



International
Association for Plant
Tissue Culture
Deutsche Sektion AK

„Workshop“

„Pflanzentransformation - Wo stehen wir heute?“

17. - 18. Juli 2003

im Interdisziplinären Forschungszentrum (IFZ)
Heinrich Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen

Der 35S-Promotor in somatischen Koniferen-Embryonen: intraklonale Varianz und interspezifische Homologien

Ulrike Behrendt, Adrian Berthold

In der vorliegenden Arbeit wurden 35S::uidA(intron) transgene embryogene Linien von *Larix decidua*, *Abies alba* und *A. nordmanniana* hinsichtlich der Glucuronidaseaktivität untersucht. Die Analyse erfolgte sowohl histochemisch durch X-Gluc, als auch fluorometrisch mittels MUG. Untersuchungsobjekt waren einzelne reifende Embryonen der unabhängig voneinander entstandenen transgenen Linien. Sowohl der qualitative als auch der quantitative Assay zeigte eine hohe Heterogenität innerhalb aller untersuchten transgenen Linien. Diese Unterschiede zwischen den Klonen einer Linie überwogen zum Teil die Unterschiede zwischen den Linien; und dies unabhängig von der Art. Während der Reifung bis zum dormanzfähigen Embryo nahm die Glucuronidaseaktivität tendenziell zu. Die Gewebsspezifität der Glucuronidase, zunächst nur epidermal und basal, nahm im Laufe der Reifung ab, obwohl eine konstitutive Expression eher die Ausnahme blieb. *Abies alba* zeigte eine generell leicht erhöhte GUS-Aktivität. Es ist zu vermuten, daß es während der Embryoreifung bei Koniferen sowohl zu einem exogen verursachten als auch zu einem zellspezifischen gene silencing kommt. Diese Arbeiten wurden im Rahmen des UBA/MUNF-Verbundprojektes „Grundlagen für die Risikobewertung transgener Gehölze“ durchgeführt.

Entwicklung von Transformationsprotokollen für Meristeme von *Wolffia spec.*, *Larix decidua* und *Helianthus annuus* unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens*

R. Boehm¹, G. Ismail¹, S. Mohammed¹, K. Zoglauer², J. Thiel², H. Schnabl¹

¹. Institut für Landwirtschaftliche Botanik, Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, Karlobert Kreitenstr. 13, D-53115 Bonn, Email r.boehm@uni-bonn.de

². Institut für Biologie der Humboldt-Universität Berlin, AG Angewandte Botanik, Labor für Pflanzliche Zell und Gewebekultur in Berlin, Invalidenstr. 42, 10115 Berlin, Email h1299egj@rz.hu-berlin.de

Pflanzen und Pflanzenzellkulturen können eine innovative, kostengünstige Möglichkeit für die Expression rekombinanter, therapeutischer Proteine darstellen. Dieses Potenzial muß in den nächsten Jahren verstärkt entwickelt werden, um den steigenden Mengenbedarf an kostengünstigen therapeutischen Proteinen für den Markt decken zu helfen. Am Institut für Landwirtschaftliche Botanik werden daher verschiedene pflanzliche Expressionssysteme für die Produktion therapeutischer Proteine entwickelt und evaluiert: somatische Embryonen der Europäischen Lärche *Larix decidua*, verschiedene Wasserlinsen-Arten (*Wolffia spec.*), sowie die Sonnenblume (*Helianthus annuus*). Die Möglichkeit zur Darstellung transgener Linien ist dabei ein erster Meilenstein. Die Verwendung von Meristemen als Zielgewebe für die Transformation verspricht eine höhere genetische Stabilität der resultierenden transgenen Linien durch Vermeidung von Kallusstadien. Daher wurden meristematische Gewebe der oben genannten Arten als Ausgangsmaterial für die Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens*-vermitteltem Gentransfer verwendet. Als Reportergen wurde das *gus*-Gen unter dem konstitutiven 35S-Promotor verwendet. Im Falle von Lärchen-Embryonen gelang die Transformation durch einfache Kokultivierung embryogener Massen mit Agrobacterien, da die meristematischen Bereiche (Embryoköpfe) unmittelbar zugänglich sind. Im Falle von *Wolffia* stellte die Zugänglichkeit der infizierenden Agrobacterien zu den meristematischen Bereichen ein Problem dar, da diese tief im Inneren der Pflanzen geschützt liegen. Zu diesem Zweck wurde ein Verfahren entwickelt, die meristematischen Bereiche mittels Mikroinjektion von Agrobacterien-Suspension gezielt zu infizieren (sog. „Agro-Injektion“). Danach wurden die Pflanzen über 6 Wochen normal weiterkultiviert, bis die Meristeme zu Tochterpflanzen ausgewachsen waren. Die regenerierten Pflanzen wurden am Ende auf Expression des nptII-Gens durch Kultivierung unter Kanamycin-Anwesenheit selektiert.

Bei *Helianthus annuus* sind Apikalmeristeme von Keimlingen ein geeignetes Zielgewebe für die Transformation, da 60-70 % der Meristeme direkt zu ganzen Pflanzen regenerieren. Bei der Hybridsorte „Capella“ konnte über Infektion gespaltener Keimlingsachsen mit Agrobacterien eine Transformationseffizienz von ca. 5 % erreicht werden. Die Inzuchtlinie „SWSR2“ ist dieser Transformationsmethode bisher jedoch nicht zugänglich. Hier könnte eine Verwundung der Explantate durch verschiedene Methoden oder die Anwendung der „Agro-Injektion“ helfen, die Transformationseffizienz der Apikalmeristeme gezielt zu steigern.

Flachowsky, Henryk; Tabea, Birk und Viola Hanke
Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen
Institut für Obstzüchtung

Etablierung von Methoden zur *Agrobacterium* vermittelten Transformation bei Apfel *Malus domestica* Borkh.

Neben der Verbesserung von konventionellen Zuchtmethoden hat besonders der gezielte Gentransfer in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. So wurden zahlreiche Methoden zur Erzeugung transgener Pflanzen an unterschiedlichsten Kulturarten etabliert. Dabei erwies sich der *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer als ein praktikabler und erfolgversprechender Weg zur Übertragung von Fremd-genen in Obstgehölze, wie dem Apfel *Malus domestica* Borkh.. Hier sind die Ziele vor allem im Transfer von Resistenzgenen zur Bekämpfung obstbaulich bedeutungsvoller Krankheiten, wie dem Feuerbrand *Erwinia amylovora*, dem Apfelschorf *Venturia inaequalis*, und dem Apfelmehltau *Podosphaera leucotricha*, zu sehen. Weiterhin wurden

erste Anstrengungen zur Erzeugung männlich steriler parthenokarper Linien unternommen, um auf diesem Weg das Risiko eines vertikalen Gentransfers bei der Freisetzung transgener Pflanzen zu vermindern. In den meisten dieser Studien erfolgte die Selektion transgener Regenerate auf der Basis von Antibiotikaresistenzgenen. Da diese wegen ihrer Nutzung im Bereich der Humanmedizin und zahlreicher negativer Einflüsse während des Regenerationsprozesses in der Diskussion stehen, stellt sich die Frage nach alternativen Selektionsmöglichkeiten.

Aus diesem Grund wurde im letzten Jahr am Institut für Obstzüchtung in Dresden-Pillnitz damit begonnen, solche Strategien an Apfel zu etablieren. Im Rahmen dieser Arbeiten werden drei verschiedene Ansätze verfolgt. Beim ersten handelt es sich um die Selektion auf der Basis des *Phosphomannoseisomerase*-Systems (Syngenta). Dieses zur Gruppe der Positivmarker zählende Gen ermöglicht es, Pflanzen- Mannose als Kohlenstoffquelle aufzuschließen. Mit diesem System wurden bereits Vorversuche mit Blatt- und Spross-explantaten sowie erste Transformationsexperimente zur Ermittlung der optimalen Mannosekonzentration durchgeführt. Die molekularen Analysen der erhaltenen Regenerate stehen noch aus.

Weiterhin wurden Versuche zur Expression des Reportergens *gfp* aus *Aequorea victoria* durchgeführt. Hierzu wurde der Vector *pGreen_35Sgfp* in die *Agrobacterien*stämme EHA105 und LBA4404 kloniert und erste Versuche zur transienten und stabilen Expression durchgeführt.

Als letztes wurde mit der Etablierung des pMAT-Systems (Nippon Paper Industries) begonnen. Dieses System basiert auf der Entfernung des Markergens im Anschluss an die Selektion unter der Nutzung einer *site*-spezifischen Rekombinase aus *Zygosaccharomyces rouxii*.

Entstehung und Entmischung chimärer Transformanden - Untersuchungen an einem Modellsystem mit normalerweise einzelligem Ursprung der Regenerate

Thomas Geier

Fachgebiet Botanik, Forschungsanstalt Geisenheim

In vitro-Systeme des *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfers basieren auf der Präsenz von transformierbaren und zugleich regenerationsfähigen Zellen. Unterschiede in der zellspezifischen Transformations- und Regenerationskompetenz können die Ausbeute an transgenen Pflanzen mindern und zur Bildung chimärischer Transformanden beitragen, letzteres mit der Folge phänotypischer Instabilität sowie des möglichen Verlusts von Transgenen. Die hier vorgetragenen Befunde lassen vermuten, daß die Entstehung chimärischer Transformanden verbreiteter als angenommen sein könnte, da sie selbst in einem Modellsystem mit normalerweise strikt einzelligem Ursprung der Regenerate auftritt. Als Untersuchungsmaterial dienten Internodienexplantate von *Kohleria* (*Gesneriaceae*), bei welchen Adventivsprosse normalerweise nur aus einem speziellen Typ von Epidermiszellen - der Basalzelle kurzstieliger glandulärer Trichome - hervorgehen. Wie frühere Untersuchungen gezeigt haben, sind diese Zellen weniger transformationskompetent als subepidermale Zellen und insbesondere solche der Leitgewebsbereiche (Geier and Sangwan, 1996). Transgene *Kohleria*-Pflanzen, welche die Homöoboxgene KNAP1 bzw. KNAP4 aus Apfel (Watillon et al., 1998) exprimieren, wurden auf Sproßinduktionsmedium SIM (N69+2,5µM BA+2,5µM IAA) mit 50mg/l Kanamycin selektiert und über Nodiensegmente auf hormonfreiem N69 in vitro erhalten. Nach dem Auspflanzen in Erde zeigten sich bei etwa 1/4 der Klone Aufspaltungen bezüglich der Blattform. Nähere Untersuchungen dieser Klone mittels zweistufigen Regenerationstesten auf SIM und SIM+50mg/l Kanamycin sowie PCR-Analysen mit Transgen-spezifischen Primern lassen auf eine periklinalchimärische Konstitution mit nicht-transgener L1 (NTT) schließen. Demnach führen die Bedingungen der Selektion teilweise zu einem veränderten Regenerationsmodus, indem sie offenbar die gemeinsame Regeneration aus benachbarten morphogenetisch kompetenten aber nicht-transgenen Epidermiszellen und transformierten aber morphogenetisch weniger kompetenten subepidermalen Zellen fördern. Periklinalchimärische NTT-Klone bleiben bei Vermehrung über Nodiensegmente stabil erhalten und sind in der Lage, auf Selektionsmedium (SIM+50mg/l Kanamycin) Adventivsprosse zu regenerieren, allerdings mehrheitlich nicht-transgene und chimärische. Einheitlich transgene Sprosse (TTT) entstehen nur in geringem Umfang, ihre Ausbeute kann jedoch durch höhere Kanamycin-Konzentrationen gesteigert werden.

Literatur:

- Geier T, Sangwan RS, 1996. Histology and chimeral segregation reveal cell-specific differences in the competence for shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Kohleria* internode explants. *Plant Cell Reports* 15: 386-390
- Watillon B, Kourteva G, Kettmann R, Boxus P, Burny A, 1998. Morphological alterations in transgenic tobacco plants expressing KNAP1, an apple kn1-like homeobox gene. *Arch. Physiol. Biochem.* 106: 75 (PP11)

Geldermann, U.; Langen, G.; Kogel, K.-H.

Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie (IPAZ), Universität Gießen, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen (email: Uta.Geldermann@agrar.uni-giessen.de)

Promotoranalyse von Markergenen der chemisch induzierten Resistenz (cIR) in Gerste

Promoter studies of marker genes of chemically induced resistance in barley

Chemikalien wie DCINA oder BTH induzieren in Gerste Resistenz gegen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. Es wurden neun DCINA-induzierte *Bci*-Gene isoliert (*Bci*: Barley chemically induced, Beßer et al. 2000). Diese Gene sind zum größten Teil vorher in Gerste noch nicht beschrieben worden und weisen außerdem keine Ähnlichkeiten zu PR-Proteinen auf, die in Dicotylen als Marker für IR gelten. Einige der *Bci*-Gene werden hochspezifisch nur durch Resistenzinduktoren aktiviert. Detaillierte Analysen dieser Promotoren ermöglichen somit Rückschlüsse auf die bei der induzierten Resistenz beteiligten Signalketten.

Von bisher vier *Bci*-Genen (mit Ähnlichkeiten zu Saure Phosphatase/VSP (*Bci3*), Ca²⁺-bindendes EF-hand Protein (*Bci4*), Proteinaseinhibitor (*Bci7*), Apyrase (*Bci9*)) konnten die Promotoren isoliert werden (Geldermann et al. 2002). Die funktionelle Analyse der Promotoren erfolgte durch transiente Transformation von Gerste in Epidermiszellen, durch die u.a. responsive Elemente ermittelt sowie der Minimalpromotor identifiziert werden können. Hierfür wurden Deletionskonstrukte erstellt. Es wurde ein biolistischer Gentransfer verwendet (Schweizer et al. 1999), wofür die Promotorfragmente vor das Reportergen GFP (*green fluorescent protein*) kloniert wurden. Unter dem Mikroskop wurde die Promotoraktivität nach Gabe der Induktoren BTH, Jasmonat (JA) und Sorbitol anhand der Anzahl an GFP-Zellen ermittelt (Geldermann et al. 2002).

In silico identifizierte Elemente, die als responsiv auf Salicylsäure oder JA beschrieben wurden, wurden vervierfacht und vor den CaMV35S-Minimalpromotor kloniert. Induzierte Pflanzen wurden mittels biolistischen Gentransfer mit den entstandenen synthetischen Promotoren transformiert. Mit Hilfe des GUS (Glucuronidase) Reportergens konnten Unterschiede in den synthetischen Promotoren fluorimetrisch gemessen werden. Hierbei zeigten sich die JA-Motive aus den *Bci3*- und *Bci4*-Promotoren besonders aktiv nach Jasmonatinduktion.

Literatur

- [1] Beßer, K., Jarosch, B., Langen, G., Kogel, K.-H. 2000. Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. *Mol. Plant Path.* 1 (5): 277-286.
- [2] Schweizer, P., Pokorny, J., Abderhalden, O., Dudler, R. 1999a. A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in wheat. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 647-654.
- [3] Geldermann, U., Langen, G., Kogel, K.-H. 2002. Promoter studies of chemically induced *Bci*-Genes in the Pathosystem Barley Powdery mildew. *Proc. 6th Conf. EFPP 2002*, Prague. *Plant Protection Sci.*, 38 (Special Issue 2): 487-489.

Agrobakterien-vermittelter Transfer von BAC-Klonen in Gerste (*Hordeum vulgare* L.) – Strategie und erste Ergebnisse

Götz Hensel und Jochen Kumlehn

IPK Gatersleben, Abt. Molekulare Zellbiologie, Ag Pflanzliche Reproduktionsbiologie, Corrensstr. 3, 06466 Gatersleben

Um die Struktur und die Funktionsweise des Gerstengenoms besser verstehen und mit diesem Wissen die Nutzpflanze in ihren Eigenschaften verbessern zu können, benötigt man ein effizientes Transformationssystem. Die Agrobakterien-vermittelte Transformation hat im Vergleich zur Biolistik den Vorteil, dass zumeist intakte T-DNA-Sequenzen als Einzelkopie in transkribierte Bereiche des pflanzlichen Zielgenoms integriert werden. Darüber hinaus besitzt dieses System aufgrund der Möglichkeit zur ungekoppelten Integration verschiedener T-DNAs ein hohes Potenzial zur Herstellung von markergenfreien Pflanzen.

Ein Anwendungsgebiet der genetischen Transformation stellt das "Positional Cloning" bzw. das "Pathway engineering" dar. Hierfür benötigt man ein Transformationssystem, das die Integration großer intakter DNA-Fragmente in das Pflanzengenom ermöglicht. Mit herkömmlichen Vektoren ist man in der Lage, Fragmente bis zu einer Größe von 20 kb zu integrieren. Vor einiger Zeit wurden von unterschiedlichen Gruppen Vektoren für die Übertragung großer DNA-Fragmente entwickelt (Hamilton et al. 1996, Liu et al. 1999). Desweiteren stehen auch BAC-Bibliotheken von Genomen unterschiedlicher Kulturpflanzenarten auf der Basis dieser Vektoren zur Verfügung (Texas A&M BAC Center). Um eine eventuelle Obergrenze für den DNA-Transfer zu ermitteln, wurden 10 BAC-Klone mit Insertgrößen von 60-150 kb einer Arabidopsis-BAC-Bibliothek im Vektor pBIBAC ausgewählt (Texas A&M BAC Center). Da diese Vektoren nicht unverändert zur Gerstentransformation genutzt werden können, wurden zum einen Co-Transformationsexperimente mit einem Plasmid durchgeführt, welches das Hygromycinresistenz-vermittelnde *hpt*-Gen enthält, und zum zweiten ist vorgesehen, mit Hilfe des Red/ET-Systems (GeneBridges, Deutschland) ein Reporter-gen (*gfp*) zur Visualisierung der Transformationsereignisse, sowie ein Markergen (*hpt*) unter Kontrolle von in Gerste konstitutiv wirksamen Promotoren zu integrieren.

Literatur:

Hamilton S, Frary A, Lewis C, Tanksley D (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 9975-9979

Liu Y, Shirano Y, Fukaki H, Yanai Y, Tasaka M, Tabata S, Shibata D (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. 96:6535-6540

EVALUATION OF STRATEGIES FOR AVOIDING VERTICAL GENE TRANSFER FROM TRANSGENIC TREES

Hoenicka H., Fladung M.

BFH, Institute for Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Sieker Land Str. 2,
D-22927 Grosshansdorf, GERMANY

E.mail: hoenicka@holz.uni-hamburg.de, mfladung@uni-hamburg.de

For long-lived forest tree species, characterised by an extended vegetative phase, genetic engineering may offer prospects for plant improvement at an accelerated rate. However, genetic engineering has been the subject of considerable controversy, with concerns raised mainly from ecological and ethical arguments. This controversy has slowed the broad use of this technique in agriculture and forestry. One of the main ecological concerns against transgenic trees is the probable introgression of the foreign genes into natural tree populations, the so-called "vertical transgene transfer". The incorporation of sterility genes into transgenic lines of trees may be used to avoid vertical transgene transfer into natural tree populations. The *barnase* gene from *Bacillus amyloliquefaciens* and *stilbene synthase* gene from *Vitis vinifera* have been used successfully with this purpose in several plant species but not in trees so far.

The application of sterility genes in trees should also consider gene stability. There are reports of variation in transgene expression levels in aspen transformants (Fladung 1999, Fladung and Kumar 2002, Kumar and Fladung 2001). Therefore, answers to questions regarding the stable integration of foreign genes in the genome of forest trees, and their subsequent stable expression during growth and development over long periods of time and under the influence of natural conditions, are essential for the use of transgenic trees in forest tree breeding programs.

In this project, established mechanisms leading to sterility in annual plants and stability of sterility genes will be evaluated in *Populus*. We are generating transgenic lines transformed with sterility genes and some lines which combine male or female sterility with genes which have been reported to induce precocious flowering in trees (*Leafy* and *MADS4*). These transgenic trees will be evaluated not only in the near future but also in a long-term study.

References: Fladung M (1999) *Molecular and General Genetics* 260:574-581; Fladung M. and Kumar S. (2002) *Plant Biology* 4:329-338; Kumar S. and Fladung M. (2001) *Planta* 213:731-740.

Enhancement of *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation efficiency of the model plant *Daucus carota* L ssp. *sativus*

Jafargholi Imani, Justus-Liebig Universität, Institut für Phytopathologie & Angewandte Zoologie, Heirich Buff-Ring 26-32, 30392 Giessen,
jafargholi.imani@ernaehrung.uni-giessen.de

Abstract

Transformation rates by *Agrobacteria* are usually very low (approx. 10%; Thomas et al., 1989). In this report we show that transformation efficiency in carrot (*Daucus carota* L., ssp. *sativus*) cell suspensions was strongly improved by using cell cycle synchronized cells. Fluorodesoxyuridine (FDU) was added for 24 h to inhibit thymidine synthesis blocking the cell cycle at the transition from G1- to S-phase. Then the blocking was released by applying thymidine. A high rate of transformation was obtained when *Agrobacterium tumefaciens* was added concurrently with thymidine. As examples of efficient and long term foreign gene expression in transgenic cells, the reporter enzyme β -glucuronidase (GUS) as a model was used. Furthermore, integration of genetic material was verified by southern blotting and PCR. Positive GUS-staining was detected in roots, leaves and petioles of mature transgenic carrot plants generated through somatic embryogenesis and raised in soil, as well as in callus cultures derived thereof.

Reference:

- J. Imani, A. Berting, S. Nitsche, S. Schaefer, W. H. Gerlich & K.-H. Neumann (2002): The integration of a major hepatitis B virus gene into cell-cycle synchronized carrot cell suspension cultures and its expression in regenerated carrot plants (2002). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71: 157–164, 2002.
- Neumann KH (1995) *Pflanzliche Zell- und Gewebekulturen*. Ulmer, Stuttgart, Germany
- Thomas JC, Gultinan MJ, Bustos S, Thomas T & Nessler C (1989) Carrot (*Daucus carota*) hypocotyl transformation using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 8: 354–357
- Blaschke JR, Forche E & Neumann KH (1978) Investigations on the cell cycle of haploid and diploid tissue cultures of *Datura innoxia* Mill. and its synchronisation. *Planta* 144: 7–12

Entwicklung von Regenerations- und Transformationsprotokollen zur Reduktion von Lebensmittelallergien bei Kirschen (*Prunus avium* L.)

Andrea Matt¹, Andreas Reuter², Stefan Vieths² and Johannes A. Jehle¹

¹ Biotechnologischer Pflanzenschutz, SLFA Neustadt / Weinstraße

² Abteilung Allergologie, Paul-Ehrlich-Institut, Langen

Pollenassoziierte Lebensmittelallergien (pLMA) gehören zu den häufigsten Nahrungsmittel-allergien überhaupt. Die in Mitteleuropa mit 8% am häufigsten verbreitete Form ist das Birkenpollen-Nuss-Kernobst-Syndrom. Dabei weisen ungefähr 70% der Personen, die eine Allergie gegenüber Birkenpollen besitzen, allergische Reaktionen gegenüber Steinfrüchten (Kirsche), Nüssen und Gemüse auf. Ursache dieser Kreuzreaktionen sind ähnliche oder identische Strukturen der Allergene. Als Hauptallergen der Süßkirsche wurde Pru av 1, ein 17-kDa großes Peptid, identifiziert (Scheurer *et al.*, 1997). Der Gehalt dieses Allergens soll durch antisense-RNA- (asRNA-) und RNA-Interferenz- (RNAi-) Technologie gentechnologisch reduziert werden. Hierzu wurden Regenerations- und Transformationsprotokolle für die Süßkirsche entwickelt.

Die Etablierung eines Regenerationsprotokolls erfolgte mit *in vitro* Blättern und mit „shoot apices“ (Caboni *et al.*, 2000) fünf verschiedener Süßkirschsorten. Zur Induktion von Adventiv-sprossen wurden sechs unterschiedliche Basalmedien, denen die Phytohormone BAP, TDZ, IBA, Kinetin, 2,4 D, IAA, NAA in unterschiedlichen Kombinationen und Konzentrationen zugefügt wurden, untersucht. Im Allgemeinen war die Regenerationseffizienz (RE) beim Einsatz von „shoot apices“ deutlich höher als bei Blättern. Bei der Sorte „Schneiders“ konnte mit einer RE von 50% eine Steigerung um das sechsfache, bei „Sweetheart“ mit 66% um das zehnfache, erzielt werden. Als Induktionsmedium eignete sich bei „Schneiders“ ein QL-Medium mit 20 g/L Saccharose, 5 mg/L BAP und 0.5 mg/L IBA, während hingegen bei der Sorte „Schneiders“ ein QL-Medium mit 30 g/L Sorbitol, 1.7 mg/L TDZ und 0.1 mg/L IBA die häufigsten Adventivsprosse erzeugte.

Auf der Grundlage des Regenerationsprotokolls wurde eine geeignete Methode zum Gentransfer mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3103::pMP90 etabliert. Als Kontrolle diente ein Plasmid mit dem Gen für β -Glucuronidase (GUS) mit Intron. Zur Reduktion des Gehalts an immunreaktivem Pru av 1 wurde ein Plasmid, welches das Pru av 1 Allergen in antisense Richtung (asRNA) bzw. in sense-antisense (RNAi) Richtung besitzt, eingesetzt. Die Selektion erfolgte mit dem Gen für Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT). Mehrere Möglichkeiten zur Kokultur wurden getestet. Hierbei wies eine Vakuumfiltration, bei der die Agrobakterien 1:1 mit dem jeweiligen Induktionsmedium verdünnt wurden und 100 μ M Acetosyringon enthielten, die höchsten Transformationseffizienz bei einem histochemischen GUS-Assay der Kontrollen auf. Zur Eliminierung der Agrobakterien wurden Timentin (150 mg/L) und Vancomycin (200 mg/L) verwendet. Die potenziell transgenen Kirschkpflanzen wurden in Vermehrungsmedium umgesetzt und werden derzeit auf die Übertragung der Pru av 1 -Sequenz mittels spezifischer PCR untersucht.

Literatur:

Scheurer, S.; Metzner, K.; Haustein, D. and S. Vieths. 1997. Molecular cloning , expression and characterization of Pru av 1, the major cherry allergen.; *Mol. Immunol.*, 34/, No 8/9, pp. 619-629.

Caboni, E.; Lauri, P. and S. Dàngeli. 2000. In vitro plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. *Plant Cell Reports* 19: 755-760.

Andrea Richter; Hans-Jörg Jacobsen & Heiko Kiesecker¹

LG Molekulargenetik - Herrenhäuserstr. 2 - 30419 Hannover

¹DSMZ – Mascheroder Weg 1b – 38124 Braunschweig

Kombination rekombinanter antifungaler Gene durch Kreuzung transgener Erbsen(*Pisum sativum* L.)

Basierend auf einem *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfersystem wurden im Rahmen eines EU-Projektes (PRELEG, FAIR CT96-1529), agronomisch relevante Erbsensorten mit vier verschiedenen, rekombinanten antifungalen Genen ausgestattet. Bei den Genen handelt es sich um β -1,3-Glucanase aus Gerste (*Hordeum vulgare* L.), zwei unterschiedliche Polygalacturonase-inhibierende Proteine aus Kiwi (*Actinidia deliciosa* L.) und Himbeere (*Rubus idaeus* L.) und das für die Stilbensynthese codierende *vst* Gen aus der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.). Es wurden für jedes Konstrukt Linien etabliert, welche die Gene auf mRNA Ebene stabil in den Nachkommen exprimieren.

Diese Linien wurden über 4 bis 5 Generationen auf ihre Expressionsstabilität hin überprüft. Hierzu diente zunächst das *bar* Gen, bzw. die Herbizidresistenz als Marker. Im Rahmen eines weiteren Projektes (Forschungsschwerpunkt Agrarbiotechnologie Niedersachsen) wurden verschiedene antifungale Gene durch Kreuzung stabil exprimierender Elternlinien kombiniert und weiterhin auf ihre Expressionstabilität in vier Generationen untersucht.

Als Endziel des Projektes sollen alle vier oben genannten Gene kombiniert werden.

Die Expression der antifungalen Gene wurde mittels HPLC (*vst* Gen), Agarosediffusionstests (PGIP) und Immunoblot (Glucanase) untersucht. Über die Expressionsstabilität der antifungalen Gene kann zur Zeit noch keine abschließende Aussage getroffen werden. Bezogen auf die Herbizidresistenz wurden jedoch Silencingphänomene festgestellt und untersucht. Die vorliegenden Daten lassen jedoch die Aussage zu, dass die Expression des `Genes of interests` nicht zwangsläufig mit der Expression des Markergens korrelieren muß. Eine wesentliche Frage wird sein, ob die Kombinationslinien bessere Resistenzeigenschaften als die monogenetischen Resistenzen der Elternpflanzen zeigen und ob sich so dauerhafte Resistenzen etablieren lassen. Abschliessend ist zu prüfen, ob es hier additive oder synergistische Effekte gibt.

Sobald die Expression der Transgene nachgewiesen ist, werden die entsprechenden Linien in Pathogenitätstests auf ihre Resistenzeigenschaften untersucht.

Identifikation kleiner G-Proteine der Gerste als Kandidaten für stabile Transformation mittels transientem Expressionsassay.

Holger Schultheiss, Cornelia Dechert, Karl-Heinz Kogel und Ralph Hueckelhoven

Während der Besiedlung der Pflanze durch phytopathogene Pilze findet ein kompliziertes Wechselspiel von Erkennungs-, Angriffs-, und Abwehrvorgängen statt. Dabei benutzen viele Erreger pflanzliche Signaltransduktionskaskaden, um eine erfolgreiche Pathogenese zu erreichen. Durch eine verstärkte Expression bzw. durch *knock-down* solcher Signaltransduktionskomponenten lässt sich eventuell die Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen erhöhen.

Da die Generierung von stabil transgenen Getreidepflanzen sehr arbeits- und zeitaufwendig ist, benötigt man eine Technik, mit der relativ schnell und sicher eine größere Anzahl von Kandidatengen auf ihre Wirkung in der Wirt-Pathogen-Interaktion überprüft werden können. Eine Möglichkeit ist die transiente Transformation von Gerstenepidermiszellen mittels Partikelbombardement [1].

Kleine G- Proteine (RAC bzw. ROP) sind molekulare Schalter, die gewöhnlich extrazelluläre Signale verarbeiten und an der Umsteuerung zellulärer Prozesse beteiligt sind. Deshalb könnten RAC/ROP Proteine möglicherweise direkt in Resistenzmechanismen involviert sein oder aber von Pathogenen zu deren Nutzen beeinflusst werden. Mit Hilfe PCR-basierter Kandidatengenansätze wurden 6 unterschiedliche Gersten-cDNA-Sequenzen identifiziert, die für RAC/ROP Proteine der Gerste kodieren. Durch den Mechanismus der RNA Interferenz (*posttranscriptional gene silencing*) mittels biolistischer Einbringung von dsRNA, konnten wir zeigen, dass der funktionale *knock-down* von RACB die Penetrationsresistenz der Gerste gegenüber dem Gertenmehltaupilz erhöht [2]. Umgekehrt führte die Überexpression einiger aber nicht aller konstitutiv aktivierten RAC/ROPs zu erhöhten Anfälligkeit, was bestätigt, dass kleine G-Proteine spezifisch als Suszeptibilitätsfaktoren in der Regulation der Penetrationsresistenz funktional sind. Die subzelluläre Lokalisation von GFP:RAC/ROP Fusionsproteinen mittels Lasermikroskopie erlaubte darüber hinaus, die Aktivität der RAC/ROPs an der Plasmamembran zu zeigen.

[1] Schweizer P, Pokorny J, Abderhalden O, Dudler R (1999) A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in wheat. *Mol Plant Microbe Interact* 12: 647-654

[2] Schultheiss H, Dechert C, Kogel K-H, Hückelhoven R (2002) A Small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley. *Plant Physiol* 128: 1447-1454

T-DNA tagging bei der Gerste

Prof. Dr. Hans-Henning Steinbiß; MPI für Züchtungsforschung, Carl-von-Linné-Weg10, 50829 Köln

email: Steinbis@mpiz-koeln.mpg.de

T-DNA tagging ist eine bei Dikotyledonen schon lange etablierte Methode und bei *Arabidopsis* extrem erfolgreich. Der Grundgedanke ist, Pflanzen mit einem Gen zu transformieren, das keine eigenen Steuerungselemente mit bringt (promotorlos). Folgerichtig kann es nur zur Genexpression kommen, wenn das neue Gen nach der Integration in das Zielgenom in den Einflussbereich neuer Steuerungselemente kommt. Durch eine geschickte Versuchsanordnung lassen sich diese Elemente molekularbiologisch charakterisieren. Bei Getreide besteht ein erheblicher Mangel an identifizierten Promotoren für die angewandte Gentechnologie.

Vor wenigen Jahren erschien es noch bei Getreide unmöglich, *Agrobacterium* zum T-DNA tagging einzusetzen, weil sie nicht zum Wirtsbereich dieses Bakteriums zählen. Die Situation hat sich dramatisch verändert. Zunächst war Reis der Genfahre *Agrobacterium* zugänglich, dann kamen im Laufe der Jahre Mais, Weizen und Gerste hinzu. Inzwischen lassen sich alle bedeutenden Getreide mit *Agrobacterium* transformieren; zumindest speziell ausgewählte Sorten. Gelingt es aber auch die notwendigen hohen Transformationsraten zu erzielen? Beim Reis kann man das zweifellos bejahen. Bei der Gerste sind wir jetzt dazu in der Lage. Eine Langzeitstudie hat ergeben, dass eine Person 5000 transgene Pflanzen pro Jahr herstellen kann. Zur Zeit stellt sich mehr die Frage, welcher Marker Verwendung finden sollte. GUS hat sich beim Reis als wirkungsvoll erwiesen. Sehr viel sensitiver scheinen jedoch GFP und RFP zu sein. Allerdings hat sich gezeigt, dass in beiden Fällen Hintergrundaktivitäten eine schnelle und aussagekräftige Analyse transgener Pflanzen stört. Optimierung ist dringend nötig und Voraussetzung für weiteres Arbeiten.

Ein molekularer Ansatz für entwicklungsphysiologische Untersuchungen zur Embryonalentwicklung und Polaritätsausprägung bei somatischen Embryonen von *Larix decidua*

Thiel, J. und Taryono

Angewandte Botanik, Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin

Das Modellsystem zur somatischen Embryogenese für die Europäische Lärche bietet ideale Voraussetzungen die Embryonalentwicklung von sehr frühen Stadien bis zum reifen Embryo zu verfolgen. Der Hormongruppe der Auxine wird schon bei frühesten Differenzierungsschritten, wie der Ausprägung der Polarität des Embryos und der Ausbildung der pflanzlichen Symmetrieachse, eine steuernde Rolle zugeschrieben.

Die Verwendung von Auxintransportinhibitoren bewirkte dramatische Veränderungen des embryonalen Entwicklungsmusters bei der Reifung von Lärchen Embryonen, ähnlich wie es schon für einige angiosperme Modellpflanzen gezeigt werden konnte. Um weitere Erkenntnisse über die Verteilung bzw. den Transport des endogenen Auxins zu erlangen, wurde ein effizientes Transformationssystem entwickelt, welches die Herstellung von transgenen Zelllinien mit auxinabhängigen Promotor-Reportergen-Konstrukten ermöglichte. Die Expression der GUS-Fusionen (*mas::GUS*, *GH3::GUS* und *AtPIN1::GUS*) wurde während der verschiedenen embryonalen Entwicklungsphasen analysiert und verglichen.

Mit den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Auxin bzw. dessen polarer Transport eine wichtige Signalfunktion für die Manifestation der Apikal-Basal-Achse des Embryos und die Entwicklung des Radikulaprimordiums hat.

Untersuchungen zur Effizienz des Mannose-Selektionssystems in der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation von Raps

M. Wallbraun, E. Eisenhauer und G. Krczal
Centrum Grüne Gentechnik, SLFA Neustadt, Breitenweg 71, 67435 Neustadt/Weinstraße
Email: mwallbraun.slfa-nw@agrarinfo.rlp.de

Phosphomannose Isomerase (PMI) katalysiert die reversible Konversion von Mannose-6-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat. Aufgrund der Tatsache, dass dieses Enzym in den meisten Pflanzen nicht vorkommt, kann PMI als Selektionsmarker in der Pflanzentransformation eingesetzt werden. Die Expression des PMI kodierenden ManA-Gens aus *E. coli* erlaubt Pflanzenzellen Mannose als Kohlenstoffquelle zu nutzen und auf mannosehaltigem Medium zu überleben. Während Mannose keinen nachteiligen Effekt auf Pflanzenzellen hat, resultiert die Selektion auf die Akkumulation von Mannose-6-Phosphat, welches von Phosphorylierung von Mannose durch die Hexokinase entsteht. Die Akkumulation von Mannose-6-Phosphat in der Pflanzenzelle wirkt sich negativ u. a. auf Glykolyse, Photosynthese und Glyoxalat Zyklus aus. Mit dem Mannose-Selektionssystem konnten bereits u. a. Mais, Reis, Weizen und Zuckerrübe erfolgreich transformiert werden. Im Rahmen dieser Studie sollte untersucht werden, ob das Mannose-Selektionssystem in der Transformation von Raps eine konkurrenzfähige Alternative zu den herkömmlichen Selektionssystemen darstellt. Hierzu wurden Hypokotylexplantate mit dem *Agrobacterium* Stamm ATHV pNOVGUS kokultiviert und auf Selektionsmedien mit unterschiedlichen Mannose/Saccharose-Konzentrationsverhältnissen überführt. Mit dem Mannose-Selektionssystem ist es möglich Raps effizient zu transformieren. Es wurden Transformationsraten bis zu 10% erreicht. Entscheidend für eine hohe Transformationseffizienz ist jedoch das richtige Mannose/Saccharose-Verhältnis im Medium. Bei dem Konzentrationsverhältnis 10 g/l Saccharose und 2,5 g/l Mannose, bei dem in einem Vorversuch mit einem „leeren“ *Agrobacterium*-Stamm die Regeneration von Hypokotylexplantaten zu 100% gehemmt wurde, waren von 49 regenerierten Pflanzen nur eine Pflanze GUS positiv. Die höchste Transformationsrate wurde mit 10 g/l Saccharose und 6,0 g/l Mannose erreicht. Es sind jedoch noch weitere Optimierungen notwendig, damit das Mannose-Selektionssystem eine Alternative zur Kanamycin- und Phosphinotricin-Selektion werden kann.

Genetische Transformation zur Optimierung der Rapsqualität
M. Karim Zarhloul, Institut für Pflanzenbau & Pflanzenzüchtung I
Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie & Umweltmanagement

Abstract

Der Raps (*Brassica napus*) nimmt weltweit als Ölpflanze für die Erzeugung von Speiseölen und Nahrungsfetten sowie als Rohstofflieferant für energetische Zwecke und die oleochemische Industrie eine wichtige Stellung ein. In den letzten Jahren wurden in der Ölpflanzenzüchtung verstärkt molekulare Ansätze verfolgt, um die Aktivität bestimmter, im Fettsäure- und Lipidstoffwechsel beteiligter Enzyme gezielt zu verändern und damit das Rohstoffangebot - das derzeit von Fettsäuren mit einer Kettenlänge von C16-18 dominiert wird - entscheidend zu erweitern. Dabei wird u.a. die Einführung kurz- und mittelkettiger Fettsäuren gezielt verfolgt. So konnten schon durch die Einführung verschiedener Thioesterase-Gene neue Rapsöl-Varianten erstellt werden, die hohe Anteile an gesättigten Fettsäuren im Kettenlängenbereich von C8-18 im Samenöl enthalten.

An unserem Institut wurde ein Protokoll zur *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation von Hypokotylexplantaten bei Raps (*B. napus*) etabliert. Dabei wurden verschiedene Parameter – insbes. die Zusammensetzung der Kulturmedien - des ursprünglichen Protokolls De Block *et al.* (1989) modifiziert, um eine höhere Ausbeute an Regeneraten bzw. potenziellen Transformanten zu erzielen. Letztere wurden charakterisiert, indem das Vorhandensein des Transgens mittels PCR und/oder *nptII*-ELISA nachgewiesen wurde. Nach Anzucht der Pflanzen im Gewächshaus wurden die T2-Samen gaschromatographisch bezüglich der angestrebten bzw. erzielten Fettsäure-Veränderungen analysiert.

Es hat sich herausgestellt, dass durch die Veränderung des Protokolls eine zufriedenstellende Anzahl an Transformanten der Sorte 'Drakkar'(00-Qualität) regeneriert werden konnte. Ein Genotypenvergleich zeigte darüber hinaus, dass Resynthese-Rapslinie 'RS306' (++)-Qualität) im Hinblick auf ihre Regenerations- und Transformationsrate der Sorte 'Drakkar' deutlich überlegen war.

Die Fettsäure-Ergebnisse der Transformanten mit integriertem Antisense-Desaturasegen zeigten, dass eine Expression des Strukturgens erzielt werden konnte, die sich in einer Akkumulation von Stearinsäure (C18:0) in den Samen der transgenen Pflanzen äußerte. Im Vergleich zur Kontrolle (3,7% C18:0) betrug der höchste Stearinsäure-Gehalt bei der besten Transformante 21,6% C18:0.