



Abstrakts



zum Workshop
des AK Gentechnik
der Deutschen Sektion der IAPTC

**„Agrobakterien-vermittelte
Transformation
und Regeneration transgener Pflanzen“**

13. - 14. Juli 2001

Bonn-Poppelsdorf

Etablierung eines Transformationssystem für die Wasserpflanze *Wolffia columbiana*

Robert Boehm¹, Cordula Kruse¹, Dirk Voeste², Stefan Barth³ und Heide Schnabl^{1*}

1. Institut für Landwirtschaftliche Botanik, Universität Bonn, Karlrobert Kreitenstr. 13, D-53115 Bonn

2. Hardtstr. 24, D-67105 Schifferstadt

3. RWTH Aachen, Institut für Biologie I, Worringer Weg 1, D-52074 Aachen

Wasserlinien (Lemnaceen) sind ein vielversprechendes System für zahlreiche Anwendungen wie Abwasserreinigung oder Futtermittel. Die homologe oder heterologe Expression von Genen könnte erweiterte Anwendungsmöglichkeiten der Pflanzen schaffen. Daher wurde die Möglichkeit untersucht, *Wolffia columbiana* (Lemnaceae) durch Agrobakterien-vermittelten Gentransfer zu transformieren. Dabei wurden mehrere Möglichkeiten getestet, die Zugänglichkeit der Pflanzenzellen für die infizierenden Bakterien (Agrobacterienstamm LBA4404 mit Plasmid p35SGusInt) zu erhöhen : Korund- oder Goldpartikelbehandlung, Vakuum-Infiltration oder Desintegration der Pflanzen. Die resultierende Transformationseffizienz war in jeden Fall höher als ganz ohne Behandlung der Pflanzen und erreichte durchschnittlich 3,9 % aller infizierten Pflanzen. Sowohl die Induktion der *vir*-Gene von *Agrobacterium* durch Medienbedingungen, als auch der Zusatz von 0,6 M Mannit während der Infektion führten zu einem klaren Anstieg der Transformationseffizienz. Maximal 30 %, durchschnittlich 15 - 20 % aller infizierten Pflanzen wiesen eine GUS-Färbung sowohl nach Korund-Behandlung als auch nach Vakuum-Infiltration auf, jedoch waren die Transformationsmuster unterschiedlich : während bei ersterer vornehmlich epidermale und subepidermale Zellen transformiert wurden, wiesen die Pflanzen bei letzterer zusätzlich transformierte Zellen im Pflanzeninneren und der meristematischen Zone auf. Desintegration der Pflanzen, gefolgt von Vakuum-Infiltration, führte zur Anfärbung ganzer Bereiche der Pflanzenfragmente, aber auch zu raschem Absterben der Pflanzenfragmente. Diese Ergebnisse und die Transformationsmuster dienen als Basis für die *in vivo* oder *in vitro*-Regeneration transgener Pflanzen.

A simplified procedure for *Agrobacterium*-mediated transformation of tobacco protoplast and regeneration of transgenic plants.

Pascal Cobanov, Marion Stoll, Ulrich Marckman-Mulisch., Edelgard Wendeler und Bernd Reiss

Max Planck Institut für Züchtungsforschung, Carl von Linné weg 10, 50829 Köln
cobanov@altavista.de

Protoplast culture is frequently used for genetic engineering of plants. However, plant regeneration from protoplasts is still a long, difficult and time consuming procedure. Here, we describe a simplified protocol for protoplast culture, transformation and plant regeneration of *Nicotiana tabacum* cv. SR1 leaf mesophyll cells.

At the beginning of this work, we started with a transformation protocol often described in the literature. Under our conditions, this protocol was not efficient enough for protoplast transformation and regeneration. For this reason a high efficient tobacco protoplast transformation and regeneration procedure needed to be developed.

First we optimised the culture and regeneration conditions of protoplasts by modifying different parameters. MS medium (Murashige and Skoog, 1962) containing BAP 0,5 mg/l and NAA 0,1 mg/l is used during the entire culture and regeneration procedure. 4 Days after protoplast culture initiation, the protoplast are embedded with MS medium containing 0,4 M sucrose and 0,8 % low melting agarose and then transferred on Petri dishes (Ø 14 cm) containing 80 ml of MS medium with only 30 g/l sucrose. We also developed technical tools to facilitate the transfer and the weekly subculture of the embedded cells. Under our culture conditions the first shoots appeared within 4 weeks after culture initiation.

The coculture efficiency was also optimised. The addition of the agrobacteria to the protoplasts need to be done just before the first protoplast division (2 to 3 days after culture initiation), 100 µl of an overnight *Agrobacterium* culture ($OD_{620} = 1$) is added per 10^6 protoplasts. In the same way, the transformation need to be stop 2 days after the addition of the agrobacteria. The coculture is stopped by adding 200mg/l cefotaxim into the low melting agarose. The transformed protoplast can be selected only after development into a small microcalli. The best results are obtain if the selection starts 5 to 7 days after end of the coculture. A transformation efficiency of up to 20 % could be identified by Gus staining.

Our simplified procedure bases on the modification of the protoplast culture medium, the hormone balance, the selection step as well as the improvement of technical tools. We could develop a high efficient transformation and regeneration protocol leading to the production of plantlets in less then 6 weeks after culture initiation.

This modified procedure could be very useful for plant breeding and research were high scale protoplast transformation and regeneration system are needed.

Einsatz und Erfahrungen mit Co-Transformation

Josef Dettendorfer, Josef Kraus und Hong Wang
PLANTA Angewandte Pflanzengenetik und Biotechnologie GmbH,
Grimsehlstrasse 31, G-37574 Einbeck; j.dettendorfer@kws.de

Öffentlichkeit und Regulierungsbehörden verlangen in der Zukunft, dass transgene Pflanzen bei einer Freisetzung bzw. für eine Inverkehrbringung frei von Marker- oder Selektionsgensequenzen sein müssen. Co-transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* ist neben der ortsspezifischen Rekombination und der Transposontechnik einer der Wege dazu. In diesem Vortrag werden unter besonderer Berücksichtigung der pflanzenzüchterischen Praxis die Vor- und Nachteile dieser Technik beschrieben. Eigene Ergebnisse, dargestellt von Tabak, Raps und Zuckerrüben, zeigen, dass bei Transformation mit Agrobakterien 30 bis 60% Co-Transformationsraten erzielt werden können. Dazu werden die Segregationsdaten der Tabakversuche im Einzelnen dargestellt. Übertragen auf andere Kulturarten zeigen diese, dass der erfolgreiche Einsatz von Co-Transformation zur Markergeneleminierung stark abhängig ist von der Transformationseffizienz der jeweiligen Kulturart. Für einen Einsatz in der pflanzenzüchterischen Praxis bedeutet dies, dass die Mechanismen der Genübertragung weiterer Forschung und Optimierung bedürfen.

Etablierung einer Mikrosporenkultur bei Pappeln; besteht die Möglichkeit einer Transformation vor der Diploidisierung?

Frank Deutsch¹, Jochen Kumelehn², Matthias Fladung¹

1 BFH, Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Sieker Lstr.2, 22927 Großhansdorf, email: deutsch@holz.uni-hamburg.de

2 Institut für allgemeine Botanik, Angewandte Molekularbiologie der Pflanzen

II, Universität Hamburg, Ohnhorststr. 18, 22609 Hamburg

Während für einige krautige Pflanzen inklusive den Gräsern (Kasha et al. 1990) bereits seit längerem Protokolle zur Mikrosporenkultur entwickelt wurden, wurde erst 1999 die erste Beschreibung einer erfolgreichen Mikrosporenkultur für eine Baumart (Apfel) veröffentlicht (Höfer et al. 1999). Hingegen liegt bisher kein Protokoll für Forstbäume vor (Baldursson und Ahuja 19996). Hier werden erste Grundlagen zur Erstellung eines Protokolls für Pappeln präsentiert.

Aus unreifen männlichen Blüten einer Schwarzpappelhybride wurden erfolgreich Mikrosporen isoliert und in ein nährstoffarmes Flüssigmedium überführt (Hungerphase). Nach 5-10 Tagen wurden die Mikrosporen in nährstoffreichem Flüssigmedium subkultiviert.

Hier konnten erste Mikrokallusse, die sich teils zu Embryonen weiterentwickelt hatten, dokumentiert werden. Derzeit wird die Pflanzenregeneration aus den Kallussen und Embryonen angestrebt. Sowohl der Ploidiegrad als auch die Homozygotie bei Diploiden soll geprüft werden.

Das vorrangige Ziel einer Mikrosporenkultur ist die Erzeugung von haploiden bzw. doppelhaploiden (homozygoten) Pflanzen. Zum Beispiel sind transformierte haploide Pflanzen für eine Genisolierung mittels T-DNA Tagging bzw. Transposon Tagging von Bedeutung. Sowohl wissenschaftliche Veröffentlichungen über Antherenkulturen und Parhenogeneseversuche bei Pappeln als auch eigene Erfahrungen lassen vermuten, dass aus

Pappelmikrosporen oder -eizellen generierte Pflanzen bereits sehr frühzeitig (als Sämling, während der Keimung oder Embryogenese) vom ursprünglichen haploiden zum stabilen diploiden Zustand wechseln (aufregulieren). Somit besteht die Notwendigkeit, Stadien während der Regeneration aus Mikrosporen *in vitro* zu identifizieren, die noch haploid und für eine Transformation geeignet sind. Solche Stadien könnten somatische Embryonen oder sogar Mikrokallusse sein, die sich innerhalb der Exine von Mikrosporen entwickeln und nach dem Aufplatzen der Exine ins Medium entlassen werden. Eine Transformation von solchen Mikrokallussen soll zur nächsten Saison versucht werden.

***Agrobacterium*-vermittelter Gentransfer bei Rosen**

Andrea Dohm

Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für Zierpflanzenzüchtung, Bornkampsweg 31., 22926 Ahrensburg
Tel.:04102/80222, e-mail a.dohm@bafz.de

Am Institut für Zierpflanzenzüchtung wird daran gearbeitet, durch Überexpression von antifungalen Genen die Anfälligkeit von Rosen gegenüber verschiedenen pilzlichen Pathogenen gleichzeitig zu reduzieren. Wir konnten bisher zeigen, dass die Expression eines Ribosomen inhibierenden Proteins aus Gerste im extrazellulären Raum die Anfälligkeit der Sorte Pariser Charme gegen Sternrußtau im Vergleich zur nicht transformierten Kontrolle um 40% vermindert. Die Gene unter Kontrolle des 35S-Promotors werden mit Hilfe des *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfers in somatische Embryonen eingebracht, die anschließend über Adventivprossbildung zu Pflanzen regeneriert werden. Die Etablierung der embryogenen Kalluskulturen erfolgt aus Blattexplantaten von *in-vitro*- Sprosskulturen. Die Blattexplantate werden durch Einschneiden quer zu den Leitbündeln an der Blattunterseite verletzt und für vier Wochen auf auxinhaltigem MS-Medium kultiviert, wo sie Kallus bilden. Die weitere Subkultur erfolgt auf cytokininhaltigem MS-Medium, wo die Blattexplantate nach 3 Wochen bis zu 6 Monaten somatische Embryonen und embryogenen Kallus bilden. Dieser kann von den Explantaten abgetrennt und auf MS-Medium mit NES, Zeatin und GA₃ erhalten und vermehrt werden. Für die Regeneration von Pflanzen wird Adventivprossbildung an den somatischen Embryonen auf BAP-haltigem MS-Medium induziert. Pflanzenregeneration durch Keimung der somatischen Embryonen erfolgt nur sporadisch. Bisher konnte dieses Protokoll für 42 verschiedenen Rosengenotypen erfolgreich angewendet werden, wobei die Auswahl der Auxine bzw. Cytokine an den jeweiligen Genotypen angepasst werden muss. Die Regenerationsrate bezogen auf die Frequenz an inkubierten Blattexplantaten mit somatischer Embryogenese beträgt 1–95%. Für die Transformation werden die somatischen Embryonen vom Kallus getrennt, in *Agrobacterien*suspension inkubiert und anschließend über Adventivprossbildung regeneriert. Maximal 3% der inkubierten somatischen Embryonen bilden transgene Sprosse, wobei die Transformationsrate erheblich von der Vorkultur der *Agrobakterien* beeinflusst wird. Es erwies sich als optimal, eine Übernachtskultur 1:20 in Minimal A-Medium zu verdünnen und nach anschließender zweistündiger Inkubation bei 100 rpm für die Transformation einzusetzen. Die Selektion des transgenen Pflanzengewebes erfolgt mit dem nptII-Gen für Kanamycinresistenz.

Als Alternative zu Antibiotika als Selektionsmarker wurden verschiedene Zucker, Eisen und 2-Deoxyglukose getestet, ein Selektionssystem konnte jedoch bisher noch nicht etabliert werden. Die transgenen Pflanzen zeigen z.T. somaklonale Variation, die auf die *in-vitro*-Regeneration sowie auf den Transformationsprozess zurückzuführen ist. Um den Problemen, die mit der Nutzung eines *in-vitro*-Regenerationssystems für den *Agrobakterien* vermittelten Gentransfer zu umgehen, wird an der Etablierung eines *in-planta*-Transformationssystems gearbeitet.

Agrobakterien-vermittelter Gentransfer für Chrysanthemen

Jens-Peter Himstedt, Hans-Jörg Jacobsen
Lehrgebiet Molekulargenetik, Universität Hannover

Das vom Niedersächsischen Ministerium für Wissenschaft und Kultur (MWK, „Forschungsschwerpunkt Agrarbiotechnologie Niedersachsen,“) geförderte Projekt hat zur Aufgabe transgene, pilzresistente Chrysanthemen zu entwickeln. Für dieses Vorhaben sollten folgende Genkonstrukte mit nachgewiesener antifungaler Wirkung eingesetzt werden. Das *vst*-gen aus der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.) ist von der Bayer AG zur Verfügung gestellt worden. Das Scottish Crop Research Institute in Dundee (Eigentümer der Rechte an PGIP) erlaubte die Benutzung des Gens für ein Polygalakturonase-inhibierendes Protein aus der Kiwi (*Actinidia deliciosa*). Als selektierbarer Marker wurde das Herbizid Resistengen *bar* verwendet. Als Pflanzenmaterial wurden marktwichtige Chrysanthemensorten von der Firma Brandkamp GmbH als *in vitro* Kulturen zur Verfügung gestellt.

Regeneration: Von 19 untersuchten Chrysanthemensorten konnten 16 erfolgreich *in vitro* regeneriert werden. Die meisten Sorten zeigten die beste Sproßregeneration bei der Verwendung von Kulturmedium mit MS Salzen unter Zugabe von 8,9 µM BAP und 2,7 µM NAA. Die Bewurzelung erfolgte mit MS- Kulturmedium unter Zugabe von 2,5 µM IBA. Die bewurzelten Pflanzen konnten im Gewächshaus erfolgreich weiter kultiviert werden.

Transformation: Zur Transformation wurden alle erfolgreich regenerierten Sorten eingesetzt, bisher konnten von den Sorten Nr. 140 und Nr. 170 transgene Pflanzen etabliert werden. Für die Transformation wurden Spross-Segmente mit einer Größe von 4-8 mm eingesetzt. Die Cokultur erfolgte für zwei Tage im Dunkeln. Die erste Subkultur erfolgte auf Regenerationsmedium mit 250 mg/L Ticarcillin. Nach zwei Wochen folgte die zweite Subkultur auf dem gleichen Medium mit zusätzlich 15 mg/L PPT. Transgene Sprosse wurden auf MS-Medium ohne Phyttohormone mit 100 mg/l Ticarcillin und 15 mg/L PPT als Elitepflanzen gehalten. Alle Pflanzen, die auf Kulturmedium mit PPT gewachsen waren, wurden zunächst mit der Leaf-Disk PCR Methode auf das *vst* bzw. *pgip*-Gen untersucht, dann folgte bei entsprechender Größe der Pflanzen die Isolierung von DNA und eine erneute PCR auf die Transgene. Wenn diese Ergebnisse positiv waren, erfolgte eine Analyse mittels Southern-Blot und RT-PCR.

Kultur der Pflanzen im Gewächshaus: Von allen Transgenen, sowie allen regenerierten Sorten wurden Elitepflanzen zur Anzucht von Mutterpflanzen in das Gewächshaus gebracht. Nach erfolgreicher Kultur der Mutterpflanzen wurden Stecklinge gebrochen, bewurzelt und getopft. Diese Pflanzen sollen herangezogen werden, um sie phänotypisch zu charakterisieren und bei den Transgenen, die Resistenzniveaus gegen das Herbizid Basta und Weißen Chrysanthemenrost zu ermitteln.

Etablierung eines effizienten Regenerationssystems zur Transformation von Hopfen

Christoph Horlemann und Gerd Weber

Universität Hohenheim, Pflanzenzüchtung und Biotechnologie (350-c),
Fruwirthstr. 21, 70599 Stuttgart,
Tel.: (07 11) 4 59 23 41, Fax: (07 11) 4 59 23 43,
E-mail: horleman@uni-hohenheim.de, weberg@uni-hohenheim.de

Innerhalb des vorgestellten Projektes soll Hopfen durch Transfer von geeigneten Genen mit einem höheren Grad von Pilzresistenz ausgestattet werden. Eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung eines Transformationssystems ist ein effizientes Regenerationsprotokoll.

Da für die Hopfensorte Tettninger bisher kein Protokoll zur Regeneration von Pflanzen aus Sterilkulturen bekannt war, wurden zunächst verschiedene Typen von Explantaten auf ihre Eignung zur Regeneration von Pflanzen hin überprüft. Dabei erwiesen sich Stengelstücke als wesentlich besser zur Regeneration geeignet als Explantate aus Blättern oder Blattstielen.

Die Zusammensetzung von Gewebekulturmedien, die für andere Hopfensorten entwickelt worden waren, wurden auf ihre Eignung zur Regeneration für die Sorte Tettninger hin überprüft und entsprechend optimiert. Ein Medium bestehend aus MS-Salzen, B5-Vitaminen, 2% Glucose, Thidiazuron (2mg/l) und IAA (0,25 mg/l) erwies sich als am besten geeignet. Auf diesem Medium konnte eine durchschnittliche Regenerationsrate von 91 % (Sprosse pro eingesetzte Stengelstücke) erreicht werden.

Nach dem erfolgreichen Aufbau eines Regenerationssystems soll ein Protokoll zur effizienten Transformation etabliert werden. Hierzu wurde versucht, eine Reportergen mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* in Hopfengewebe zu übertragen. In mehr als 30% der eingesetzten Stengelstücke konnte die stabile Expression des Reportergens nachgewiesen werden.

Nach der Optimierung des Transformationsprotokolls sollen Gene übertragen werden, die Hopfen mit einem höheren Grad an Resistenz gegenüber Pilzen ausstatten können.

***Agrobacterium*-vermittelter Gentransfer in Karotten-, Gerste- und Weizenkulturen und deren Regeneration**

J. Imani

Institut für Pflanzenernährung, Abt. Gewebekultur, Justus-Liebig Universität, Giessen

Abstract:

Nach empirischen Untersuchungen zur somatischen Embryogenese z. B. bei *Daucus carota* spielt, neben dem Genotyp (Imani et al. 2001) und Induktionsfaktoren, auch das Ausgangsmaterial eine sehr wichtige Rolle. Die embryogene Kompetenz des Ausgangsgewebes nimmt nach folgendem Schema ab (Neumann 1999): **Embryo > Hypocotyl > Petiole > Blattlamina > Wurzel.**

Daher wurde bei einigen Pflanzenarten direkt von Samen mit reifen Embryonen ein hoch embryogenes Zellmaterial erstellt, das sich nach Überführung auf ein hormonfreies Nährmedium über die somatische Embryogenese zu intakten Pflanzen entwickelte. Ausgehend von solchen Versuchen unter Verwendung von Karottensamen konnten entsprechende Verfahren bei *Hypericum*, Gerste und Weizen erfolgreich entwickelt werden. In Zellsuspensionen der letzten beiden Pflanzenarten wurde Fremd DNA unter Verwendung eines *Agrobacterium tumefaciens*-System inseriert. Die höchsten Einbauraten wurden in zellzyklussynchronen Zellsuspensionen (FDU/Thymidin-System) erzielt. Aus solchen transgenen Zellsuspensionen wurden intakte Pflanzen herangezogen. In Karottengenom wurde das auxinsensitive MAS/GUS-System eingebaut und die Auxinverteilung sowohl in kultivierten Petiolenexplantaten während des Ablaufs der somatischen Embryogenese, als auch in verschiedenen Teilen der daraus gewonnenen intakten Pflanzen ermittelt. Bei Karotten konnte weiterhin ein Gen für ein Oberflächenprotein des Hepatitis B-Virus eingebaut werden, das sowohl in Zellsuspensionen als auch in Sproßorganen und der Vorratswurzel der erntereifen Pflanzen exprimiert wurde. Klinische Test mit solchen Wurzelmaterial stehen noch aus.

Literatur:

Imani J. (1999): In situ-Nachweis der Auxinverteilung in kultivierten Petiolenexplantaten von transgenen Pflanzen während der Induktion der somatischen Embryogenese bei *Daucus carota* L Diss Justus Liebig Universität Gießen Germany pp 199

Imani J., L. Tran Thi, G. Langen, B. Arnholdt-Schmitt, S. Roy, C. Lein, A. Kumar and K.-H. Neumann: Somatic embryogenesis and DNA organization of genomes from selected *Daucus* species.. Plant Cell Reports. Online published, 5 July 2001. DOI 10.1007/s002990100363

Neumann, K-H. (1999): Some studies on somatic embryogenesis, a tool in plant Biotechnology. <http://bibd.uni-giessen.de/ghtm/2000/uni/p000004.htm>

Agrobacterium-vermittelter Gentransfer der TuMV-Virushüllprotein- und Nib-Gene in Brassica oleracea

Evelyn Klocke, U. Ryschka, G. Schumann, R. Krämer, J. Schubert
Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen
Neuer Weg 22/23, 06484 Quedlinburg

Das Kohlschwarzringflecken-Virus (*Turnip mosaic virus*, TuMV) infiziert den Gemüsekohl und führt zu erheblichen Ertragseinbußen. Eine nachhaltige Bekämpfung des TuMV und seiner Vektoren (Aphiden) ist gegenwärtig nicht möglich. Eine Resistenz der Pflanzen ist daher wünschenswert. Mit der Übertragung von Genen des Virus in *Brassica oleracea* sollen neue Wege zur Resistenzinduktion beschritten werden.

Die Transformation von *B. oleracea* mittels *Agrobacterium tumefaciens* stellt bis heute keine Routine dar. Es wurden pflanzliche Expressionskassetten mit dem Selektionsmarker PAT und den Genen des Virus-Hüllproteins (TuMV-CP) als auch des Nib-Gens (TuMV-Nib) verwendet. Die Selektion mit Gluphosinolat nach Übertragung des *pat*-Gens ist offensichtlich sehr gut für *B. oleracea* geeignet, denn in einigen Experimenten wurden Transformationsraten bis 42% erreicht. Die mittlere Transformationsrate unter Berücksichtigung aller Experimente mit insgesamt 11.210 kultivierten Hypocotylexplantaten betrug 5,09%. Es konnte nachgewiesen werden, dass der verwendete Agrobakterienstamm einen bedeutenden Einfluss auf die Regenerationsrate hat. So wurde mit dem Stamm EHA 105 eine mittlere Transformationsrate von 17,2% gegenüber nur 2,4% mit dem Stamm FV2260 erreicht. Weitere Ergebnisse zum positiven Einfluss einer Ammenkultur während der Co-Kultivation mit *A. tumefaciens* werden vorgestellt.

Die Regeneratpflanzen wurden mit den Gen-spezifischen Primern in der PCR überprüft. Eine zusätzliche PCR mit spezifischen Primern aus DNA-Sequenzen der Agrobakterien dienen dem Nachweis der Agrobakterienfreiheit. Die ersten Southern-Untersuchungen zeigen, dass die transgenen Pflanzen 1-6 Kopien der Fremdgene enthalten.

Die Pflanzen wurden *in vitro* verklont und ins Gewächshaus überführt. Testungen gegen das TuMV-Virus mittels Sichtbonitur und ELISA zeigen, dass die transgenen Linien sehr unterschiedlich gegen einzelne Pathotypen reagieren.

Agrobakterien-bermittelter Gentransfer bei Pollenkulturen der Gerste

Jochen Kumlehn und Horst Lörz

Institut für Allgemeine Botanik, AMPII, Universität Hamburg

Den immer effizienter werdenden Möglichkeiten zur Identifizierung von Genen mit voraussichtlich wissenschaftlich bzw. wirtschaftlich relevanter Funktion standen für Gerste bislang nur vergleichsweise ineffektive Methoden zur genetischen Transformation gegenüber. Bei Gerste verfügen isolierte unreife Pollen bezogen auf eine Donorpflanze über das mit Abstand größte Potenzial zur massenhaften Pflanzenregeneration. Pro Ähre können bis zu 10.000 Pflanzen regeneriert werden, von denen über 80% eine spontane Aufdopplung des haploiden Genoms der gametophysischen Ausgangszellen durchlaufen haben. Als maßgebliche Besonderheit bei der Entwicklung von Methoden zur Agrobakterien-vermittelten Transformation von Pollenkulturen ist zu bedenken, dass die CO-Kultur mit den *Agrobakterien* in flüssigem Medium erfolgen muss. Daher sind Erkenntnisse und Erfahrungen, die im Rahmen der Transformation auf Festmedium bzw. *in planta* gewonnenen worden sind, nur in eingeschränktem Maße nutzbar. Andererseits ergeben sich aus der Notwendigkeit der submersen Co-Kultur durchaus auch verbesserte Möglichkeiten zur Untersuchung und Optimierung des Transformationsprozesse. So besteht hier der Vorteil, dass eine Analyse von funktionellen Zusammenhängen zwischen Kulturbedingungen und Gentransfer tatsächlich erst ermöglicht wird, da zum einen das untergetauchte Zielgewebe den Bedingungen vollständig ausgesetzt ist, und zum anderen die im Flüssigmedium gewährleistete freie Diffusion einer durch Bakterien und/oder pflanzliche Zellen hervorgerufenen lokalen Veränderung der Bedingungen im Kontaktbereich der Zielzellen ständig entgegenwirkt. Da beispielsweise der pH-Wert einen maßgeblichen Einfluss auf die Transformationsaktivität der Bakterien ausübt, jedoch sowohl von den *Agrobakterien* selbst als auch von den pflanzlichen Zielzellen innerhalb von wenigen Stunden drastisch verändert werden kann, ist die Reproduzierbarkeit einer effizienten Transformation nur über eine stabile Balance zwischen Bakterie - und Pflanzenzellpopulation, sowie einen unterstützenden Einfluss von pH-puffernden Medienbestandteilen zu erreichen. Anhand zahlreicher Experimente wurden auch weitere Kulturparameter identifiziert (Glutamin, Kalzium, Acetosyringon), bei denen wie beim pH-Wert das Optimum bezüglich der Transformationsaktivität der Bakterien nicht mit deren Vermehrungsoptimum übereinstimmte. Es wurde ein Protokoll etabliert, das unter Nutzung neuer Prinzipien zur Regulierung der bakteriellen Aktivität während sowie nach der CO-Kultur eine effiziente Transformation von Pollenkulturen gewährleistet. Nach Optimierung der Selektionsbedingungen, d.h. frühzeitigem Einsetzen des Selektionsdruckes, Selektion in submerser Kultur sowie hoher Konzentration des Selektionsagens Bialaphos, konnten zahlreiche transgene Pflanzen regeneriert werden. Dabei erwies sich der neue Ansatz im Vergleich zu den bisher verwendeten Methoden zu Gerstentransformation bezüglich der Effizienz als deutlich überlegen.

Transformation von Apfel

Iris Szankowski¹, Jörg Schönherr¹, Hans-Jörg Jacobsen²

¹Institut für Gemüse- und Obstbau, Am Steinberg 3, 31157 Sarstedt

²Lehrgebiet Molekulargenetik, Herrenhäuserstrasse 2, 30419 Hannover

Die vier marktwirtschaftlich bedeutendsten Apfelsorten des Alten Landes, Elstar, Holsteiner Cox, Gloster und Boskoop, sind wie viele andere Sorten sehr anfällig für pilzliche Pathogene wie z.B. Apfelschorf (*Venturia inaequalis*) oder Apfelmehltau (*Podosphaera leucotricha*).

Anwendung bei der Transformation dieser Apfelsorten finden Genkonstrukte, deren Produkte in Abwehrmechanismen gegen Pilzbefall involviert sind, wie z.B. die Stilbensynthese und die Polygalacturonase inhibierenden Proteine (PGIP).

Die Stilbensynthese ist verantwortlich für die Bildung des Phytoalexins Resveratrol aus p-coumaroyl-CoA und malonyl CoA, zwei Substrate, die in jeder Pflanze vorhanden sind, da sie auch für andere Stoffwechselwege benötigt werden. Durch den Transfer der Stilbensynthese in verschiedene Pflanzenspezies wurde bereits erhöhte Resistenz gegen Pilzbefall festgestellt (Hain, R. et al. 1993; Stark-Lorenzen, P. et al. 1997; Leckband G.; Lörz H. 1998).

Die PGIPs inhibieren Polygalacturonasen, die bei der Penetration von pilzlichen Pathogenen freigesetzt werden.

Für die genannten Sorten wurden zunächst effektive Regenerationssysteme aus Blattmaterial entwickelt. Die Sproßinduktion erfolgte durch 6-wöchige Kultur auf TDZ-haltigem Medium, wobei sich Konzentrationen im Bereich von 3-5 µM als optimal für die verschiedenen Sorten erwiesen haben. Nach einer Elongationsphase mit BAP und GA₃ erfolgte die Bewurzelung auf IBA-haltigem Medium.

Für die Transformation wurde der *Agrobacterium*-Stamm EHA105 eingesetzt. Das binäre Vektorkonstrukt enthielt neben den obengenannten antifungalen Genen ebenfalls das *bar*-Gen, welches für die Phosphinotricinacetyltransferase codiert und somit die Selektion mit dem Herbizid Phosphinotricin (ppt; Bestandteil von Liberty®, ehemals Basta®) erlaubt. Bei der Selektion wurden zwei verschiedene Selektionsschemata angewendet. Das selektive Agens wurde zum Teil sofort nach der Cocultivierung appliziert, wobei die Konzentration von ppt während der Regenerationsphase auf 10 mg/L gesteigert wurde. Mit Hilfe dieser Methode wurden mehrere transgene Holsteiner Cox Linien mit dem Stilbensynthesegen (*vst*) regeneriert. Bei einigen Transformationen wurden zunächst Sprosse ohne Selektionsdruck regeneriert und diese im Anschluss der Selektion unterworfen. Von der Sorte Elstar konnte auf diese Weise eine *vst* transgene Linie regeneriert werden.

Die Bewurzelung erfolgte immer unter Selektionsdruck (10 mg/L ppt). Die Integration des Stilbensynthesegens wurde mit Hilfe der PCR sowie mit dem Southern Blot überprüft. Die Expression des Gens wurde mit der RT-PCR nachgewiesen. Zukünftige Arbeiten zielen auf den Nachweis des Resveratrols sowie auf die Untersuchung der Interaktion zwischen transgenen Apfellinien und Apfelpathogenen.

Hain R., Reif H.-J., Krause E., Langebartels R., Kindl H., Vornam B., Wiese W., Schmelzer E., Schreier P.H., Stöcker R.H., Stenzel K. (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361: 153-156.

Stark-Lorenzen P., Lörz H. (1998) Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. *Theor Appl Genet* 96: 1001-1012.

Stark-Lorenzen P., Nelke B., Hänßler G., Mühlbach H.P., Thomzik J.E. (1997) Transfer of a grapevine stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Cell Reports* 16: 668-673.

Agrobakterien-vermittelter Gentransfer bei *Brassica napus*

Karin Sonntag

Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, Institut für landwirtschaftliche Kulturen, 18190 Groß Lüsewitz, Rudolf- Schick- Platz 3a

Pflanzen transformation durch *A. tumefaciens*-vermittelten Gentransfer ist allgemein von hohem Interesse, weil in den meisten Fällen nur eine Kopie der zu transferierenden T-DNA in das Pflanzengenom integriert wird. Die einfache Handhabbarkeit dieser Technik ist ein weiterer Vorteil. Der Erfolg des Transformationsprozesses und die Regeneration transgener Pflanzen werden von zahlreichen experimentellen Faktoren beeinflusst.

Brassica napus, weltweit eine wichtige anuelle Ölpflanze, wurde in erster Linie mit einer modifizierten Methode von DeBlock et al. (1989) transformiert. Die Kokultivierung der Hypokotyle erfolgte mit dem binären Vektor pRE1, dem das Resistenzmarkergen Kanamycin unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors und das Nutzgen inseriert wurde (von Frentzen und Heinz, Uni Hamburg, sowie Broer, Uni Rostock, zur Verfügung gestellt). Winterraps- und Sommerrapslinien wurden vergleichend analysiert. Die Ergebnisse zeigten deutliche Unterschiede in der Transformationseffizienz zwischen den Linien (0 bis 18 %). Für die Optimierung der Rapstransformation wurden zwei Agrobakterienstämme mit unterschiedlichen Virulenzeigenschaften geprüft. Die höhere Transformationsrate mit dem Agrobakterienstamm C58C1ATHV gegenüber GV3101 belegt seine Hypervirulenz und zeigt damit die größere Fähigkeit dieses Stammes, den Vektor stabil zu vererben. Als Nachteil erweist sich das Problem der Elimination der Bakterien.

In Experimenten mit Kotyledonenexplantaten zeigte sich keine Erhöhung in der Zahl der transformierten Sprosse gegenüber der Verwendung von Hypokotylexplantaten. Demgegenüber war ein Zusatz von Silbernitrat zum Medium bei *Brassica napus* essentiell und führte zu erhöhten Regenerations- und Transformationsraten. Absterbende und verbräunte Zellen traten auf, wenn Silbernitrat im Medium fehlte.

Die auf unterschiedliche Expressionsstärken und -spezifitäten getesteten Promotoren Napin, Thioesterase und DC3 zeigten nur geringe Effekte auf die Transformationseffizienz. Wesentlich größer hingegen waren die Unterschiede zwischen einzelnen Versuchsansätzen, die auf einen differenzierten physiologischen Zustand der Explantate hindeuten.

Bei der Weiterentwicklung der Transformationssysteme können Techniken, die unabhängig von der In-Vitro-Regeneration sind, neue Perspektiven eröffnen.

Etablierung eines *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransferprotokolls für Rose

Th. Halbach, Prof. Dr. H.-J. Jacobsen

Lehrgebiet für Molekulargenetik, Universität Hannover

Diese Arbeit findet im Rahmen eines Teilprojektes des vom Land Niedersachsen geförderten Forschungsschwerpunktes Agrarbiotechnologie statt und wird in Kooperation mit dem Institut für Zierpflanzenzüchtung (IZZ) in Ahrensburg durchgeführt. Daher konnten *in-vitro* Sprosskulturen und embryogener Kallus der Sorten „Pariser Charme“ (PC) und „Heckenzauber“ (H) von Frau Dr. A. Dohm bezogen werden. Die Sprosskulturen wurden problemlos etabliert. Die dauerhafte Kultivierung des embryogenen Kallus war leider nur eingeschränkt erfolgreich, da er mit der Zeit seinen embryogenen Charakter verlor, so dass keine somatischen Embryonen (SE) mehr als Ausgangsmaterial für Transformationen gewonnen werden konnten. Bei den bis dahin durchgeführten Versuchen zur Transformation unterschied sich die Vorgehensweise in einigen Punkten von der aus dem IZZ (siehe bei A. Dohm): Es kamen andere Gene mit potenziell antifungaler Wirkung zum Einsatz, zur Verletzung der SE wurde ein (anderes) Ultraschallgerät eingesetzt und die Selektion erfolgte entsprechend der Projektvorgaben statt mit Antibiotikum (Kanamycin) mit Glufosinat-Ammonium, dem Wirkstoff des Totalherbizides Basta. Im vorgestellten Fall wurden SE der Sorte H mit *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 pHKvst co-kultiviert, um das Basta-Resistenzgen *bar* als Selektionsmarker und das *vst*-Gen aus *Vitis vinifera* L., das für Stilbensynthese codiert, zu übertragen. Die SE wurden für 0, 2 oder 4 Minuten mit Ultraschall behandelt. Die Selektion begann direkt nach der Co-Kultur oder nach drei Wochen mit der nächsten Subkultur. Der Selektionsdruck wurde alle drei Wochen gesteigert und bei 10 g/L Glufosinat-Ammonium beibehalten. Von ursprünglich 720 Explantaten haben 11 überlebt, die bis zur Southernblot-Analyse als je ein Klon betrachtet werden. Die Regeneration von Sprossen dauerte mit 13 bis 23 Monaten erheblich länger als am IZZ (6 Mon.). Von 6 Klonen konnten bereits Sprosse unter Selektion bewurzelt und dann Pflänzchen in Erde getopft und im Gewächshaus abgehärtet werden. Einige dieser Pflanzen wurden in einem ersten Test komplett mit Basta gespritzt (1 g/L Glufosinat-Ammonium). Während die untransformierten Kontrollen abgestorben sind, zeigten die transformierten lediglich unterschiedlich starke Effekte. Das bedeutet, dass einige Blätter abstarben, anders als bei den Kontrollen die Sproßachsen jedoch vital blieben und die Achselknospen neu austrieben. Teilweise war eine unterschiedliche Reaktion sogar zwischen den Fiederblättchen der selben Blattspreite zu beobachten. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich die Frage, ob es möglich ist, dass das Gewebe tatsächlich noch untransformierte Anteile enthält oder ob der Befund auf andere Faktoren wie Expressionsstärke, Bestrahlungsintensität oder Konzentrationsunterschiede zurück zu führen ist. Mit den molekularbiologischen Untersuchung der Pflanzen ist begonnen worden.