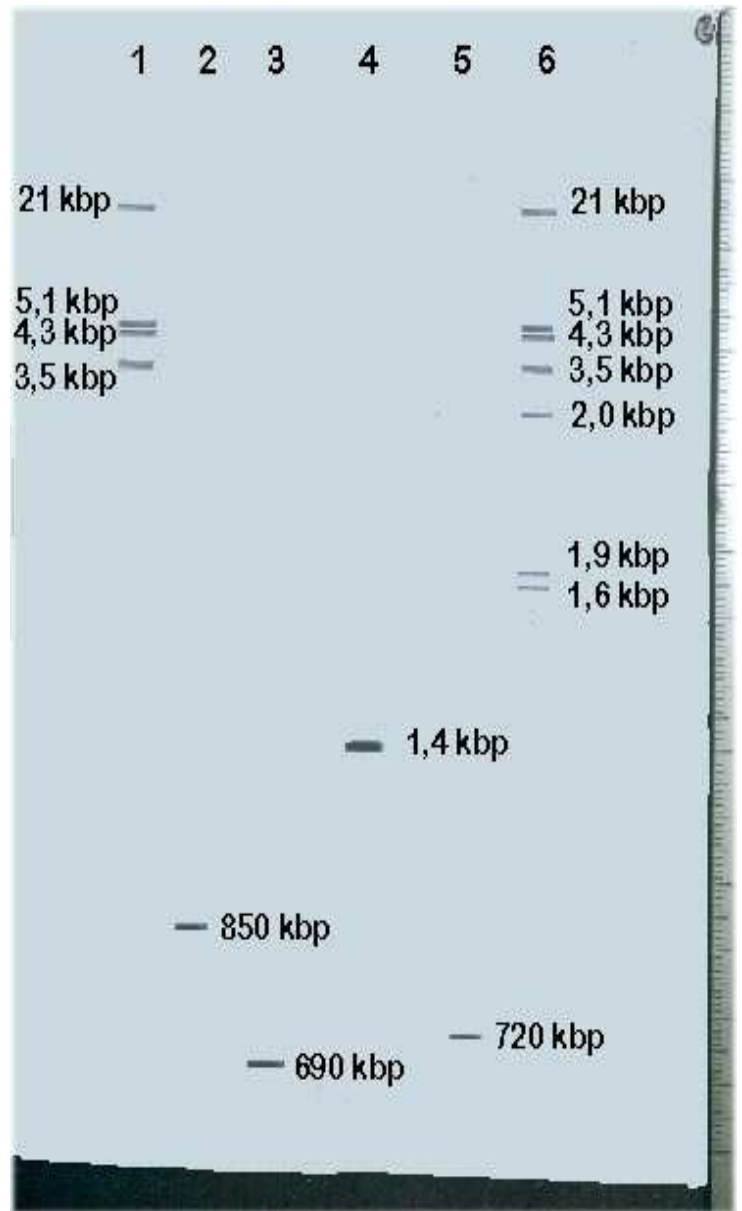
Southern Blot 1  
Nachweis von rolA



Der Southern Blot 1 wurde ausschließlich mit Mischproben von Pflanzen der Transformation I (4 h Cokultur) durchgeführt.

Slot 1 : Marker  
Slot 2 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0)  
Slot 3 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(2)  
Slot 4 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(6)  
Slot 5 : Marker

Southern Blot 2  
Nachweis von rolB



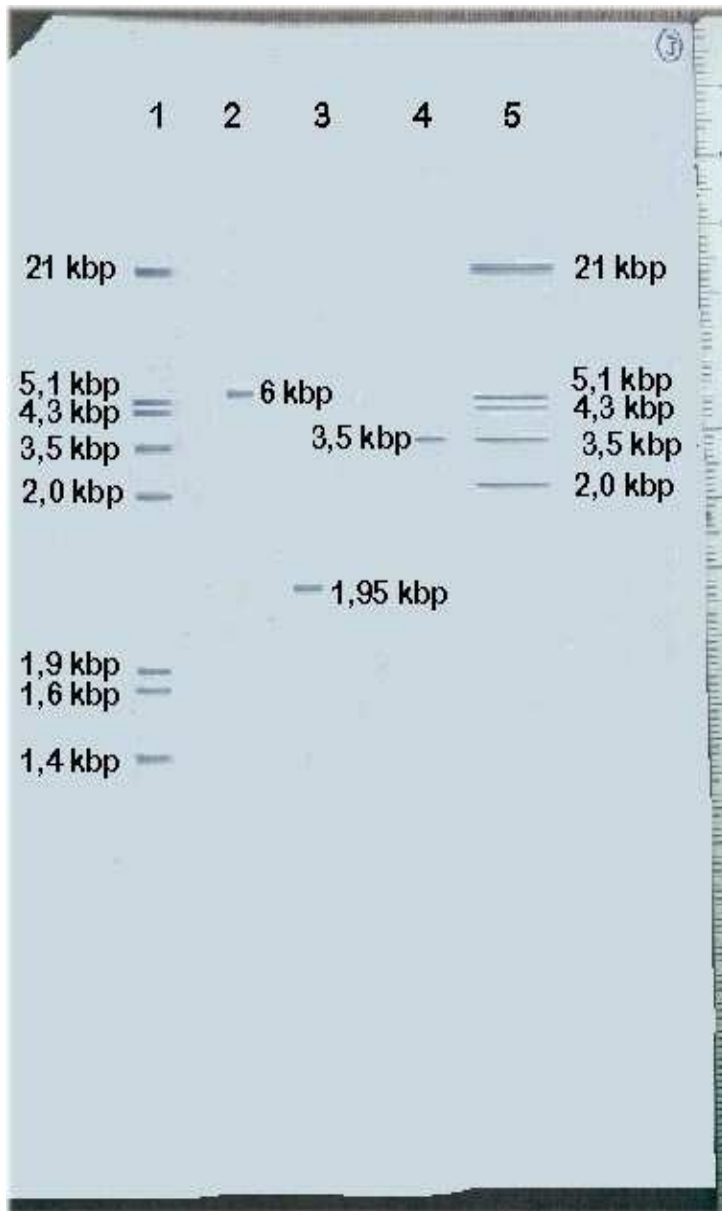
Der Southern Blot 2 wurde ausschließlich mit Mischproben von Pflanzen der Transformation I (4 Cokultur) durchgeführt.

Slot 1 : Marker  
Slot 2 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0)  
Slot 3 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0,5)  
Slot 4 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1,5)  
Slot 5 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(2)  
Slot 6 : Marker



## Abb. 29/2: Southern Blots ausgesuchter Pflanzenproben

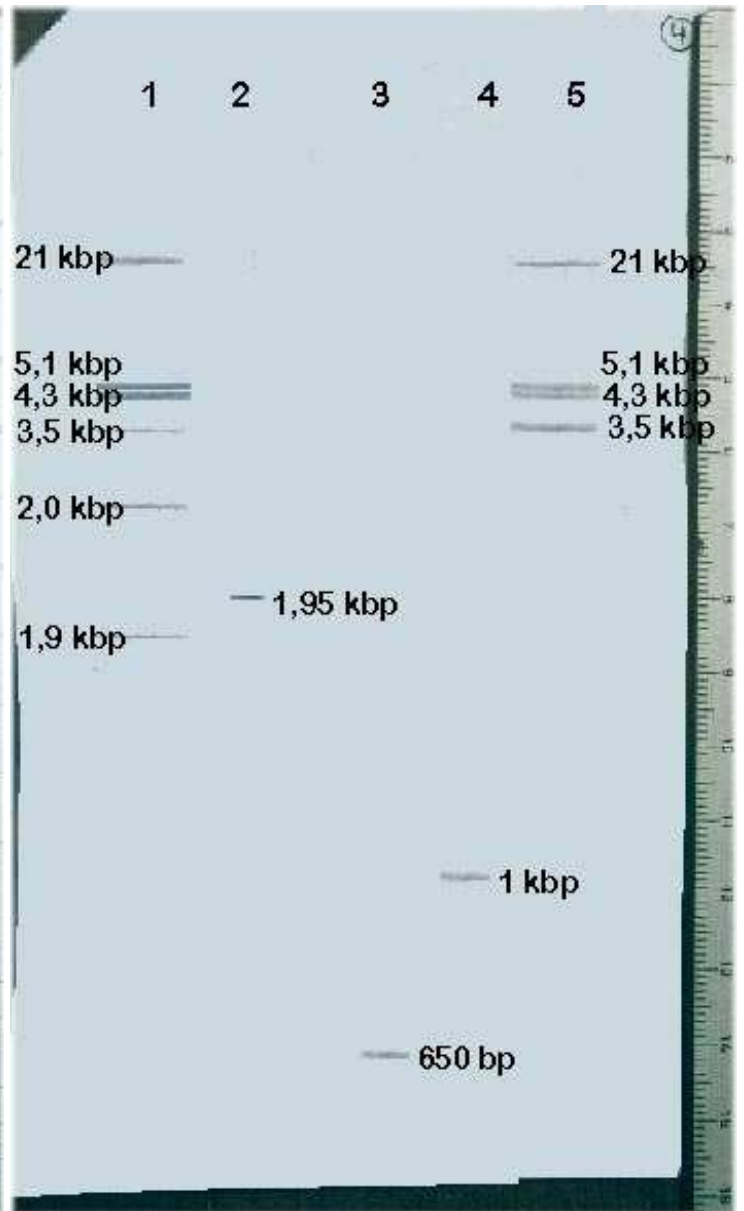
Southern Blot 3  
Nachweis von rolB



Der Southern Blot 3 wurde ausschließlich mit Mischproben von Pflanzen der Transformation III (48 h Cokultur) durchgeführt.

Slot 1 : Marker  
Slot 2 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0,5)  
Slot 3 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1)  
Slot 4 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(2)  
Slot 5 : Marker

Southern Blot 4  
Nachweis von rolC

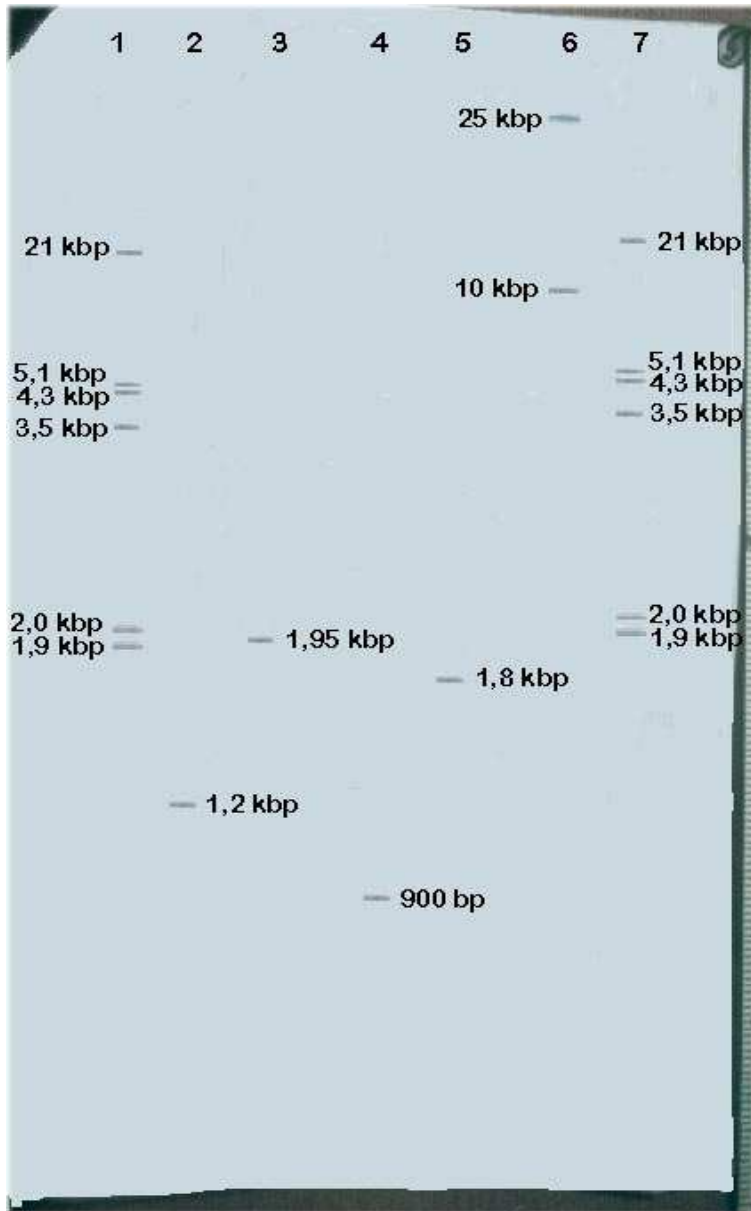


Der Southern Blot 4 wurde ausschließlich mit Mischproben von Pflanzen der Transformation I (4 Cokultur) durchgeführt.

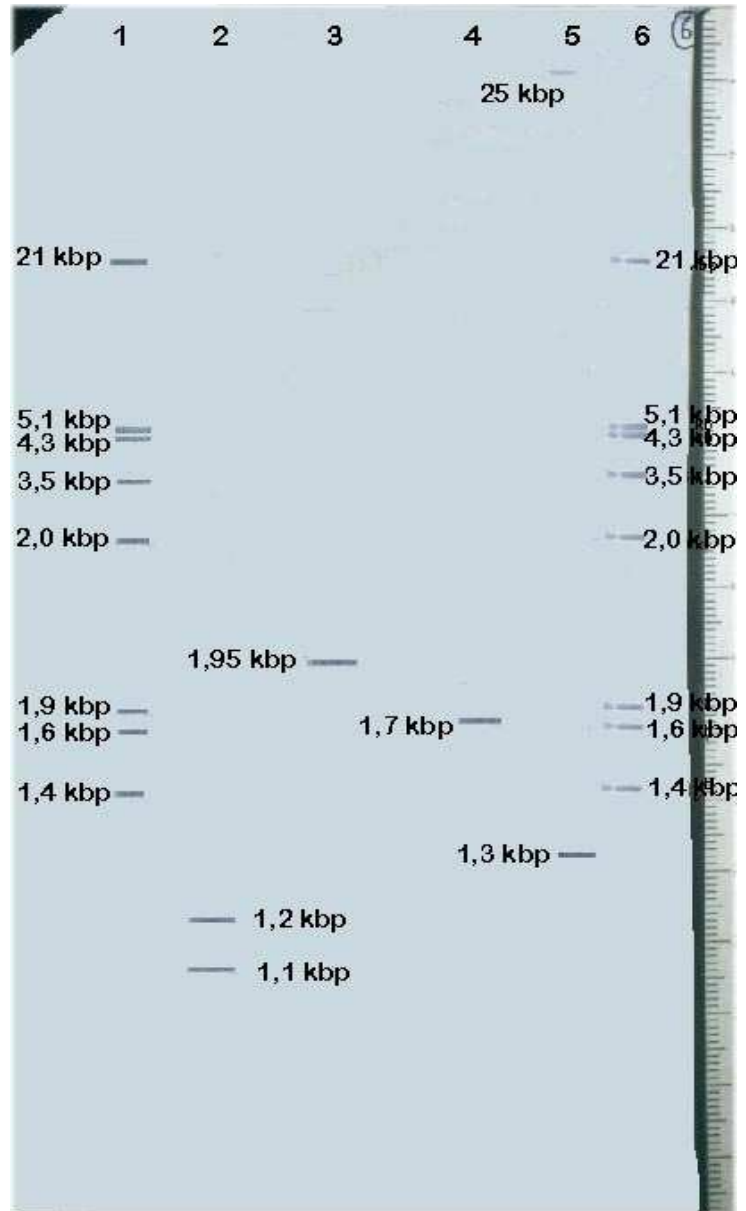
Slot 1 : Marker  
Slot 2 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1,5)  
Slot 3 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(2)  
Slot 4 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(6)  
Slot 5 : Marker

### Abb. 29/3: Southern Blots ausgesuchter Pflanzenproben

Southern Blot 5  
Nachweis von rolC



Southern Blot 6  
Nachweis von rolB



Der Southern Blot 5 wurde mit Mischproben von Pflanzen der Transformation II (8 h Cokultur) (Slots 2-5) sowie der Transformation III (48 h Cokultur) (Slot 6) durchgeführt.

Der Southern Blot 6 wurde ausschließlich mit Mischproben von Pflanzen der Transformation II (8 h Cokultur) durchgeführt.

- Slot 1 : Marker
- Slot 2 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0)
- Slot 3 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1)
- Slot 4 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(2)
- Slot 5 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(3)
- Slot 6 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(0)
- Slot 7 : Marker

- Slot 1 : Marker
- Slot 2 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(1)
- Slot 3 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(2)
- Slot 4 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(3)
- Slot 5 : Pflanzen-DNS-Probe zum Zeitpunkt T(6)
- Slot 6 : Marker

## **Danksagung**

Herzlichen Dank möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. K.-H. Neumann für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung aussprechen. Insbesondere bedanke ich mich für die jederzeit gewährte Bereitschaft zur intensiven Diskussion und die fachliche und persönliche Unterstützung

Herzlich danken möchte ich auch Frau Prof. Dr. B. Arnholdt-Schmitt, die mir bei den molekularbiologischen Untersuchungen eine große Hilfe war.

Frau C. Lein danke ich für die Einarbeitung in die Techniken der Gewebekultur, ihre immer gewährte Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Bei Frau Dr. E. Pleschka möchte ich mich ganz herzlich für stete Diskussionsbereitschaft sowie ihre fachliche und freundschaftliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit bedanken.

Herrn Dr. B. Pauler danke ich für seine Unterstützung bei der cytophotometrischen DNS-Gehaltsbestimmung und statistischen Berechnungen sowie für die gute und motivierende Zusammenarbeit im Praktikum.

Bei Frau J. Korb-Müller bedanke ich mich für die Bearbeitung des Schriftverkehrs, der im Rahmen meiner Arbeit und bei Reisen anfiel, und ihre freundschaftliche Unterstützung zu jedem Zeitpunkt der Arbeit.

An dieser Stelle sei auch allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des Institutes für die Diskussionsbereitschaft und Hilfe gedankt, Herrn Dr. J. Imani für das Korrekturlesen.

Zuletzt möchte ich mich natürlich auch ganz herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich jederzeit rührend unterstützt und motiviert haben und die immer für mich da waren, wenn ich sie brauchte.

Für die finanzielle Unterstützung bei Sachmitteln danke ich der DFG.

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe. Die Stellen, die ich anderen Untersuchungen dem Wortlaut oder Sinn nach entnommen habe, sind durch entsprechende Quellenangaben kenntlich gemacht.

Gießen, im März 2001