

**Entwicklung eines**  
***Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfersystems**  
**für Kichererbsen (*Cicer arietinum* L.)**

Grundlagen zur gentechnischen Resistenzvermittlung gegenüber *Ascochyta rabiei*.

Von dem Fachbereich Biologie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
— Dr. rer. nat. —  
genehmigte Dissertation

von Dipl. Biol. Heiko Kiesecker  
geboren am 28.10.1963 in Hannover  
2000

Referent: Prof. Dr. Jacobsen

Korreferent: PD. Dr. Huchzermeyer

Tag der Prüfung: 03.02.2000

Iris, Pontus und Glen

## Zusammenfassung

---

Mit dieser Arbeit wurde ein Modellsystem für die Entwicklung transgener Kichererbsen (*Cicer arietinum* L.) beschrieben. Für die Etablierung des Systems wurde der *A. tumefaciens* Stamm EHA 105 mit dem binären Plasmid *pIBgus*, welches ein *gus uidA* - und ein *pat* -Gen trägt, verwendet. Beide Gene werden von einem 35S CaMV Promotor angetrieben.

Für eine spätere Anwendung wurde das Stilbensynthasegen aus *Vitis vinifera* (*vst 1*), welches von der Firma Bayer zur Verfügung gestellt wurde, in den binären Pflanzentransformations-Vektor pGPTV übertragen. Das neue Konstrukt (*pHK vst*) enthält das *vst-1* - Gen unter dem induzierbaren *vst*-Promotor und ein *bar*-Gen unter der *nos*-Promotor Kontrolle

Die reifen, dekapitierten Embryonen wurden einer Ultraschall-unterstützten, Agrobakterien-vermittelte Transformationsmethode unterzogen (SAAT-Methode: Trick & Finer, 1998)

Die Regeneration der Pflanzen erfolgte über eine Induktion multipler Sprosse mittels 10 µM Thidiazuron (TDZ) während der Co-Kultur auf MS-Medium. Für die Elongation der induzierten Sproßknospen wurde die TDZ Konzentration in den folgenden Subkulturen auf demselben Medium verringert [10µM - 1µM]. Zeitraum von vier Wochen. Die Selektion erfolgte auf MS-Medium mit 2.3 µM Kinetin und 3 mg/l Phosphinothricin (PPT). Der Selektionsdruck wurde über 5 mg/l PPT auf 10 mg/l PPT gesteigert. Es wurde ferner versucht, eine Regeneration an protoplastenbürtigen Kalli zu induzieren, dies jedoch ohne Erfolg.

Die transgenen Sprosse wurden auf eine nicht transgene Unterlage gepfropft und kamen im Gewächshaus zur Samenreife. Eine Bewurzelung der Sprosse auf IBA supplementiertem MS-Medium mit 15 mg/l PPT war ebenso möglich. Die Wurzeln der bewurzelten Pflanzen waren aber vergleichsweise schwach, was die Pflanzen anfälliger machte.

Beide Markergene wurden in der T<sub>1</sub> und T<sub>2</sub> exprimiert. Für weitere Untersuchungen konnten homozygote, transgene Linien entwickelt werden. Die Pflanzen waren resistent gegenüber 600 mg/l PPT, welches in Form eines Leaf-Paint-Assays mit dem Totalherbizid BASTA<sup>®</sup> appliziert wurde.

Die Integration der Transgene erfolgte über *PCR*, einen radioaktiven *Phosphiothricin-Acetyl-Transferase-Assay* und *gus-Assays*.

### **Stichworte:**

**Kichererbse; Agrobacterium; Rekombinant**

In this studies a model system for the development of transgenic chickpea (*Cicer arietinum* L.) has been presented. For the establishment of the system the binary plasmid pIB-gus, harbouring a gus uidA - and a pat -gene was used in the *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA 101. Both genes are driven by a 35S CaMV promoter. Simultaneously the antifungal stilbensynthase gene from *Vitis vinifera* (vst1) was inserted in the binary plant transformation vector pGPTV bar. The new plasmid pHK vst contains the vst1 gene under its own promoter and the selectable marker gene (bar) under a nos-promoter.

Decapitated mature chickpea embryo explants were transformed by Sonication Assisted *Agrobacteria* - mediated gene Transfer (SAAT: Trick&Finer, 1998). Regeneration of plants was possible via multiple shoot induction on MS-medium containing 10  $\mu$ M Thidiazuron (TDZ) during co-culture. It was essential to subculture the induced shoot buds on decreasing concentrations of TDZ [5 $\mu$ M - 1 $\mu$ M] for elongation of shoot buds. The regenerated shoots were cultured on MS - medium supplemented with 3 mg/l PPT with 2.3  $\mu$ M Kinetin for selection. The selection pressure was subsequently increased up to 10 mg/l PPT on the same medium. Regeneration of plants were also tried from protoplast derived calli, however this system of plant regeneration failed. The transgenic shoots were established on soil through grafting on non transgenic root stock. Rooting was also achieved on IBA supplemented MS-medium having 15 mg/l PPT. The induced roots were comparatively weaker than the grafting ones. Both marker genes were expressed in T1 and T2 plants. The transgenic plants showed resistance in leaf paint assays on even up to 600 mg/l PPT. The transgenic homozygous plants were screened and grown in the green house for further studies. The integration of transgenes into the plant genome was confirmed through PCR, radioactive phosphiothricin-acetyl-transferase-assay and gus-assays in the progenies.

**Keywords:**

**Chickpea; *Agrobacterium*; Recombinant**

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 DIE BEDEUTUNG VON KICHERERBSEN ( <i>CICER ARIETINUM</i> L.).....	1
1.2 PROBLEMATIK .....	3
1.3 RESISTENZMECHANISMEN IN <i>CICER ARIETINUM</i> L. ....	5
1.4 PRODUKTE DES SEKUNDÄRSTOFFWECHSELS IN DER RESISTENZENTWICKLUNG .....	5
1.5 BIOTECHNOLOGISCHE ANSÄTZE .....	7
1.6 MÖGLICHE INTERFERENZEN UND ZU ERWARTENDER NUTZEN <i>vst 1</i> TRANSGENER <i>CICER ARIETINUM</i> PFLANZEN. ....	7
1.7 ZIELE DER ARBEIT .....	8
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>10</b>
2.1 REAGENZIEN .....	10
2.2 MEDIEN UND KULTURGEFÄßE.....	11
2.2.1 Pflanzenmedien .....	11
2.2.2 Bakterienmedien.....	12
2.3 PFLANZENMATERIAL.....	13
2.4 STERILISATION DES SAATGUTES.....	13
2.5 BAKTERIEN .....	13
2.5.1 Bakterienanzucht.....	14
2.5.1.1 <i>E. coli</i> .....	14
2.5.1.2 <i>Agrobacterium</i> .....	14
2.6 GEWEBEKULTUR.....	15
2.6.1 Protoplasten .....	15
2.6.2 Direkte Organogenese ( <i>multiple Sproßinduktion</i> ) .....	17
2.6.2.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> vermittelte Transformation.....	18
2.6.3 SAAT-Methode .....	18
2.6.3.1 Ultraschallgerät.....	19
2.6.4 Co-Kultur .....	20
2.6.5 Selektion .....	21
2.6.6 Pflanzung .....	22
2.6.7 Bewurzelung.....	22
2.7 CO-TRANSFORMATION .....	22
2.7.1 Tumorentstehung mit <i>A. tumefaciens C58C1</i> .....	22
2.8 NACHWEIS DER TRANSFORMATIONSMARKER .....	23
2.8.1 Transiente <i>gus</i> -Expression .....	23
2.8.2 Stabile <i>gus</i> -Expression .....	23
2.8.2.1 Zur Durchführung der <i>gus</i> -Assays benötigte Puffer: .....	24
2.8.3 Leaf-Paint-Assay.....	24
2.8.4 Phosphinothricin Acetyl Transferase -Assay.....	25
2.9 MOLEKULARE NACHWEISMETHODEN AN PFLANZEN.....	26
2.9.1 Isolation genomischer DNA aus Kichererbsenblättern.....	26
2.9.2 PCR .....	27
2.9.2.1 <i>gus</i> -PCR.....	27
2.9.2.2 <i>vst 1</i> PCR .....	27
2.10 KLONIERUNG DES BINÄREN VEKTORS <i>PHKVST 1</i> .....	29
2.10.1 Bakterientransformation .....	29
2.10.2 Kompetente Bakterien .....	29
2.10.3 Elektroporation .....	29
2.10.4 Elektroporation der unter 2.10.12 beschriebenen Ligationsansätze.....	30
2.10.5 Lagerung.....	31

2.10.6 Plasmidpräparation .....	31
2.10.7 Lösungen.....	31
2.10.8 Durchführung.....	32
2.10.9 DNA Aufreinigung .....	32
2.10.10 Aufbereitung des vst 1 Gens.....	33
2.10.11 Aufbereitung des pGPTV Bar Vektors .....	34
2.10.12 Ligation des vst 1 Gens mit dem pGPTV Body .....	34
2.10.13 Glycogenfällung.....	35
<b>3 ERGEBNISSE.....</b>	<b>36</b>
3.1 GEWEBEKULTUR .....	36
3.1.1 Protoplasten.....	36
3.1.2 Thidiazuron induzierte multiple Sprosse an dekapitierten Embryonen (Meristemkultur).....	37
3.2 URSPRUNG DER SPROßREGENERATION .....	38
3.3 GENTRANSFER IN PFLANZLICHES GEWEBE.....	42
3.3.1 Lokalisierung der transienten gus-Expression.....	42
3.4 TRANSFORMATION MIT DER SAAT METHODE .....	44
3.4.1 Anwendung der SAAT Methode zur Transformation von reifen Embryonen.....	46
3.4.1.1 Beschallung mit 40kHz .....	47
3.4.1.2 Beschallung mit 35 kHz .....	47
3.5 REGENERATION UND SELEKTION VON MUTMAßLICH TRANSGENEN SPROSSE .....	48
3.5.1 Gewebekulturstadien der, über <i>A. tumefaciens</i> (SAAT) transformierten, transgenen Kichererbsen. ....	49
3.6 WURZELINDUKTION / PFROPFUNG .....	52
3.6.1 gus-Expression an bewurzelten Sprossen .....	53
3.7 T <sub>0</sub> PFLANZEN ( <i>PIBGUS</i> ) IN DER GEWÄCHSHAUSPHASE.....	54
3.7.1 gus-Expression.....	55
3.7.2 Leaf Paint - Assays.....	58
3.7.3 gus-PCR.....	59
3.7.4 Phosphinothricin Acetyl Transferase - Assay .....	60
3.8 T <sub>1</sub> PFLANZEN ( <i>PIBGUS</i> ).....	61
3.8.1 gus-Expression.....	61
3.8.2 Leaf Paint.....	63
3.8.3 gus PCR .....	63
3.8.4 PAT Assay .....	64
3.8.5 Segregationsanalyse der T <sub>1</sub> Pflanzen .....	65
3.8.6 Segregationsanalyse der transgenen Nachkommenschaft. ....	65
3.8.6.1 T <sub>1</sub> Pflanzen .....	65
3.9 T <sub>2</sub> PFLANZEN .....	67
3.9.1 Homozygote Pflanzen.....	67
3.9.2 Überprüfung der Linie 14 auf ein Abschalten der Markergene.....	68
3.10 KLONIERUNG DES VST IGENS IN PGPTV BAR.....	69
3.10.1 Etablierung einer vst 1 PCR .....	71
3.11 TRANSFORMATION DER AGROBAKTERIEN .....	71
3.11.1 Transformationsvektor EHA 105 .....	71
3.11.2 Weitere rekombinante Agrobakterienstämme mit pHK vst .....	72
3.12 CO-TRANSFORMATION .....	73
3.12.1 vst 1 PCR.....	74
3.12.2 Phosphinothricin Acetylase -Assay.....	75

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>4 DISKUSSION</b> .....	<b>76</b>
4.1 PROTOPLASTEN.....	76
4.2 DIREKTE ORGANOGENESE UND <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> VERMITTELTER GENTRANSFER. ....	77
4.3 METHODENVERGLEICH.....	79
4.3.1 <i>Regeneration</i> .....	80
4.4 TRANSFORMATION.....	82
4.5 CO-TRANSFORMATION MIT TUMOR INDUZIERENDEM AGROBAKTERIUM C58C1 <i>PHKvst 1</i> .....	83
4.6 EXPRESSIONS- UND TRANSFORMATIONSCHIMÄREN.....	83
4.7 ULTRASCHALLBEHANDLUNG (SAAT) .....	88
4.8 ERSTELLUNG VON <i>PIBGUS</i> TRANSGENEN KICHERERBSEN .....	90
4.9 ANALYSETECHNIKEN .....	91
4.9.1 <i>Leaf paints-Assays zur schnellen Charakterisierung der mutmaßlich transgenen Pflanzen und deren Nachkommenschaft</i> .....	91
4.10 T <sub>1</sub> PFLANZEN .....	92
4.11 PFROPFUNG.....	93
<b>5 AUSBLICK</b> .....	<b>95</b>
<b>6 LITERATUR</b> .....	<b>96</b>

**Bilder und Graphiken**

Abb. 1 Ernteerträge, Körnerleguminosen, (FAO Statistik, 1999)	2
Abb. 2 Anbaufläche für Kichererbsen (FAO Statistik, 1999)	2
Abb. 3 Hektar- Erträge von Körnerleguminosen im Anbauggebiet Naher Osten und Syrien.	3
Abb. 4 PPT, ein Strukturanalogon zu Glutamat	21
Abb. 5 Detoxifizierungsreaktion des Phosphinothricins	21
Abb. 6 <i>vst 1</i> - Genarchitektur mit Primerbindungsstellen	28
Abb. 7 Längsschnitt durch einen Embryo	39
Abb. 8 Embryo vor und nach der Dekapitierung	40
Abb. 9 Darstellung der Lateralsproßmeristeme eines dekapitierten Embryos	40
Abb. 10 Sproßentwicklungskinetik	41
Abb. 11 Längsschnitt durch ein multiplen Sproßklon	42
Abb. 12 Transiente <i>gus</i> Expression an dekapitierten Embryonen	43
Abb. 13 Aufsicht auf dekapitierten Embryo mit transienter <i>gus</i> -Expression	43
Abb. 14 Summe <i>gus</i> -positiver Zellen nach der US-Behandlung (SAAT) *	45
Abb. 15 Stabile <i>gus</i> Expression an Explantaten nach vierwöchiger Gewebekultur.	46
Abb. 16 Stabile <i>gus</i> Expression an Explantaten mit und ohne SAAT-Behandlung	47
Abb. 17 Selektion über vier Wochen auf 3 mg/l PPT	49
Abb. 18 <i>gus</i> Expression an sproßproliferierendem Explantat	50
Abb. 19 <i>gus</i> -Expression an Sproßmeristem	50
Abb. 20 Chimäre Sproßregenrate	51
Abb. 21 Sproßregeneration von der Basis eines nicht ausreichend PPT resistenten Sprosses	52
Abb. 22 Unter selektiven Bedingungen bewurzelter Sproß	52
Abb. 23 <i>gus</i> Expression an Blatt und Wurzel einer bewurzelten Pflanze	53
Abb. 24 Sektorielle <i>gus</i> -Expression an ausdifferenzierten Blättern der Sproßklone	54
Abb. 25 Expressionsmuster in Blättern verschiedener T <sub>0</sub> Pflanzen	56
Abb. 26 <i>gus</i> Expression in Blüte (Antheren) und Samen	57
Abb. 27 Leaf-Paint- Assay an transgenen T <sub>1</sub> Pflanzen der T <sub>0</sub> Pflanzen 13 und 14	59
Abb. 28 <i>gus</i> PCR T <sub>0</sub> , Gel A:	60
Abb. 29 <i>gus</i> PCR T <sub>0</sub> , Gel B	60
Abb. 30 PAT-Assay an T <sub>0</sub> -Pflanzen	60
Abb. 31 <i>gus</i> Expression in den Blättern von T <sub>1</sub> Pflanzen	62
Abb. 32 <i>gus</i> PCR T <sub>1</sub> Pflanzen	64
Abb. 33 Phosphinothricin Acetyl Transferase Assay an T <sub>1</sub> Pflanzen	64
Abb. 34 <i>gus</i> - PCR an den DNA-Sammelproben aus	68
Abb. 35 Kontrollverdau der Ligationsansätze	69
Abb. 36 Doppelverdau des Ligationsproduktes <i>pGPTV bar-vst 1</i>	70
Abb. 37 Pflanzentransformationsvektor <i>pHKvst 1</i>	70
Abb. 38 <i>VST 1</i> PCR	71
Abb. 39 Kontrollverdau nach Elektroporation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA 105	72
Abb. 40 <i>VST 1</i> PCR zur Kontrolle der Agrobakterienstämme	72
Abb. 41 Tumorwachstum nach einmaliger Inokulation im basalen Teil des Keimlings	73
Abb. 42 <i>vst 1</i> PCR an Tumorgewebe	74
Abb. 43 PAT-Assay an Pflanzentumoren	75
Abb. 44: Geier T., (1989)	85
Abb. 45 Mikroverwundung an Ultraschallbehandeltem Soja ( <i>Glycine max</i> ) Kotelydo	89

# Abbildungsverzeichnis

---

## Tabellen

Tab. 1 Protoplastendaten	37
Tab. 2: Thidiazuroneffekte auf die Induktion von multiplen Sproßmeristemen und die Elongation der daraus hervorgehenden Sprosse	38
Tab. 3 Entfernungen der Lateralmeristeme von der Spitze des Embryos	39
Tab. 4 Experimente nach der Ultraschallarbeit geordnet	45
Tab. 5:SAAT behandelte Expantate auf Selektionsmedium: Vergleich zu nicht nichtbeschallten Explantaten	48
Tab. 6 Zeitliche Entwicklung der mutmaßlich transgenen Regenerate	54
Tab. 7 <i>gus</i> Expression an Blättern verschiedener T <sub>0</sub> Pflanzen	55
Tab. 8 <i>gus</i> - Expression in den Blüten bzw. Konnektiva der T <sub>0</sub> Pflanzen	58
Tab. 9 Leaf-Paint-Assay Ergebnisse	58
Tab. 10 <i>gus</i> Genexpression in den T <sub>1</sub> Nachkommen	63
Tab. 11 In der PCR 3.8.3und im PAT-Assay 3.8.4 getestete Pflanzen	63
Tab. 12 <i>pat</i> Genexpression in den T <sub>1</sub> Nachkommen	63
Tab. 13 Zu erwartende Aufspaltung bei der Integration einer Kopie der Markergene	65
Tab. 14 Zu erwartende Aufspaltung bei der Integration zweier Kopien der Markergene	66
Tab. 15 Chi-Quadratstest für eine 15:1 Segregation	66
Tab. 16 Stichproben zur Findung homozygoter Pflanzen	67
Tab. 17 Für die Analyse verwendete T <sub>1</sub> Pflanzen	68

---

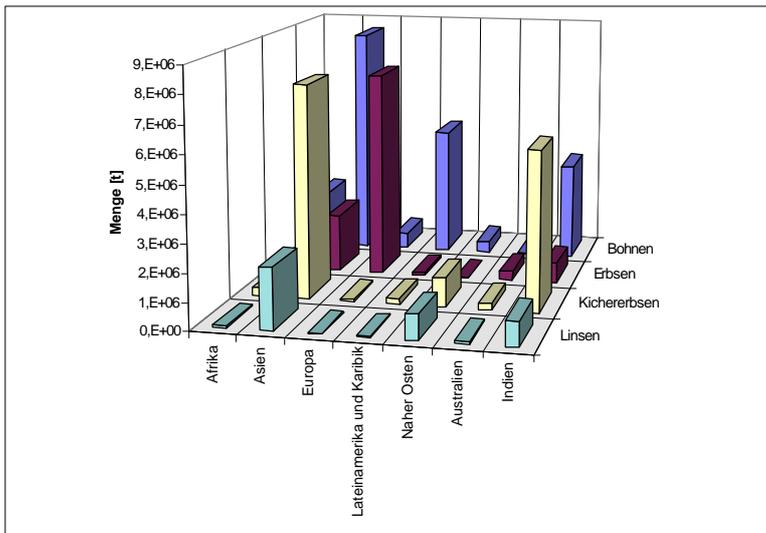
## **1 Einleitung**

Die Kichererbse, engl. „chickpea“, (*Cicer arietinum* L.), ist ein Schmetterlingsblütler. Diese Familie umfaßt etwa 600 - 700 Gattungen und 18000 Arten. Die Gattung *Cicer* umfaßt etwa 40 Arten, von denen *Cicer arietinum* L. die einzige Art ist, die landwirtschaftlich genutzt wird. Bis auf die letzten 15 Jahre wurde an *C. arietinum* vergleichsweise wenig Züchtungsarbeit geleistet. Neben dem heute verfügbaren, zertifizierten Saatgut werden in weiten Bereichen auch noch lokale Varietäten angebaut. Grundsätzlich ist *Cicer arietinum* L. in zwei Typen zu unterteilen, den *kabuli* - und den *desi* - Typ. Der in dieser Arbeit verwendete Samen des *kabuli* - Typs hat eine helle Testa und ist etwa so groß wie eine europäische Erbse (*Pisum sativum* L.). *Desi* - Typen haben überwiegend eine dunkle Testa und sind meist erheblich kleiner als *kabuli* -Typen. In der Samenfarbe gibt es bei *Cicer arietinum* L. allerdings erhebliche Variationen, so daß diese nicht allein zur Charakterisierung herangezogen werden kann. Der *desi* -Typ wird überwiegend in Indien angebaut, *kabuli* - Typen sind dort eher die Seltenheit. Im restlichen Anbaugebiet wozu West-Asien, Ost-Afrika, der Mittelmeerraum und Mittel- und Südamerika zählen, werden fast ausschließlich *kabuli* - Typen angebaut.

### **1.1 Die Bedeutung von Kichererbsen (*Cicer arietinum* L.)**

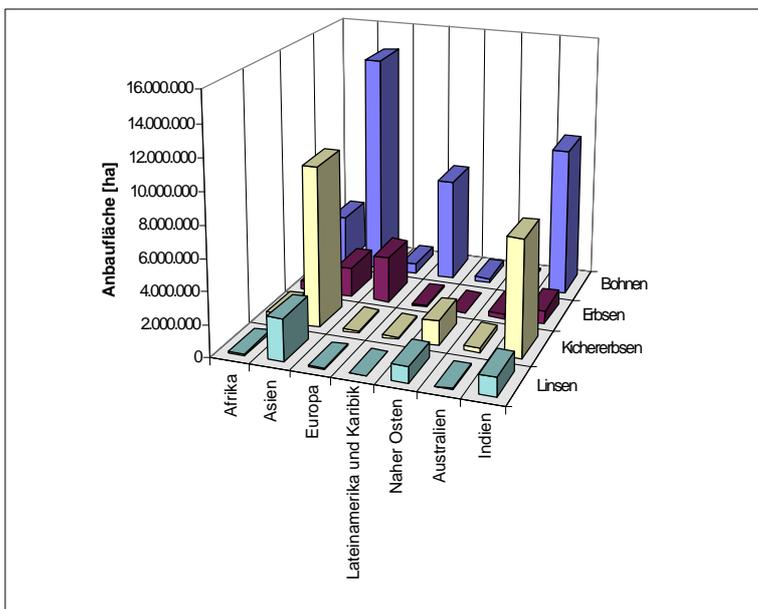
Die Kichererbse ist neben anderen Körnerleguminosen in Ländern mit niedriger Fleischproduktion von großem Interesse für die menschliche Ernährung. Als symbiotische Stickstofffixierer sind diese Pflanzen zudem in der Lage, auf marginalen Böden zu wachsen und sie weisen eine relative Trockenresistenz auf. Diese Eigenschaften kommen nicht zuletzt auch einer extensiven Landwirtschaft zugute. Weltweit liegen die Erträge an Kichererbsen hinter Bohnen und Erbsen. Die Ernteerträge von Kichererbsen stagnieren aber in den letzten fünf Jahren (FAO Statistik, 1999). In Abb. 1 sind die Produktionsmengen ausgewählter Körnerleguminosen in verschiedenen Regionen dargestellt. In Asien, dem Nahen Osten und Indien haben die Kichererbsen einen erheblichen Anteil an den Gesamtproduktionsmengen.

**Abb. 1 Ernteerträge, Körnerleguminosen, (FAO Statistik, 1999)**



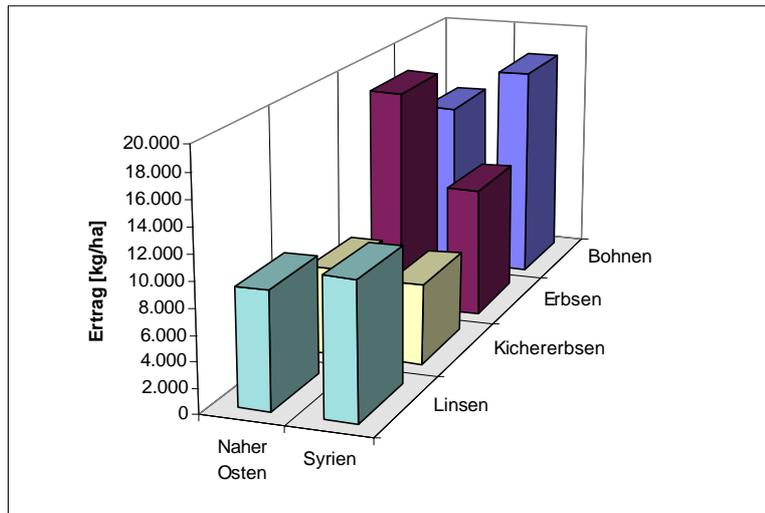
Bezogen auf die Anbauflächen (Abb. 2) wird deutlich, daß im Nahen Osten die Kichererbsen auf einer weit größeren Anbaufläche von 1,546,919 ha angebaut werden, als die übrigen aufgezählten Körnerleguminosen.

**Abb. 2 Anbaufläche für Kichererbsen (FAO Statistik, 1999)**



Der Anbau dieser ertrags stärkeren Arten ist jedoch in weiten Teilen des Nahen Ostens nicht möglich, da die Niederschläge nicht ausreichen. Somit bieten allein die Kichererbse und die Linse die Möglichkeit, auch unter ungünstigen landwirtschaftlichen Bedingungen proteinreiche Nahrungspflanzen anzubauen. Die Erträge von Kichererbsen ( Abb. 3) im Nahen Osten stehen denen der drei übrigen aufgeführten Körnerleguminosen um bis zu 50% nach, dies steht im Gegensatz zu den Anbauflächen (Abb. 2)

**Abb. 3 Hektar- Erträge von Körnerleguminosen im Anbaugebiet Naher Osten und Syrien.**



Die bereits aufgeführten Faktoren wie die ehemals weitverbreitete Verwendung lokaler Varietäten und der Anbau auf Böden, auf denen nur Kichererbsen und Linsen wachsen, sind eine Erklärung dafür. Heute besteht aber ein weltweites Bestreben, sich züchterisch der Probleme anzunehmen und die Sortenstabilität zu sichern (Kumar et al., 1998).

Ein weiterer Punkt ist die Winteraussaat und die damit verbundene, eigentliche Problematik.

### **1.2 Problematik**

Im Folgenden wird nur auf die Probleme des Nahen Osten eingegangen, da diese Arbeit im Rahmen eines Projektes mit dem ICARDA (International Center of Agricultural Research in Dry Areas) angefertigt wurde. Um eine Ertragssteigerung erzielen zu können, wurden die traditionellen Aussaatzeitpunkte von Februar/März auf die Monate November/Dezember vorverlagert. Der Grund liegt darin, daß die Niederschläge von November bis Februar zwischen 60 mm und 80 mm liegen, ab März fallen diese rapide auf unter 40 mm. Eine Voraussetzung für die Winteraussaat war die Züchtung von kühetoleranten Sorten, da die Temperaturen in den Anbaugebieten von November bis März zwischen 5°C und 10°C liegen. Unter diesen Bedingungen können die kühetoleranten Pflanzen mehr Blattmasse bilden, und sind mit Beginn des warmen Frühlings bereits in der Blüte. Bis zum Erntezeitpunkt im Mai/Juni (traditionell Juni/Juli) sind die klimatischen Bedingungen dann optimal für die Hülsenfüllung. Dies führt dazu, daß die Erträge der Wintersaaten zwischen 50 - 100 % über der Frühjahrsaussaat liegen (Pala & Mazid.,1992; K.B. Singh, 1996).

## Einleitung

---

Der Nachteil dieser Anbauform ist jedoch, daß gerade die Feuchte und Kühle optimale Bedingungen für phytopathogene Pilze darstellen. Das Hauptproblem ist eine Infektion der Kichererbsen mit *Ascochyta rabiei* und der daraus resultierenden „Ascochyta Blight“. Während der traditionellen Frühjahrsaussaat waren die Resistenzeigenschaften der damaligen Sorten ausreichend, weil die jahreszeitlichen Bedingungen für den Pilz ungünstig waren. Eine Vorverlagerung der Aussaat schafft nun aber zwangsläufig die Voraussetzung für den Pilz, die Resistenzen zu durchbrechen. *Ascochyta* besitzt eine hohe pathogene Variabilität, die sich in unterschiedlichen Schadbildern an *Cicer arietinum* ausdrückt. Auf diese Weise konnten unterschiedliche Pathotypen definiert werden (Reddy & Siham, 1984; Singh & Pal, 1993). Durch DNA-Fingerprints an vier verschiedenen Untersuchungsbezirken in einem Feld konnte Morajane et al. (1994) die genetische Variabilität von *A. rabiei* zeigen. In 50 Isolaten wurden 7 verschiedenen Haplotypen gefunden. Die genetische Variabilität war innerhalb eines Untersuchungsbezirkes größer als zwischen verschiedenen Bezirken. Außerdem wurden an einer Blattlesion mehr als ein Haplotyp gefunden.

Dies zeigt, daß Mischinfektionen mit verschiedenen Pathotypen sehr wahrscheinlich sind. Diese Wahrscheinlichkeit wird umso größer, je stärker der Pathogendruck ist. Der Gebrauch des Wortes Resistenz in einigen Publikationen bezieht sich im Zusammenhang mit *Ascochyta rabiei* aber immer nur auf einen bestimmten Pathotyp und dessen Wechselwirkung mit *Cicer arietinum* L., eine absolute Resistenz gibt es nicht. Die Sorte ILC-482 ist resistent gegenüber zwei von drei Pathotypen von *A. rabiei* (ICARDA Isolate).

Weite Teile der Anbauflächen Syriens sind heute bereits von *Ascochyta* betroffen. Ein steigender Pathogendruck führte in der jüngsten Vergangenheit zu gravierenden Ernteaufschlägen, so daß die Aussaatperiode wieder in das Frühjahr verlagert werden mußte. Mit dieser Einschränkung ist ein wichtiger Faktor zur Intensivierung und Ertragssteigerung in den betroffenen Gebieten weggebrochen.

Durch konventionelle Züchtungsarbeit ist es den Pflanzenzüchtern gelungen Sorten hervorzubringen, die ein hohes Maß an Toleranz gegenüber *Ascochyta rabiei* besitzen. Da für das Toleranzniveau der Pflanzen mehrere Gene verantwortlich sind, welche interallelisch miteinander agieren, ist aber die Vererbung der Resistenzeigenschaften nur schwer nachzuvollziehen (Dey & Singh, 1993). Bisher reichen die Toleranzeigenschaften auch nicht aus, um wieder die Vorteile der Winteraussaat voll nutzen zu können.

Wenn keine hinreichenden Resistenzen innerhalb einer Art gefunden werden können, so ergeben sich zwei Möglichkeiten:

---

## 1) „Weite Kreuzungen“

„Weite Kreuzung“ mit Gattungsverwandten, die die gewünschten Eigenschaften tragen. Innerhalb der Gattung *Cicer* sind die Arten *C. judaicum*, *C. pinnatifidum* und *C. bijugum* resistent gegenüber *A. rabiei*. Bisher sind aber nur interspezifische Kreuzungen mit fertilen Nachkommen zwischen *C. arietinum* und *C. echinospermum* und *C. reticulatum* gelungen. Diese beiden Arten sind nicht gegen *A. rabiei* resistent, jedoch kühletolerant (Singh et al. 1990; 1995). Solche Ansätze der Pflanzenzüchtung sind aber mit großen Schwierigkeiten verbunden, da mit dem Überschreiten der Artgrenzen oft auch sexuelle Inkompatibilitäten und reduzierte Fertilität einhergehen.

## 2) Gentransfer

Beim Gentransfer werden einzelne Gene in das Genom der Pflanze eingebracht, Art und Gattungsgrenzen spielen dabei keine Rolle. Bezüglich der Auswahl der einzubringenden Gene gibt auch keine Beschränkung auf das Pflanzenreich.

### 1.3 Resistenzmechanismen in *Cicer arietinum* L.

In der Literatur sind potentielle Resistenzmechanismen beschrieben, welche nicht immer mit dem Toleranzniveau der jeweiligen Sorten korrelieren. So induziert *Ascochyta rabiei* in den Kultivaren ILC-1929 und ILC-3279 in gleichem Maße  $\beta$ -1,3-Glucanase- und saure-Chitinase-Aktivität (Vogelsang & Barz, 1992;). Da ILC - 3279 jedoch ein deutlich höheres Toleranzniveau gegenüber der suszeptiblen ILC - 1929 besitzt, können diese Eigenschaften also zumindest nicht die alleinige Ursache für die relative Resistenz von ILC-3279 sein. Im Unterschied zu diesen Ergebnissen induziert *A. rabiei* sowohl bei der resistenten Sorte E 100Y als auch bei der suszeptiblen Sorte PB-7 die Expression einer endogenen Chitinase. Bei E 100Y ist aber die Chitinaseaktivität etwa doppelt so hoch wie bei PB-7 (Nehera et al., 1994). Ob mit der Chitinaseaktivität noch eine andere Resistenzeigenschaft gekoppelt ist, wie etwa die Expression von Phytoalexinen, wurde nicht beschrieben.

### 1.4 Produkte des Sekundärstoffwechsels in der Resistenzentwicklung

Phytoalexine sind pflanzliche Abwehrstoffe, die nach einer Infektion in den betreffenden Bereichen akkumuliert werden. Die Phytoalexine der Leguminosen sind meist Isoflavonoide, also in ihrem Grundgerüst sehr ähnlich. Die Biosynthese von Flavonoiden, Stilbenen und Chalkonen stellen die Grundgerüste für die Synthese von Phytoalexinen. Für Kichererbsen sind wenigstens zwei dem Flavonoidstoffwechsel entstammende Substanzen bekannt, Medicarpin und Maackiain, welche durch *A. rabiei* induzierbar sind

## Einleitung

---

(Weigand et al., 1985). Die Präsenz einer Chalkonsynthase ist ebenfalls in *Cicer arietinum* L. auf DNA-Ebene nachgewiesen (Ichinose et al., EMBL-Datenbank, siehe Literaturteil).

Der Isoflavonstoffwechsel, ausgehend vom Chalkon, führt über diverse Zwischenstufen über die Pterocarpane zu den oben genannten Phytoalexinen. Eine Stilbensynthase ist jedoch im Repertoire des *Cicer arietinum* L. Genpools nicht vorhanden. Sie ist aber unter anderem innerhalb derselben Pflanzenfamilie in der Erdnuß, *Arachis hypogaea* (Ingham J.L., 1960) und im nicht verwandten Wein, *Vitis vinifera* (Langcake P., 1986). anzutreffen. In diesen Arten wird die Stilbensynthase ebenfalls durch Pilzinfektionen induziert. Die Substrate für die Stilben- oder Resveratrol Synthase sind p-Malonyl-SCoA und p-Cumaryl-SCoA, welche in allen Pflanzen vorkommen und ebenfalls das Substrat der Chalkonsynthase darstellen (Rupprich & Kindl, 1978). Die beiden Schlüsselenzyme nutzen dieselben Substrate, führen aber zu grundlegend unterschiedlichen Phytoalexinen.

Erstmals wurde innerhalb der Leguminosen ein Phytoalexin in Erbsen *Pisum sativum* L. nach einer Infektion mit *Sclerotinia fructicola* nachgewiesen (Cruikshank & Perrin, 1960). Es handelte sich dabei um ein Pterocarpanderivat, so wie auch die Phytoalexine Maackiain und Medicarpin aus *C. arietinum* L., und es wurde Pisatin genannt.

Weigand et al. (1985) zeigten einen deutlichen Anstieg des Isoflavongehalts bei ILC-1929 und ILC-3279 nach einer Infektion mit *A. rabiei*. Die Bildung der Phytoalexine Maackiain und Medicarpin bei ILC-3279 war jedoch signifikant höher als bei ILC-1929, bei der lediglich Medicarpin in einem vergleichsweise geringen Maße gebildet wurde. Dies korreliert auch mit den Resistenzeigenschaften im Feld. Ein Hinweis darauf, daß Maackiain in Kichererbsen ein wichtiger Stoff zur Pathogenabwehr ist, wird dadurch gezeigt, daß die Fähigkeit zur Infektion von *C. arietinum* durch den Pilz *Nectaria haematococca* mit der Fähigkeit zur Maackiaindetoxifikation, korreliert ist (Covert et al. 1996). Diese Fähigkeit wird durch die Gene *MAK 1* und *MAK 2* codiert, deren Genprodukt, eine Flavoprotein-mono-oxygenase, Maackiain in 1a-Hydroxy-Maackiain umwandelt. Ein drittes Gen, *MAK 3*, codiert für ein Enzym welches Maackiain in ein 6a-Hydroxy-Maackiain umwandelt. Das *MAK 3* Gen korreliert nicht mit der Virulenz von *Nectaria haematococca* in Kichererbsen (Sarah F, 1996). Aus einem Wildstamm von *A. rabiei* konnte eine lösliche Flavoprotein-mono-oxygenase isoliert werden, diese wandelt ebenfalls Maackiain in 1a-Hydroxy-Maackiain um (Tenhaken et al., 1991).

---

## **1.5 Biotechnologische Ansätze**

Das Einbringen von Genen aus anderen Genpools zur Resistenzvermittlung und Qualitätsverbesserung in Kulturpflanzen ist heute die Schnittstellen der konventionellen Züchtung und der Gentechnik (Kahl et al., 1994). Zum einen bieten die Methoden der Molekularbiologie heute die Möglichkeit, Pflanzenfamilien auf molekularer Ebene zu charakterisieren (Udupa et al., 1999) und so gezielt nach Resistenzgenen in Pflanzen zu suchen. Zum anderen schreitet die Gentechnik mit neuen Protokollen zur Transformation von Nutzpflanzen weiter fort, bedarf aber der molekular charakterisierten, entsprechenden Resistenzgene.

Für Pilzinfestationen stehen mittlerweile eine Reihe potentiell resistenzvermittelnder Gene zur Verfügung, die teils bakteriellen, teils pflanzlichen Ursprungs sind. Hier ist zwischen jenen Genen zu unterscheiden, die für direkt fungitoxisch wirkende Enzyme codieren und solchen, die in den Sekundärstoffwechsel der Pflanze eingreifen und die Phytoalexinsynthese bestimmen. Ein Beispiel für direkt wirkende Fremdgene ist die Übertragung eines Chitinasegens aus der Bohne in Tabak und Raps Pflanzen mit daraus resultierenden, verbesserte Resistenzeigenschaften gegenüber dem Bodenpilz *Rhizoctonia solani* (Broglie et al. 1991).

Nachdem das Stilbensynthese-Gen aus *Vitis vinifera* „vst 1“ kloniert worden ist (Melchior & Kindl, 1990), bietet es die Möglichkeit, den Sekundärstoffwechsel in transgenen Pflanzen zu verändern.

Die Integration des Stilbensynthese-Gens aus *Vitis vinifera* führte zu einer etwa 50%igen Befallsreduktion an transgenem Tabak ( Hain et al. 1993). Auch in Reis (Stark-Lorenzen et al. 1997), und Weizen (Leckband & Lörz, 1998) führt eine Integration des Stilbensynthese gens zu verbesserten Resistenzeigenschaften gegenüber Pilzkrankheiten.

## **1.6 Mögliche Interferenzen und zu erwartender Nutzen vst 1 transgener Cicer arietinum Pflanzen.**

Der pflanzliche Sekundärstoffwechsel stellt eine sehr komplexe Vernetzung einzelner biochemischer Reaktionswege dar. Die Folgen einer Integration Sekundärstoffwechsel beeinflussender Fremdgene läßt sich nur ansatzweise voraussehen. So liegt auf der Hand, daß es bei dem gleichzeitigen Vohandensein von Chalkon- und Stilbensynthese, beide werden transkriptional reguliert, eine Substratkompetition geben wird. Für beide Enzyme sind p-Malonyl-SCoA und p-Cumaryl-SCoA die Eingangsmoleküle. Inwieweit durch die gleichzeitige Induktion der beiden Gene eine Substratknappheit auftreten kann, ist im einzelnen nicht vorauszusehen. Denkbar wäre, daß sich die Präsenz der

## Einleitung

---

Stilbensynthese in Kichererbsen negativ auf die Syntheseleistung der Pflanze in Bezug auf Maackiain und Medicarpin auswirken könnte.

Die Toleranz einzelner *Cicer arietinum* Sorten gegenüber einigen Pathotypen von *Ascochyta rabiei* ist aber offenbar auch an die Phytoalexine Maackiain und Medicarpin gebunden. Ein Nachlassen der Produktion dieser Phytoalexine könnte diesbezüglich negative Auswirkungen haben.

So führte in Tabak die Überexpression der Stilbensynthese unter einem konstitutiven CaMV 35S Promotor neben der 50%igen Befallsreduktion, auch zu einer Veränderung der Blütenfarbe und zu männlicher Sterilität. Es wurde das Stilbensynthese-Gen mit dem eigenen induzierbaren Promotor und mit dem CaMV-35S-Promotor verglichen. Ein vor den Stilbensynthesepromotor geschalteter Vierfach-Enhancer führte ebenfalls zu einer höheren Expression der Stilbensynthese gegenüber dem Promotor ohne Enhancer. Auch hier wurde eine Veränderung der Blütenfarbe beobachtet, es gab aber fertile Nachkommen (Fischer R. et al., 1997).

Da die Virulenz vieler Pathogene auf ihre Fähigkeit zur Phytoalexindetoxifikation zurückzuführen ist, könnte das Auftreten eines zusätzlichen neuen Phytoalexins in der *Ascochyta rabiei* / *Cicer arietinum* Interaktion zu einer Verbesserung der Resistenzeigenschaften in Kichererbsen führen.

Vor diesem Hintergrund ist die Transformation von Kichererbsen mit der Stilbensynthese ein sinnvoller Ansatz. Klarheit über die Auswirkungen des Stilbensynthese-Gens in Kichererbsen können nur transgene Pflanzen und ihre Nachkommenschaft liefern.

### **1.7 Ziele der Arbeit**

Vorangiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine robuste und reproduzierbare Methode zur gentechnischen Veränderung von Kichererbsen zu entwickeln. Für die Arbeiten sollte im Rahmen des Projektes mit dem ICARDA eine relevante Sorte verwendet werden. Die Sorte ILC 482 ist kühetolerant und gegenüber zwei von drei *A. rabiei* Isolaten (ICARDA) resistent. Es handelt sich dabei um einen *kabuli*-Typ. Zwei Techniken sollten auf ihre Anwendbarkeit an Kichererbsen überprüft werden:

- Erstens ein Protoplastensystem mit der Möglichkeit des direkten Gentransfers.
- Zweitens ein Agrobakterien-vermittelter Gentransfer auf der Basis einer direkten Organogenese.

---

Für die Verbesserung der Resistenzeigenschaften von Kichererbsen gegenüber *A. rabiei* sollte ferner die Voraussetzungen für die Übertragung des Stilbensynthase-Gens aus *Vitis vinifera* L., „*vst 1*“ in das pflanzliche Genom geschaffen werden. Dazu sollte das *vst 1*- Gen mit einer Phosphinothricinresistenz als selektierbarem Marker kombiniert und dieses Konstrukt in einem binären Vektor für den Agrobakterien-vermittelten Gentransfer bereitgestellt werden.

Außerdem sollten Grundlagen für einen Co-Transfer von zwei binären Plasmiden aus einem Agrobakterium erarbeitet werden, von denen nur eines den Selektionsmarker trägt. Eine erfolgreiche Co-Transformation würde die Möglichkeit erschließen markerfreie transgene Pflanzen über Auskreuzungen zu erhalten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien

1-Naphtyllessigsäure (NAA)	Mr=186,21, Sigma N-0646
2,4-Dichloro-Phenoacetic Acid (2,4-D)	Mr=221,6, Sigma D-8407
6-Benzylamino-Purin (BAP)	Mr=225,3, Sigma B-9355
Acetosyringon	Mr=196,20; Roth
Alginat	A-0682
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Mr=147,02, Roth 5239
Cellulase Onozuka R-10 (1,0/mg)	Serva 16419
Combactam	Pfizer
CTAB ( Haxadecyl Tri-Methylammonium)	Mr=364,64 Sigma
D (+) Saccharose	Mr=342,30, Roth 4661.2
D(+)-Saccharose	Mr=342,30; Roth
D-Glucose Monohydrat	Mr=198,17; Duchefa
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Mr=141,96, Riedel-de Haen
D-Mannitol	Mr=182,18, Roth 4175
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Mr=78,10; Serva
EDTA (Dinatriumsalz-Dihydrat)	Mr=372,24; Roth
EDTA	Mr=372,24, Fluka 03680
Formaldehydlösung, min. 37 % z.A.	Mr=30,03; Merck
Gamborg B 5, Vitamin Mixtur	Duchefa
Gentamycinsulfat	Mr=694-723; Fluka
Hefeextrakt	Roth
Kaliumhexacyanoferrat (K <sub>3</sub> (Fe(CN) <sub>6</sub> ))	Mr=329,20
Kanamycinsulfat	Mr=582,60; Duchefa
Kinetin	Mr=215,20; Serva
Macerozym R-10 (Pectinase 0,6 U/mg)	Serva 28302
MES (2-(N-Morpholino)ethane H <sub>2</sub> O sulfonic acid)	Mr=213,85; Biomol
MS-Medium (Micro und Macro Elemente)	Duchefa
MS-Medium, Microsalz Mixtur	Duchefa
MS-Medium, Vitamin Mixtur	Duchefa
Natriumchlorid (NaCl)	Mr=58,44
Natrium-Dihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Mr=137,99; Riedel-de Haen
Natriumhypochlorit (NaOCl) 12 %	Mr=74,45; Roth
Pectolyase (3,0 U/mg)	Sigma P-3026
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (Trypton)	Roth
Plant-Agar	Duchefa
ppt (Glufosinate-Ammonium)	Mr=198,16; Riedel-de Haen
Thidiazuron, (1-Phenyl-3-(1,2,3,-thioazol-5-yl)-Harnstoff)	Mr=220,20; Duchefa
Ticarcillin	Duchefa
Triton X-100	Fluka
X-Glc A-Cyclohexylammoniumsalz, (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronat)	Mr=521,80; Duchefa

---

## **2.2 Medien und Kulturgefäße**

Die im einzelnen aufgeführten Pflanzenmedien wurden jeweils in Volumina < 500 ml autoklaviert, um ein Karamelisieren des Zuckers zu vermeiden. Größere Volumina erhöhten die Autoklavierzeiten auf über 90 min., da die Abkühlphase entsprechend länger dauert, was sich in einer Dunkelfärbung der Medien bemerkbar machte. Alle in dieser Arbeit verwendeten Phytohormone wurden stets mitautoklaviert (Herstellerangabe), ebenso die Standardvitamine der Pflanzenmedien. Sterilfiltrierte Antibiotika und Phosphinothricin wurden erst bei einer Temperatur von  $\approx 40^{\circ}\text{C}$  zugegeben. Die Bakterienmedien wurden in 1l Volumina autoklaviert, Antibiotika wurden ebenfalls bei Temperaturen <  $40^{\circ}\text{C}$  zugegeben.

Für die ersten 4 Subkulturen wurden Petrischalen verwendet, diese wurden entsprechend der Explantatgröße mit maximal 20 Explantaten in der Anfangsphase bestückt. Für die Co-Kultur wurde ein Filterpapier auf das Medium gelegt. Für die weitere Kultur wurden Pflanzencontainer 10cmx10cmx10 cm verwendet (Duchefa), diese wurden mit 100-150 ml Medium gefüllt und mit maximal 16 Explantaten bestückt.

### **2.2.1 Pflanzenmedien**

Die nachfolgenden Medien wurden mit den dem jeweiligen Gewebekulturstadium entsprechenden Phytohormonen supplementiert. Den Festmedien wurde 8 g/l Plant-Agar zugesetzt. Ferner wurde den Medien nach dem Autoklavieren Ticarcillin ( $\beta$ -Lactamantibiotikum) gegen Gramnegative Bakterien und Combactam ( $\beta$ -Lactamaseinhibitor) zugesetzt. Für die 1.Subkultur 150 mg/l Ticarcillin und 100 mg/l Combactam, für die weiteren Kulturen 100 Ticarcillin und 50 mg/l Combactam. Ticarcillin wird zwar von Duchefa mit dem  $\beta$ -Lactamaseinhibitor Calavulansäure vertrieben, eine zusätzliche Supplementierung mit Combactam verlängert aber die Wirksamkeit des Antibiotikums im Medium (persönliche Mitteilung Andre de Kathen).

### **MS-Medium (Murashige & Skoog, 1962)**

MS-Macrosalze	4,42 g/l
MS-Microsalze	1 g/l
MS-Vitamine	0,1 g/l
Saccharose	20 g/l
MES	1 g/l
ph	5,6 - 5,8

### Co-Kulturmedium

MS-Macrosalze	4,42 g/l
MS-Microsalze	1 g/l
MS-Vitamine	0,1 g/l
Saccharose	15 g/l
Glucose	15 g/l
MES	1 g/l
ph	5,6 - 5,8

Dieses Medium wurde zur Cokultur der Explantate benutzt.

### 2.2.2 Bakterienmedien

#### YEP Medium

Hefeextrakt	10 g/l
Trypton	5 g/l
NaCl	5 g/l
ph	7

#### SOC1Medium

Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	20 g/l
NaCl	580 mg/l
KCl	186,4 mg/l
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	2,4 g/l
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	2,0 g/l
Glukose	3,6 g/l Filtersterilisiert nach Autokl.

#### LB Medium

Hefeextrakt	10 g/l
Trypton	5 g/l
NaCl	10 g/l

---

## MS-Cokultur Medium

MS-Macrosalze	4,42 g/l
MS-Microsalze	1 g/l
MS-Vitamine	0,1 g/l
Saccharose	20 g/l
MES	1 g/l
Actosyringone	100 µM
ph	5,6 - 5,8

### 2.3 Pflanzenmaterial

Als Material für die vorliegende Arbeit diente Saatgut von *Cicer arietinum* L. der Sorte ILC 482 vom *kabuli* Typ. Dieses Saatgut wurde vom ICARDA zur Verfügung gestellt. Diese Sorte zeichnet sich durch ein hohes Maß an Toleranz gegenüber dem phytopathogenen Pilz *Ascochyta rabiei* aus. Neben der durch konventionelle Züchtung verbesserten Toleranz gegenüber *Ascochyta* ist diese Sorte auch kühltolerant und besonders ertragreich.

### 2.4 Sterilisation des Saatgutes

Die Samen wurden entsprechend der für das jeweilige Experiment erforderlichen Menge abgewogen und einer optischen Kontrolle auf Beschädigungen der Samenschale unterzogen. Defekte oder beschädigte Samen wurden aussortiert. Die Samen wurden dann für 1 min. in 70% Ethanol geschwenkt und anschließend für 10 min. in Natriumhypochlorit belassen. Nach dieser Zeit wurde das Hypochlorit abgossen und es wurde mit etwa dem doppelten Volumen des Saatgutes 3 x mit sterilem, demineralisiertem Wasser gespült. Das Saatgut wurde dann für 2h in dem etwa vierfachen Volumen Wasser belassen. Nach diesen zwei Stunden wurde das Wasser erneut ausgetauscht und die Samen quollen über Nacht.

### 2.5 Bakterien

In der nachfolgenden Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme aufgezählt. Die im Rahmen dieser Arbeit mit einem neuen Plasmid ausgestatteten Stämme sind mit einem Stern „\*“ gekennzeichnet.

Bakterien-	Stamm	Plasmid	Antibiotikares itenz Med.- Konz. [mg/l]
<i>E. coli</i> *	NM 522	<i>pGEM-3Zf+ vst 1</i>	30 Kan/ 100 Amp
<i>E. coli</i> *	NM 522	<i>pGPTV bar</i>	30 Kan/ 100 Amp
<i>E. coli</i> *	NM 522	<i>pHKvst 1</i>	30 Kan/ 100 Amp
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> *	EHA 105	<i>pHKvst 1</i>	50 Kan
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	EHA 101	<i>pIBgus</i>	50 Kan / 40 Gent
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> *	C58C1	<i>pHKvst 1</i>	50 Kan
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> *	C58C1 pRi 15834	<i>pHKvst 1</i>	100 Kan
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> *	R 1000	<i>pHKvst 1</i>	100 Kan
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C58C1		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C58C1 15834 pRi	—	—
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	R 1000	—	—

### 2.5.1 Bakterienanzucht

Angeimpft wurde immer mit 200µl Glycerin-Stock auf 25 ml Medium. Die Kulturen wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 25 ml Medium ü. N. angezogen. Antibiotika wurden dem Medium aus eingefrorenen Stammlösungen jeweils frisch zugegeben.

#### 2.5.1.1 *E. coli*

Für die Vektorkonstruktion *pHKvst* wurde der *E. coli* Stamm NM 522 verwendet. Die Kultur erfolgte ü. N. bei 37°C in LB-Medium. Für die weitere Verwendung wurden die Bakterien bei 3000 x g abzentrifugiert, der Überstand wurde dekantiert und anschließend mit einer Pipette quantitativ entfernt.

#### 2.5.1.2 *Agrobacterium*

Agrobakterien wurden über Nacht bei 28°C in YEP angezogen. *Agrobacterium* ist ein Bodenbakterium, welches bei höheren Temperaturen als 28°C seine tumorinduzierenden Plasmide (Ti oder Ri) sowie das binäre Plasmid verlieren kann.

---

Für die weitere Verwendung wurden die Bakterien bei 3000 x g abzentrifugiert, 25 ml in einem 50 ml Falcon Tube, bei 4°C. Für die Transformation von Pflanzen wurde das YEP Medium quantitativ entfernt. Anschließend wurde das Bakterienpellet durch Anschlagen gelockert und schließlich mit MS-Medium, welches mit 100µM Acetosyringon supplementiert wurde, auf eine OD<sub>600</sub> von 1 - 1,1 eingestellt. Das Acetosyringon dient der Aktivierung der *vir* - Gene auf dem Ti Plasmid, dieses steuert die Übertragung der T-DNA in das Pflanzengenom (Stachel et al., 1985; Delzer et al., 1990 )

## **2.6 Gewebekultur**

### **2.6.1 Protoplasten**

In Anlehnung an das Protokoll zur Isolation von Protoplasten aus *Pisum sativum* (Lehminger Mertens, R. 1989) wurde ein Protokoll für Kichererbsen entwickelt ( Kiesecker, H. 1996).

#### **Enzym Mix :**

- 1 % MES
- 0,1 % BSA
- 8 mM CaCl<sub>2</sub>  
gelöst in H<sub>2</sub>O deion.  
pH 5,5

#### **Darin werden gelöst:**

- 5 % Cellulase
- 2 % Macerozym
- 0,1 % Pectolyase  
*Einstellen der Osmolarität von 470 mOs/kg mit Mannitol*

#### **Mannit-Lösung:**

- 0,4 M Mannitol
- 0,1 % MES  
pH 5.6

#### **Seewasser W5 Lösung**

- 23 g/l Synthetisches Seesalz (Aquarienbedarf)
- 100 mM NaCl
- 100 mM CaCl<sub>2</sub>
- 5 mM KCl
- 0.1 % MES  
*pH 5.7, 520 mOs/kg durch Mannitolzugabe*

#### **0,2 M CaCl<sub>2</sub>- Lösung**

- 50 mM CaCl<sub>2</sub>
- 0,1 % MES  
pH 5,7, 520 mOs/kg

#### **Lösung 1**

- 50 mM CaCl<sub>2</sub>
- 0,1 % MES  
pH 5,7, 520 mOs/kg

#### **Lösung 2**

- 10 mM CaCl<sub>2</sub>
- 0,1 % MES  
pH 5,7, 520 mOs/kg

### Na-alginat

### Lösung

### CaCl<sub>2</sub> - Agar

### Kulturmedium (flüssig)

- 2 % w/v Na-alginat, *gelöst in Mannit - Lösung*
- 20 mM CaCl<sub>2</sub>, *gelöst in Mannit - Lösung*
- 1 % Agar
- Gamborgs B5 Kompletmedium (GAMBORG et al., 1968)
- 0,1 % MES
- 1,5 % Saccharose
- Je 0,5 mg/l NAA, BAP, 2.4 D  
pH 5,7, 520 mOs/kg

### **Explantatpräparation von 3-4 Tage alten Sprossen**

#### **Klimabedingungen: 20-23°C, 16h Licht / 8 h dunkel**

- 1) Entnahme der Sproßspitze bis 2 mm unterhalb des Hakens von etwa 50 Sprossen. Sammeln der Explantate in 4°C Seewasser
- 2) Submerses Zerschneiden der Explantate mit Hilfe einer Rasierklinge in einer Glaspetrischale. Dabei ist darauf zu achten, daß das Gewebe nicht gequetscht wird. Das Gewebe sollte in etwa 2 mm große Stücke zerschnitten werden, dabei sollte wiederholt das Seewasser abgesaugt und durch frisches ersetzt werden. Es muß dabei zügig gearbeitet werden.
- 3) Seewasser absaugen und das Gewebe unverzüglich in eine 9 cm Plastikpetrischale mit 10 ml Enzymmix überführen.
- 4) Inkubation bei 20 - 23 °C, dunkel, für ca 4 h bei 50 rpm auf einem Horizontalschüttler.
- 5) Aufnehmen der Protoplastensuspension mit Hilfe einer Weithalspipette und Reinigung über Nylonsiebe ( 250-, 100-, 60 µM Maschenweite). Nachspülen der Inkubationspetrischale und der Siebe erfolgt mit 0,2 M CaCl<sub>2</sub> Lsg.
- 6) Aufteilen der Protoplastensuspension in zwei 50 ml Falcon<sup>®</sup> Tubes, eventuell mit zusätzlichen CaCl<sub>2</sub> Lsg. auf 50 ml auffüllen. Zentrifugation bei 4°C, 8 min, 60 x g.
- 7) Überstand abgießen und Protoplasten in 6 ml Mannitol-Lösung und 12 ml 0,2 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendieren. Protoplastensuspension dann auf vier 15 ml Falcon<sup>®</sup> Tubes aufteilen
- 8) Zentrifugieren, 5 min, 50 x g. Überstand mit Pasteurpipette vorsichtig abheben. 3 ml Mannit-Lösung und 6 ml 0,2 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung zugeben und Pellet vorsichtig resuspendieren.
- 9) Schritt 9 wiederholen und dabei die Lebendzellzahl bestimmen.
- 10) Protoplasten-Pellets in jeweils 5 ml W5 Lösung resuspendieren und auf Eis für 30 min lagern. ⇒ Von hier ab stehen die Protoplasten für den direkten Gentransfer via PEG (Nicolaisen & Poulson, 1993, Böhmer P., 1995) oder Elektroporation (Puonti-Kaerlas et al.; 1992, Mitchell et al., 1997) zur Verfügung.

---

## **Alginateinbettung**

- 1) Zentrifugation der in W5 Lösung zwischengelagerten Protoplasten, 5 min bei 50 x g und 4°C. Den Überstand vollständig abnehmen. 12 ml 4°C Mannit-Lösung zugeben und das Pellet resuspendieren.
- 2) Zellzahl auf  $4 \times 10^5$  / ml Protoplasten einstellen
- 3) Gleiches Volumen wie in 2 an Alginat-Lösung zugeben um final auf eine Zelldichte von  $2 \times 10^5$  / ml zu gelangen.
- 4) Jeweils 500 µl der Protoplastensuspension aus Schritt 3 auf CaCl<sub>2</sub> Agarplatten geben und zu einer möglichst dünnen Scheibe zerlaufen lassen.
- 5) Nach 1 Stunde bei Raumtemperatur die Alginatscheibe mit Lösung 1 überschichten und für eine weitere ½ Stunde inkubieren.
- 6) Die Alginatscheibe im Ganzen oder geviertelt in 9 cm Petrischalen mit 5 ml Kulturmedium überführen.
- 7) Dunkelkultur bei 26°C. Medienwechsel alle 7 Tage, dabei nur jeweils die Hälfte des Mediums austauschen.

## **Kalluskultur**

- 1) Auflösen der Alginatmatrix mit 20 mM Na-Citrat Lösung ohne Osmotikum. Dies erfolgt auf einem Schüttler für 10 min bei 50 rpm.
- 2) Überführen der Kalli auf Festmedium, Gamborgs B5, 2 % Saccharose plus Phytohormone. Kultur zunächst in Schwachlicht 16 h.

### **2.6.2 Direkte Organogenese (multiple Sproßinduktion)**

Die Gewebekultur besteht aus vier Stufen, die in ihrer zeitlichen Abfolge und Dauer etwas variieren können. Entscheidend ist dabei oft der Entwicklungsstand der Explantate, nicht das Alter der Kultur.

1. Transformation und Co-Kultur
2. Sproßinduktion, multiple Sproßbildung
3. Elongation der Sprosse unter selektiven Bedingungen
4. Bewurzelung oder Pfropfung der T<sub>0</sub> Pflanzen und späterer Transfer in Erde.

Die Wurzel und die Sproßspitze werden vom Embryo entfernt und der Embryo wird am Konnektiv vom Koteltydo abgebrochen. Die so behandelten Embryonen werden wie unter (2.6.2) beschrieben transformiert. Nach der Cokultur und der Antibiotikabehandlung wurden die Explantate für 7-9 Tage auf MS-2 µM TDZ bei 21°C im Licht (16 / 8h Rhythmus) in Petrischalen, 8,5 cm Durchmesser, kultiviert. Anschließend wurden die Explantate von nekrotischem Gewebe befreit und nur der basale Sproßteil ohne die Axillarmeristeme wurde auf MS 1µM TDZ subkultiviert. Nach drei Wochen wurde dann die auf MS-Medium mit 3 mg/l PPT und Kinetin 2,32 µM ( 0,5 mg/l) umgesetzt. Nach drei bis vier Wochen wurden die PPT-resistenten Explantate auf frisches Medium, 3 mg/l PPT und 2,32 µM Kinetin überführt. Die daraus entstandenen Sprosse wurden

abgeschnitten und auf Medium mit 2,46  $\mu\text{M}$  (0,5 mg/l) IBA zur Bewurzelung und 5 mg/l PPT überführt. Ein Teil der Sprosse wurde auf eine nichttransgene Unterlage (ILC 482) gepfropft (2.6.6). Die sproßproliferierenden Explantate wurden auf MS-Medium mit 2,32  $\mu\text{M}$  Kinetin und 10 mg/l PPT weiterkultiviert.

### **2.6.2.1 *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation**

Für die Transformation wurden oberflächensterilisierte, reife Samen verwendet. Diese wurden nach der Sterilisation über Nacht in demin. Wasser gequollen. Der Samen wurde dann mittels Skalpell zwischen den Kotyledonen aufgebrochen. Der Embryo verblieb dabei zunächst an einem der Kotyledonen. Zur Dekapitierung wurde die Skalpellklinge in die Agrobaktériensuspension (2.5.1.2,S.14) getaucht, um diese zu benetzen. Auf diese Weise erfolgt unmittelbar mit der Verwundung des Pflanzengewebes eine Bakterieninokulation. Nachdem auch der Wurzelpol abgeschnitten worden ist, wurden die Explantate vom Kotyledon entfernt und in Agrobaktériensuspension gesammelt und für etwa 2h inkubiert. Anschließend wurden sie beschallt (2.6.3) oder direkt auf Filterpapier abgetupft und auf Co-Kulturmedium überführt.

Die Co-Kulturzeit betrug 3-4 Tage bei 21°C im Dunkeln. Nach der Co-Kultur wurden die Explantate gewaschen und für 0,5h in 200 mg/l Ticarcillin inkubiert, um die im Gewebe befindlichen Agrobakterien unter Kontrolle zu bringen. Anschließend wurden die Explantate auf Filterpapier abgetupft und auf Sproßinduktionsmedium ohne Filterpapierunterlage weiterkultiviert

### **2.6.3 SAAT-Methode**

SAAT (**S**onication **A**ssisted **A**grobacterium mediated **T**ransformation) dieser Begriff wurde von Trick und Finer (1997) ins Leben gerufen. Sie zeigten an ultraschallbehandelten Sojakotyledonen, daß Ultraschall dazu geeignet ist, Verwundungen an pflanzlichem Gewebe zu verursachen. Verwundungen sind als die Grundvoraussetzung für einen Agrobakterien-vermittelten Gentransfer anzusehen, da von den verwundeten Zellen phenolische Substanzen freigesetzt werden. Diese können die Virulenzgene in Agrobakterien aktivieren(Stachel et al., 1985).

Dieser Effekt sollte genutzt werden, um die Transformationseffizienz an Kichererbsenembryonen zu erhöhen. Dazu wurden die Explantate nach der Dekapitierung in gläserne Gewebekulturröhrchen mit Aluminiumdeckel (D 2,5 cm, H 8 cm) überführt und in mit 5ml Agrobaktériensuspension beschallt. Anschließend wurden sie für eine Stunde in der Suspension belassen und dann wie unter (2.6.3) beschrieben co-kultiviert. Die Routinetransformationen für die Übertragung des *vst 1*-Gens wurden mit dem Gerät der Firma Bandelin

---

durchgeführt, da das Gerät T490 DH eine freundliche Leihgabe der Firma Elma war und nicht für die gesamte Zeit zur Verfügung stand.

### 2.6.3.1 Ultraschallgerät

Ein Ultraschallgerät moduliert eine hochfrequente Wechselspannung, die dann über einen piezoelektrischen Ultraschallwandler in eine Schwingung umgewandelt wird. Als Ultraschallwandler dient ein Sinterkeramikschwinger, welcher in dem Rhythmus der Wechselspannung seine Form ändert. Dieser Wandler überträgt die Schwingung dann auf beliebige Bauteile, die dann ihrerseits eine akustische Welle erzeugen, den Ultraschall. In dem in dieser Arbeit verwendeten Wasserbad-Ultraschallgerät wird die Schwingung auf eine Wanne übertragen. Die Welle setzt sich dann in dem Medium Wasser fort.

Bei den verwendeten Wasserbadultraschallgeräten wird die Schwingung auf eine mit Wasser gefüllte Edelstahlwanne übertragen. Die Explantate werden also nicht direkt beschallt, die Schallwellen gelangen über das Medium Wasser an das Probengefäß. Abhängig von der Materialbeschaffenheit des Gefäßes setzt sich die Schallwelle im Inneren des Probengefäßes fort. Entsprechend den physikalischen Gesetzen der Reflektion an Grenzflächen zu anderen Medien ist es wichtig, den Anstellwinkel der der Schallquelle zugewandten Seite möglichst bei 90° zu halten. Innerhalb der Wanne baut sich innerhalb von Sekundenbruchteilen eine „Stehende Welle“ auf, mit einer Wellenlänge von etwa 3 cm. Da sich die Amplitude bei 1,5 cm befindet, ist es wichtig, daß die Agrobaktériensuspension im Gefäß eine Höhe von wenigstens 2 cm hat. Da sich die Explantate unter der Schalleinwirkung ständig bewegen, und während der Beschallung das Probengefäß in der Eintauchtiefe verändert wird, kann so eine homogene Beschallungsintensität gewährleistet werden.

<b>LEISTUNGS- MERKMAL</b>	<b>FA.: BANDELIN SONOREX RK 255S</b>	<b>FA.: ELMA T 490 DH</b>
Arbeitsfrequenz	35 kHz	40 kHz
HF-Spitzenleistung	200 W	240 W
max. Schalleistung bzw. Schalleistungs-dichte	100 W	100 W

Bei der HF-Spitzenleistung handelt es sich um die maximal vom Ultraschall-Generator erzeugte Leistung.

Die maximale Schalleistung bzw. Schalleistungsdichte gibt die an der abstrahlenden Fläche tatsächlich abgegebene Leistung an und ist somit für die durchgeführten Versuche maßgeblich. Es ist dabei zu beachten, daß die Füllmengen der Wasserbäder immer gleich sein müssen. Die Proben sind über den an der Wanne befindlichen Schallköpfen zu positionieren.

Durch die Möglichkeit der Einstellung der verschiedenen Beschallungsstufen ist die HF Leistung bei dem Gerät T490 DH variabel. Die in den Versuchen

## Material und Methoden

---

verwendeten Intensitätsstufen 2, 5 und 9 entsprechen laut Herstellerangaben den Schalleistungen 22, 70 und 100 W. Aus dieser ins gesamte Medium abgegebenen Energie wurde der Anteil berechnet, der in dem Probevolumen (5 ml) wirkt:  $2750 \text{ ml} / 5 \text{ ml} = 550$ .

Stufe 2:  $22 \text{ W} / 550 = 0,040 \text{ W}$

Stufe 5:  $70 \text{ W} / 550 = 0,127 \text{ W}$

Stufe 9:  $100 \text{ W} / 550 = 0,182 \text{ W}$

Für das Bandelin Gerät gilt  $4500 \text{ ml} / 5 \text{ ml} = 900$

Nicht variabel:  $100 \text{ W} / 900 = 0,111 \text{ W}$

Dies entspricht in etwa der Stufe 5 des Gerätes T490 DH

Da neben der Intensität auch die Expositionszeit variiert wurde, kann hier von einer Beschallungsarbeit [Ws] gesprochen werden, Leistung in [W]) X Zeit [s].

### 2.6.4 Co-Kultur

Nach der Transformation wurden die Explantate auf Filterpapier abgetupft. Während der Explantatpräparation wurden die bereits präparierten Explantate in Agrobaktériensuspension zwischengelagert, in dieser Zeit haben die Agrobakterien Gelegenheit, sich in das Pflanzengewebe hineinzubewegen.

Während der Präparation und der Co-Kultur wurde das Explantat mit TDZ bereits zur Sproßproliferation angeregt. Die Verwendung von Wachstumsregulatoren während der Co-kultur erhöht bei *Pisum* die Transformationsfrequenz (Schroeder et al., 1993; de Kathen & Jacobsen, 1995).

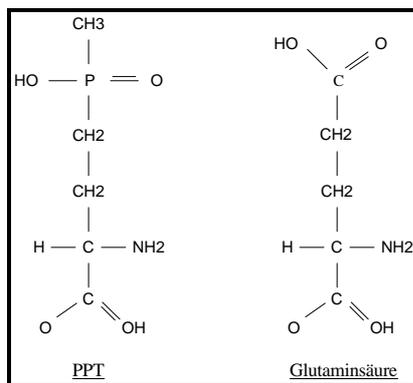
Die Co-Kulturbedingungen stellen einen Kompromiß zwischen den Bedürfnissen der Bakterien und der Explantate dar. Als optimal erwies es sich, ein Filterpapier zwischen Medium und Explantat zu legen. Dieses verhindert ein Überwachsen der Explantate mit *Agrobacterium* und verbessert so die Bedingungen für die Explantate, die andernfalls leicht verbräunen. Die Co-kulturzeit betrug 3-4 Tage bei 21°C im Dunkeln. Am Ende der Co-Kulturzeit wurden die Explantate gewaschen und für 0,5h in 200 mg/l Ticarcillin inkubiert. Anschließend wurden die Explantate auf Filterpapier getrocknet und auf Medium (ohne Filterpapierunterlage) gelegt.

## 2.6.5 Selektion

Zur Selektion der transformierten Explantate wurde Phosphinothricin (PPT) in Konzentrationen zwischen 1 mg/l und 15 mg/l eingesetzt.

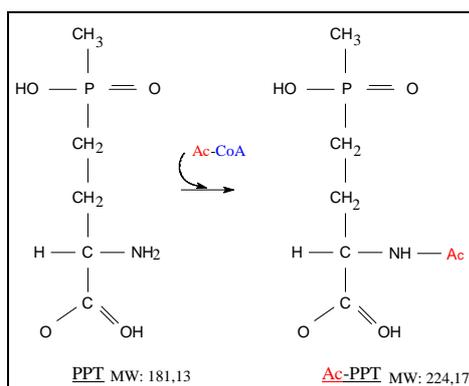
Das *pat*-Gen aus *Streptomyces viridochromogenes* und das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* weisen große Sequenzhomologien auf. Beide Gene vermitteln eine Resistenz gegenüber dem Glutamatsynthetase-Hemmer Bialaphos. Bialaphos wird ebenfalls von *Streptomyces hygroscopicus* gebildet, es ist ein Struktur analogon zu Glutaminsäure. Die synthetischen Analoga zu Bialaphos sind Phosphinothricin (PPT) oder auch synonym Glufosinat.

### Abb. 4 PPT, ein Struktur analogon zu Glutamat



Der Wirkmechanismus von *pat* und *bar* ist identisch, beide Gene sind in der Lage, Phosphinothricin über eine Acetylierung zu detoxifizieren und sind gleichwertig in der Pflanzengentechnik als Selektionsmarker einzusetzen (Wehrmann et al., 1996).

### Abb. 5 Detoxifizierungsreaktion des Phosphinothricins



PPT ist hitzelabil und wurde daher dem Pflanzenmedium nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur unter 40°C zugegeben.

### **2.6.6 Pfropfung**

Da eine spontane Bewurzelung der abgeschnittenen Sprosse auf hormonfreiem Medium nicht erfolgte, wurden die putativ transgenen Sprosse auf eine nicht transgene Unterlage gepfropft. Für die Pfropfung wurden  $\approx 1$  cm lange Sprosse vom Sproßklon abgeschnitten und bis zu einer Länge von  $\approx 3$  cm auf Medium mit 0,5 Kinetin weiterkultiviert. Die Medien wurden zusätzlich mit 5 - 10 mg/l PPT supplementiert.

Diese elongierten Sprosse wurden mit einer Rasierklinge im basalen Teil zweiseitig schräg angeschnitten. Anschließend wurde ein  $\approx 7$ -Tage alter nichttransgener Keimling innerhalb des ersten Nodus dekapitiert. In diese, den Nodus teilende Schnittfläche wurde ebenfalls mit einer Rasierklinge ein etwa 5 mm tiefer Keil geschnitten. Der Pfröplling, dessen Schnittflächen etwa den gleichen Winkel wie der Keil im Unterbau haben sollte, wird dann in diesen Keil geschoben. Eine Fixierung des Pfröpfinges mit einem Faden ist unbedingt erforderlich. Steriles Arbeiten ist in dieser Phase nur noch von geringer Bedeutung, die Produktionssterilität eines handelsüblichen Nähgarns ist ausreichend. Zur Fixierung wird eine Schlaufe um den oberen Teil des Stumpfes gelegt, welche, nachdem der Pfröplling möglichst dicht schließend eingeschoben worden ist, gezogen und verknotet wird. Dadurch wird verhindert, daß der ausgeschnittene Keil sich durch Austrocknung der Basis und späteres Wundkalluswachstum weitet und der Pfröplling herausfällt, ehe er in einer festen Verbindung mit dem Vaskularsystem der Unterlage steht.

Die Pfröpfe müssen noch solange in einem Tischgewächshaus (Hobbybereich des Gärtnereibedarfs) mit entsprechend hoher Luftfeuchte in der Klimakammer verbleiben, bis die Wundfläche verheilt ist. Dann wird eine behutsame Akklimatisierung durchgeführt, indem die Pflanzen zunächst mit dem Tischgewächshaus in das S1 Gewächshaus gebracht werden, wo sie sich vor allem an die niedrigere Luftfeuchte anpassen müssen. Wichtig ist, daß der Faden spätestens nach der Überführung des Pflanze in das Gewächshaus entfernt wird.

### **2.6.7 Bewurzelung**

Für eine direkte Bewurzelung wurde dem Medium 0,5 mg/l - 2mg/l IBA zugesetzt. Desweiteren wurde das Medium mit 5 - 15 mg/l PPT supplementiert.

## **2.7 Co-Transformation**

### **2.7.1 Tumorinduktion mit *A. tumefaciens* C58C1**

Zur Tumorinduktion wurde der Agrobakterienwildstamm C58C1 verwendet. Dieser Stamm trägt ein nicht entwaffnetes Ti-Plasmid und ist somit

---

in der Lage, an Pflanzen ein Tumorwachstum zu induzieren. Dieser Stamm wurde zusätzlich mit dem binären *pHK vst* Plasmid ausgestattet. Es sollte zunächst die Möglichkeit einer Übertragung von zwei T-DNA's aus einem Agrobakterium nachgewiesen werden. Ein weiteres Ziel war, das *pHK vst* Konstrukt einer funktionalen Kontrolle zu unterziehen. An diesem sollte überprüft werden, ob das *bar*-Gen nach der Übertragung in die Pflanze intakt, das heißt funktionsfähig ist. Der Nachweis erfolgte über einen PAT-Assay (2.8.4).

Die Bakterieninokulation wurde mit ü.N Kulturen des genannten *A. tumefaciens* Stamms durchgeführt. Es wurden dazu unter Gewächshausbedingungen 7 Tage alte Keimlinge herangezogen. Die Inokulation erfolgte durch ein mit Agrobaktériensuspension benetztem Skalpell im basalen Teil des Epikotyls, etwa 1 cm über der Erdoberfläche.

## **2.8 Nachweis der Transformationsmarker**

### **2.8.1 Transiente *gus*-Expression**

Im Anschluß an die Cokultur wurden die Explantate mit Equilibrierungspuffer gewaschen und für 3-4h in Substratpuffer bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Substratpuffer abgenommen und durch Ethanol (70%) ersetzt. Der *gus*-Test wurde entsprechend der Expressionsstärke gestoppt, um ein Auslaufen des Farbstoffes aus den Zellen in den Interzellularraum zu verhindern. Ziel war es, einzelne Transformationsereignisse möglichst so zu lokalisieren, daß die Farbkristalle im Cytoplasma zu sehen waren. Dies traf für die vergleichenden Studien der unterschiedlichen Ultraschallbedingungen zu.

Wurde nur eine qualitative Aussage benötigt, so wurden die Explantate ü. N. in Substratpuffer inkubiert. Dies traf für die Nachkommenschaftsanalysen zu, da hier auch schwach exprimierende Gewebeproben (Blätter) mit erfaßt werden sollten.

### **2.8.2 Stabile *gus*-Expression**

Der *gus*-Assay wurde mit den gleichen Reagenzien und unter den gleichen Bedingungen angesetzt, unter denen auch die transiente *gus*-

Expression untersucht wurde. Als „stabil transformiert“ galt prinzipiell alles, was länger als 10 Tage nach der Transformation gemessen wurde. Der Terminus „Stabil“ wird in dieser Arbeit nur bei den Ultraschallexperimenten der „Transienten Expression“ gegenübergestellt. Für die  $T_0$  und deren Nachkommenschaften erübrigt sich eine derartige Differenzierung, da es sich hierbei in jedem Fall um eine stabile Integration handelt. Im Gegensatz zum direkten Gentransfer, bei dem das Transgen als doppelsträngige DNA mittels Vektor über zufällige Ereignisse in den Kern gelangt, muß bei einem Agrobacterium-vermittelten Transfer von einer stabilen Integration zum Zeitpunkt der Expression ausgegangen werden. Dies erklärt sich aus der Tatsache, daß vom Bakterium einzelsträngige DNA gezielt in den Kern übertragen wird. Für die Translation ist aber die Doppelsträngigkeit die Grundvoraussetzung. Die Gene auf der T-DNA können also erst translatiert werden, wenn sie in das pflanzliche Genom integriert worden ist und der komplementäre DNA-Strang der T-DNA ergänzt wurde.

### 2.8.2.1 Zur Durchführung der *gus*-Assays benötigte Puffer:

**Phosphatpuffer:** 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

Zugabe von  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  zu  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  bis ein pH-Wert von 7 erreicht ist ( zu  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  wird etwa das doppelte Volumen  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  zugegeben)

**Prefixpuffer:**  $\Rightarrow$  Phosphatpuffer + 2% v/v Formaldehyd(37%)

**Equilibrierungspuffer:**  $\Rightarrow$  Phosphatpuffer + 0,5 mM  $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$   
10 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$   
0,1 % (v/v) Triton X-100

***gus*-Puffer:**  $\Rightarrow$  Equilibrierungspuffer + 0,5 mg/ml X-Glc A

### 2.8.3 Leaf-Paint-Assay

Für den Leaf-Paint-Assay wird das Totalherbizid BASTA<sup>®</sup> in einer entsprechenden Verdünnung (300-600 mg/l) mit Hilfe eines Pinsels auf das Blatt aufgetragen, dieses Blatt wird dann entsprechend markiert. BASTA<sup>®</sup> enthält 200 g/l Posphinotricin. Dieses Herbizid findet eine breite Anwendung in der Landwirtschaft. Da das Herbizid innerhalb der Pflanze nur bedingt transportiert wird, kann es lokal begrenzt auf den Blättern appliziert werden.

Das Herbizid wird auf die Blattoberfläche aufgetragen, durch Tropfenbildung und anschließende Verdunstung besteht immer die Möglichkeit der lokalen Konzentrationserhöhung. Das Herbizid sollte also nicht bei hohen Gewächshaustemperaturen aufgetragen werden.

---

## 2.8.4 Phosphinothricin Acetyl Transferase -Assay

Um die Expression der Phosphinothricin-detoxifizierenden Gene *pat* und *bar* nachweisen zu können, wurde ein Enzymaktivitätstest durchgeführt. Die Phosphinothricin-Acetyltransferasen befinden sich im Cytoplasma, sie behalten ihre Aktivität nach einem Gewebeaufschluß bei und können so für einen Enzymtest eingesetzt werden.

### Lösungen:

<u>Extraktionspuffer :</u>	50	mM	TRIS-HCL
	1	mM	PMSF (gelöst in Isopropanol)
	3	g/l	BSA ( Fettsäurefrei)
	300	mg/l	Dithiotreitol, DTT
	2	mM	Na-EDTA (0,5 M stock, ph 8 )

### Chromatographie:

<u>MIX:</u>	300	ml	1-Propanol
	200	ml	25% NH <sub>4</sub> OH Lösung

### Chromatographie

Platten: TLC Platten, Silica 60F<sub>254</sub>, 20 x 20 cm,  
Schichtstärke 0,25 mm Merck,(Artikel.Nr.: 5715)

### Protokoll:

1. Homogenisieren von 20 - 30 mg Blattmaterial in Extraktionspuffer, 1µl Puffer pro 1mg Blattmaterial.
2. Abzentrifugieren des Rohextraktes in einem Eppendorf Cap für 5 min bei 4°C und 10000 x g.
3. Abnehmen des Überstandes
4. Auf 20 µl Rohextract aus Schritt 3. werden 2 -ml Glufosinat-NH<sub>3</sub> und 3 -µl <sup>14</sup>C-AcetylCoA ( entsprechend 50 mCi/mmol) gegeben
5. Inkubation für 45 min bei 37°C
6. Zentrifugieren, 1 min 10000 x g
7. 3-6 µl des Überstandes aus 6. auf die Chromatographieplatte pipettieren, dies in 1 -µl Schritten, um den Auftrag möglichst auf einen Punkt zu konzentrieren — dies führt zu schärferen Banden.
8. Nach 2-3 Stunden werden die Chromatographieplatten aus der Kammer genommen und luftgetrocknet. (unter einem Abzug, da beim Öffnen der Kammer Ammoniak frei wird)
9. Die radioaktiv markierten Reaktionsprodukte werden via Autoradiographie (Film: Kodak biomax ML) sichtbar gemacht. Expositionszeit beträgt zwischen 12-48 Stunden bei -80°C.

### **2.9 Molekulare Nachweismethoden an Pflanzen**

Für die molekulare Nachweise wurde die genomische DNA nach der von Doyle & Doyle, (1990) modifizierten CTAB Methode (Murray & Thompson, 1980) isoliert.

#### **2.9.1 Isolation genomischer DNA aus Kichererbsenblättern**

##### **Lösungen und Puffer:**

###### **CTAB-Puffer:**

3 % CTAB  
1,4 M NaCl  
0,2 %  $\beta$ -Mercaptoethanol  
20 mM EDTA  
100 mM Tris-HCl pH 8,0  
0,5 % PVP-40 (löslich)

CTAB und  $\beta$ -Mercaptoethanol wurden nach dem Autoklavieren zugegeben

###### **24:1 Chloroform-Isoamylalkohol Mix**

23 ml Chloroform  
1 ml Iso-Amylalkohol

###### **Waschpuffer**

76 % Ethanol Abs.  
10 mM Ammoniumacetat

###### **RNase A**

10  $\mu$ g/ $\mu$ l Stocklösung in ddH<sub>2</sub>O

###### **TE-Puffer + RNaseA**

10 mM Tris-HCl, pH 8,0  
1 mM EDTA  
10  $\mu$ g/ml RNaseA

##### **DNA-Isolationsprotokoll:**

- 1) 150 - 200 mg möglichst junges Blattmaterial (etwas mehr als ein Kichererbsenblatt)
- 2) Zermörsern in flüssigem Stickstoff und anschließend in 2 ml Eppendorf tubes überführen.
- 3) 800  $\mu$ L CTAB-Puffer (60°C vorgewärmt) zugeben und sehr gut mischen.
- 4) 800  $\mu$ l Chloroform-Isoamylalkohol Mix zugeben, vorsichtig aber gut mischen
- 5) zentrifugieren, 10 min, 12000 rpm (1300 x g) bei Raumtemperatur
- 6) Wässrige Phase in frisches Gefäß geben (Schritt 5 und 6 wiederholen bis wässrige Phase klar ist)
- 7) 2/3 Volumen Isopropanol ( - 20°C) zugeben und schwenken bis die DNA sichtbar präzipitiert.
- 8) zentrifugieren, 10 min, 12000 rpm (1300 x g) bei Raumtemperatur
- 9) Überstand abgießen und in 200 $\mu$ l Waschpuffer das Pellet vom Rand lösen.
- 10) Waschpuffer entfernen und das Pellet in 200  $\mu$ l TE-Puffer + RNaseA inkubieren, 30 min. Bei 37°C 30 min inkubieren.
- 11) 100  $\mu$ l 7,5 M NH<sub>4</sub>Ac und 750  $\mu$ l Ethanol abs. zugeben und gut mischen

- 
- 12) zentrifugieren, 10 min, 12000 rpm (1300 x g) bei Raumtemperatur
  - 13) Überstand abgießen und Pellet in 100-250 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendieren
  - 14) Für PCR die DNA 10 min. auf 60°C inkubieren.

## 2.9.2 PCR

Die PCR Reaktionskomponenten wurden in ein dünnwandiges 0,2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) auf Eis pipettiert. Die PCR wurde dann in einem Biometra Trio Thermoblock durchgeführt.

### 2.9.2.1 *gus*-PCR

Nachgewiesen wurde ein 952 bp Fragment aus dem *gus*-Gen des *pIBgus* Vektors. Die Ansätze waren standardmäßig wie folgt:

x	µl-----	H <sub>2</sub> O reinst
2,5	µl-----	10 x PCR-Puffer (Klentherm)
1,0	µl-----	MgCl <sub>2</sub> , 25 mM
1,0	µl-----	je dNTP 20 mM
1,0	µl-----	je Primer (10 pmol/µl)
0,13	U-----	Klentherm (10U / µl )
≈ 50	ng-----	Template DNA
25	µl-----	Gesamtvolumen

#### Primer:

*gus* A 10: 5'-CCTGT AGAAA CCCCA ACCCG-3'

*gus* A 769: 5'-TGGCT GTGAC GCACA GTTCA-3'

#### Programm:

94°C	60''
94°C	90''
65°C	90''
72°C	2'----- 30 Zyklen
72°C	5'
4°C	∞

### 2.9.2.2 *vst 1* PCR

Für den Nachweis der Integration des *vst 1*-Gens wurden mit einer Demo-Version des Programmes „Vector NTI“ (© 1994-1997 InforMax, inc.) die aufgeführten Primer generiert. Die Oligosynthese wurde bei Firma Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe in Auftrag gegeben.



---

**Programm:**

94°C	2'
94°C	90''
60°C	90''
72°C	2' ----- 30 Cyclen
72°C	5'
4°C	∞

**2.10 Klonierung des binären Vektors *pHKvst 1*****2.10.1 Bakterientransformation**

Die Klonierungs- und Transformationsvektoren wurden über eine Elektroporation (Wirth R. 1989) in die Bakterien *E. coli* und *A. tumefaciens* übertragen. Diese Methode setzt voraus, daß das Medium, in welchem sich die Bakterien zum Zeitpunkt des elektrischen Pulses befinden, keine Ladungsträger enthält. Ist dies nicht gewährleistet, so zerbirst die Küvette aufgrund eines zu hohen Stromflusses. Daher werden die Bakterien elektrokompent gemacht, indem sie mehrfach in Glycerin gewaschen und abschließend darin resuspendiert werden.

**2.10.2 Kompetente Bakterien**

- 1) Einzelkolonie von LB-Festmedium in 2x10 ml LB-Medium (YEP für Agrobacterium) mit entsprechenden Antibiotika animpfen. 20 Stunden bei 28°C auf einem Schüttler inkubieren.
- 2) Anschließend 200 ml LB-Medium mit den Übernachtskulturen animpfen und für 3-5 Stunden bei 28°C auf einem Schüttler inkubieren. (OD<sub>600</sub> 0,4 - 0,5)
- 3) Bakterien bei 4 °C und 3000 x g abzentrifugieren ( SS 34 Röhrchen) und anschließend in 100 ml 4°C kaltem, 10% Glycerin resuspendieren. Diesen Schritt wiederholen.
- 4) Pelletieren und in 10 ml 10% Glycerin resuspendieren. Diesen Schritt wiederholen.
- 5) Pelletieren und in 5 ml 10% Glycerin resuspendieren und in 1 ml Aliquots aufteilen.
- 6) Aliquots pelletieren und in 100 µl 10% Glycerin aufnehmen. Für den sofortigen Gebrauch die Bakterien auf Eis lagern. Andernfalls die Aliquots bei -80°C für max. 6 Monate lagern.

**2.10.3 Elektroporation**

Die Transformation erfolgte mit einem *Gene Pulser*<sup>®</sup> (Bio Rad GmbH). Die verwendeten 2mm Küvetten stammt von der Firma BTX. Alle Medien und Gerätschaften, auch der Küvettenhalter wurden auf 4°C gekühlt. Die unter 2.10.2 hergestellten Bakterien *A. tumefaciens* oder *E. coli* wurden entweder direkt nach der Herstellung verwendet und auf Eis zwischengelagert, oder als Kryostamm (-80°C) aufgetaut und dann auf Eis kühl gehalten.

## Material und Methoden

---

Der Elektroporator wurde auf 2,5 kV, 25  $\mu$ FD und 10 Ohm eingestellt (modifiziertes Bio Rad Protokoll). Die Entladungszeit (Puls) sollte etwa 4,5 ms betragen. Eine wesentlich kürzere Zeit deutet auf zu hohe Salzkonzentrationen in der DNA oder den kompetenten Bakterien hin.

- 1) 40  $\mu$ l kompetente Bakterien mit 2-4 $\mu$ g DNA mischen und in die Küvette pipettieren. Sicherstellen, daß sich die Bakterien in einem Tropfen am Boden der Küvette befinden.
- 2) Küvette in den Elektroporator einführen und unverzüglich elektroporieren.
- 3) Unverzüglich nach dem Puls 1 ml 4°C kaltes SOC Medium in die Küvette pipettieren und die Bakterien darin verdünnen.
- 4) Bakterien in der Küvette für 10 min auf Eis belassen
- 5) Bakteriensuspension in 2 ml Eppendorf-cap geben und für 1h bei der entsprechenden Temperatur ( 28°C für *A. tumefaciens* oder 37°C für *E. coli*) inkubieren.
- 6) Verdünnungsreihen der verschiedenen Elektroporationsansätze,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  und  $10^{-3}$  anlegen.
- 7) Jeweils 100 $\mu$ l der Elektroporationsansätze, einer Kontrolle ohne DNA und einer nicht gepulsten Kontrolle der kompetenten Bakterien ausplattieren. Dazu entsprechende Anzahl von LB-Platten mit und ohne den entsprechenden Antibiotika bereitstellen. Das Ausplattieren mit einem Drigalskispatel erfolgt solange, bis die Platten trocken sind. Die Inkubation erfolgt bei 28°C oder 37°C, entsprechend dem jeweiligen Bakterienstamm

### **2.10.4 Elektroporation der unter 2.10.12 beschriebenen Ligationsansätze.**

Mit den Ligationsansätzen L 1 und L 2 wurden jeweils zwei Elektroporationen von *E. coli* NM 522 durchgeführt. Die Geräteeinstellung entspricht der unter 2.10.3.

Ansatz	L 1.1	L 1.2	L 2.1	L 2.2
Komp. Bakterien [ $\mu$ l]	40	40	40	40
DNA aus Ligationsansatz [ $\mu$ l]	2	4	2	4

Von den vier Ansätzen wurden jeweils 100 und 500  $\mu$ l auf LB-Platten mit 50 mg/l Kanamycin ausplattiert. Verdünnungsreihen wurden nicht angelegt, da nach der Ligation nicht mit einer sehr hohen Transformationsfrequenz zu rechnen war.

Desweiteren wurde eine Kontrolle von elektroporierten Bakterien ( ohne Plasmid) auf eine LB-Platte mit Kanamycin und eine LB-Platte ohne Kanamycin ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C.

An den auf Selektionsmedium gewonnenen Kolonien wurde dann eine Plasmidpräparation entsprechend 2.10.6 durchgeführt, anschließend ein Restriktionsverdau (Sambrook et al., 1989):

3 µl	DNA
1 µl	Puffer R“
1 µl	Hind III
5 µl	H <sub>2</sub> O

Inkubation 2 h bei 37°C in einem Inkubator. Dieser Verdau wurde dann auf einem Agarose-Gel aufgetrennt (Sambrook J., 1989), sein für das Plasmid spezifisches Bandenmuster wurde dann mit dem zu erwartenden verglichen.

### 2.10.5 Lagerung

Die in 2.10.3 gewonnenen Bakterien wurden von einer Einzelkolonie über Nacht in 3-4 ml LB- bzw. YEP-Flüssigmedium vermehrt. Aus dieser Kultur wurden dann 2 ml, bei Agrobakterien 3ml, für eine Plasmidpräparation (2.10.6) eingesetzt. Der Rest wurde zum Animpfen von 25 ml in einem 100 ml Erlenmeyerkolben verwendet. Dieser wurden dann bis zu einer OD<sub>600</sub> > 1 kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde dann in einem Verhältnis 2:1 mit Glycerin 86% vermischt und in 2 ml Kryocaps der Firma Nalgene bei -80°C gelagert.

### 2.10.6 Plasmidpräparation

Für die routinemäßigen Kontrollen der Transformationsvektoren in den Agrobakterienstämmen wurden die Bakterien in 3-4 ml des entsprechenden Mediums angezogen. Anschließend erfolgte eine Plasmidpräparation aus den Bakterien (Birnboim & Doly, 1979). Für die Klonierung wurden größere Plasmid-Mengen mit einem entsprechenden Kit der Firma Quiagen gewonnen und aufgereinigt.

### 2.10.7 Lösungen

<b><u>Lsg.A:</u></b>	15 mM Tris-Cl pH 8,0, 10 mM EDTA, 50 mM Glucose, 2 mg/ml frisches Lysozym zusetzen
<b><u>Lsg.B:</u></b>	0,2 M NaOH, 1% SDS
<b><u>Lsg.C:</u></b>	3 M NaOAc, pH 4,8
<b><u>Lsg.D:</u></b>	0,1 M NaOAc, pH 7,0, 0,05 M Tris-Cl pH 8,0

### 2.10.8 Durchführung

- 1) 2 ml der Übernachtskultur in 2 ml Eppendorf-cap pipettieren und 5' in Laborzentrifuge zentrifugieren. Überstand quantitativ entfernen.  
→ Bei Agrobakterien das Pellet in 1 ml der Bakteriensuspension erneut resuspendieren und Schritt 1 wiederholen.
- 2) Pellet vorsichtig in 200 µl Lsg.A aufnehmen und 15' bei RT. stehen lassen
- 3) 400 µl Lsg.B zugeben, gut mischen
- 4) 300 µl Lsg.B zugeben, gut mischen und 15 min auf Eis stellen.
- 5) 10' zentrifugieren, den Überstand in 1,5 ml Eppendorf-cap überführen und erneut 10' zentrifugieren
- 6) 800 µl Überstand abnehmen, in 1,5 ml Eppendorf-cap überführen und mit 600 µl Isopropanol (-20°C) fällen.
- 7) 10' zentrifugieren, Überstand verwerfen, Reste mit Pipette vom Pellet vollständig entfernen.
- 8) Pellet in 200 µl Lsg.D vollständig aufnehmen, gut mischen und vollständig lösen
- 9) 400 µl abs. EtOH zugeben, mischen
- 10) 10' zentrifugieren, EtOH vollständig entfernen, Pellet trocknen.
- 11) Pellet in 50 µl TE 10/0,1 + 1 µl RNase ( 1mg/ml) aufnehmen.  
→ Für Ligation nur in Reinst-H<sub>2</sub>O + 1 µl RNase aufnehmen.

### 2.10.9 DNA Aufreinigung

Nach dem Restriktionsverdau wurden die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente auf dem UV-Leuchttisch aus dem Gel so knapp wie möglich ausgeschnitten, in 1,5 ml Eppendorf-caps (Tara) überführt und gewogen. Die in der Agarosematrix befindliche DNA mußte nun für die Ligation aufgereinigt werden.

Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem Aufreinigungs Kit, Easy Pure<sup>®</sup> (Biozym Diagnostik GmbH). Es wurde genau nach dem mitgelieferten Protokoll gearbeitet. Die einzelnen Komponenten sind nicht näher beschrieben, es kann daher nicht näher auf das dem Kit beiliegende Protokoll eingegangen werden. Prinzipiell handelt es sich um ein Glasmilchverfahren, bei dem die DNA unter bestimmten Pufferbedingungen an die Glaskugeln gebunden, anschließend gewaschen und abschließend wieder unter bestimmten Pufferbedingungen von den Glaskugeln gelöst wird.

Nach der Aufreinigung der DNA wurden diese direkt für die Ligation eingesetzt. Die DNA wurde dazu in autoklaviertem, zweifach deionisiertem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

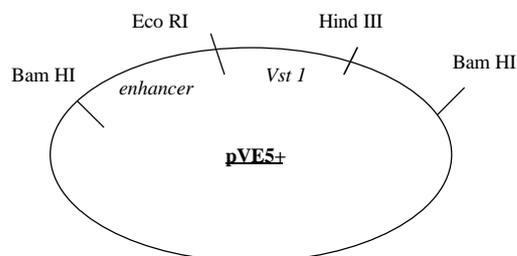
### 2.10.10 Aufbereitung des *vst 1* Gens

Das Stilbensynthase Gen wurde von der Firma Bayer in dem binären Pflanzenvektor *pPCV001* (Koncz & Schell, 1986) als *pVE5<sup>+</sup>* zur Verfügung gestellt. Das binäre Plasmid trägt als Pflanzenmarker ein *npt II*-Gen, es sollte zur besseren Selektierbarkeit in Pflanzen mit einem *bar*-Gen kombiniert werden. Die nachfolgenden Klonierungsschritte waren erforderlich, um das *vst 1*-Gen in den Pflanzenvektor *pGPTV bar* (Becker et al., 1992) einzuklonieren. Die Kasette in *pVE5<sup>+</sup>* besteht aus einem 1,3 kb großen 4x Enhancer (Enhancersequenzen des 35S RNA Promotors) und dem 3,8 kb großen *vst 1*-Gen inclusive dem induzierbaren *vst 1*-Promotor, einem Intron und dem Terminator. Flankiert wird sie von zwei Bam HI Restriktionsschnittstellen, so daß prinzipiell beide Orientierungen möglich sind. Das Plasmid wurde in *E.coli* NM 522 via Elektroporation transformiert (entsprechend 2.10.3).

Das *vst 1*-Gen wurde dann über die Eco RI / Bam HI Site aus der *pVE5<sup>+</sup>* Kasette herausgeschnitten und in die Multiple Cloning Site von *pGEM-3zf<sup>+</sup>* einkloniert. Innerhalb dieser Multiple Cloning Site befindet sich neben der Bam HI eine Xba 1 Site. Über diese Schnittstellen kann das *vst 1*-Gen an Stelle des *gus*-Gens in den *pGPTV bar* Vektor (Becker D., 1992) einkloniert werden.

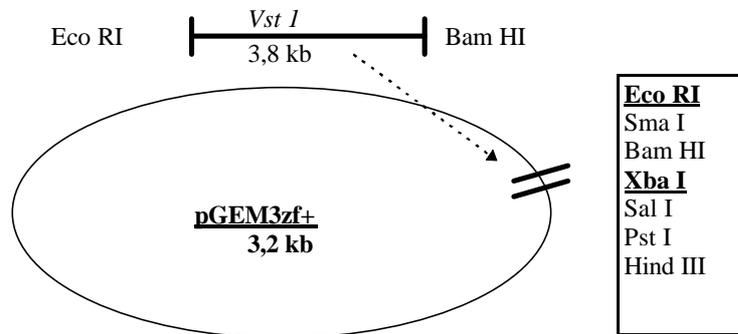
Für die Suche geeigneter Schnittstellen stand die Sequenz des aus *Vitis vinifera* klonierten und mit dem Enhancer kombinierten *vst 1* zur Verfügung (Hain et al. 1993). Es wurde zunächst darauf verzichtet, den Enhancer mit in den binären Vektor zu übernehmen, da dieser Enhancer zu einer verstärkten Expression in Tabak führte (Fischer R, 1997). Eine verstärkte Expression könnte aber zu einer männlichen Sterilität in Kichererbsen führen.

Dies hatte zwei weitere Vorteile, zum einen war der zu klonierende Bereich nur noch 3,8 kb groß und zum anderen war so eine Polarisierung des *vst 1* Gens zwischen der flankierenden Eco RI und Bam HI Site möglich.



Das *vst 1* Gen wurde dann über die Eco RI / Bam HI Schnittstelle in die Multiple Cloning Site des *pGEM-3zf<sup>+</sup>* Vektor (Yanish-Perron et al., 1985) der Firma Promega kloniert .

Aus diesem Vektor wurde das *vst 1* Gen über Eco RI / Xba I wieder herausgeschnitten. Es wurde dann über diese Schnittstellen in den *pGPTV bar* Vektor an Stelle des *gus*-Gens eingefügt.

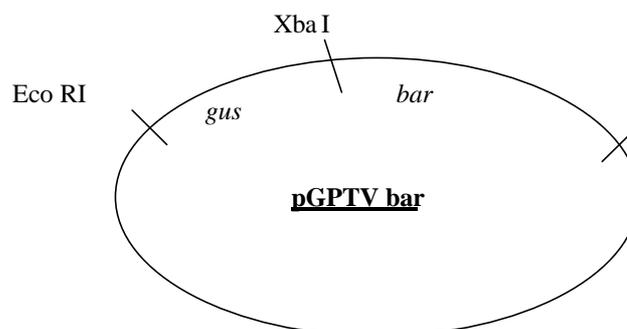


### 2.10.11 Aufbereitung des *pGPTV Bar* Vektors

Es handelt sich bei diesem Vektor um ein Bin 19 Derivat, welches zwischen der linken und rechten Border ein promotorloses *uid A*-Gen und ein *bar*-Gen enthält. Der Vorteil dieses binären Vektors besteht vor allem darin, daß sich das zu übertragende Strukturgen nahe der Linken Border der T-DNA befindet und so zuerst übertragen wird. Wird die Übertragung aus irgend einem Grund unterbrochen, so wird bevorzugt der selektierbare Marker nicht mit übertragen. Dies verhindert, daß unter Umständen Pflanzen resistent gegenüber dem selektiven Agens sind, jedoch das Strukturgen nicht übertragen wurde (Becker et al., 1992). Auf dem Plasmid befindet sich ein Kanamycinresistenzgen aus *E. coli* zur Selektion in Bakterien und ein RK 2 Origin zur Replikation. Für die Klonierung wurde der binäre Vektor zunächst in *E. coli* NM 522 transformiert, da er sich hier schneller amplifizieren und isolieren läßt. Die Eco RI / Xba I Site ermöglicht es, das *gus*-Gen herauszuschneiden und über diese Sites das *vst 1* Gen einzufügen.

### 2.10.12 Ligation des *vst 1* Gens mit dem *pGPTV Body*

Beide Ligationspartner, der *pGPTV bar*-Vektor und das *vst 1*-Insert wurden über Eco RI / Xba I geschnitten. Es handelt sich hier um ungleiche Enden, der Vektor kann sich also nicht ohne Insert schließen.



---

Insert ( *vst 1* ) und Vektor sollten in einem 4:1 Verhältnis, vorliegen (Sambrock J., 1989). Da das Insert mit 3,8 kb etwa ein Drittel des Vektors mit 11,5 kb ausmacht, ist eine Schätzung der Fluoreszenzintensität der Ethidiumbromid gefärbten Banden auf dem UV-Tisch schwierig. Es wurden daher zwei Ansätze gefahren, um etwa das geforderte 4:1 Verhältnis einzustellen.

Ansatz	L 1	L 2
<i>vst 1</i> 1 [μl]	10	10
<i>pGPTV</i> [μl]	5	2,5
Puffer [μl]	4	4
H <sub>2</sub> O [μl]	—	2,5
Ligase T4 [μl]	1	1

Die Ligation wurde über Nacht bei 14°C durchgeführt.

### 2.10.13 Glycogenfällung

Um das Ligationsprodukt für eine Elektroporation nutzen zu können, wurde die DNA direkt nach der Ligation gefällt und in die Bakterien elektroporiert. Das Risiko des DNA-Abbaus durch kontaminierende DNAsen wurde so minimiert.

Die beiden 20 μl Ligationsansätze L1 und L2 wurden folgendermaßen aufbereitet.

- 1) + 1 μl Glycogen
- 2) + 3 μl LiCl 8 mM
- 3) 129 μl EtOH abs.
- 4) 30' bei -80°C inkubieren
- 5) 10' bei 13000 RPM ( 15100 x g ) zentrifugieren
- 6) Überstand abpipettieren und 100μl EtOH 70% zugeben
- 7) 5' in Laborzentrifuge zentrifugieren
- 8) Überstand abnehmen und Pellet trocknen lassen
- 9) Pellet in 10μl 2 fach deion. H<sub>2</sub>O lösen

Die DNA kann nun zur Elektroporation verwendet werden.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Gewebekultur**

Die in dieser Arbeit durchgeführten Gewebekulturarbeiten beschränken sich auf den Versuch, ein Protoplastensystem für *Cicer arietinum* zu entwickeln und auf die Meristemkultur prä-existierender Meristeme zur direkten Organogenese.

Das Protoplastensystem zur Regeneration von Pflanzen basiert letztendlich auf der Sproßinduktion an protoplastenbürtigem Kallusmaterial, welches im Idealfall auf eine Einzelzelle zurückzuführen ist. Alle von einem Kallus stammenden Sprosse sollten demnach einen Klon darstellen. Dies trifft jedoch nur zu, wenn ein Zusammenwachsen benachbarter Kalli vermieden werden kann. Der so erhaltene Kallus stellt zu Beginn der Kultur ein unorganisiertes Gewebe dar, an dem über entsprechende Phytohormongaben eine Organogenese oder eine somatische Embryogenese induziert werden kann. Das für die Protoplastierung verwendete Material kann einerseits aus Suspensionskulturen stammen oder aus komplexen pflanzlichen Geweben direkt isoliert werden.

Bei der Verwendung pflanzlicher Organe gibt es die Möglichkeit, aus bereits vorhandenen Meristemen Sprosse zu regenerieren. Über geeignete Phytohormongaben können die Meristeme dazu angeregt werden, über den physiologischen Status hinaus Sproßproliferation zu betreiben.

Die Entstehung von Adventivorganen (Wurzel oder Sproß) aus epidermalen Zellschichten ist ebenfalls möglich und kann auch parallel zu der meristematischen Sproßproliferation stattfinden. Adventivorgane sind in der Regel nur durch entsprechende Phytohormongaben induzierbar. Charakteristisch ist, daß diese Organe zunächst keine Verbindung zum Vaskularsystem besitzen.

##### **3.1.1 Protoplasten**

Ziel war es, ein Regenerations- und Transformationssystem für *Cicer arietinum* zu entwickeln. Dazu wurden die Regenerationsprotokolle für *Pisum sativum* nach Böhmer (Böhmer et al., 1995) und für *Vicia faba* cv. Mythos (Tegeeder et al., 1995) auf Kichererbsen angewendet. Bis dato liegt kein Protokoll zur Sproßregeneration aus protoplastenbürtigen Kalli für *Cicer arietinum* vor, trotzdem wurde die Protoplastenkultur zu Beginn der Arbeit favorisiert, da hier bereits positive Ergebnisse in Bezug auf die Regeneration von transgenen T<sub>0</sub> Erbsen (*Pisum sativum*) vorlagen ( Böhmer P., 1995).

Als Basismedium diente Gamborgs B5 Medium mit 2% Saccharose. Die

---

Induktion von Sproßknospen erfolgt an *Pisum sativum* durch die Applikation von 10µM TDZ über einen Zeitraum von 16 - 22 Wochen.

Es wurden vier TDZ Konzentrationen (2,5 -, 5 -, 7,5 - und 10 µM TDZ) mit fünf NAA Konzentrationen (5,3 -, 4 -, 0,5 -, 0,05 und 0 µM) kombiniert. Pro Kombination wurden 200 Kalli eingesetzt, insgesamt 4000 Kalli. Alle Kalli entstammten einer Protoplastenisolation und wurden unter identischen Bedingungen kultiviert.

Dieser Versuch wurde nach drei Subkulturen (3 Monaten) abgebrochen, da das Kallusmaterial in allen Ansätzen weich und braun wurde. Eine morphologische Veränderung, die auf die Entstehung von Sproßknospen hindeutet, so wie sie von Böhmer an Erbsen beschrieben wird, konnte an den untersuchten Kichererbsenkalli nicht beobachtet werden.

### **Tab. 1 Protoplastendaten**

Pflanzenmaterial	3-4 Tage alte, grüne Sprosse
Mazerationsvolumen	10 ml, in 9 cm Petrischale
Ausbeute	6-10 <sup>6</sup> / 10 ml
Ausbeute/g Frischgewicht	12-20 x 10 <sup>6</sup>
Plating efficiency <sup>1</sup>	1-1,3 %

Die in diesem Versuchsansatz gewählten Phytohormonkombinationen und -konzentrationen repräsentieren nur ein kleines Spektrum der Möglichkeiten. Der Grund dafür, daß mit dem Protoplastensystem nicht weitergearbeitet wurde, ist nicht direkt auf dieses Experiment zurückzuführen. Vielmehr waren es die Ergebnisse aus der Protoplastenarbeit an *Pisum sativum*. Hier war die Pollenproduktion der Primäregenerate erheblich reduziert, eine Nachkommenschaft blieb bisher aus (de Kathen et al. 1998).

### **3.1.2 Thidiazuron induzierte multiple Sprosse an dekapitierten Embryonen (Meristemkultur)**

Da eine direkte Organogenese an protoplastenbürtigen Kalli unter den gewählten Bedingungen nicht beobachtet werden konnte, wurde mit komplexen Geweben weitergearbeitet. Reife Embryonen besitzen bereits eine ausdifferenzierte Sproßanlage. Durch die Dekapitierung und die damit gebrochene Apikaldominanz treiben die Axillarsprosse auch ohne den Einsatz von Phytohormonen aus. Die Verwendung von TDZ führte dazu, daß sich an der Embryoachse in der Nähe der Schnittfläche multiple Sproßmeristeme bildeten. Dazu ist bereits ein einmaliger Puls mit 10µM TDZ über die Zeit der Co-Kultur ausreichend. Multiple Sproßmeristeme entwickeln sich aber nur bei länger andauernder Kultur auf TDZ supplementierten Medien.

---

<sup>1</sup> **Plating efficiency:** Anteil der auf Festmedium wachsenden Kalli bezogen auf die Zahl der

## Ergebnisse

---

Unter der Wirkung von 2µM, 5µM und 10 µM TDZ bildeten sich mit zunehmender TDZ-Konzentration immer kompaktere multiple Sproßmeristeme aus. Wurde eine Konzentration von 10µM TDZ jedoch über einen Zeitraum von vier Wochen beibehalten, so konnte keine Sproßelongation beobachtet werden.

**Tab. 2: Thidiazuroneffekte auf die Induktion von multiplen Sproßmeristemen und die Elongation der daraus hervorgehenden Sprosse**

	10 µM TDZ	5 µM TDZ	2 µM TDZ
<b>Entwicklung eines multiples Sproßmeristem</b>	+++	++	+
<b>Sproßelongation der multiplen Sprosse</b>	-	+	++

Die Bonitierung der multiplen Sproßbildung erfolgte im gegenseitigen Vergleich der Explantate, da die Sproßknospen nicht zählbar sind: Die Explantate konnten aber eindeutig in drei Entwicklungsklassen eingeteilt werden.

Die Bonitierung der Sproßelongation erfolgte ebenfalls im gegenseitigen Vergleich: „-“ bedeutet, daß hier keine Elongation statt fand, „+“ Zeichen stehen für den Unterschied in der Elongation.

Dieser Versuch zeigte, daß mit 10µM TDZ ein sehr kompaktes multiples Sproßmeristem im apikalen Teil des Embryos entsteht.

Für die weitere Kultur wurde nach der Co-Kultur auf 10µM TDZ-Medium die TDZ-Konzentration verringert, um eine spätere Elongation der Sprosse nicht zu inhibieren.

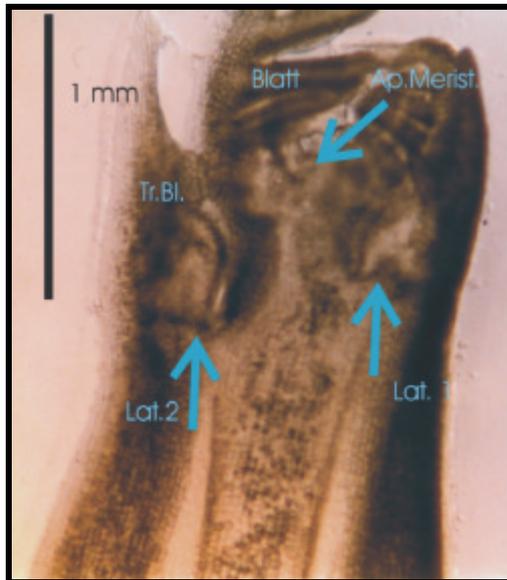
### **3.2 Ursprung der Sproßregeneration**

Bei der Regeneration transgener Pflanzen ist der Ursprung der Sproßregeneration zumindest mitentscheidend dafür, ob es sich bei den Regeneraten um Chimären oder um genetisch homogene Pflanzen handelt. Von Kar et al. (1996) wird ein multizellulärer Ursprung und von Fontana et al. (1993) eine neoforme, wundinduzierte Sproßregeneration angenommen. Beide arbeiteten mit reifen, dekapitierten Embryonen von *Cicer arietinum*, allerdings nicht unter identischen Bedingungen und darüberhinaus mit verschiedenen Sorten.

Unter den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen wurde erneut überprüft, welches der Ursprung der sich an den dekapitierten Embryonen entwickelnden Sproßmeristeme sein könnte. Die in diesem Abschnitt gewonnenen Daten müssen abschließend zusammen mit den aus den Expressionsdaten der an transgenen Pflanzen gewonnen Erkenntnisse gemeinsam diskutiert werden.

Die Anatomie der Embryoachse von über Nacht gequollenen Samen von ILC 482 ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

**Abb. 7 Längsschnitt durch einen Embryo**



50 fache Vergrößerung eines Längsschnittes durch einen reifen Embryo. Die Pfeile markieren die Lateralmeristeme (Lat.1 und Lat.2) und den apikalen Dom. Der Balken entspricht 1 mm. Im oberen Teil befindet sich links neben dem Apikalmeristem vermutlich ein weiteres Lateralmeristem (Pfeil) , dieses wird aber bei der Dekapitierung in den überwiegenden Fällen entfernt.

**Tr.Bl.**= Tragblatt; **Lat.** = Lateralmeristem  
**Ap. Merist.** = Apikalmeristem

Es wurden 21 Embryonen der Kabuli-Sorte ILC 482 entsprechend der unter Abb. 7 dargestellten Weise geschnitten und mikroskopisch ausgewertet.

Tab. 3 Entfernungen der Lateralmeristeme von der Spitze des Embryos

n=21	Abstand zur Spitze in [mm]
Apikalmeristem	0,5
Lat. 1	0,7
Lat. 2	1

Bei der Routinetransformation wird die Sproßspitze entfernt, dies ist in Abb. 8 dargestellt. Mit dem bloßen Auge ist es allerdings unmöglich, an allen Embryonen exakt an einer anatomisch definierten Stelle zu schneiden, wie zum Beispiel oberhalb des untersten Lateralmeristems (hier Lat 2. genannt) Die Schnitte streuen um einen Mittelwert. Es sollte nun überprüft werden, in wieweit dies eine Auswirkung auf die Regeneration hat, bzw. auf die Homogenität der Explantate.

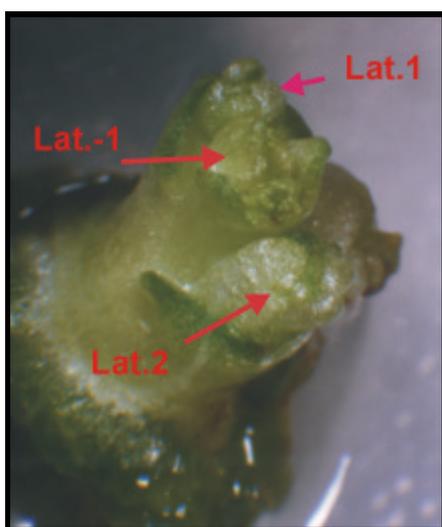
## **Abb. 8 Embryo vor und nach der Dekapitierung**



Der entfernte Teil entspricht etwa der Länge von 1 mm (15 x).

Nach der Dekapitierung wird der Wurzelpol ebenfalls entfernt und anschließend wird der Embryo vom Kotyledo abgebrochen. Die verbliebenen Lateralmeristeme sind bei der Routine nicht mit dem bloßen Auge auszumachen. Die Schnittführung verläuft bei der Routine vermutlich auch nicht immer im rechten Winkel zur Sproßachse.

## **Abb. 9 Darstellung der Lateral sproßmeristeme eines dekapitierten Embryos**



Aufsicht auf ein aus den Lateralmeristemen sproßproliferierendes Explantat. Lat 2. und Lat 1 sind eindeutig die beiden unteren Lateralmeristeme. Lat -1 liegt räumlich über diesen Lateral sprossen. Da bei Lat -1 aber das Tragblatt zu erkennen ist, wird es sich bei diesem Sproß nicht um einen Adventiv sproß handeln

Um retrospektiv zu überprüfen, wo der Schnitt für die Dekapitierung gesetzt wurde, wurden die Sproßentwicklung von 90 Explantaten nach der Dekapitierung untersucht. Die sich weiterentwickelnden Lateral sproßmeristeme

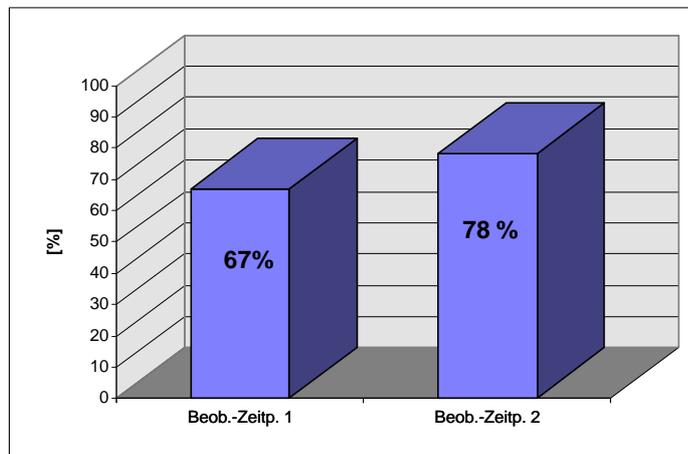
---

geben dabei indirekt Aufschluß darüber, wo der Schnitt am über Nacht gequollenen Embryo gesetzt wurde.

Würde der Schnitt tiefer als 1mm und damit bei dem größten Teil der Embryonen unterhalb des untersten Lateralmeristems (Lat. 2) gesetzt, so würde bei einem großen Teil der Embryonen kein Lateralmeristem übrig bleiben.

Beobachtungszeitpunkt 1 ist der Status direkt nach der Co-Kultur von vier Tagen. Zu diesem Zeitpunkt waren die Lateral sproßknospen unter einem Binokular gut zu erkennen. Beobachtungszeitpunkt 2 ist nach sechs Tagen, hier strecken sich die Lateral sprosse, die Schnittfläche trocknet ein und wird von der Epidermis überwachsen.

### **Abb. 10 Sproßentwicklungskinetik**

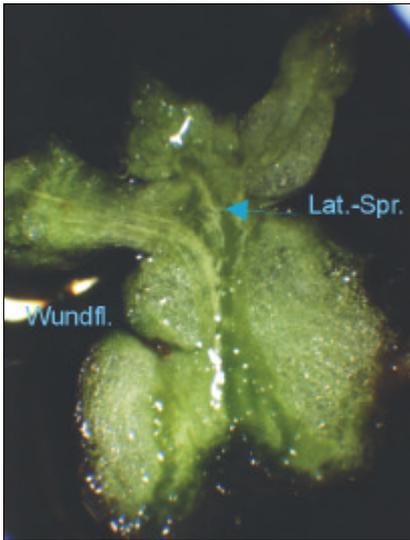


**Beobachtungszeitpunkt 1:** Vier Tage nach Dekapitierung

**Beobachtungszeitpunkt 2:** Sechs Tage nach Dekapitierung

An Beobachtungszeitpunkt 1 betrug der Anteil sproßproliferierender Explantate 66%, 44% der Explantate hatten ein -, 22 % der Explantate zwei Lateralmeristeme. An Beobachtungszeitpunkt 2 nimmt die Zahl sproßproliferierenden Explantate zu, die Sproßmeristeme sind hier bereits 1mm groß und aufgrund ihrer Morphologie eindeutig als Lateral sprosse ansprechbar. Möglicherweise ist der Zuwachs durch eine Rekonstitution stark verwundeter Meristeme hervorgerufen worden. Dies ließ sich aber nicht belegen. Für Adventivsprosse wären die Sprosse zu diesem Zeitpunkt aber schon zu komplex, wie dies in Abb. 11 zu erkennen ist. Es ist also davon auszugehen, daß in 2/3 der Fälle oberhalb des untersten Lateralmeristems geschnitten wurde.

### **Abb. 11 Längsschnitt durch ein multiplen Sproßklon**



Längsschnitt durch ein vier Wochen altes Explantat. Die Wundfläche (Wundfl.) wird von dem sich entwickelnden Lateralsproß (Lat.-Spr.) überwachsen. Eine Verbindung der Sprosse zum Vaskularsystem ist gut sichtbar.

In Abb. 11 ist auch die Überwachsung der Wundfläche durch den sich entwickelnden Lateralsproß gut zu erkennen.

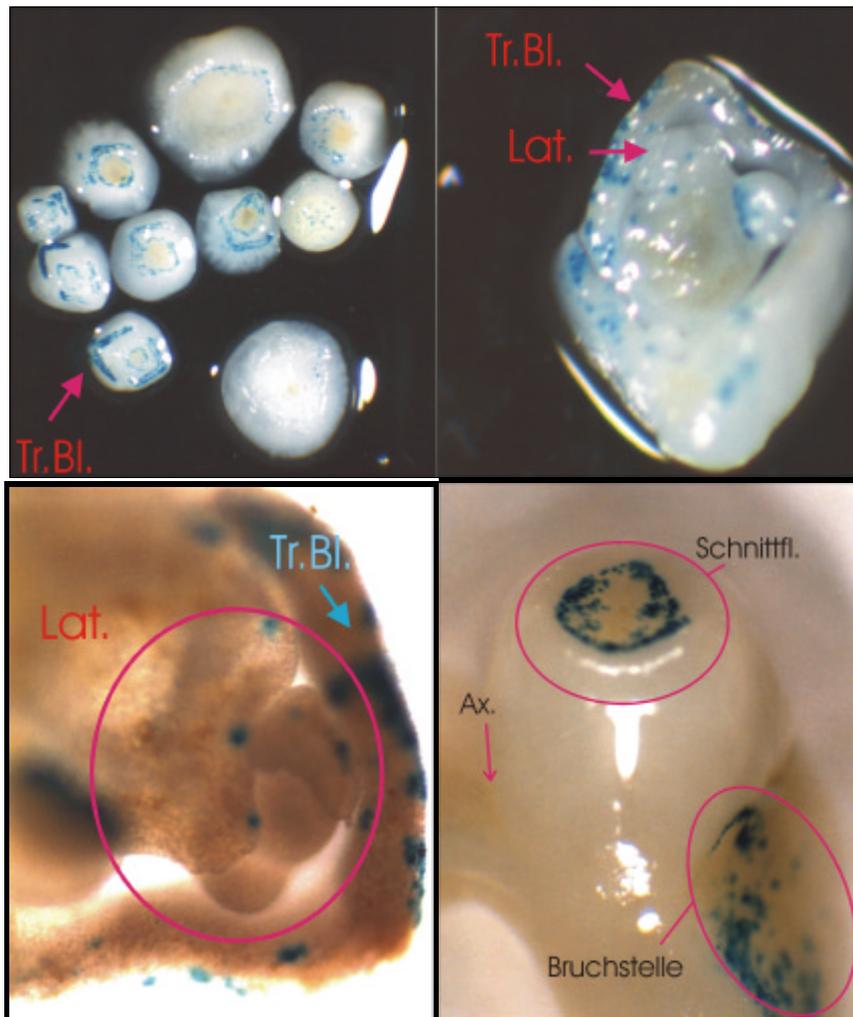
### **3.3 Gentransfer in pflanzliches Gewebe**

Im weiteren Verlauf der Gewebekultur kam es darauf an, die Zielgewebe des Gentransfers entsprechend in ihrer Entwicklung zu fördern und die nicht transgenen Zellen in ihrer Entwicklung zu bremsen. Hier besteht der direkte Zusammenhang des Gewebekultursystems und der Transformationsmethode. Wichtig ist dabei, daß bekannt sein sollte, welche Bereiche der Transformationsexplantate transformationskompetent sind. Um dies herauszuarbeiten, wurde in der vorliegenden Arbeit ein  $\beta$ -Glucuronidase Gen (*gus*, *uidA*) verwendet, welches ein Intron trägt und somit nur von einem eukaryontischen Organismus exprimiert werden kann (Vancanneyt et al. 1990). Über einen entsprechenden Test wurden dann die Zellen lokalisiert, welche das Gen exprimierten.

#### **3.3.1 Lokalisierung der transienten *gus*-Expression**

Hier wurden an den Explantaten die Bereiche lokalisiert, in welchen *gus*-Expression direkt nach der Co-Kultur ausgemacht werden konnte. Die Expression des Reportergens in den ersten 4-5 Tagen nach der Transformation kann wieder verloren gehen, daher wird der Begriff „transiente Expression“ verwendet. Es wurde aber postuliert, daß die transient exprimierenden Bereiche jene Bereiche sind, an denen später auch mit stabiler Expression zu rechnen ist (Jansen B.-J. et al., 1989; Villemont et al., 1997). Ferner sollte damit untersucht werden, ob diese transiente Expression in regenerationskompetenten Bereichen lokalisiert ist. Wie in den zu sehen, gibt es zwei prominente Bereiche der transienten *gus*-Expression an der Schnittstelle.

**Abb. 12** Transiente *gus* Expression an dekapitierten Embryonen



**Oben links und rechts:** Die Explantate zeigen *gus*-Expression in den Tragblättern (Tr.-Bl.) und in den Lateral sprossen (Lat.)

**Unten links:** Querschnitt parallel zur Oberfläche der Schnittfläche nach der Dekapitierung (wie oben rechts). Deutlich ist die *gus*-Expression im Lateralmeristem und im Tragblatt.

**Unten rechts:** *gus*-exprimierender Bereich direkt an der Schnittfläche. Die Bruchstelle an der sich ursprünglich das Kotyledo befand, zeigt ebenfalls *gus*-Expression. Mit Ax. ist der Ort bezeichnet an dem sich das verbliebene Axillarmaristem befindet (Hier nicht sichtbar).

**Abb. 13** Aufsicht auf dekapitierten Embryo mit transienter *gus*-Expression



(20 x), Wr. = Wundrand

In Abb. 13 ist ein in allen Embryonen wiederzufindendes Expressionsmuster transienter *gus*-Expression zu sehen.

Diese beiden Beobachtungen grenzen den Ursprung transgener Sprosse indirekt ein. Transgene Sprosse können nur dort entstehen, wo mit hoher Wahrscheinlichkeit Transformationsereignisse stattfinden. Diese Ergebnisse waren insofern hilfreich und wichtig, als daß so der Bereich definiert werden konnte, welcher in der Gewebekultur zur Sproßregeneration angeregt und gefördert werden sollte.

### **3.4 Transformation mit der SAAT Methode**

In dem vorangegangenen Abschnitt wurden die Lateralmeristeme als Ursprungsort für die Entstehung transgener Sprosse favorisiert. Als Alternative zu der vergleichsweise grobmechanischen Verwundung mittels Skalpell wurde untersucht, ob eine homogene Verwundung des gesamten Explantates durch eine Ultraschallbehandlung möglicherweise die Transformationseffizienz erhöhen könnte.

Für die Auswertung nach der US-Behandlung wurden die an der Schnittfläche des dekapitierten Embryos auftretenden *gus*-exprimierenden Zellen gezählt und mit den Zellen der unbehandelten Kontrolle verglichen. Die Versuche wurden in einer Diplomarbeit (Andreas Spötter, 1999) im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt. Es wurde besonderes Augenmerk auf die Erfassung zellulärer *gus*-Expressionseignisse gelegt. Für die Darstellung wurden dann die Einzelereignisse an allen Explantaten aufsummiert.

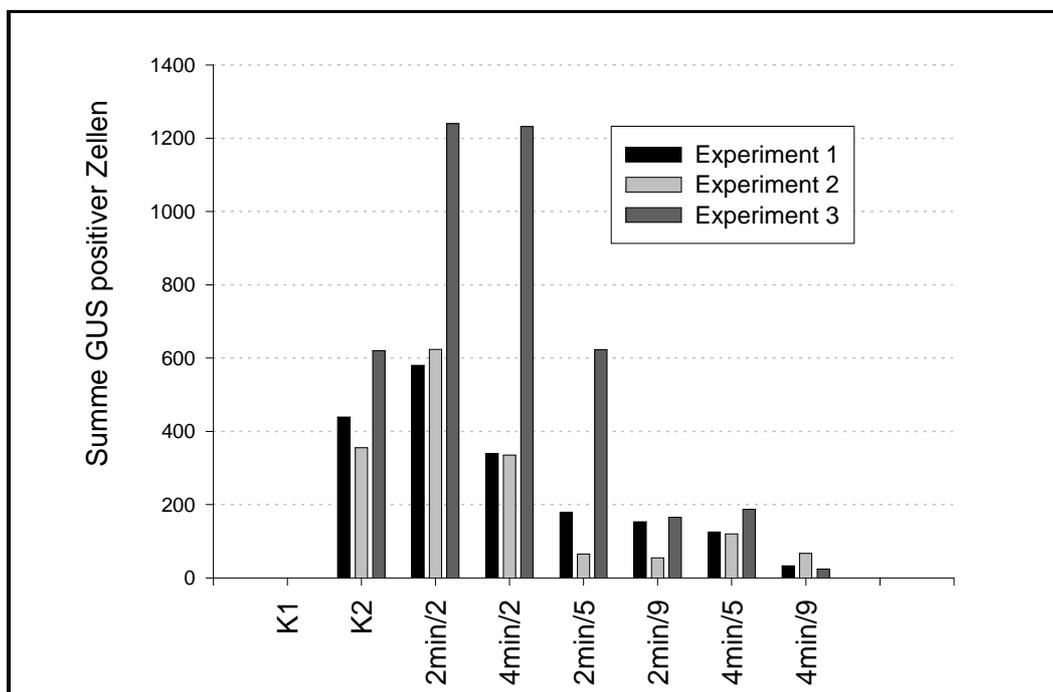
Es zeigte sich, daß mit steigender Ultraschallarbeit (Arbeit wird hier im physikalischen Sinn verstanden) die transiente Expression abnimmt.

Das Produkt aus Leistung [W] x Zeit [s] ergibt die an den Explantaten verrichtete Ultraschallarbeit [Ws]. Die Reihenfolge der Experimente in den Abbildungen 14 und 15 entspricht der verrichteten US-Arbeit.

**Tab. 4 Experimente nach der Ultraschallarbeit geordnet**

Expositionszeit [min] Geräteeinstellung	2 min Stufe 2	4 min Stufe 2	2 min Stufe 5	4 min Stufe 5	2 min Stufe 9	4 min Stufe 9
US-Arbeit [Ws]	5	10	15	31	22	44

**Abb. 14 Summe *gus*-positiver Zellen nach der US-Behandlung (SAAT) \***



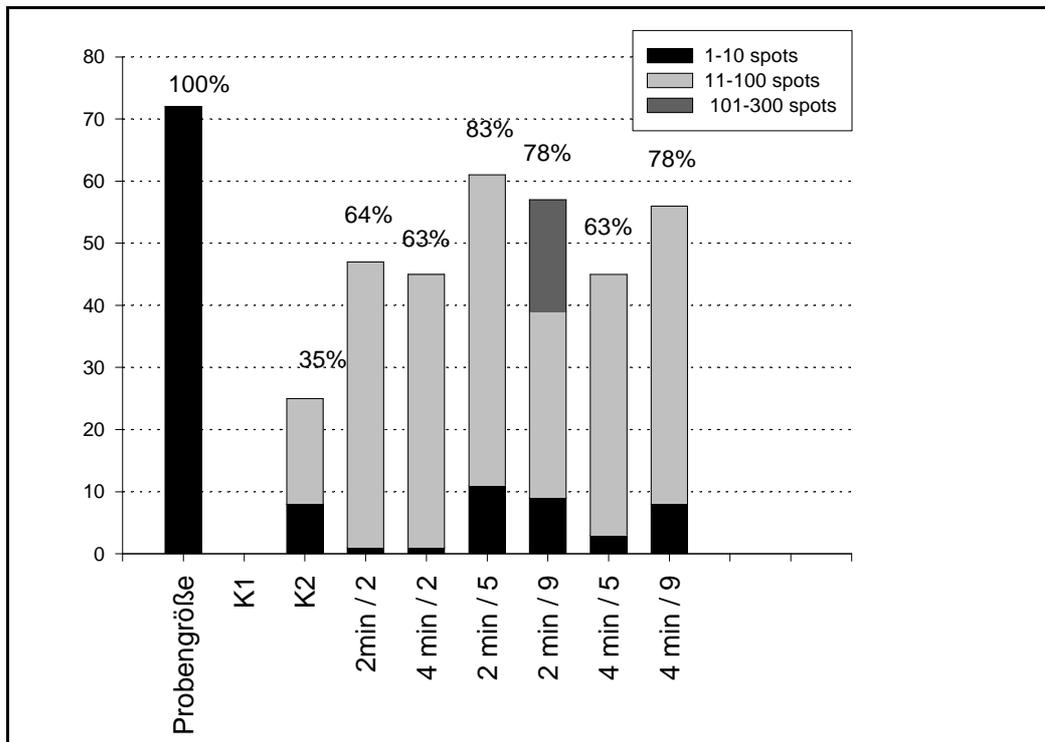
Die Experimente 1-3 repräsentieren die Daten dreier unabhängiger Experimente mit gleichem Versuchsaufbau.

K1: Negativkontrolle, K2: nicht SAAT.

Die Kinetik zeigt eine transiente *gus*-Expression, die bis auf 2min/Stufe 2, deutlich unterhalb der nichtbeschallten Probe K2 liegt. Die erhaltenen Daten sind sehr inhomogen, zeigen jedoch tendenziell eine Abnahme der transienten Expression mit steigender Ultraschallarbeit am Explantat. Abb. 15 zeigt die stabile Expression des *gus*-Gens in vier Wochen alten Explantaten. Die Präparation und Kultur erfolgte nach dem in „Material und Methoden“ beschriebenen Protokoll.

\* Die Abbildungen 14 und 15 beruhen auf Daten welche in einer Diplomarbeit im Rahmen dieser Arbeit gesammelt und ausgewertet wurden ( Spötter, 1999).

**Abb. 15 Stabile *gus* Expression an Explantaten nach vierwöchiger Gewebekultur.**



Hier ist der prozentuale Anteil stabil *gus*-exprimierender Explantate dargestellt. Für die Bonitierung wurden die *gus*-exprimierenden Explantate in drei Klassen eingeteilt: 1-10 —, 11-100 — und 101-300 *gus* - Expressionsspots  
 K1: Negativkontrolle, K2: nicht SAAT behandelt.

Die Explantate (Abb: 15) wurden vier Wochen unter nichtselektiven Bedingungen kultiviert. Dies ist der Zeitraum nach dem die Explantate standardmäßig auf Selektionsmedium ( 3mg/l PPT) überführt werden. Der der transienten Expression zugrunde liegende Effekt hat sich in den stabilen Expressionsergebnissen in Bezug auf die exprimierenden Zellen bzw. Bereiche teilweise umgekehrt. In jedem Fall liegen die Werte für die stabile Expression der beschallten Proben deutlich über denen der Kontrolle.

### 3.4.1 Anwendung der SAAT Methode zur Transformation von reifen Embryonen

Ziel war es nun, die unter 3.4 beschriebenen Auswirkungen der Beschallung auf die Erhöhung der Transformationseffizienz der Embryonen direkt in das Regenerationsprotokoll zu integrieren. Das unter 3.4.1.1 beschriebene Experiment war ein Vorversuch für die nachfolgenden Routinetransformationen mit dem *vst 1*-Gen. Das Experiment wurde mit dem 35 kHz Ultraschallbad der Firma *Bandelin* durchgeführt.

---

#### 3.4.1.1 Beschallung mit 40kHz

Es wurden 150 Explantate für 2 min auf Stufe 5 (  $\approx 15$  Ws ) beschallt. Aus diesen Explantaten wurden innerhalb von vier Monaten acht 3 PPT resistente Sproßklone generiert. Die daraus gewonnen Sprossen werden in dieser Arbeit näher charakterisiert.

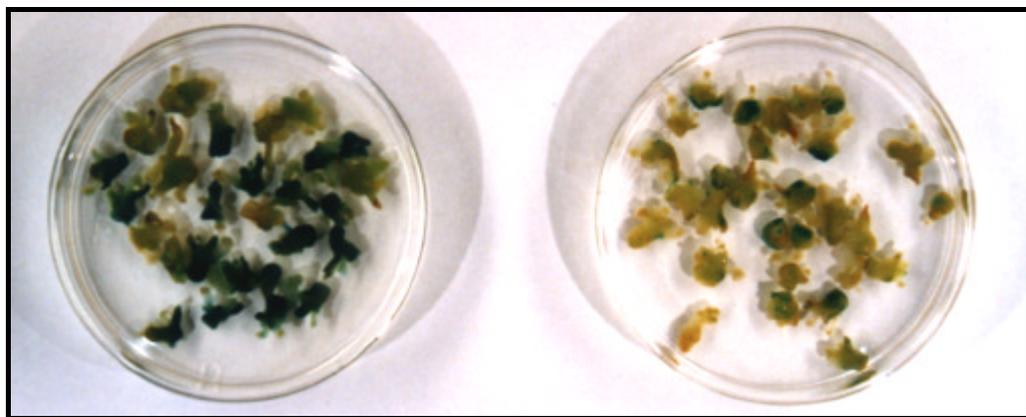
Bei einer höheren Beschallungsintensität ( 4 min. Stufe 9  $\approx 44$  Ws) konnte über einen Zeitraum von 6 Monaten aus 75 Explantaten ein 5 mg/l PPT resistenter Sproßklon regeneriert werden. Dieser Klon exprimierte in weiten Teilen des Gewebes *gus*, war allerdings stark vitrifiziert. Über weitere drei Subkulturen auf MS-Medium mit 0,5 mg/l Kinetin gelang es schließlich, über klonale Propagation nicht vitrifizierte Sprosse zu regenerieren. Diese exprimierten das *gus*-Gen in der Wurzelspitze und in den Blättern.

Es gelang aber nicht, die daraus abgeleiteten Sprosse in Erde weiter zu kultivieren.

#### 3.4.1.2 Beschallung mit 35 kHz

Der unter 3.4 beschriebene Effekt der Ultraschallbehandlung auf die Expression des *gus*-Gens ließ sich mit dem 35 kHz Gerät reproduzieren. Die Explantate wurden nach der Beschallung mit EHA 101 (Hood et al., 1986) -*pIB gus* vier Tage co-kultiviert. Mit diesem Gerät konnte die Ultraschallarbeit nur über die Expositionszeit variiert werden. Es war eine Abnahme der transienten *gus*-Expression in der Reihenfolge 30, 60, 120 Sekunden zu beobachten. Lediglich die 30 sekundige Expositionszeit zeigte einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, welcher sich bei dieser Analyse in der *gus*-Expression der gesamten Oberfläche ausdrückte.

**Abb. 16 Stabile *gus*Expression an Explantaten mit und ohne SAAT-Behandlung**



**Links:** 30 Sekunden mit 35 kHz beschallt

**Rechts:** Unbeschallt

Es sollte nun der Effekt der SAAT Behandlung auf die Selektion mit 3 mg/l PPT 4 Wochen nach der Co-Kultur überprüft werden. Die Durchführung entspricht

## Ergebnisse

---

der Explantatbehandlung, wie sie unter 2.6 für den *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer beschrieben ist. Die Beschallung wurde für 2 min vorgenommen; angegeben sind die Zahlen der sproßprolierenden Explantate der 4.- und 5. Subkultur, also vor und nach dem ersten Selektionsschritt. Für die nicht beschallten ebenfalls *Agrobacterium* inokulierten Kontrollen wurden die Lateral- (Lat.) und die Axillarmeristeme (Axill) verwendet.

**Tab. 5: SAAT behandelte Explantate auf Selektionsmedium: Vergleich zu nicht nichtbeschallten Explantaten**

	4. Sub, 3 mg/l PPT	Überlebende Explantate	Prozentsatz überlebender Explantate
K1 Lat.	116	5	4,31
K1 Axill.	204	11	5,39
K2 Lat.	256	22	8,59
K2 Axill.	343	26	7,58
SAAT 1.1	410	86	20,98
SAAT 1.2	343	84	24,49
SAAT 2.1	464	103	22,20
SAAT 2.2	331	60	18,13
SAAT 3.1	702	260	37,04
SAAT 3.2	459	135	29,41
SAAT 3.3	196	81	41,33
Über alle SAAT Gruppen:	2905	809	27,85

K1 und K2 sind zwei unabhängige Kontrollen, von einer Person präpariert.

SAAT 1-3 sind drei unabhängige Experimente; von zwei bzw. drei Personen präpariert.

Der Prozentsatz der auf PPT-Medium überlebende Explantate ist analog den *gus*-Expressionsdaten aus Abb. 15 als ein Maß für die stabile Expression des Transgens zu sehen.

### **3.5 Regeneration und Selektion von mutmaßlich transgenen Sprosse**

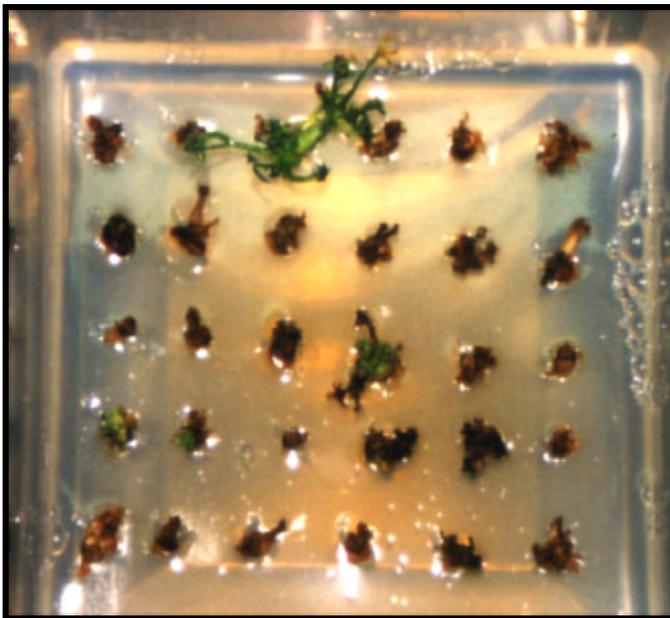
Für die Regeneration von *Cicer arietinum* über Meristemkulturen sind Literaturdaten vorhanden z.B. (Islam et al., 1995) ebenso ist eine Fülle von Literaturdaten über somatische Embryogenese z.B. (Sagare et al., 1995, Dineshkumar et al., 1995) verfügbar, so daß die Regeneration heute offenbar kein besonderes Problem mehr darstellt. Für die Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* konnte aber auf kein Protokoll zurückgegriffen werden, welches als Beweis für die Funktionstüchtigkeit eine Nachkommenschaftsanalyse zeigte. Über transgene Primäregenerate wurde aber bereits von Fontana et al. (1993) und Kar et al. (1996) berichtet.

---

### 3.5.1 Gewebekulturstadien der, über *A. tumefaciens* (SAAT) transformierten, transgenen Kichererbsen.

Die mittels der SAAT Methode erhaltenen primären Regenerate wiesen nach vier Wochen ohne Selektion in der ersten Subkultur unter selektiven Bedingungen, (3 mg/l PPT), immer eine sektorielle *gus* - Expression auf. Die erste Transformationsexperimente wurden vier Wochen im selben Medium auf 0,5 mg/l Kinetin und 3 mg/l PPT selektiert. Ein Durchwachsen der Agrobakterien konnte dabei nicht beobachtet werden. In Abb. 17 ist die Effizienz der PPT Selektion anhand der Verbräunung der Explantate gut zu erkennen.

#### **Abb. 17 Selektion über vier Wochen auf 3 mg/l PPT**

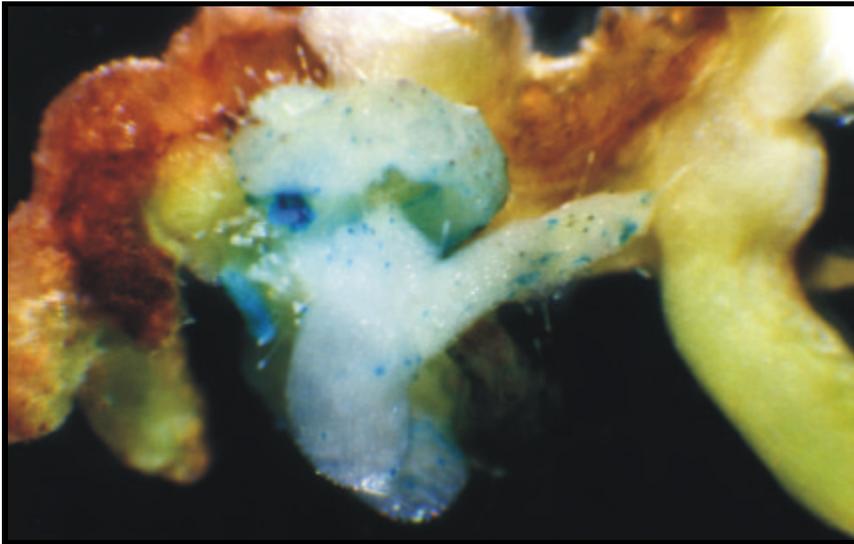


Aufsicht auf Explantate die sich erstmalig für vier Wochen auf 3 mg/l PPT Medium mit 0,5 mg/l Kinetin befanden. Die nicht transgenen Explantate sind zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig verbräunt. Transgenes Material proliferiert unter diesen Bedingungen.

In den folgenden Transformationsexperimenten wurde die erste Selektionsphase auf 2 Wochen verkürzt, um den PPT-resistenten Explantaten bessere Ausgangsbedingungen zu schaffen. Die absterbenden Explantate beeinflussen das Medium durch die Abgabe phenolischer Substanzen negativ.

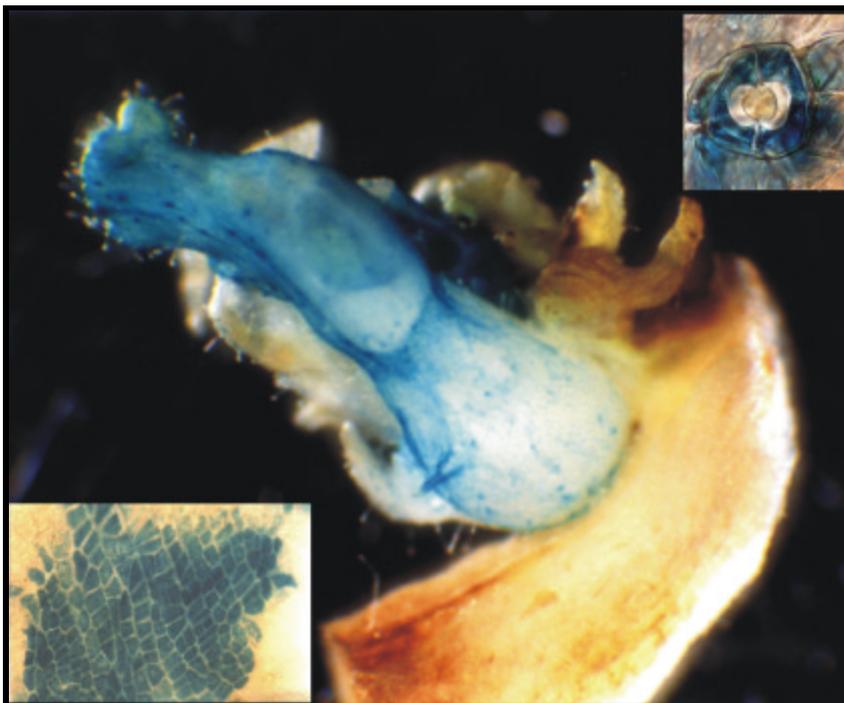
In Abb. 18 ist ein chlorophyllfreies, nicht voll ausdifferenziertes Organ zu sehen. Aufgrund des Vorhandenseins der Drüsenhaare, welche bei *Cicer arietinum* überwiegend an der Blattoberseite oder aber an jungen Keimlingen zu beobachten sind, handelt es sich hier vermutlich um einen Sproß. Ein solches Explantat sollte also nicht verworfen werden, vor allem dann nicht, wenn es unter selektiven Bedingungen entstanden ist.

### Abb. 18 *gus* Expression an sproßproliferierendem Explantat



*gus*-Expression an einem nicht ausdifferenzierten Organ eines unter 3 mg/l PPT verbräunten Primärexplantates. Das chlorophylllose Organ zeigt Drüsenhaare an der Oberfläche.

### Abb. 19 *gus*-Expression an Sproßmeristem



Der abgebildete Sproß stammt aus einem unter 3mg/l PPT stark verbräuntem Bereich eines primären Sprosses des Mutterexplantates. **Oben rechts:** Vergrößerung *gus*-exprimierender Schließzellen des abgebildeten Explantates. **Unten links:** Sektorielle *gus*-Expression in den Epidermiszellen des abgebildeten Explantates.

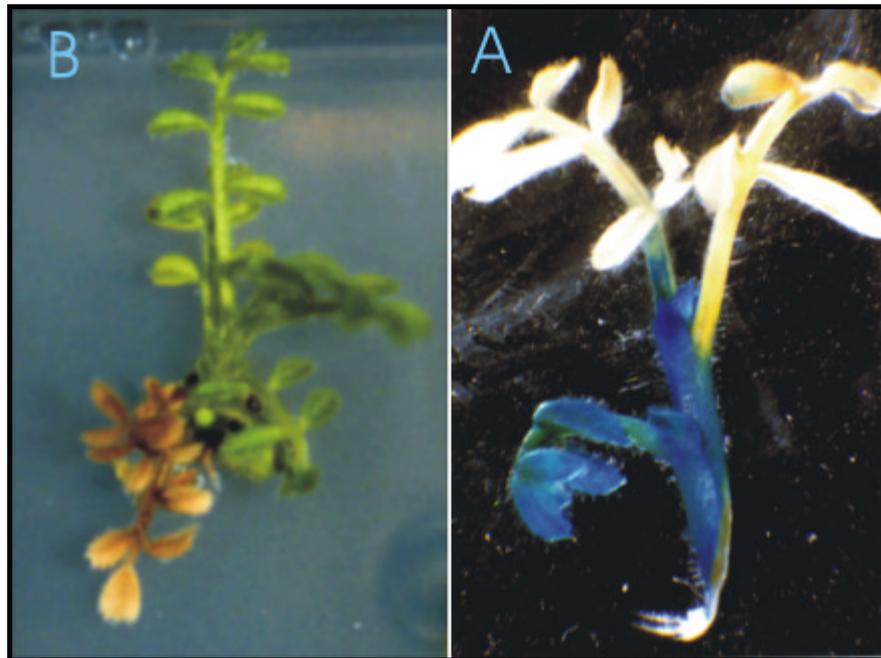
In Abb.19 sind an einem Sproß *gus*- positive Schließzellen zu erkennen. Es ist auffällig, daß diese transformierten Zellen in einem Gewebeverbund von nicht *gus* exprimierenden Zellen liegen. Das Vorhandensein von Schließzellen ist als Hinweis für eine intakte Struktur der Epidermis anzusehen. Es sind aber

---

auch Bereiche zu finden, in denen ein größerer zusammenhängender Bereich von Epidermiszellen eine sektorielle *gus*-Expression aufweist.

Nach sechs Wochen auf 3 mg/l PPT war die Entwicklung der *gus* exprimierenden Sproßteile weiter fortgeschritten. Es sind deutlich Blattanlagen zu erkennen, die Epidermis ist mit Drüsenhaaren besetzt und mit Schließzellen durchsetzt. Das *gus*-Expressionsmuster hat sich ausgeweitet, es ist aber auch hier wieder zu beobachten, daß die Schließzellen präferenziell *gus* - Expression zeigen.

**Abb. 20 Chimäre Sproßregenerate**



**A:** Unter der Wirkung von 10 mg/l PPT ist der obere Teil des Sprosses ausgebleicht, der untere bis dahin noch grüne Teil zeigte *gus*-Expression.

**B:** Aus dem selben Explantat entstehen 10 mg/l PPT resistente Sprosse und solche die dem Selektionsdruck nicht standhalten.

Es handelte sich hierbei offensichtlich um einen chimären Sproß. Bei allen weiteren Kulturen war zu beobachten, daß die Regeneration von Sprossen unter selektiven Bedingungen immer von der Basis eines bis dahin resistenten Sproßklons ausging.

### **Abb. 21 Sproßregeneration von der Basis eines nicht ausreichend PPT resistenten Sprosses**



Regeneration eines 10 mg/l PPT resistenten Sprosses (grün) aus der Basis eines bis dahin 3mg/l PPT resistenten Sproßklons.

### **3.6 Wurzelinduktion / Pfropfung**

Durch die Überführung der Sprosse in ein auxinhaltiges Medium wurden im basalen Teil des Sprosses Adventivwurzeln induziert. Während bei *desi* Kichererbsen die Wurzelinduktion an direkt von den sprossproliferierenden Explantaten stammenden Sprossen spontan geschieht, ist diese bei *kabuli* Typen nach einer TDZ induzierten Sproßregeneration, zumindest bei ILC 482, nur durch die Supplementierung des Mediums mit IBA hervorzurufen.

### **Abb. 22 Unter selektiven Bedingungen bewurzelter Sproß**



Auf 0,5mg/l IBA und 5 mg/l PPT bewurzelter Sproß.

Durch die Erhöhung der IBA Konzentration von 0,5 mg/l (Kar et al., 1996) auf 2 mg/l (9,8  $\mu$ M) konnte die Qualität der Adventivwurzeln verbessert werden. Dies zeigte sich in einer kräftigeren Wurzel und dem Auftreten mehrerer

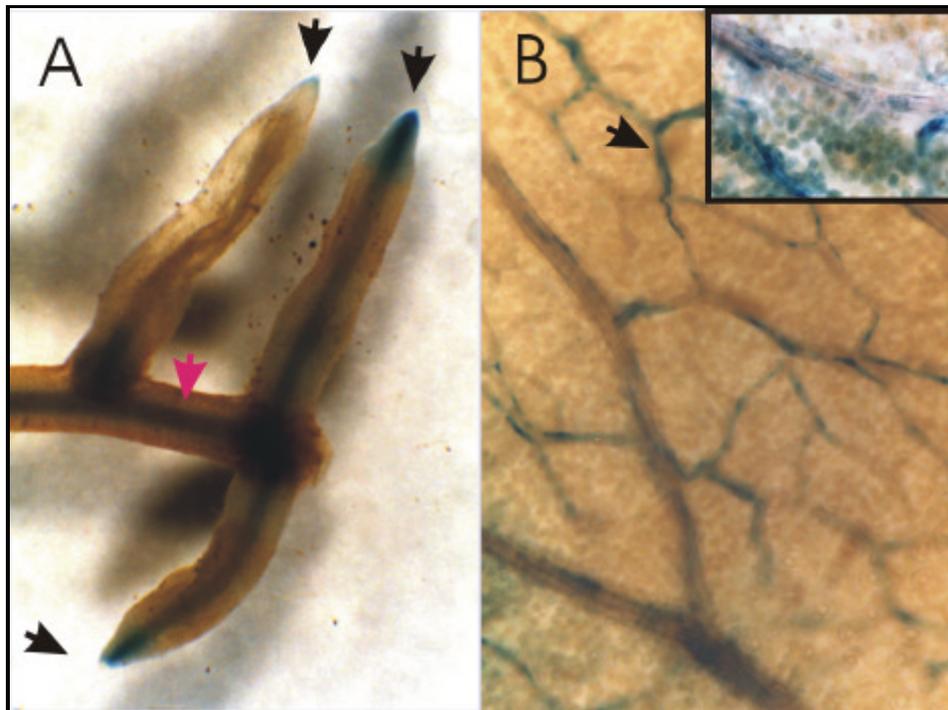
Adventivwurzeln direkt am Sproß. Im weiteren Verlauf wurde der Selektionsdruck der Sprosse auf 15 mg/l PPT im Bewurzelungsmedium gesteigert, um das Resistenzniveau der Sprosse besser einschätzen zu können. Auch unter diesen Bedingungen konnte eine Wurzelbildung induziert werden. Von 15 dieser unter 15 mg/l PPT bewurzelten Sprosse bildeten aber nur zwei Samen. Die übrigen Pflanzen sind vermutlich auf grund des zu schwachen Wurzelsystems vertrocknet.

### 3.6.1 *gus*-Expression an bewurzelten Sprossen

Die Bewurzelung der in der Arbeit weiter charakterisierten Pflanzen erfolgte auf Medium mit 5 mg/l PPT mit 2,46 µM/l IBA. Zwei von 20 Sprossen bildeten unter diesen Bedingungen Wurzelstöcke.

Von diesen Explantaten wurden jeweils die Wurzelspitze und ein Blatt für einen *gus*-Assay eingesetzt. Beide Pflanzen waren in Blatt und Wurzel *gus* - positiv. Die Pflanzen 1.1 und 2.2 vertrockneten noch vor der Samenreife. Die Sproßspitze der Pflanze 2.2, konnte aber auf eine nicht transgene Unterlage gepfropft werden und wurde in dieser Arbeit als Pflanze 8 weiter analysiert.

#### **Abb. 23 *gus* Expression an Blatt und Wurzel einer bewurzelten Pflanze**



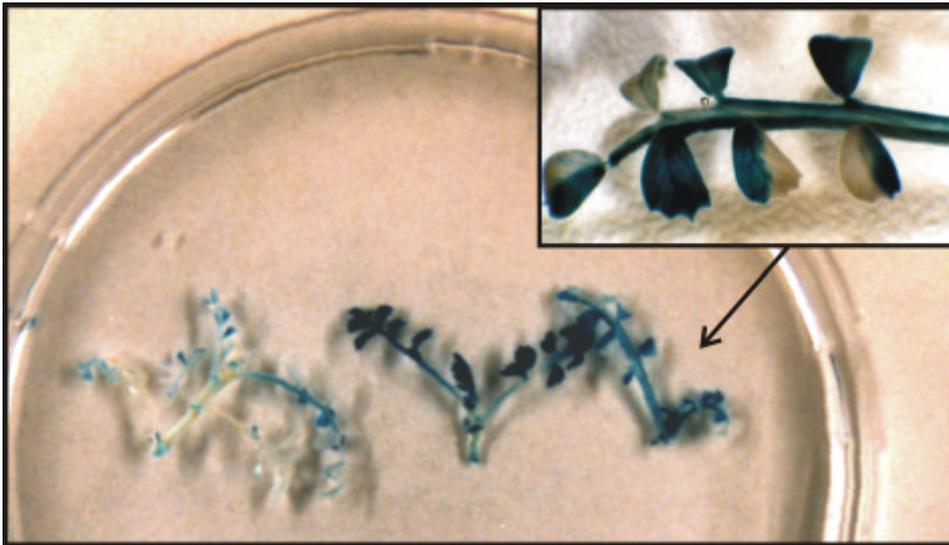
A: *gus*-exprimierende Wurzel, die Expression ist überwiegend in Zellen des Vaskularsystems und in der Wurzelspitze anzutreffen. B: *gus*-Expression in einem Blatt, auch hier ist die Expression in den Zellen des Vaskularsystems am intensivsten. Die Vergrößerung zeigt aber, daß auch Mesophyllzellen *gus* exprimieren.

## Ergebnisse

Im Blatt ist die *gus*-Expression vor allem im Vaskularsystem anzutreffen. Bei stärkerer Vergrößerung zeigen jedoch auch die Parenchymzellen des von der Epidermis befreiten Blattes *gus*-Expression.

Die von den sproßproliferierenden Explantaten abgeernteten voll entwickelten Blätter wiesen ein chimäres *gus*-Expressionsmuster auf.

### **Abb. 24 Sektorielle *gus*-Expression an ausdifferenzierten Blättern der Sproßklone**



Dargestellt sind Sprosse aus der Gewebekulturphase. Die *gus*-Expression ist in den verschiedenen Explantaten unterschiedlich intensiv. Der vergrößerte Ausschnitt deutet auf einen chimären Charakter des Explantates hin.

### **3.7 T<sub>0</sub> Pflanzen ( *p1Bgus* ) in der Gewächshausphase**

Nach einer kurzen Abhärtungsphase zeigten die Pflanzen eine normale Entwicklung im Gewächshaus bis hin zur Blütenanlage. In diesem Stadium blieben die Pflanzen dann aber für drei Monate arretiert. Der Aufbau der Blattmasse war jedoch nicht davon betroffen. Alle sieben selektierten und regenerierten Pflanzen wiesen in zwei unterschiedlichen Gewächshäusern eine etwa synchrone Entwicklung auf, der Aussaatzeitpunkt viel dabei nicht ins Gewicht.

#### **Tab. 6 Zeitliche Entwicklung der mutmaßlich transgenen Regenerate**

	Gewächshaus 1				Gewächshaus 2			
Pflanze	1.1	2.1	2.2*	3	8*	11	13	14
gepopt	Nov 98	Nov 98			Januar 99	Dez 98		
Blüte	Febr 99	Febr 99			März 99	Febr 99		
Samenreife	^ 03/99	März 99 bis auf 2.2			Mai 99	März 99		

\* Die Pflanze 2.2 mußte daher vor der Samenreife auf eine nicht transgene Unterlage gepfropft werden und wird hier nocheinmal als Pflanze 8 repräsentiert, siehe 3.6.1

Die Pflanzen 1.1, 2.1 und 8 (2.2), sowie Pflanze 3 repräsentieren drei unabhängige Klone. Die Pflanzen 11, 13 und 14 sind einem der ursprünglichen acht sproßproliferierenden Klone zuzuordnen.

### 3.7.1 *gus*-Expression

Alle T<sub>0</sub> Pflanzen wiesen eine nicht homogene *gus* Expression auf. Oft ist die *gus*-Expression auch nur bei einer Vergrößerung ( 20 fach) zu erkennen, da einzelne blaue Zellen mit dem bloßen Auge nicht auszumachen waren. Einheitlich ist jedoch, daß auch hier immer das Vaskularsystem, bzw. die Geleitzellen *gus* exprimieren.

Die *gus* Expression in der unter 5 mg/l PPT Selektionsdruck induzierten Wurzel an Pflanze 1.1 blieb über die gesamte Vegetationszeit bestehen. Das gesamte Wuzelsystem, also auch die später entstandenen Seitenwurzeln exprimierten *gus*.

**Tab. 7 *gus* Expression an Blättern verschiedener T<sub>0</sub> Pflanzen**

Pflanze	1.1	2.1	2.2*	3	8*	11	13	14
<i>gus</i> Expression an Blättern	+	+	+	+	+	-	+	+

In Abb. 25 sind die unterschiedlichen Expressionsmuster an den Blättern zu erkennen. Es gibt zwei Typen von Mustern: Bei dem ersten Typ ist die *gus*-Expression scharf gegen den nicht exprimierenden Bereich abgegrenzt, wie z.B. bei Pflanze 14. Innerhalb dieses Bereichs ist die Expression dann homogen. Der überwiegende Teil der Pflanzen zeigt jedoch eine diffuse Blaufärbung, die durch eine Verteilung der *gus*-positiven Zellen im Gewebeverbund hervorgerufen wird. Die Expression ist nicht auf einen bestimmten Zelltyp wie den der Stomata beschränkt.

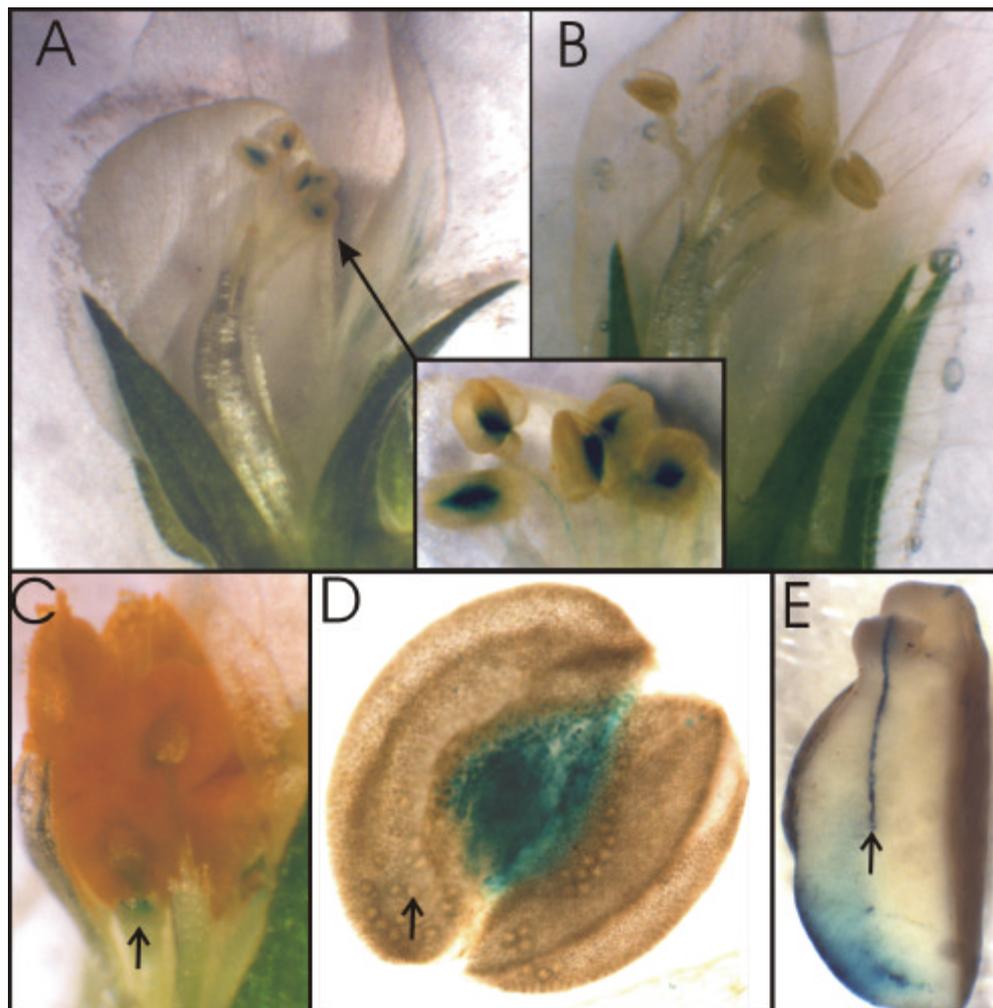
**Abb. 25 Expressionsmuster in Blättern verschiedener T<sub>0</sub> Pflanzen**



*gus*-Expression an verschiedenen Blättern der jeweiligen Pflanzen.

Als weiteres Organ wurde die Blüte der T<sub>0</sub> Pflanzen auf *gus* Expression untersucht. Wie auf Abb. 26 zu sehen, ist die *gus* Expression im Kelch und in den Antheren anzutreffen. Die Blütenblätter wiesen nur sehr selten und dann nur in den Geleitzellen *gus* Expression auf. In den Antheren exprimierten ebenfalls nur die Geleitzellen der Siebröhren. Die Expression ist in den Konnektiva am intensivsten. Nachdem die Pollen frei präpariert wurden, zeigt sich, daß es sich bei den exprimierenden Zellen nicht um den Pollen selbst handelt.

**Abb. 26 *gus* Expression in Blüte (Antheren) und Samen**



**A:** *gus*-Expression in den Antheren einer T<sub>0</sub> Pflanze (Pflanze 14). **B:** Kontrollpflanze, ohne *gus*-Expression. **C:** Der Pollen exprimiert nicht, der Pfeil zeigt auf *gus*-exprimierendes Gewebe. **D:** Die Theken und der darin enthaltene Pollen (Pfeil) zeigen keine *gus*-Expression, blau ist lediglich das Konnektivum. **E:** *gus*-Expression in dem Kotyledo eines transgenen T<sub>1</sub> Samens.

Wie aus Tab. 8 ersichtlich ist, zeigen alle der potentiell transgenen Pflanzen (bis auf Pflanze 11) *gus* Expression in der Blüte. Um ein Maß für eine eventuelle Korrelation der *gus* Expression in den Blüten und der Entstehung transgener T<sub>1</sub>-Pflanzen zu finden, wurde bei der Auswertung der prozentuale Anteil der *gus* positiven Antheren an der Gesamtzahl ermittelt. Die Blüte und

## Ergebnisse

---

auch der unreife Samen wurden als zu wertvoll für eine weitere Untersuchung angesehen, da mit einer solchen Analyse ein Teil der möglichen transgenen Nachkommenschaft hätte geopfert werden müssen. An den Kelchblättern befinden sich aber nach der Samenbildung noch die vertrockneten, mehr oder weniger vollständigen Reste der Blüte. Wie sich zeigte, ist die Glucuronidase ein derart stabiles Enzym, daß es durch eine Trocknung nicht zerstört wird, sondern sich unter den Bedingungen des *gus*-Assays rekonstituiert.

Es wurden nun die trockenen Blütenreste an den Hülsen für weitere Analysen genutzt. Die Negativkontrolle (Blüten einer nicht transformierten Pflanze) sind eindeutig negativ. Da aber die Blüten nicht immer vollständig erhalten geblieben sind, wurde ein Grenzwert für die Auswertung gesetzt. Es ist nur jener Anteil der Pflanzen dargestellt, der noch 7 Antheren besitzt.

**Tab. 8 *gus* - Expression in den Blüten bzw. Konnektiva der T<sub>0</sub> Pflanzen**

Pflanze	n=	1.1	8*	11	13	14	Kontr.
Prozentualer Anteil exprimierende Antheren pro Pflanze	<i>gus</i>	7	29	4	44	36	12
		88 %	85 %	0	66 %	50 %	0

Die Pflanzen 2.1 und 3 hatten zu diesem Zeitpunkt noch keine abgereiften Blüten.

### 3.7.2 Leaf Paint - Assays

Die Leaf Paints an den T<sub>0</sub> Pflanzen wurden mit 200 mg/l und 300 mg/l PPT (BASTA<sup>®</sup>) in wässriger Lösung durchgeführt.

**Tab. 9 Leaf-Paint-Assay Ergebnisse**

Pflanze	1.1	2.1	2.2*	3	11	8*	13	14
<i>gus</i> Expr.	+	+	+	+	-	+	+	+
LP 1 200mg/l	+	+	+	+	-	+	+	-
LP 2 200mg/l	+	+	+	+	-	+	+	-
LP 3 300mg/l	+	+	+	+	-	+	+	-

Es ist hier eine weitgehende Korrelation mit den Ergebnissen des GUS-Assays zu sehen. Die Ergebnisse der in dreifacher Wiederholung durchgeführten „Leaf Paints“ sind für Pflanze 11 und auch für Pflanze 14 immer negativ ausgefallen.

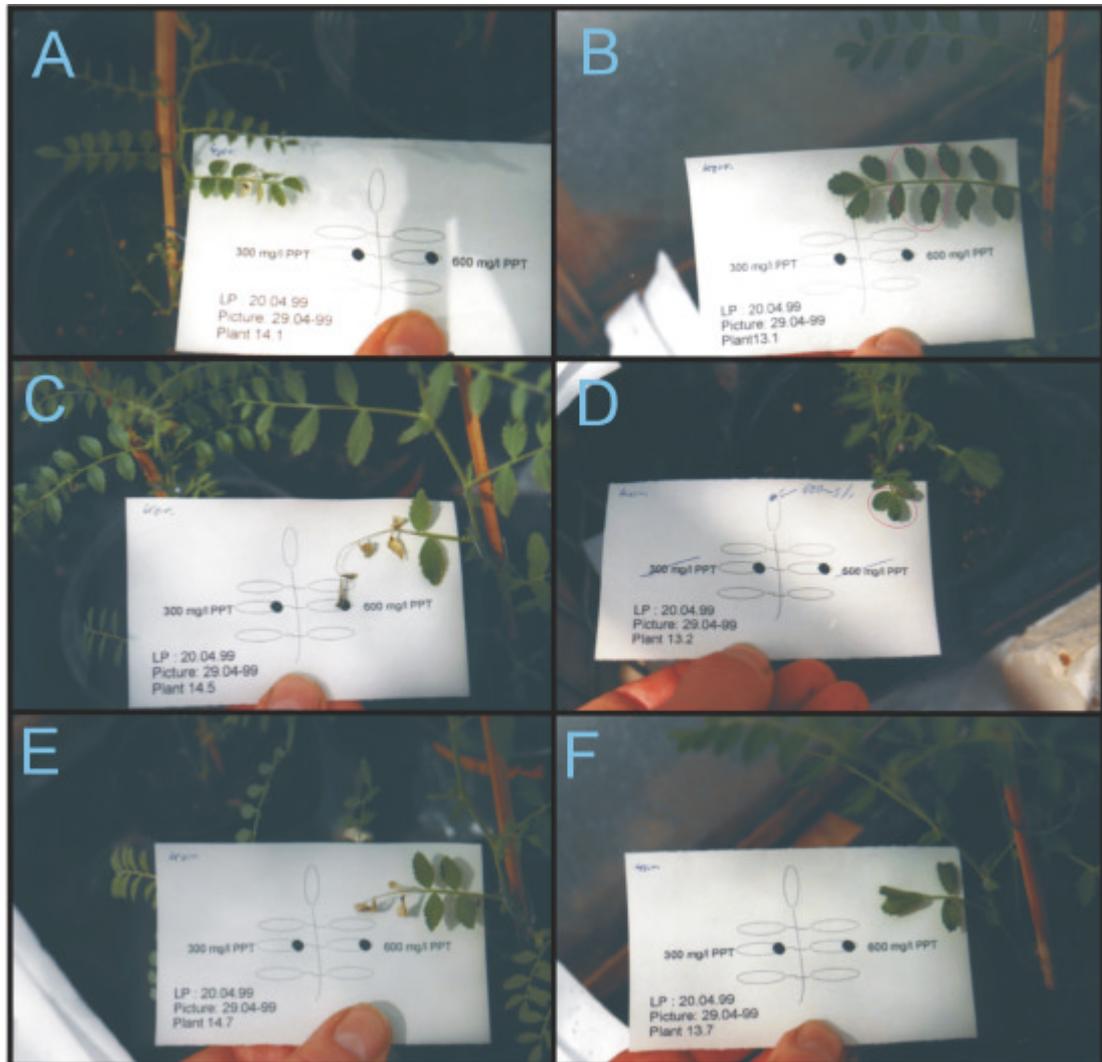
Für die T<sub>1</sub> zeigte sich, daß mit dem Leaf Paint die Gefahr falsch positiver Ergebnisse auszuschließen ist, sofern die Konzentration nicht unter 200 mg/l PPT liegt. Der Anteil der transgenen Nachkommenschaft bleibt auch unter

---

\*Siehe 3.6.1.

einer Belastung von 600 mg/l BASTA® grün, wie in der folgenden Abb. 27 zu ersehen ist.

**Abb. 27 Leaf-Paint- Assay an transgenen T<sub>1</sub> Pflanzen der T<sub>0</sub> Pflanzen 13 und 14**



An allen hier dargestellten Leaf Paint - Assays wurden links und rechts der Blattspreite zwei unterschiedliche Phosphinothricinonzentrationen ( 300 mg/l und 600 mg/l) auf die Blätter appliziert. **A,C,E:** T<sub>1</sub> Nachkommenschaft der Pflanze 14. **B,D,F:** T<sub>1</sub> Nachkommenschaft der Pflanze 13.

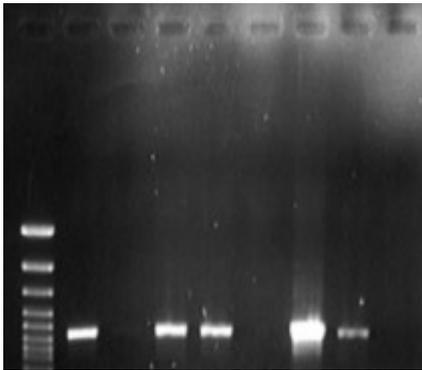
### 3.7.3 *gus*-PCR

Es wurde hier die Verlässlichkeit einer PCR an T<sub>0</sub> -Pflanzen anhand der späteren Analyse der Nachkommenschaft untersucht. Dazu war zu prüfen inwieweit persistierende Agrobakterien die PCR-Ergebnisse falsch positiv beeinflussen könnten.

## Ergebnisse

**Abb. 28 *gus* PCR T<sub>0</sub>, Gel A:**

1 2 3 4 5 6 7 8 9

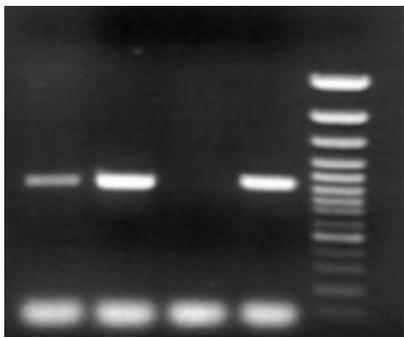


Spur 1 ----- 100 bp MW-Marker  
 Spur 2 ----- Pflanze 1.1,  
 Spur 3 ----- Pflanze 14  
 Spur 4 ----- Pflanze 2.2\*  
 Spur 5 ----- Pflanze 2.1  
 Spur 6 ----- Kontrollpflanze  
 Spur 7 ----- *A.tumefaciens*  
 Spur 8 ----- EHA 105 pIB-*gus*  
 Spur 9 ----- Positiv Kontr. *Pisum*  
 Spur 9 ----- Wasserprobe

952 bp

**Abb. 29 *gus* PCR T<sub>0</sub>, Gel B**

1 2 3 4 5



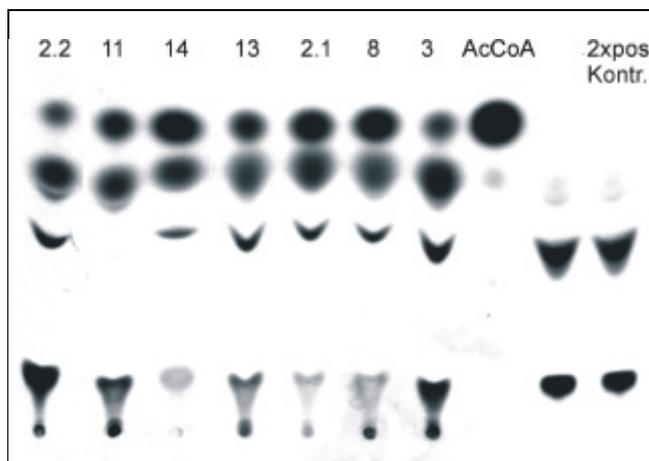
952 bp

Spur 1 ----- Pflanze 3  
 Spur 2 ----- Pflanze 13  
 Spur 3 ----- Pflanze 11  
 Spur 4 ----- Pflanze 8\*  
 Spur 5 ----- 100 bp MW-Marker

### 3.7.4 Phosphinothricin Acetyl Transferase - Assay

Die Expression des Markergens allein über einen Leaf Paint-Assay zu bestätigen, erschien nicht aussagekräftig genug. Daher wurde die Expression des *pat*-Gens weiter über einen Enzymassay (PAT-Assay) mit dem Rohextrakt aus Blattextplantaten der T<sub>0</sub>-Pflanzen untersucht.

**Abb. 30 PAT-Assay an T<sub>0</sub>-Pflanzen**



Ac-PPT

\* Siehe 3.6.1

---

Die im Leaf Paint-Assay erhaltenen Daten konnten mit dem PAT-Assay bestätigt werden, bis auf Pflanze 14. Es zeigte sich, daß mit dem Leaf Paint die Gefahr falsch positiver Ergebnisse zu vernachlässigen ist, sofern die Konzentration über 200 mg/l PPT liegt.

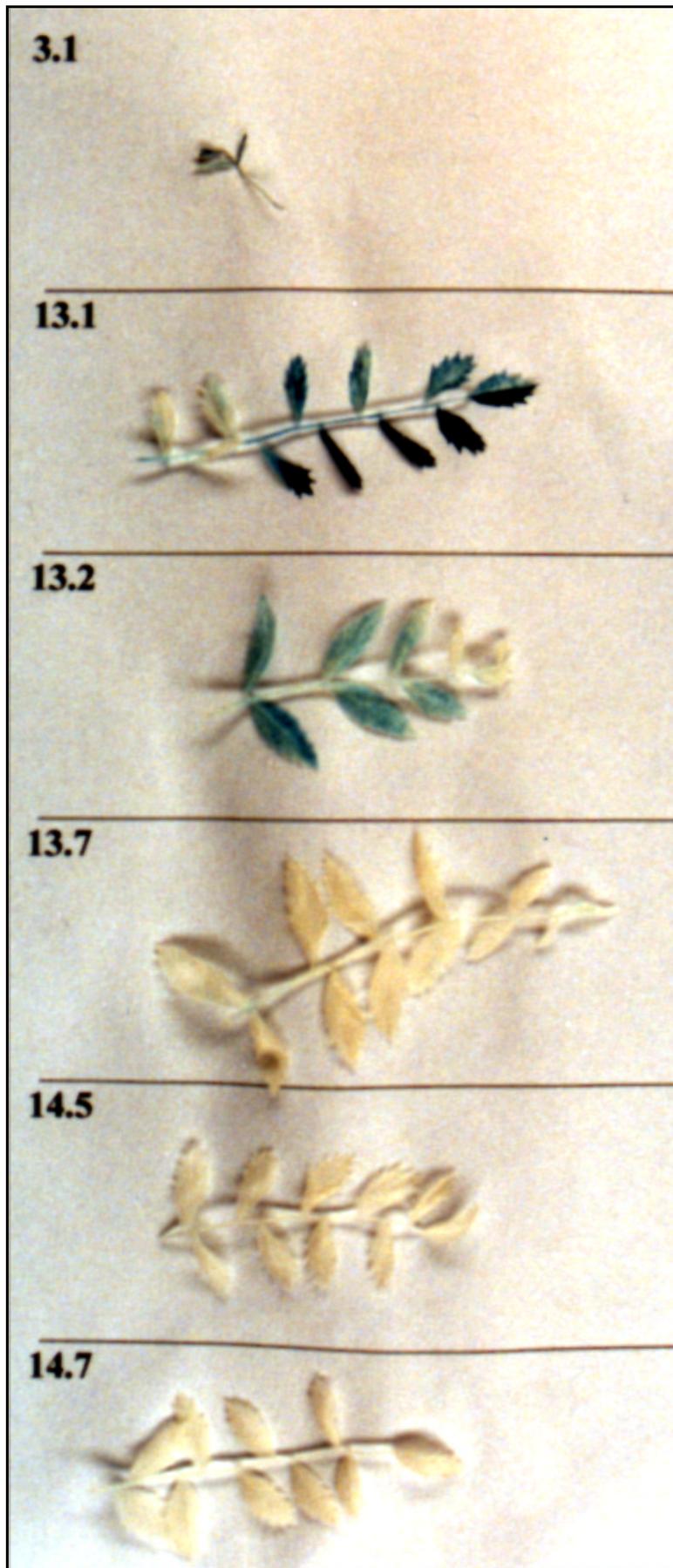
### **3.8 T<sub>1</sub> Pflanzen (pIBgus)**

Die unter 3.7 präsentierten Daten geben lediglich Auskunft darüber, ob ein Agrobakterien-vermittelter Gentransfer in das Pflanzengenom stattgefunden hat. Die Analyse der Nachkommenschaft gibt jedoch einen Aufschluß darüber, ob bei den Primärregeneraten auch die Keimbahn transformiert wurde, da nur dann die in das Pflanzengenom integrierten Fremdgene in die Nachkommenschaft weitergegeben werden können.

#### **3.8.1 *gus*-Expression**

Die *gus*-Expression in den Blättern der T<sub>1</sub> Pflanzen weist ein Expressionsmuster auf, wie dies auch schon für die T<sub>0</sub> Pflanzen (Abb. 25) beschrieben wurde. Es zeigten sich einzelne blaue Zellen sowie über diffus im Blatt verteilte blauen Zellen, bis hin zu stark exprimierenden Blättern. Es konnte jedoch keine scharf abgegrenzte sektorielle Expression beobachtet werden.

**Abb. 31 *gus* Expression in den Blättern von T<sub>1</sub> Pflanzen**



Pflanze 3.1 ist *gus* positiv. Die hier gezeigte T<sub>1</sub> der Pflanze 13 zeigt ebenfalls in allen drei Blättern 13.1, 13.2 und 13.7 *gus*-Expression; in 13.7 ist dies aber auf dem Bild nicht zu erkennen. Pflanzen 14.5 und 14.7 zeigen keine *gus* Expression

Während die Pflanzen 2.1, 3, 8 und 13 das *gus*-Gen in die Nachkommenschaft weitergegeben haben, sind alle Nachkommen der Pflanze 14 im *gus* - Assay negativ.

**Tab. 10 *gus* Genexpression in den T<sub>1</sub> Nachkommen**

<b>Mutterpflanze (T<sub>0</sub>) Stichprobenumfang</b>	<b>2.1</b> n = 1	<b>3</b> n = 1	<b>8</b> n = 56	<b>14</b> n = 22	<b>13</b> n = 32
<b><i>gus</i>-Expression auf die Nachkommenschaft bezogen</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>

Von den Pflanzen 3.1, 13 und 14 wurden die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten T<sub>1</sub> Pflanzen stellvertretend für alle analysiert.

**Tab. 11 In der PCR 3.8.3 und im PAT-Assay 3.8.4 getestete Pflanzen**

<b>Pflanze</b>	<b>3.1</b>	<b>13.7</b>	<b>13.1</b>	<b>13.2.</b>	<b>14.5.</b>	<b>14.7</b>	<b>14.1</b>
<b><i>gus</i> Expression:</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

### **3.8.2 Leaf Paint**

Die Leaf Paint's wurden mit 300 mg/l und mit 600 mg/l Phosphinothricin (BASTA<sup>®</sup>) durchgeführt. Die transgene T<sub>1</sub> ist gegenüber beiden Konzentrationen unempfindlich. Bis auf Pflanze 3.1 gibt es keine Intermediate, welche 300 mg/l PPT tolerieren und gegenüber 600 mg/l sensitiv sind. Die Pflanze 3.1 ist, wie sich später herausstellte in ihrer Konstitution stark geschwächt gewesen und ist später eingegangen, vermutlich durch Wurzelfraß von Trauermückenlarven.

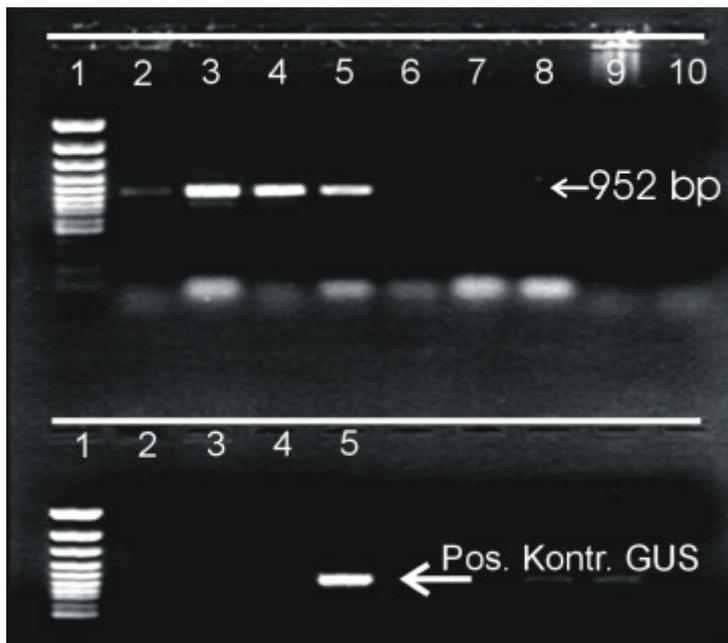
**Tab. 12 *pat* Genexpression in den T<sub>1</sub> Nachkommen**

<b>Mutterpflanze (T<sub>0</sub>) Stichprobenumfang</b>	<b>2.1</b> n = 1	<b>3</b> n = 1	<b>8</b> n = 56	<b>14</b> n = 22	<b>13</b> n = 32
<b><i>pat</i>-Expression auf die Nachkommenschaft bezogen</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>

### **3.8.3 *gus* PCR**

Die positiven PCR Ergebnisse belegen, daß die entsprechenden T<sub>1</sub> Pflanzen transgen sind. Bei der Nachkommenschaft sollte davon ausgegangen werden, daß keine persistierende Agrobakterien die PCR Ergebnisse beeinflussen können. Diese müßten sonst über das Saatgut weitergegeben worden sein. Literatur, die diese Möglichkeit der Übertragung von *A. tumefaciens* bestätigt, wurde nicht gefunden.

**Abb. 32 *gus* PCR T<sub>1</sub> Pflanzen**

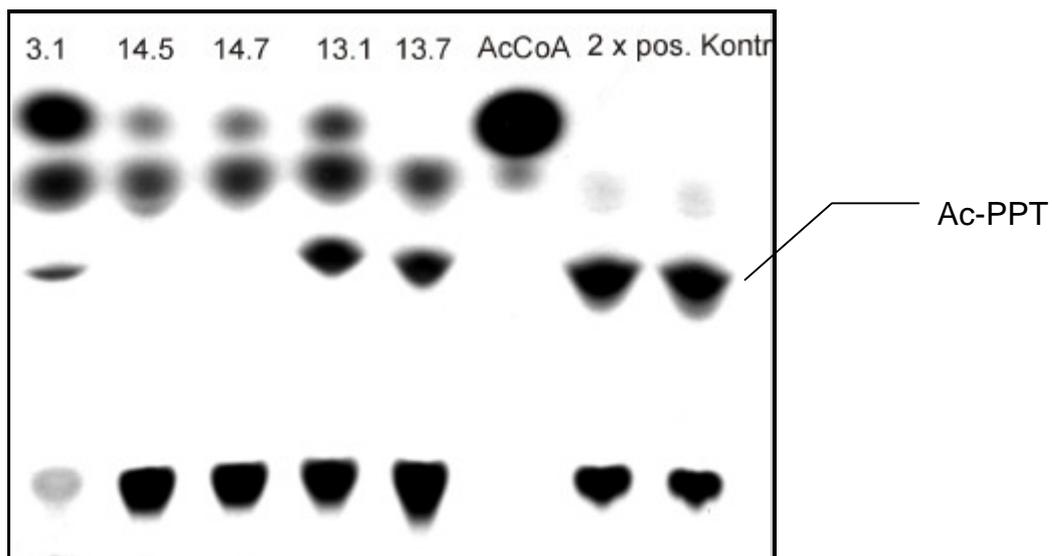


Spur:	1	2	3	4	5	6	7	8
Oben:	100bp Ladder	3.1	13.7	13.1	13.2.	14.5.	14.7	14.1
Unten:	100bp Ladder			H <sub>2</sub> O Kontr.	Pos. Kontr.			

### 3.8.4 PAT Assay

Der Pat Assay zeigt, daß das *pat*-Gen in allen untersuchten Pflanzen der T<sub>1</sub> exprimiert wird.

**Abb. 33 Phosphinothricin Acetyl Transferase Assay an T<sub>1</sub> Pflanzen**



### 3.8.5 Segregationsanalyse der T<sub>1</sub> Pflanzen

In der geselbsteten Nachkommenschaft der T<sub>0</sub> Pflanzen muß im Idealfall, wenn eine Kopie des Gens integriert wurde, von einer Segregation des Fremdgens von 3:1 ausgegangen werden. Die Integration zweier Kopien würde in einer 15:1 Segregation resultieren. Da die Gene *gusAint* und *pat* auf dem Konstrukt nur 100bp voneinander entfernt sind, sind sie als absolut gekoppelt anzusehen. Die Integration eines Genes führt aber nicht zwangsläufig zu einer gleichmäßigen *Expression* in der Nachkommenschaft. Es ist von daher kein Widerspruch, wenn sich die über den *gus*-Assay und Leaf Paint-Assay gewonnenen Daten nicht decken.

Daten für eine Segregationsanalyse der Nachkommenschaft wurden bisher nur an den Pflanzen 8, 13 und 14 erhoben. Für die Nachkommenschaft der Pflanze 14 erübrigt sich aber eine solche Analyse, da alle T<sub>1</sub>-Pflanzen bei allen Analysen eindeutig negativ waren. Der Chi-Quadratstest ist nur für den Fall der Ablehnung der Nullhypothese aussagekräftig (Sachs L., 1992). Es kommt also darauf an, ob die 15:1 Aufspaltung abgelehnt wird.

### 3.8.6 Segregationsanalyse der transgenen Nachkommenschaft.

#### 3.8.6.1 T<sub>1</sub> Pflanzen

Bei den Primärregeneraten (T<sub>0</sub>) handelt sich um hemizygoten Pflanzen, da Homozygotie nicht vorkommen kann.

**Tab. 13 Zu erwartende Aufspaltung bei der Integration einer Kopie der Markergene**

$$T_0 = + 0 \times + 0$$

Gameten	+	0
+	+/+	+/0
0	0/+	0/0

Die *gus* - exprimierenden Genotypen sind grau unterlegt. Eine quantitative Auswertung der *gus* - Expression ist nicht möglich. Unterschiede zwischen homo- und hemizygoten Pflanzen können daher nicht festgestellt werden.

Das eigentliche Spaltungsverhältnis (Genotypenaufteilung) ist 1:2:1, daraus ergibt sich ein 3:1 Verhältnis für die Merkmalsausprägung der Markergene, da dominante Expression über einen 35S Promotor vorliegt.

Werden zwei Kopien der T-DNA in das Pflanzengenom integriert, so entspricht die Segregation dem folgenden Schema:

## Ergebnisse

**Tab. 14 Zu erwartende Aufspaltung bei der Integration zweier Kopien der Markergene**

$$T_0 = +_1 0 \times +_2 0$$

Gameten	$+_1 +_2$	$+_1 0$	$+_2 0$	$0 0$
$+_1 +_2$	$+_1 +_2 / +_1 +_2$	$+_1 0 / +_1 +_2$	$+_2 0 / +_1 +_2$	$0 0 / +_1 +_2$
$+_1 0$	$+_1 +_2 / +_1 0$	$+_1 0 / +_1 0$	$+_2 0 / +_1 0$	$0 0 / +_1 0$
$+_2 0$	$+_1 +_2 / +_2 0$	$+_1 0 / +_2 0$	$+_2 0 / +_2 0$	$0 0 / +_2 0$
$0 0$	$+_1 +_2 / 0 0$	$+_1 0 / 0 0$	$+_2 0 / 0 0$	$0 0 / 0 0$

Die *gus* - exprimierenden Genotypen sind grau unterlegt.

Die transgenen Nachkommen werden entsprechend zusammengezählt, es ergibt sich daraus eine 15:1 Aufspaltung bezüglich der *gus* - Expression. Bei einer engen Kopplung zweier Kopien auf dem selben Chromosom ist der Erbgang an Crossing over Häufigkeiten gebunden, dies wurde nicht untersucht.

**Tab. 15 Chi-Quadratstest für eine 15:1 Segregation**

Pflanze 8, <i>gus</i> Gen			Pflanze 13, <i>gus</i> Gen		
$H_0 =$	15: 1		$H_0 =$	15: 1	
Stichprobenumfang		56	Stichprobenumfang		32
beobachtet	38	18	beobachtet	26	6
erwartet	52,5	3,5	erwartet	30	2
beob.-erwartet	-14,5	14,5	beob.-erwartet	-4	4
$(\text{beob.} - \text{erwart.})^2$ erwart.	4,00	60,07	$(\text{beob.} - \text{erwart.})^2$ erwart.	0,53	8,00
$\chi^2 =$	64,08	P=0,0001	$\chi^2 =$	8,53	P=0,0035
Kritischer Wert, 1FG	3,84	$\alpha=0,05$	Kritischer Wert, 1FG	3,84	$\alpha=0,05$
Pflanze 8, <i>pat</i> Gen			Pflanze 13, <i>pat</i> Gen		
$H_0 =$	15: 1		$H_0 =$	15: 1	
Stichprobenumfang		56	Stichprobenumfang		32
beobachtet	33	23	beobachtet	29	3
erwartet	52,5	3,5	erwartet	30	2
beob.-erwartet	-19,5	19,5	beob.-erwartet	-1	1
$(\text{beob.} - \text{erwart.})^2$ erwart.	7,24	108,64	$(\text{beob.} - \text{erwart.})^2$ erwart.	0,03	0,50
$\chi^2 =$	115,89	P=0,001	$\chi^2 =$	0,53	P=0,46
Kritischer Wert, 1FG	3,84	$\alpha=0,05$	Kritischer Wert, 1FG	3,84	$\alpha=0,05$

Für Pflanze 8 wird  $H_0 = 15:1$  abgelehnt. Im Umkehrschluß kann nur eine 3:1 Segregation vorliegen. Bei  $H_0 = 15:1$  liegt Pflanze 13 aber nur in Bezug auf die Segregation des *pat* Gens unterhalb des kritischen Wertes.

Es ist also eher davon auszugehen, daß es sich bei Pflanze 8 um die Integration einer Kopie handelt als bei Pflanze 13. Aus diesem Grund wurde mit Pflanze 8 in 3.9.1 weitergearbeitet.

### 3.9 T<sub>2</sub> Pflanzen

#### 3.9.1 Homozygote Pflanzen

Ziel war es das Transgen homozygot in einer Pflanze vorliegen zu haben. Für weiterführende Untersuchungen (Kreuzungen) ist es wichtig, daß die Nachkommen nicht mehr segregieren.

Für die folgende Untersuchung ist also bei jeder T<sub>1</sub> Pflanze der Linie 8 mit den Genotypen GG (P=1/4), GX (P=2/4) und XX (P=1/4) zu rechnen. „G“ steht für das *gus*-Gen und „X“ für das auf dem homologen Chromosom nicht vorhandene *gus*-Gen. Da die nicht transgenen Nachkommen transgener Eltern durch einen GUS-Assay diskriminiert werden können, gibt es nur noch die beiden Möglichkeiten homozygot dominant (P=1/3) und heterozygot (P=2/3). Die homozygoten Pflanzen sind gesucht. Die Frage ist: Wie hoch ist die Wahrscheinlichkeit bei den in Tab 16. angegebenen Stichprobenumfängen eine homozygote Linie richtig zu klassifizieren? Das Auftreten nur einer *gus*-negativen Pflanze in der Nachkommenschaft bestätigt dabei einen hemizygoten Elter, eine Statistik erübrigt sich daher für die hemizygoten Pflanzen. Die in Tab 16 aufgeführten P-Werte errechnen sich aus der nachfolgenden Formel\* .

$$P = \frac{1}{1 + 2 \left( \frac{3}{4} \right)^{K_2}}$$

K<sub>2</sub>= Zahl der *gus*-positiven Nachkommen (T<sub>2</sub>).

**Tab. 16 Stichproben zur Findung homozygoter Pflanzen**

T <sub>1</sub> Pflanze	Σ <i>gus</i> positive Nachkommen (T <sub>2</sub> )	Stichprobenumfang	P=
8.37.	14	49	0,99
8.4	13	29	0,99
8.17	10	12	hemizygot
8.49	13	28	0,99
8.32	6	7	hemizygot
8.30	6	12	hemizygot
8.40	10	12	hemizygot
8.12	8	8	0,83
8.41	7	33	0,99
8.36	0	4	neg. Kontr.

Die Stichprobengröße der ausgebrachten Samen war wenigstens 15, es sind aber nicht

\* Die Formel wurde von Herrn Dipl. Math. Michael Weichert hergeleitet (LG Bioinformatik UNI-Hannover).

## Ergebnisse

immer alle Samen gekeimt.

Pflanze 8.36 war nach der T<sub>1</sub> Analyse bereits als homozygot rezessiv klassifiziert, sie diente hier als Kontrolle.

### 3.9.2 Überprüfung der Linie 14 auf ein Abschalten der Markergene

Zuächst wurden die Nachkommen der Pflanze 14 nocheinmal über eine PCR auf das Vorhandensein des *gus*-Gens untersucht. Um auszuschließen, daß nur homozygot rezessive Pflanzen untersucht werden, wurden 57 T<sub>2</sub> Pflanzen von 16 verschiedenen T<sub>1</sub> Pflanzen dieser Linie analysiert.

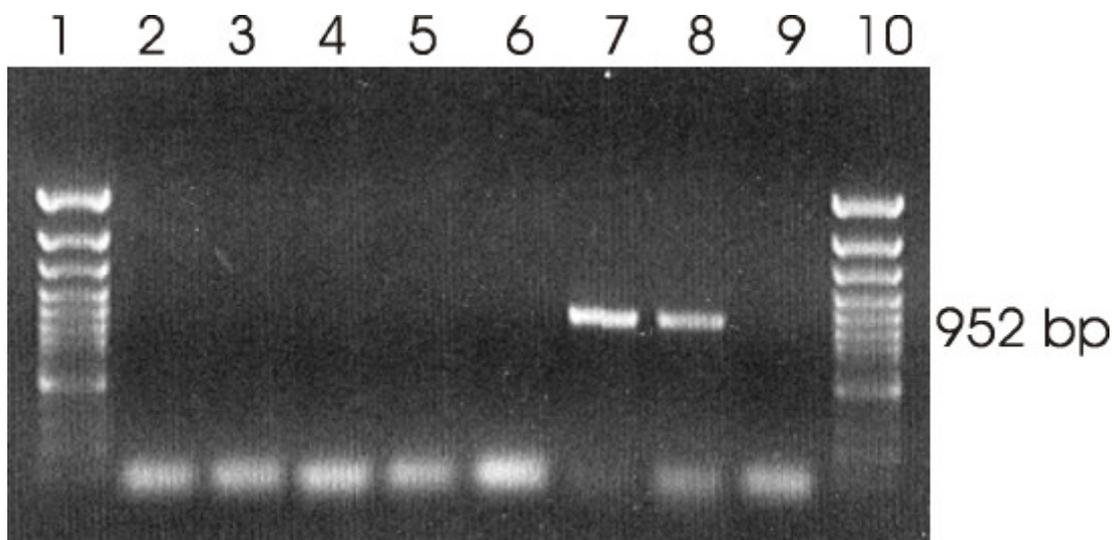
**Tab. 17 Für die Analyse verwendete T<sub>1</sub> Pflanzen**

Gruppe	T <sub>1</sub> Pflanzen			T <sub>2</sub> Pflanzen je T <sub>1</sub> Pflanze
<b>A</b>	14.8	14.10	14.19	je 5 T <sub>2</sub> = 15
<b>B</b>	14.13	14.14	14.15	je 5 T <sub>2</sub> = 15
<b>C</b>	14.16	14.17	14.18	je 5 T <sub>2</sub> = 15
<b>D</b>	14.9	14.11	14.12	je 4 T <sub>2</sub> = 12*

- nicht alle fünf Samen sind zur Keimung gekommen.

Es wurde jeweils eine DNA-Extraktion von allen Pflanzen einer Gruppe durchgeführt. Der Nachweis eines *gus* - PCR Produktes in den Sammelproben wäre ausreichend, um die Weitergabe des Reportergens in die Nachkommenschaft zu belegen.

**Abb. 34 *gus* - PCR an den DNA-Sammelproben aus**



Spur 1: 100 bp Marker; Spur 2-5: Gruppe A-D; Spur 5: H<sub>2</sub>O Kontrolle;  
Spur 7-9: 1:10, 1:20, 1:30 Verdünnung einer Positivkontrolle (genomische DNA einer transgenen Pflanze der Linie 8 (8.19.6))

Die DNA-Konzentrationen der genomischen DNA Sammelproben und der positiven Kontroll-DNA wurden über eine Gelabschätzung einander angeglichen. Anschließend wurde die Kontroll-DNA in drei Schritten verdünnt

(1:10, 1:20, 1:30), um sicherzustellen, daß eine einzige positive Pflanze in der Sammelprobe auch hätte nachgewiesen werden können. Da eine 1:20 Verdünnung der Kontroll-DNA noch ein PCR-Produkt liefert, ist dies sichergestellt. Es zeigt sich, daß in keiner der T<sub>2</sub> Nachkommen der T<sub>0</sub> Pflanze 14 das *gus* - Gen vorkommt. Damit ist ein Abschalten des Genes in der T<sub>1</sub> auszuschließen.

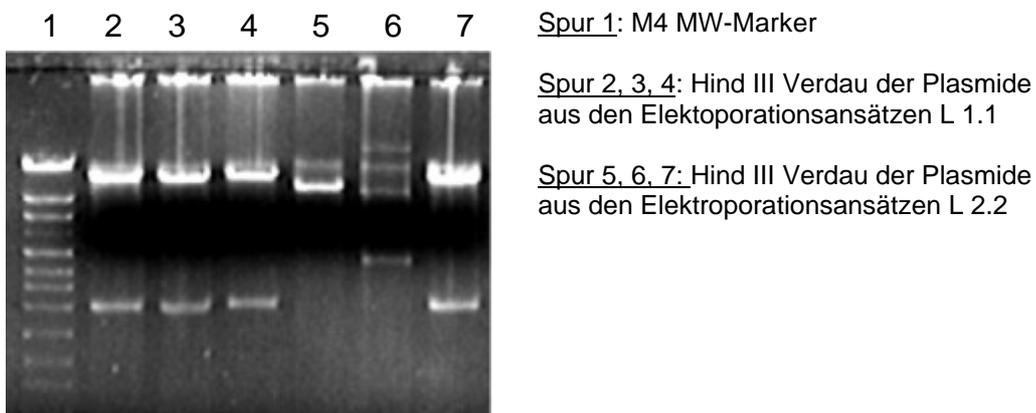
### **3.10 Klonierung des *vst 1* Gens in *pGPTV bar***

Für die Übertragung des *vst1* Gens in *Cicer arietinum* über einen Agrobakterium vermittelten Gentransfer mußte das Gen in ein binäres Plasmid *pGPTV bar* (Becker D., 1992), kloniert werden. Dazu wurde das im *pGPTV* Vektor befindliche promotorlose *gus*-Gen herausgeschnitten und durch das *vst 1* -Gen ersetzt. Das so entstandene Ligationsprodukt wurde über eine Elektroporation in den *E. coli* Stamm NM 522 transformiert und amplifiziert.

Elektroporationsdaten zur Bakterienelektroporation

	Kolonien / 100 µl des ausplattierten Elektroporationsansatzes	Kolonien / 500 µl des ausplattierten Elektroporationsansatzes
<b>L 1.1</b>	51	34
<b>L 1.2</b>	69	142
<b>L 2.1</b>	29	n.d. wegen Kondenswassers
<b>L 2.2</b>	19	> 150

### **Abb. 35 Kontrollverdau der Ligationsansätze**



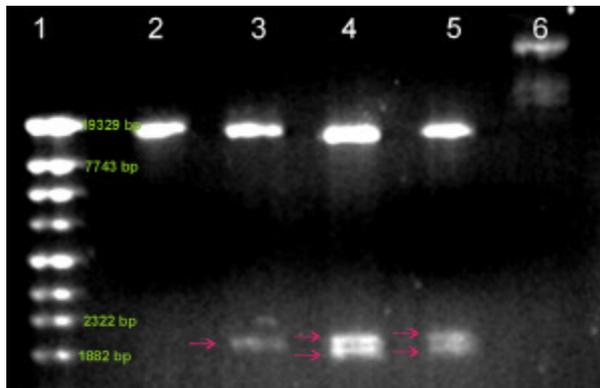
Da sich sowohl in dem *vst 1*-Gen als auch in dem *pGPTV bar* Vektor eine Hind III Schnittstelle befindet, sind nach einem Hind III Verdau zwei Banden zu erwarten. Ohne die Integration des *vst 1* Gens würde durch einen Hind III Verdau lediglich eine Linearisierung des *pGPTV* Vektors erfolgen.

Entsprechend entsteht nach einem Hind III Verdau ein 13,099 kb und ein 2,254 kb großes Fragment. Diese Fragmente sind obigem 0,8% Agarosegel auch zu sehen.

## Ergebnisse

Da die Klonierung des *vst 1*-Gens in den Transformationsvektor von großer Bedeutung für die Pflanzentransformation ist, wurde zur Bestätigung ein Doppelrestriktionsverdau mit den Enzymen EcoR I und Hind III in dem Ligationsprodukt durchgeführt.

**Abb. 36 Doppelverdau des Ligationsproduktes *pGPTV bar-vst 1***

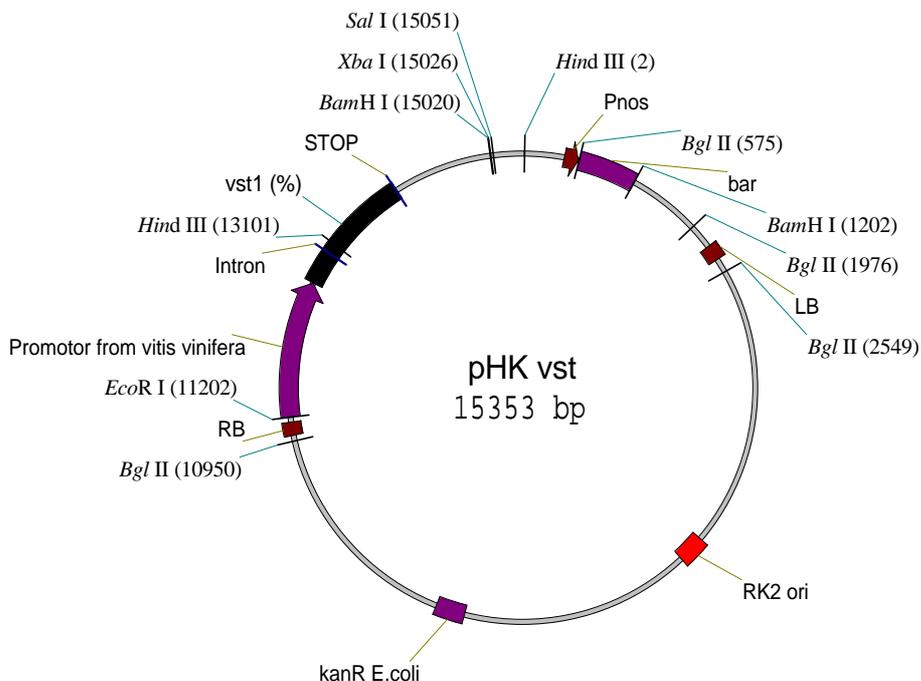


Spur 1: M4 Marker  
Spur 2: EcoR I.  
Spur 3: Hind III Verdau  
Spur 4 und 5: EcoR I / Hind III,  
Spur 6: unverdautes Plasmid.

<i>pHK vst<sup>+</sup></i> Verdau	Eco RI	Hind III	Eco RI / Hind III	unverdaut
Erwartete Banden	15,353 kb	13,099 kb 2,254 kb	11,2 kb 2,254 kb 1,899 kb	15,4 kb

Das 1,0 % Agarose Gel zeigt das erwartete Bandenmuster und bestätigt so die Integration des *vst 1* Gens in den *pGPTV bar* Vektor anstelle des *gus* Gens.

**Abb. 37 Pflanzentransformationsvektor *pHKvst 1***

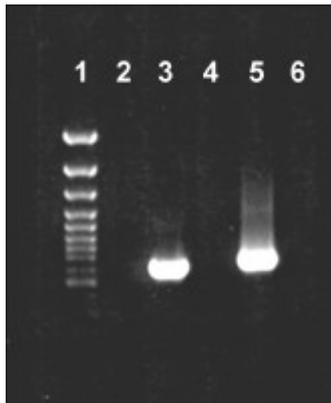


+ Die Fragmentlängen wurden einem Internetdokument entnommen, da es sich um einen nicht sequenzierten Vektor handelt, basiert die Karte auf Restriktionsfragmentlängen. (<ftp://ftp.genome.ad.jp/db/ncbi/vector-ig/UNCOMPLETABLE/PGPTVbar.SEQ>).

### 3.10.1 Etablierung einer *vst 1* PCR

Für die Analyse der das *vst 1*-Gen tragenden *Cicer arietinum* Pflanzen wurde ein entsprechendes PCR-Protokoll für zwei verschiedene Primerpaare entwickelt. Wie aus 2.9.2.2 hervorgeht, bindet der Primer B des *vst 1*, int Primerpaares im Intron. Das Primerpaar RT-*vst 1* flankiert hingegen das Intron und ist somit auch für eine RT-PCR tauglich.

**Abb. 38 VST 1 PCR**



<u>Spur 1:</u>	100 bp MW-Marker
<u>Spur 2:</u>	Genomische DNA aus <i>Cicer arietinum</i> mit dem RT- <i>vst 1</i> Primerpaar
<u>Spur 3:</u>	PCR-Produkt von pHK <i>vst 1</i> Plasmid DNA mit dem RT- <i>vst 1</i> Primerpaar
<u>Spur 4:</u>	Genomische DNA aus <i>Cicer arietinum</i> mit dem <i>vst 1</i> , int Primerpaar
<u>Spur 5:</u>	PCR-Produkt von pHK <i>vst 1</i> Plasmid DNA mit dem <i>vst 1</i> , int Primerpaar
<u>Spur 6:</u>	H <sub>2</sub> O Kontrolle

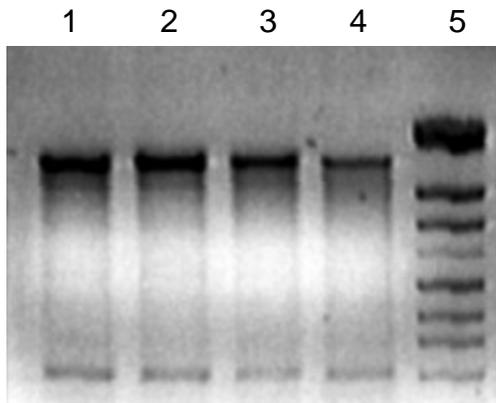
Die Primerpaare binden nicht unspezifisch an die genomische DNA aus *Cicer arietinum*. Beide Primerpaare liefern aber ein klares PCR-Produkt von dem pHK *vst 1* Plasmid. Wie zu erwarten, liefert das Primerpaar RT-*vst 1* ein um 51 bp kleineres Produkt, als das *vst 1* int Primerpaar.

## 3.11 Transformation der Agrobakterien

### 3.11.1 Transformationsvektor EHA 105

Mit den Plasmiden Abb. 35, Spur 3 und 4 wurde der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm EHA 105 via Elektroporation transformiert. Jeweils zwei Agrobakterienkolonien, die nach Elektroporation auf Selektivmedium gewachsen waren, wurden mit Hind III verdaut.

### **Abb. 39 Kontrollverdau nach Elektroporation von *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105**



Spur 1 und 2: Hind III - Kontrollverdau der Agrobakterien - Elektroporationen mit dem zuvor in Abb. 35, Spur 3 überprüften Plasmid.;

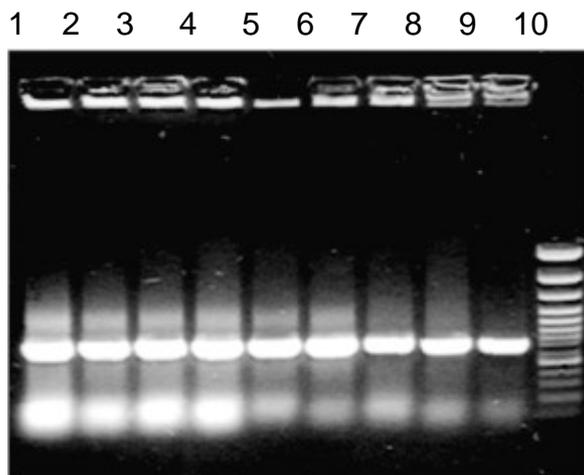
Spur 3 und 4: Hind III - Kontrollverdau der Agrobakterien - Elektroporationen mit dem zuvor in Abb. 35, Spur 4 überprüften Plasmid.;

Spur 5: M4 MW-Marker.

### **3.11.2 Weitere rekombinante Agrobakterienstämme mit *pHK vst***

Für die Transformation der nachfolgenden Bakterienstämme wurde auf weitere Restriktionsverdau verzichtet, da die Vektorarchitektur hinreichend belegt wurde. Es wurde stattdessen eine PCR-Analyse durchgeführt. Nach einer erfolgreichen Transformation via Elektroporation wachsen auf den 100 mg/l Kanamycinplatten nur Bakterienkolonien, welche das auf dem *pHK vst* lokalisierte *Kanamycinresistenz*-Gen aus *E.coli* tragen. Diese Kolonien wurden gepickt und in Flüssigkultur vermehrt.

### **Abb. 40 VST 1 PCR zur Kontrolle der Agrobakterienstämme**



Spur 1 - 4 PCR-Produkte von vier unabhängigen Transformanden des *A. tumefaciens* Stammes C58C1, *pHKvst*.

Spur 5: PCR-Produkt aus *E. coli*, NM 522 *pHKvst*

Spur 6: PCR-Produkt von *A. tumefaciens*, EHA 105 *pHKvst* welcher für die *Cicer arietinum* Transformationsroutine verwendet wurde.

Spur 7: PCR-Produkt von *A. rhizogenes*, R 1000 *pHKvst 1*

Spur 8 und 9: Zwei unabhängige Kolonien von *A. tumefaciens*, C58 C1 Ri *pHKvst 1*

Spur 10: 100bp DNA Ladder

Die amplifizierten Banden entsprechen den zu erwartenden Größen von 662 bp. Spur 1-4 ü.N. Kulturen in 10 ml YEP Medium, Spur 5-7 Glycerinstocks  $OD_{600} > 1$ , Spur 8 und 9 direkt von der Platte gepickte Kolonien von 2mm Durchmesser, wovon ein Teil zum Animpfen von 1 ml YEP benutzt wurde. Die untersuchten Bakterienstämme enthalten demnach alle das *pHKvst 1* Plasmid. Eine routinemäßige Kontrolle der Transformationsstämme ist somit ebenfalls via PCR möglich.

### **3.12 Co-Transformation**

Die in der beschriebenen Weise durchgeführten Tumorinduktionen an im Licht gekeimten Keimlingen haben eine Erfolgsquote von 90 %. Das Tumorstadium erstreckt sich dann über einen Zeitraum von drei Wochen. Dann sind die Tumoren groß genug, um sie für molekulare Nachweise zu nutzen. Für die folgenden PCR und PAT-Assays wurden junge, zwei Wochen alte und über vier Wochen alte Tumoren verwendet.

#### **Abb. 41 Tumorstadium nach einmaliger Inokulation im basalen Teil des Keimlings**



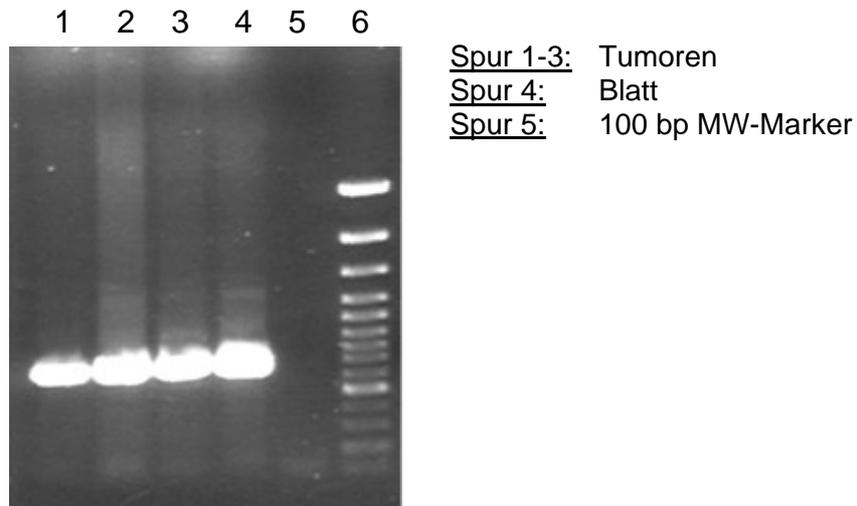
Die blauen Pfeile markieren Tumorstadium in den Verzweigungen der Sprossachse. Diese sind nicht durch eine Verwundung induziert, da die Inokulationsstelle wesentlich tiefer liegt (Inok. Stelle).

Interessanterweise entsteht nicht nur an der Inokulationsstelle des jungen Keimlings ein Tumor, sondern auch in den Verzweigungen des Sprosses. Dieses Transformationsereignis ist demnach offenbar nicht wundinduziert.

### 3.12.1 *vst 1* PCR

Es wurde von einer Pflanze aus drei Tumoren und von einem Blatt, an dem kein Tumor wuchs, DNA isoliert. Für die PCR wurden die Primer *vst 1* A und B verwendet. Wie Abb. 42 zeigt, konnte in allen drei Tumoren das *vst 1*-PCR-Produkt amplifiziert werden. Ebenso lieferte aber auch das Blatt ein *vst 1*-PCR-Produkt.

#### **Abb. 42 *vst 1* PCR an Tumorgewebe**

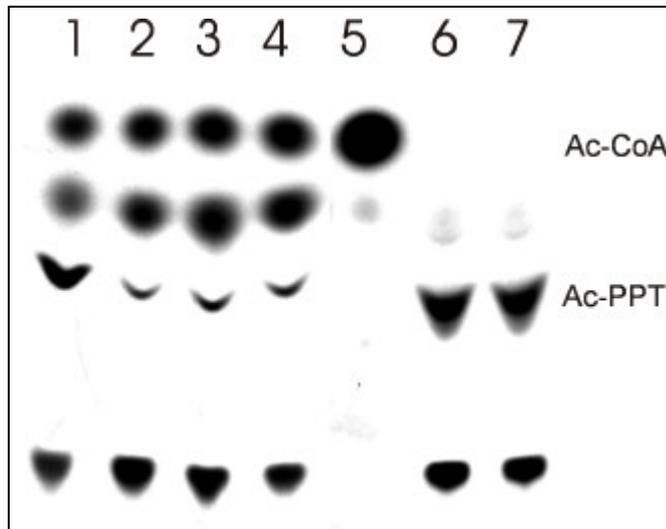


Die Tumoren an den Gewächshauspflanzen sind nahezu unter Freilandbedingungen gewachsen und nicht, wie dies bei *in vitro* Kulturen der Fall ist, unter Antibiotikakontrolle. Es wurde daher davon ausgegangen, daß sich die Agrobakterien in hoher Dichte in dem Tumorgewebe, möglicherweise aber auch in der Pflanze befinden. Die Amplifikation der *vst 1* PCR-Produkte aus Blattmaterial bei gleichzeitiger Phosphinothricinsensitivität der Blätter bestätigt diese Annahme.

### 3.12.2 Phosphinothricin Acetylase -Assay

Da der *pHK vst* Vektor neben dem *vst 1*-Gen auch ein *bar*-Gen enthält, wurde ein PAT Assay an dem Rohextrakt von vier verschiedenen Tumoren durchgeführt. Drei davon waren jung (drei Wochen nach der Inokulation) einer alt ( $\approx$  sechs Wochen nach der Inokulation)

**Abb. 43 PAT-Assay an Pflanzentumoren**



Spur 1-3: Junge Tumoren

Spur 4: Alter Tumor

Spur 5: Ac-CoA

Spur 6 und 7: Positivkontrolle

Es zeigt sich, daß alle vier Tumoren das *bar* Gen exprimieren. Die Enzymaktivität ist, wie auf der Abb. 43 zu sehen, bei den jungen Tumoren 1-3 etwa gleich. Der ältere Tumor exprimiert deutlich stärker.

Damit kann gezeigt werden, daß eine Co-transformation des Ti- und des binäres Plasmids, unter den beschriebenen Bedingungen effizient durchgeführt werden kann.

## 4 Diskussion

### 4.1 Protoplasten

Die Protoplastenkultur wurde zu Beginn der Arbeit favorisiert, da hier bereits positive Ergebnisse für die Regeneration von transgenen Erbsen (*Pisum sativum*) vorlagen ( Böhmer Planta. et al., 1996). Im Nachfolgenden kann gezeigt werden, daß das an Kichererbsen adaptierte Protokoll durchaus die Grundvoraussetzungen für einen direkten Gentransfer bietet.

	<b>Methode nach Böhmer an Erbsen</b>	<b>Kichererbse</b>
Pflanzenmaterial	Etiolierte sekundäre Sprosse aus Embryovorkultur. Nach Lehminger-Mertens, (1989)	3-4 Tage alte, grüne Sprosse
Mazerationsvolumen	6 ml, in 6 cm Petrischale	10 ml, in 9 cm Petrischale
Ausbeute	1-2 x 10 <sup>6</sup> / 6 ml	6-10 <sup>6</sup> / 10 ml
Ausbeute/g Frischgewicht	10 - 20 x 10 <sup>6</sup>	12-20 x 10 <sup>6</sup>
Plating efficiency*	1,4-3,3 %	1-1,3 %
Transformationsrate	0,03 %	?
Sprossinduktionsrate an transgenen Kalli	0,000043 %	?

Bei der Isolation von Protoplasten aus dem Hypokotyl von Kichererbsen konnten Ausbeuten von 1-7,6 x 10<sup>6</sup> Protoplasten pro Gramm Frischgewicht erzielt werden, mit einer Vitalität von 80 % (Sagare & Krishnamurthy, 1991). Eine Regeneration von Sprossen aus diesen protoplastenbürtigen Kalli war Sagare und Krishnamurthy aber nicht gelungen. Da für *Cicer arietinum* bis dato kein Protokoll zur Sproßregeneration aus protoplastenbürtigen Kalli vorliegt, wurden die Regenerationsprotokolle für *Pisum sativum* nach Böhmer und für *Vicia faba* cv. Mythos (Tegeder et al., 1995) auf Kichererbsen angewendet (Kiesecker, 1996). An *Cicer arietinum* führte diese Art der Sproßinduktion aber bereits nach drei Monaten dazu, daß der Kallus weich und braun wurde. Eine morphologische Veränderung, die auf die Entstehung von Sproßknospen hindeutet, so wie sie von BÖHMER et al., (1995) für Erbse gezeigt wird, konnte an Kichererbsen nicht beobachtet werden.

Das Protokoll von Tegeder, bei dem eine Sproßinduktion innerhalb von 7-8 Monaten erfolgt, konnte ebenfalls nicht auf die Kichererbsen übertragen werden, da auch hier der Kichererbsenkallus weich und braun wurde. Generell wurde entschieden, daß diese Protokolle zu langwierig waren.

---

\* **Plating efficiency:** Anteil der auf Festmedium wachsenden Kalli bezogen auf die Zahl der eingebetteten Protoplasten. BÖHMER bezog sich nicht auf die Protoplasten sondern auf die in Flüssigphase gewachsenen Mikrokalli vor dem Transfer auf Festmedium.

---

Das beschriebene Protoplastenisolationsprotokoll für Kichererbsen sowie die Einbettungs- und Kulturtechnik als solche ließen sich aber direkt auf *Pisum sativum* (Himstedt, 1998) und *Lens culinaris* (Halbach, 1998) übertragen.

Von einer weiteren Optimierung wurde nicht zuletzt vor dem Hintergrund der sich ergebenden Fertilitätsprobleme der T<sub>0</sub> Pflanzen transgener Erbsen in der eigenen Arbeitsgruppe Abstand genommen. Ein weiterer wichtiger Punkt bestand aber darin, daß die Kichererbsenliteratur bis 1999 nur wenige Protokolle für somatische Organogenese aufweist. Barna & Wakhulu (1994) beschreiben die Sproßbildungskompetenz von auf 25 µM 2,4 D und 10 µM BAP generierten Kalli, welche aus der Embryoachse, unreifen Blättern und dem basalen Teil der Sproßspitze stammen. Kallus aus Kotyledonen, dem Hypokotyl, dem Epikotyl und dem apikalen Teil der Sproßspitze eignen sich nach ihren Untersuchungen nicht zur Sproßregeneration.

Ob es sich dabei um eine tatsächliche *de novo* Regeneration handelt ist allerdings schwer zu sagen, da präformierte Meristeme möglicherweise auch während einer Kallusphase regenerativ bleiben. Die Tatsache, daß zum Teil auch die Gewebe, welche einen großen Anteil meristematischen Gewebes besitzen Sprosse, innerhalb der Kallusphase regenerieren, deutet auf diese Problematik hin.

#### **4.2 Direkte Organogenese und Agrobacterium tumefaciens vermittelter Gentransfer.**

Zu Beginn dieser Arbeit lag zum Thema Kichererbsentransformation nur eine Publikation von Fontana et al. (1993) vor. Dort werden transgene T<sub>0</sub>-Pflanzen vorgestellt, welche über einen Agrobakterien vermittelten Gentransfer gewonnen wurden. Eine transgene Nachkommenschaft gab es nicht, wurde zumindest nicht gezeigt. Kar et al. (1996) zeigten eine Transformationsmethode über einen Agrobakterien-vermittelten Gentransfer in Kichererbsen. Auch in dieser Publikation zeigten nur T<sub>0</sub> Pflanzen Transgenität. In beiden Arbeiten fehlt also der notwendige Nachweis der stabilen Weitergabe des jeweiligen Transgens auf die folgenden Generationen. Obwohl in der Publikation (Kar et al., 1996) ausdrücklich betont wird, daß diese Pflanzen bereits Hülsen trugen, wurde später keine transgene Nachkommenschaft publiziert.

Kar et al. (1996) beziehen sich in ihrer Arbeit auf Fontana et al. (1993) und, wie im Folgenden dargestellt, gibt es Gemeinsamkeiten in den Ansätzen und Ergebnissen. Diese werden mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit verglichen.

## Diskussion

---

### Protokoll nach Fontana et al.(1993)

1	Material	Reife Embryonen aus ü. N. gequollenen Samen. Lokale Varietät (Consortio Provinciale, Rome, Italy), daher vermutlich <i>kabuli</i> .
2	Expl. Präparation	Dekapitierung der Sproßspitze (1mm)
3	Agrobakterien Kultur	- 48 h auf Festmedium
4	Inokulation	20 min Inokulation in Bakteriensuspension ( $1 - 5 \times 10^8$ /ml), MS-Flüssigmedium hormonfrei
5	Co-Kultur	3 Tage auf MS-Medium mit 1,0 mg/l (4,65 $\mu$ M) Kinetin
6	Kultur	MS-Medium mit 1,0 mg / l (4,65 $\mu$ M) Kinetin
7	Sproßreg.	nach 3 Wochen
8	Selektion	Sprosse aus Schritt 6 werden auf MS- Medium mit 1 mg/l Kinetin + 50 mg/l Kanamycin überführt.
9	Bewurzelung	nach weiteren drei bis vier Wochen auf MS-Medium mit 0,5 mg/l ( 2,85 $\mu$ M) IAA, ohne weitere Selektion

Die Sproßregenerationsfrequenz liegt bei 40 - 50 %.

### Protokoll nach Kar et al. (1996)

1	Material	Reife Embryonen aus ü. N. gequollenen Samen. Sorten ICCV-1, ICCV-6 ( <i>kabuli</i> Typ) und eine nicht charakterisierte, lokale <i>desi</i> Varietät
2	Expl. Präparation	Dekapitierung der Sproß- und Wurzelspitze
3	24 h Vorkultur	MS-Medium mit vierfach Microsalzen, 3,0 mg/l (13,31 $\mu$ M) BAP und 0,004 mg/l (0,021 $\mu$ M) NAA. (SR-Medium genannt)
4	Agrobakterien Kultur	- 24 h Flüssigkultur
5	Inokulation /	24 h Inokulation von 50 Explantaten in 10 ml Bakteriensuspension ( $1 \times 10^8$ /ml), SR-Flüssig, 0,004 mg/l NAA und 3 mg/l BAP
6	Co-Kultur	72 h auf halbfestem SR-Medium, 0,004 mg/l NAA und 3 mg/l BAP
7	Kultur/Selektion	SR-Medium 0,004 mg/l NAA und 3 mg/l BAP mit 500 mg/l Cefotaxim und 25 mg/l Kanamycin
8	Sproßreg.	nach 3 Wochen
9	Selektion	Sprosse aus Schritt 8 werden auf SR- Medium 0,004 mg/l NAA und 3 mg/l BAP mit 50 mg/l Kanamycin überführt.
10	Subkulturen	dreimalige Wiederholung des Schrittes 9
11	Bewurzelung	MS-Medium mit 0,5 mg/l ( 2,46 $\mu$ M) IBA, ohne weitere Selektion

Die Sproßregenerationsfrequenz liegt bei 95 % für die lokale Varietät (*desi*-Typ) , zwischen 60% ICCV-1, 70% ICCV-6 (*kabuli*- Typen)

## Diese Arbeit

1	Material	Reife Embryonen aus ü. N. gequollenen Samen. Sorten ILC 482 ( ICARDA)
2	Expl. Präparation	Dekapitierung der Sproßspitze
3	Agrobakterien Anzucht	- ü.N. Flüssigkultur
4	Inokulation /	2 h Inokulation in Bakteriensuspension (OD 600 $\approx$ $1 \times 10^9$ /ml) in SR-Medium mit 10 $\mu$ M TDZ , 100 $\mu$ M Acetosyringone, Ultraschallbehandlung, anschließend 1h Inokulation
5	Co-Kultur	4 Tage auf SR-Medium mit 10 $\mu$ M TDZ, Explantate auf Filterpapier
6	Kultur 1. Sub 1 Woche	MS-Medium 2 $\mu$ M TDZ, 150 mg/l Ticarcillin, 50 mg/l Combactam).
7	2. Sub. 3 Wochen	MS-Medium 1 $\mu$ M TDZ, 100 mg/l Ticarcillin, 50 mg/l Combactam).
8	3. Sub. 2-3 Wochen	MS-Medium 2,32 $\mu$ M Kin, 100 mg/l Ticarcillin, 50 mg/l Combactam, 3 mg/l PPT
9	4. Sub. 2-3 Wochen	MS-Medium 2,32 $\mu$ M Kin, 100 mg/l Ticarcillin, 50 mg/l Combactam, 3 mg/l PPT
10	Subkulturen im 2-3 wöchigem Medienwechsel	MS-Medium 2,32 $\mu$ M Kin, 100 mg/l Ticarcillin, 50 mg/l Combactam, 5 mg/l PPT ansteigend bis 15 mg/l
12	<b>Bewurzelung</b> von Sprossen ab Schritt 10 in obiger Tabelle	MS-Medium 9,8 $\mu$ M IBA, 100 mg/l Ticarcillin, 50 mg/l Combactam, 5 mg/l PPT für 2 Subkulturen. Mit steigendem Resistenzniveau der Mutterkulturen bis 15 mg/l PPT
13	<b>Pfropfung</b> von Sprossen ab Schritt 11	MS-Medium 2,32 $\mu$ M Kin, 100 mg/l Ticarcillin, 50 mg/l Combactam, 5 mg/l PPT. Mit steigendem Resistenzniveau der Mutterkulturen bis 15 mg/l PPT ansteigend. Oder Pfropfung der Sprosse aus der Bewurzelungsphase.

Die Sproßregenerationsfrequenz liegt bei durchschnittlich 50-70%.

### 4.3 Methodenvergleich

Die Art der Explantatpräparation ist in allen drei Arbeiten, soweit dies den Publikationen zu entnehmen ist, etwa gleich. Die *kabuli*-Typen zeigen in dieser, in Fontana et al. (1993) und auch in Kar's et al. (1996) Arbeit nach der Dekapitierung etwa vergleichbare Regenerationsfrequenzen von 50-70%. Die *desi*-Varietät in Kar's et al. (1996) Arbeit liegt deutlich darüber. Diese unterschiedliche Sproßproliferationskapazität wird auch von Brandt & Hess (1994) an Sproßspitzenmeristemen der *kabuli*-Sorte ICCV-6 und der *desi*-Sorte *Annigeri* gezeigt. Zur klonalen Vermehrung teilte BRANDT die Sproßspitzenmeristeme fortwährend und bekam pro Explantat 90 Sprosse aus *Annigeri* und 50 Sprosse aus ICCV-6 .

Die jeweiligen Inokulationsbedingungen unterscheiden sich allerdings voneinander, wobei eine 24h Inokulation, wie sie von Kar et al. (1996) praktiziert wird, den größten Unterschied macht. Fontana et al. (1993) inokuliert mit hormonfreiem Medium. Ultraschall wird nur in dieser vorliegenden Arbeit angewandt.

In allen drei Arbeiten werden während der Co-Kultur Cytokinine verwendet. Kar et al. (1996) verwendet zusätzlich ein Auxin in einer sehr schwachen Dosierung. In der vorliegenden Arbeit wird TDZ verwendet. TDZ hat neben einer starken Cytokinin- möglicherweise auch eine Auxinwirkung, dies wird von Gill & Saxena (1992) aufgrund einer TDZ abhängigen Induktion somatischer Embryonen an unreifen Blättern vermutet. In dieser Arbeit konnte aber nur eine Cytokininwirkung anhand der Sproßinduktion und der geringen Elongation beobachtet werden.

Für die weitere Kultur werden die Hormonzusammensetzungen und -konzentrationen bei Fontana et al. (1993) und Kar et al. (1996) nicht geändert. In der vorliegenden Arbeit wird die TDZ-Konzentration auf 1µM verringert. Mit dem Beginn der Selektion wurde auf 0,5 mg/l Kinetin gewechselt. Diese Konzentration ist nur halb so stark wie die von Fontana verwendete. Der Wechsel auf Kinetin war in dieser Arbeit notwendig, um eine Elongation der Sprosse zuzulassen.

Der wesentliche Unterschied in den drei Arbeiten bezieht sich auf die Selektion. Der Selektionsdruck der nach 3 Wochen mit 50 mg/l Kanamycin in Fontanas et al. (1993) Arbeit ausgeübt wird, ist in etwa vergleichbar mit den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Bedingungen. Diese Aussage kann anhand der überlebenden Explantate nach der Selektion getroffen werden: 10% bei Fontana et al. (1993), zwischen 5 und 8 % in dieser Arbeit. Der Schwerpunkt liegt also eher in der Selektion über verschiedene Subkulturen hinweg. Kar et al. (1997) steigern gegenüber Kar et al. (1996) die Zahl der Subkulturen um eine auf fünf bis sechs Selektionsschritte mit 50 mg/l Kanamycin. Die Sprosse werden von Kar et al. (1996) an den Verzweigungen abgeschnitten und wieder mit dem Medium in Kontakt gebracht. Für eine Kanamycinselektion an Erbsen schlagen Grant et al. (1998) eine Re-Selektion bei der Bewurzelung vor: Die Wurzeln nicht transgener Sprosse verbräunen in Kanamycinmedium. Fontana et al. (1993) bewurzelten die Sprosse nach nur einem Selektionsschritt ohne Kanamycin. Kar et al. (1996) bewurzelten ebenfalls ohne Kanamycin, sie führten aber mehrere Selektionsschritte durch.

Im Gegensatz zu dieser Arbeit zeigen Fontana et al. (1993) und Kar et al. (1996) keine transgenen Nachkommen der transgenen Kichererbsen.

### 4.3.1 Regeneration

Das Pflanzenmaterial von Fontana et al. (1993) wurde als „lokale Varietät“ beschrieben, es handelt sich also offenbar nicht um zertifiziertes Saatgut. Da in Italien aber hauptsächlich *kabuli* Typen angebaut werden, ist hier eine größere Ähnlichkeit zu ILC 482 zu vermuten. Kar et al. (1996, 1997)

---

verwenden zertifiziertes Saatgut der Sorten ICCV-1, ICCV-6 (*kabuli*) und eine lokale *desi* Varietät.

Die Phytohormonzusammensetzung von 3 mg/l BAP und 0,004 mg/l NAA führt bei den von Kar et al. (1996, 1997) verwendeten Sorten zu einer Verzweigung der entstehenden Sprosse (Kar et al., 1996). Die von Kar et al. (1996) beobachtete Verzweigung wird auch von Kartha et al., (1981) beschrieben. Es ist jedoch nicht klar, um welche Sorte es sich in jener Arbeit handelte. Hohe Cytokiningaben (10  $\mu$ M BAP = 2,3 mg/l) führen bei Kartha et al. (1981) zu multipler Sproßinduktion an Apikalmeristemen, das weitere Wachstum ist aber durch hohe Cytokininkonzentrationen reduziert. Charakteristisch für Kichererbsen ist bei Kartha et al. (1981) die häufige axillare Verzweigung eines Sprosses (10 Verzweigungen an einem 5 cm Sproß). Diese Aussage trafen die Autoren im direkten Vergleich mit andern Körnerleguminosen. Parallelen dazu konnten auch in dieser Arbeit beobachtet werden, eine hohe Cytokiningabe (10  $\mu$ M TDZ) über einen längeren Zeitraum verringert die Sproßelongation. Durch TDZ sind die Verzweigungen sehr gestaucht und am Mutterexplantat nur schwer zu erkennen. Erst wenn in den proliferierenden Sprossen die Tragblätter als solche erkennbar werden, kann die Anatomie der stark gestauchten Sproßachse nachvollzogen werden. Die unter Selektionsdruck entstehenden Sprosse hatten in dieser Arbeit ihren Ursprung entweder in einem Nodus oder in der Basis eines Sprosses (Abb 21). Auch Polisetty et al. (1997) beobachten in Kichererbsen eine deutliche Verringerung der Sproßelongation und Verlangsamung des Sproßwachstums bei ansteigenden BAP Konzentrationen.

Fontana et al. (1993) nehmen eine Adventivsproßbildung an, sie diskutieren eine wundinduzierte, neoforme Sproßentwicklung.

Fontana et al. (1993) geben als Optimum für die Sproßregenerationsfrequenz eine Dekapitierungstiefe von etwa 1 mm unterhalb des Apex an. Wie in dieser Arbeit herausgearbeitet wurde, liegen im Embryo eines ü. N. gequollenen Samens die beiden unteren Lateralsproßmeristeme etwa einen Millimeter unterhalb der Apex. Unterhalb dieses Bereichs beschreiben Fontana et al. (1993), eine Inhibition der Regeneration. Eine Sproßproliferationsfrequenz von 40 - 50 % (Fontana et al., 1993) könnte bedeuten, daß Fontana tiefer geschnitten hat, als es Kar et al. (1996) taten und als es in dieser Arbeit durchgeführt wurde. „Tiefer“ ist hier relativ zur Anatomie der verwendeten Sorte zu sehen. In einer Diplomarbeit (Spötter, 1999) wurde aus versuchstechnischen Gründen so tief geschnitten, daß im Querschnitt keine Tragblätter mehr an den Explantaten von ILC 482 Embryonen zu sehen waren. Dies führte zu einer Regenerationsfrequenz von etwa 10 % gegenüber sonst 50 -60%. Der beobachtete Effekt war nicht auf die Ultraschallbehandlung zurückzuführen, da die der SAAT Methode unterzogenen Proben bezüglich der Sproßproliferation sogar über der Nullkontrolle lagen. Das Ausschließen von Tragblättern am

## Diskussion

---

Explantat führt zwangsläufig dazu, daß sich keine Lateralmeristeme mehr an der Embryonachse befanden.

Die embryonale Anatomie der Sproßachse entspricht der des ausgewachsenen Sprosses, wobei vom Apex basalwärts die Differenzierung voranschreitet. Im Apex befindet sich die Embryonalzone (0 - 0,02 mm), daran schließt sich die Differenzierungszone an (0,02 - 0,04 mm). Hier finden sich die ersten Ausläufer der Procambiumstränge, welche Bestandteil des Meristemringes sind. Am Übergang zwischen Determinierungs- zur Differenzierungszone befinden sich die Blattprimordien, welche basalwärts ausdifferenzieren. Die Differenzierungszone reicht von 0,04 - 25 mm unterhalb des Sproßscheitels (Sitte et al., 1991). Bei einem reifen Embryo ist die Differenzierungszone entsprechend gestaucht (Abb 9). Die Anatomie der Lateralisprosse entspricht wiederum der der Sproßachse.

### **4.4 Transformation**

In dieser Arbeit wurden etwa 1 mm des Apex entfernt und der dekapitierte Embryo wurde mit Agrobakterien inokuliert. An dem Embryo verblieben ein bis zwei Lateralprimordien. Die Lateralprimordien wurden als der Ursprung für die Regeneration transgener Sprosse angesehen (Abschnitt 3.2).

Da die Transformationskompetenz stark mit der Zellteilungsfrequenz korreliert (de Kathen & Jacobsen, 1995), erfüllen nach dem Brechen der Apikaldominanz die Lateralisprosse eine der Bedingungen für einen *A. tumefaciens* vermittelten Gentransfer, nämlich daß sie teilungsaktiv sind. In diesem Zusammenhang zeigten Colin et al. (1997) einen schnellen Anstieg der Cytokininkonzentration in den Lateralisprossen von Kichererbsen nach der Dekapitierung der Sproßspitze 7-8 Tage alter Keimlinge. Bereits nach einer lag-Phase von 2-3 Stunden, welche durch BAP auf 1-2 Stunden verkürzt werden konnte, stieg die endogene Cytokininkonzentration in den Lateralmeristemen. Dies führte zu einem beschleunigtem Wachstum der Lateralisprossmeristeme (Colin et al. 1997). Auxine hemmen diesen Prozess der durch Dekapitierung bedingten Steigerung der endogenen Cytokininkonzentration in *Phaseolus vulgaris* L. (Bangerth, 1994).

Als eine weitere Grundvoraussetzung wird die Aktivierung der Virulenzgene durch eine Verwundung an der Pflanze angesehen (Zupan & Zambryski, 1995). Escudero & Hohn (1997) zeigen, daß *Agrobacterium* auch in nicht verwundete Tabakblätter eindringen kann. Sie sprühen *vir* aktivierte Agrobakterien (200µM Acetosyringon) auf die Blätter und beobachteten später Transformationsereignisse. Sie gehen von einem Eindringen der Bakterien über die Stomata aus.

---

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Tumorinduktion in Axillarmeristemen nicht wundinduzierbar sein muß (Abb 41). Es ist also auch denkbar, daß Zellen der Lateralmeristeme der dekapitierten Embryonen ohne eine direkte Verwundung des Meristems transformiert werden können.

#### **4.5 Co-Transformation mit Tumor induzierendem Agrobacterium C58C1 pHKvst 1**

Die Inokulationen der keimenden Pflanzen mit dem Tumor induzierenden Stamm C58C1 im basalen Teil des sich streckenden Epikotyls zeigt, daß die Agrobakterien in den Nodi entsprechend teilungsaktive Zellen vorfinden. Neben der Verwundungsstelle sind dies die einzigen Orte, an denen Tumorwachstum stattfindet. Die Co-Transformation zweier T-DNAs aus einem Agrobakterium wurde von Depiker et al. (1985) gezeigt. Die Übertragung zweier T-DNAs aus einem Vektor (binären Plasmid) in Pflanzen unter nicht selektiven Bedingungen wurde von Hamill et al. (1987) mit *Agrobacterium rhizogenes* und einem entwaffneten binären Plasmid gezeigt. In der vorliegenden Arbeit zeigten vier von vier untersuchten Tumoren die Integration des Markergens in den Tumorzellen über den PAT-Assay. Da das *bar*-Gen von einem viralen 35S CaMV Promotor (eukaryontisch) angetrieben wird, sind die Bakterien nicht in der Lage, die Phosphinothricin Acetyltransferase zu exprimieren. Durch das Tumorwachstum ist die Integration der *Ti* Gene hinreichend belegt. Auch in einem der Blätter der Tumorpflanze wurde das *vst 1* Gen via PCR nachgewiesen, obwohl hier kein Tumorwachstum zu verzeichnen war. Da die Blätter der Tumorpflanzen auch im Leaf-Paint-Assay negativ waren, die Pflanze also offensichtlich nicht *pat* exprimierte, konnte das PCR-Signal nur von persistierenden Agrobakterien stammen.

#### **4.6 Expressions- und Transformationschimären**

Durch alle Phasen der Regeneration und auch an den Nachkommenschaften wurden unterschiedliche Expressionsmuster des *gus* Gens nach dem GUS-Assay beobachtet. Sowohl die Primärregenerate der Sproßexplantate als auch die Nachkommenschaften zeigten Unterschiede im Expressionsmuster auf. Dies kann einen direkten genetischen Hintergrund haben, dann dürften die entsprechenden Gene in bestimmten Bereichen (Gewebespezifität) nicht exprimiert werden. Es ist aber auch möglich, daß es sich um chimäre Sprosse handelt, was als wahrscheinlicher anzusehen ist.

Grundsätzlich gibt es keine Literaturdaten, die belegen können, welches das tatsächliche Ursprungsgewebe für die Entstehung transgener Primärregenerate in Körnerleguminosen ist. Für diese Arbeit wurden prinzipiell zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen: Entweder es findet eine Regeneration aus bereits

## Diskussion

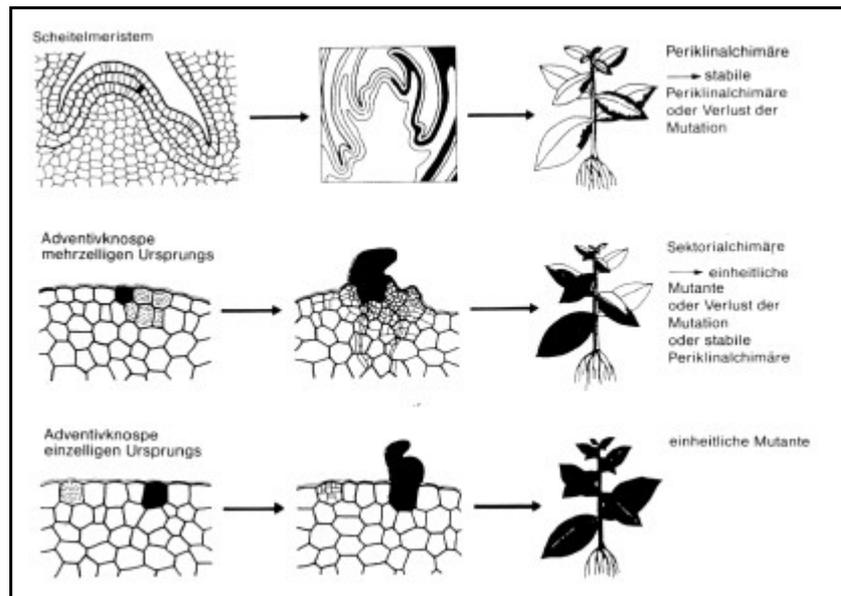
---

bestehenden Meristemen statt, oder es entstehen Adventivsprosse aus epidermalen- oder subepidermalen Zellen, die die Teilungsfähigkeit wiedererlangt haben.

Die ersten überzeugenden Untersuchungen bezüglich der Entstehung von chimären Pflanzen wurden an einer Zierpflanze gemacht, *Kohleria* „Orange Glow“, *Gesnariaceae*. Für die Sortenbildung im Zierpflanzenbau spielt die Mutationszüchtung eine wichtige Rolle, da mit ihrer Hilfe ein größeres Spektrum an Variabilität erzielt werden kann. Da diese Pflanzen oft vegetativ vermehrt werden, stellt sich nicht die Frage der Heritabilität der neu erworbenen Merkmale. Am Beispiel *Kohleria* (Geier T., 1989) konnte gezeigt werden, daß ein epidermales Mutationsereignis, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit singulär ist, unterschiedliche Auswirkungen auf den Phänotyp der sich entwickelnden Pflanze hat. Dies richtet sich nach der Lokalisation des Mutationsereignisses. Geier verwendet hier den Begriff Periclinalchimäre für Pflanzen, bei denen alle Zellen einer Zellschicht verändert sind, die Pflanze jedoch nicht genetisch homogen ist. Ein Adventivsproß ist also nicht zwangsläufig genetisch homogen, dies konnte von Schmülling & Schell (1993) an Blattscheibenregeneraten aus Tabak gezeigt werden, diese wurden mit *A. rhizogenes* transformiert, welche ein  $P_{\text{rbcS-roIC}}$  Gen trugen. Dieses Gen bewirkte eine Chlorophylldefizienz in transformierten Zellen. Sie beobachteten, daß 6.5% der regenerierten Sprosse periclinale Transformationschimären waren. Desweiteren konnten sie beobachten, daß unter Selektionsdruck selbstbefruchtete, transformations-periclinalchimäre Pflanzen transgene Nachkommenschaften hervorbrachten. Dies führen sie darauf zurück, daß transgene Zellen des L3 (zweite Subepidermale Zellschicht) in die bei Tabak regenerative L2 Zellschicht einwandern können. Die L1 Zellschicht ist die Epidermis (meristematisch), L2-L3 sind Mesophyllzellen (Schmülling & Schell, 1993).

Mit der Analyse der *gus*-Expression in den Blüten in der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß Pflanze 14 (50 %) den geringsten Anteil *gus*-exprimierender Blüten aufweist. Auch die Pflanzen 8 (85%) und 13 (66%) zeigen nicht in 100 % der Blüten *gus*-Expression, sie lieferten aber transgene Nachkommen. Pflanze 14 brachte im Gegensatz zu den Pflanzen 8 und 13 keine transgenen Nachkommen hervor. Eine Korrelation der *gus*-Expression mit der transgenen Nachkommenschaft ist aber nicht daraus abzuleiten, da die *gus*-Expression der transgenen Pflanzen starken Schwankungen unterliegt. Bei den *gus*-exprimierenden Zellen in den Antheren handelt es sich offenbar um diploides Gewebe.

**Abb. 44: Geier T., (1989)**



In einer weiterführenden Arbeit transformierten Geier et al. (1996) *Kohleria* Internodalsegmente mit einem *gus*-Gen tragenden Vektor über *Agrobacterium tumefaciens*. Sie stellten dabei fest, daß die Basis von glandulären Trichomen in *Kohleria* ein hohes regeneratives Potential bei gleichzeitiger geringer Suszeptibilität gegenüber *Agrobacterium tumefaciens* besitzen. Die Basis der glandulären Trichome befindet sich wie auch die der Schließzellen in der ersten epidermalen Zellschicht. Geier et al. (1996) beschreiben eine effiziente Adventivsproßbildung an den Internodalsegmenten. Der Ursprungsort der Sproßbildung sind die Trichome, diese werden von Geier et al. (1996) als homogen transgen angesehen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß Schließzellen teilweise die einzigen *gus* exprimierenden Zellen in größeren Epidermisbereichen sind. Dieses Phänomen trat in unserer Arbeitsgruppe auch bei protoplastenbürtigen transgenen Erbsen auf und wurde von Petra Böhmer im Rahmen ihrer Dissertation beschrieben. Dies wurde als eine Expressionschimäre verstanden, da die Pflanze aus einem einzigen transgenen Protoplasten regeneriert wurde. Sektoriell exprimierten aber auch Epidermiszellen *gus*, was auf die Vermehrung ursprünglich einer transformierten Epidermiszelle hindeutet.

Geier et al. (1996) beschreiben weiterhin, daß sich an den Schnittflächen der Internodalsegmente nach drei Wochen Adventivsprosse bilden (2,5 mM IAA, 2,5 µM BAP). Da Kichererbsen ebenfalls Trichome besitzen, stützt diese Beobachtung Fontana's et al. (1993) Aussage über eine neoforme, wundinduzierte Sproßinduktion. Die Bildung von dominierenden Adventivsprossen neben präformierten Meristemen der Explantate während des ersten Selektionsschrittes gilt aber dennoch als sehr unwahrscheinlich aufgrund der Apikaldominanz, die von den existierenden Meristemen ausgeht..

## Diskussion

---

Da in der vorliegenden Arbeit die ausdifferenzierten Blätter und auch die Sproßkulturen während der Selektion eindeutig einen chimären Charakter aufweisen, ist auch in diesem Zusammenhang eher von einem einzelnen Transformationsereignis in einem präexistierenden Meristem auszugehen.

Eine Adventivsproßentwicklung würde also mit hoher Wahrscheinlichkeit erst in den Subkulturen der multiplen Sproßkulturen, bzw. den abgetrennten Sprossen, einsetzen. Dieser Prozeß wäre analog der Entstehung von Adventivwurzeln an transgenen Sprossen unter selektiven Bedingungen. MC Hughen & Jordan (1989) zeigen an über somatische Organogenese regeneriertem Flax (*Linum usitatissimum* L.), daß sie aus chimären Pflanzen über eine zweite Zellkulturphase, unter entsprechenden selektiven Bedingungen, stabil transgene Pflanzen regenerieren konnten. Dies war zuvor an den Chimären nicht möglich. Möglicherweise ist dieser Effekt auch in der vorliegenden Arbeit zum Tragen gekommen. Im Gegensatz zu Fontana et al. (1993) und Kar et al. (1996) wurde die Selektion in dieser Arbeit stringenter betrieben. Polisetty et al. (1997) beschreibt anhand histologischer Studien die Entstehung von „Protuberanzen“ an der Basis bereites elongierter Sprosse. Der Begriff Protuberanzen drückt vermutlich aus, daß hier die Epidermis aufbricht. Diese entstehen in der Epidermis und wachsen zu Sprossen aus. Es handelt sich dabei um Adventivsprosse, präexistierende Meristeme als Ursprung werden von Polisetty et al. (1997) histologisch ausgeschlossen. Murthy et al. (1996) sprechen bei einer 10 µM TDZ induzierten Sproßregeneration ebenfalls von Adventivsprossen. Die Entwicklung findet ohne Kallusphase innerhalb von 2-3 Wochen statt. Es handelt es sich hierbei um Regenerate aus der „hypocotyledonary notch“ Region. Unklar ist, was der Autor damit meint. Kichererbsen sind hypogäische Keimer, daß heißt, das Epikotyl streckt sich bei der Keimung. Entsprechend ist das Hypokotyl nur ein sehr schmaler Bereich von 1-2 mm zwischen Epikotyl und der Wurzel, in welchem sich das Vaskularsystem umorientiert. Flankiert wird es von den Konnektiva zu den Kotyledonen. Möglicherweise ist dieser Bereich als „Hypokotylkerbe“ gemeint. Chandra et al. (1993) können keine Sproßentwicklung an Hypokotylsegmenten induzieren, im Gegensatz zu Sproßspitzen und Cotyledonarnodien als Ausgangsgewebe.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten über die Expression des *gus*-Gens zeigen, daß auch die Nachkommenschaften keine homogene Expression aufweisen. Es handelt sich also bei den Nachkommenschaften um Expressionsschimären, da die Keimzellen der Mutterpflanzen transgen gewesen sein müssen. Lediglich Pflanze 14 war offenbar eine Chimäre, da sie in der T<sub>0</sub> *gus*-Expression zeigte, diese Eigenschaften aber nicht in die Folgegeneration übertragen wurden. Damit zeigt sich, daß das *gus*-Gen unter dem 35S Promotor nur bedingt tauglich ist, um Aussagen über den genetischen Zustand

---

der T<sub>0</sub> Pflanzen zu geben, da die an den T<sub>0</sub> Pflanzen gemachten Beobachtungen auch für die T<sub>1</sub> gelten.

Während der Zellkultur kann nicht zwischen den verschiedenen Chimärentypen unterschieden werden. In Anbetracht der Explantanzahl pro Transformation wird auch eine Adventivprossbildung nur schwer zu finden sein. Bei Pflanzen mit niedrigen Regenerationsraten sollte also das Gewicht auf eine effiziente Selektion gelegt werden. Ob der Ursprung der erhaltenen transgenen Pflanzen direkt im Primärexplantat liegt oder ob eine zweite Regeneration (Adventivprossbildung) während der folgenden Gewebekulturphasen stattfindet, ist nicht so sehr von Belang.

Verschiedene Faktoren wie der Ort der Integration im pflanzlichen Genom und Methylierungen der Gene oder ihrer Promotoren, sowie die Zahl der integrierten Genkopien und die Transkriptionsstärke der Promotoren, unter denen das Fremdgen transkribiert wird, bestimmen die Expression der Fremdgene (Matzke & Matzke, 1998). Die auch in dieser Arbeit verwendeten 35S Promotoren aus dem Cauliflower Mosaic Virus (*gus*- und *pat*-Gen des *pIBgus* Vektors) und der aus *Agrobacterium tumefaciens* stammende *nos*-Promotor (*bar*-Gen des *pHK vst* Vektors) können bei Mehrfachintegrationen im pflanzlichen Genom durch Methylierung transkriptional abgeschaltet werden (Matzke et al., 1989; Park et al., 1996). In dieser Arbeit konnte bis in die T<sub>2</sub> kein Abschalten der Fremdgene beobachtet werden, was demnach für die Integration nur einer Kopie der übertragenen T-DNA spricht. Da aber in der T-DNA des *pIB gus* Vektors zwei 35S Promotoren in unmittelbarer Nachbarschaft liegen, könnte dies möglicherweise die Ursache für die chimären Expressionsmuster in den Nachkommenschaften sein. In den T<sub>0</sub> Pflanzen gibt es sicher Überlagerungen der beschriebenen Möglichkeiten bezüglich sektorieller *gus*-Expression. Es kann sich sowohl um Expressionschimären als auch um echte Chimären handeln, ein Kombination beider Möglichkeiten ist dabei nicht auszuschließen. Chareonporwanwattana et al. (1999) zeigen das Abschalten einer transgenen Chitinase in Kombination mit einem *hpt*-Gen (Hygromycinresistenz) in Reis. Beide Gene standen unter der Kontrolle eines 35S Promotors. Zwei während dieser Untersuchungen von Chareonporwanwattana et al. (1999) detektierte endogene, induzierbare Chitinasen wurden nicht abgeschaltet. Ferner wurde von Chareonporwanwattana et al. (1999) herausgearbeitet, daß es sich bei dem Mechanismus, der zur Abschaltung führte, um einen transkriptionalen Mechanismus handelte.

In Erdnüssen führt die gleichzeitige Integration mehrerer Hüllproteingene des TSWV (Tomato Spotted Wilt Virus) bereits in der T<sub>0</sub> zu einem Abschalten des Gens, nur Einzelintegrationen führen zu einer Expression in den Primärexplantaten (Yang et al., 1998).

### **4.7 Ultraschallbehandlung (SAAT)**

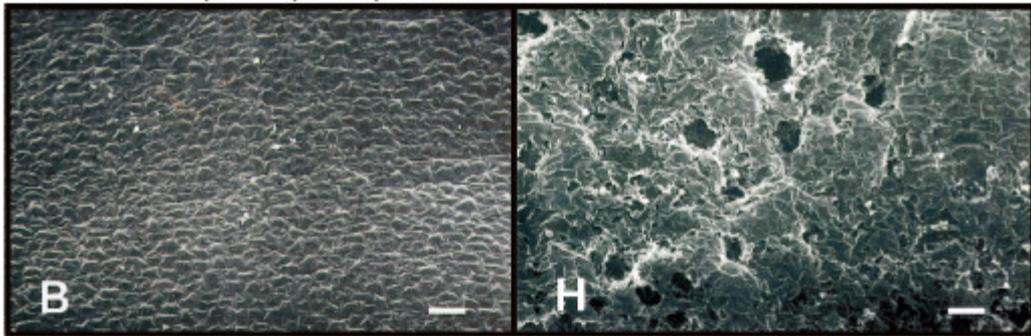
In allen drei Publikationen, die sich mit der SAAT-Methode befassen (Trick & Finer, 1997,1998; Meurer et al., 1998) wird derselbe Gerätetyp eines Wasserbad-Ultraschallgerätes eingesetzt, nämlich das Gerät PC5 von der Firma L&R Manufacturing Company. Dieses Gerät arbeitet mit einer Frequenz von 55kHz und besitzt zwei Schallköpfe. Bei diesem Gerät ist die Leistung nicht variabel. Finer und Meurer et al. (1998) haben die geleistete Beschallungsarbeit also nur über die Zeit variieren können. Weitere Leistungsmerkmale ließen sich nicht in Erfahrung bringen. Das Gerät der Firma Elma arbeitet mit 40 kHz und hat nur einen Schallkopf. Dies ist aber für die Homogenität des Schallfeldes irrelevant, da sich ohnehin nach wenigen Sekundenbruchteilen eine stehende Welle aufbaut und so ein ebenso homogenes Schallfeld entsteht wie dies bei zwei Schallköpfen der Fall ist ( Dr. Jung von Firma Elma, pers. Mitteilung).

Die Kernaussage der durchgeführten Experimente mit dem Wasserbad-Ultraschallgerät (T490) in der vorliegenden Arbeit liegt in dem Verhältnis der transienten zur stabilen Transformationsrate. Zunächst wurden die Parameter für eine optimale transiente Expression ermittelt. Es wird deutlich, daß die transiente Expression mit steigender Intensität und mit längerer Expositionszeit abnimmt. Dies ist vermutlich auf die Störungen im Proteinsyntheseapparat zurückzuführen. Lediglich die Versuche 2min/Stufe 2 und 4min/Stufe 2 liegen über der unbeschallten Kontrolle.

Es wäre zu prüfen, ob sich die transiente Expression bei einer Verringerung der Expositionszeit und/oder einer Beschallung auf Stufe 1 noch steigern ließe. Diese Versuche wurden nicht durchgeführt, weil sich im weiteren Verlauf der Experimente eine negative Korrelation von transienter zu stabiler Expression zeigte. Es wurde deutlich gemacht (Abb. 15), daß nach 28 Tagen auf nicht selektivem Medium die stabile *gus*-Expression an den Explantaten um den Faktor zwei über der unbeschallten Positivkontrolle liegen. Hinzu kommt, daß innerhalb der absoluten Prozentsätze *gus*-exprimierender Explantate das Verhältnis der Explantate mit >10-100 *gus* exprimierender Bereiche (Foki) zu denen mit < 10 deutlich zunimmt.

Wie bereits diskutiert, ist für die *Agrobakterien*-vermittelte Transformation eine Verwundung zumindest die Grundvoraussetzung für die Penetration des Pflanzengewebes und die Aktivierung der *vir* Gene in *Agrobacterium*. Einer der in der zeitlichen Abfolge ersten Effekte des Ultraschalls ist zweifelsfrei die Verwundung. So zeigten Trick & Finer (1997), daß die Ultraschallbehandlung eines Soja Kotyledos für 2 Sekunden ausreicht, um gegenüber einem nicht beschallten Kotyledo eine signifikant höhere Transformationseffizienz zu erzielen. Santarém et al. (1998) zeigten im Anschluß, daß eine Erhöhung der Expositionszeit auf 5 bzw 10 Sekunden keine Steigerung der transienten Expression mehr bringt.

**Abb. 45 Mikroverwundung an Ultraschallbehandeltem Soya (*Glycine max*)  
Kotelydo**



Trick & Finer, Plant Cell Reports (1998) 17:756

**B:** Ohne Ultraschallbehandlung; **H:** 10s, 50 kHz beschallt ( Balken = 10µm)

Bei der Beschallung dekapitierter Embryonen ist bereits eine Verwundung gesetzt. In einer Diplomarbeit (Spötter, 1999) konnte gezeigt werden, daß dennoch der Ultraschall einen additiven Effekt sowohl auf die transiente, als auch auf die stabile Expression hat. Die transiente Expression ließ sich durch eine 4-tägige Co-Kultur gegenüber einer 3-tägigen nochmals steigern. In dieser Arbeit konnte darüberhinaus gezeigt werden, daß auch das Resistenzniveau gegenüber 3 mg/l PPT durch eine Ultraschallbehandlung gesteigert werden konnte. Es ist damit belegt, daß die Transformationseffizienz bezogen auf das Gesamtexplantat erhöht werden konnte. Die gewählten Parameter der Ultraschallbehandlung wirken sich nicht nachteilig auf die Sproßregeneration aus. Meurer et al. (1998) sehen keine Steigerung der stabilen *gus*-Expression durch eine Ultraschallbehandlung der Kotyledonarnodi von Soja an den daraus entstehenden Regeneraten. Zur Optimierung der Methode beschallte man die Nodi für 6, 60 und 600 Sekunden. Bei einer Beschallungszeit von 600 Sekunden ist die *gus*-Expression 10 Tage später am höchsten, die Überlebensrate ist aber erheblich eingeschränkt. Die Gruppe entschied sich daraufhin für eine Beschallungszeit von 6 Sekunden mit der niedrigsten *gus*-Expression, aber der höchsten Vitalität der Explantate. Dies deckt sich nicht mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen einer negativen Korrelation der Expositionszeit zur Ultraschallarbeit. Möglicherweise sind die Leistungsunterschiede der Geräte zu groß, so daß andere Effekte zum Tragen kommen.

In der vorliegenden Arbeit wurden nur die Embryonen beschallt. Diese weisen nach 11 Tagen bei einer 30 sek. Beschallung eine deutlich höhere *gus*-Expression in der Epidermis auf als die nicht beschallte *Agrobacterium* transformierte Kontrolle (Abb 16). Beschallungszeiten von 60 und 120 Sekunden führen zu einer Abnahme der Expression.

Direkt vergleichen lassen sich die gewonnenen Daten aus Finers, Meurer et al. (1998) und dieser Arbeit nicht, weil hier mit unterschiedlichen Organen

## Diskussion

---

(Gewebe) unterschiedlicher Arten sowie unterschiedlichen Geräten gearbeitet wurde.

Die eigenen Arbeiten haben gezeigt, daß es sich bei der Optimierung der SAAT Methode für den jeweiligen Explantattyp und Spezies nur um eine empirische Annäherung handeln kann. Bis auf die technischen Parameter der Beschallung ist das gesamte System sehr inhomogen. Die Embryonen variieren allein in Größe und Anatomie beträchtlich. Die hohe Varianz, welche sich innerhalb der unterschiedlichen Beschallungsversuche ergab, ist ein Maß für die Inhomogenität.

Trick & Finer (1998) regenerieren transgene Sojabohnen aus embryogenen Kulturen. Bei einer Meßreihe der transienten *gus*-Expression in Abhängigkeit von der Expositionszeit (0 / 1 / 3 / 10 / 30 / 100 und 300 Sekunden) ist ein Anstieg der transienten Expression bis 30 Sekunden Beschallung angegeben. Danach fällt der Anteil *gus*-exprimierender Zellen an der Oberfläche wieder langsam ab. In der Publikation wird leider kein Bezug zur stabilen Expression hergestellt, wie dies in der vorliegenden Arbeit der Fall ist.

### **4.8 Erstellung von *pIBgus* transgenen Kichererbsen**

Es wurde gezeigt, daß eine Verwundung an den Lateralmeristemen mittels Skalpell die Sproßentwicklung nicht nachhaltig beeinträchtigt. Kar et al. (1997) stellen transgene Kichererbsen über ein „particle bombardement“ her. Das Protokoll zur Induktion multipler Sprosse an dekapitierten Embryonen ist dabei gleich geblieben. Beschossen werden dabei die durch die Dekapitierung freigelegten Lateralmeristeme. Auch dies ist ein zufälliger Prozess, der von dem Vorhandensein der Lateralsprosskosen in der Nähe der Schnittebene abhängt, andernfalls würden diese nur unzureichend von Partikeln getroffen werden. Durch den Partikelbeschuß werden in den Lateralmeristemen Verwundungen gesetzt, bevor die Partikel in einer Zelle gebremst werden. Da Kar et al. (1997) aber primäre transgene Pflanzen bekommen, kann die Verwundung nicht so massiv sein, daß die Sproßentwicklung inhibiert wird.

Bei dem Agrobakterien-vermittelten Gentransfer gibt es in der Schnittebene zwei Bereiche, die präferenziell *gus* transient exprimieren: Zum Einen ein kreisförmiger Bereich in der Schnittfläche und zweitens die lateralen Sproßprimordien in den Achseln der Tragblätter.

Die Regenerationsdaten zeigen, daß mit hoher Wahrscheinlichkeit die Entstehung multipler Sprosse von den existierenden Meristemen, also den Seitensproßmeristemen ausgeht. Diese Annahme steht im Einklang mit dem *gus*-Expressionsmuster der Sprosse aus der Gewebekultur (Abb 24), welches

---

nach der Theorie Geiers (1989) auf ein einziges Transformationsereignis im Sproßscheitelmeristem zurückzuführen ist.

Die in der Nähe der Schnittfläche befindliche Lateralsprossknospen sind in einer exponierten Position, da die Tragblätter den Lateralsproß nicht mehr umschließen. Zum einen kann eine spontane Transformation angenommen werden, möglicherweise wird aber auch mit dem Skallpell eine Verwundung an diesem Organ gesetzt. Eine hinreichende Verwundung der Lateralsproßknospen durch Ultraschall wird aber ebenfalls für wahrscheinlich gehalten. Ein weiterer Ultraschalleffekt ist die Stimulation der Proteinbiosynthese (Joersboe, 1990), was möglicherweise mit einem beschleunigtem Zellzyklus und eventuell auch mit einer höheren Integrationskompetenz für Fremd-DNA einhergeht.

Aus einem Beschallungsversuch (2 min, bei Stufe 5 und 40 kHz entsprechend 15 Ws) gingen acht zunächst 3mg/l PPT resistente Sprosse von insgesamt 150 Explantaten hervor. Dies entspricht einer Transformationsrate von 5,3 Prozent. Bis dahin wurden  $\approx$  2000 Explantate konventionell, das heißt ohne Ultraschall präpariert. Aus diesen Explantaten gab es keine Sproßklone, die unter selektiven Bedingungen proliferierten, stabile *gus*-Expression konnte aber auch an diesen Explantaten beobachtet werden.

Aus einem weiteren Transformationsexperiment bei dem die Beschallung für 4 min, bei Stufe 9 (44 Ws) durchgeführt wurde, konnte ein sproßproliferierender Klon aus 75 Explantaten auf 5 mg/l PPT Medium etabliert werden, dies entspricht einer Transformationsrate von 1,3 % (Spötter 1999). Hier muß allerdings angemerkt werden, daß versuchsbedingt unter für die Regeneration suboptimalen Bedingungen dekapitiert wurde. Bezogen auf diesen Versuch hat die Regenerationsrate nicht unter der Beschallung gelitten, sie lag im Mittel sogar über der Rate der nicht mit Agrobakterien inokulierten und unbeschallten Kontrolle. Dieser Klon war aber stark vitrifiziert und konnte bis zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Arbeit noch nicht weitervermehrt werden.

## **4.9 Analysetechniken**

### **4.9.1 Leaf paints-Assays zur schnellen Charakterisierung der mutmaßlich transgenen Pflanzen und deren Nachkommenschaft.**

Die durchgeführten Analysen und die detaillierten Beschreibungen der  $T_0$  Pflanzen dienen der Etablierung geeigneter Nachweisverfahren der über Agrobakterien transformierten Kichererbsen. Anders als bei den „genes of interest“ kann die Expression des Reportergens einfach, aber verbunden mit der irreversiblen Fixierung des Untersuchungsmaterials nachgewiesen werden.

Bis auf Pflanze 11 waren alle beschriebenen  $T_0$  Pflanzen *gus* positiv. Es gab bezüglich der Expression in den Blättern keine signifikanten Unterschiede zwischen den Pflanzen, die nicht auch innerhalb der Varianz der Stichproben von einer Pflanze liegen könnten. Die PCR Ergebnisse korrelieren mit den *gus*-Assay Ergebnissen mit Ausnahme von Pflanze 14. Pflanze 14 war im GUS-Assay immer positiv, ist aber in der *gus* PCR negativ. Die PCR als molekularer Nachweis für die Transgenität der transformierten  $T_0$  Pflanzen steht immer im Verdacht, falsch positive Ergebnisse zu liefern. Dies ist damit zu begründen, daß in den  $T_0$  Pflanzen noch immer Agrobakterien persistieren, welche den Transformationsvektor tragen, der dann die Matrize für die PCR liefern könnte. Trotz eines ausreichenden Antibiotikaeinsatzes über die gesamte Zeit der Gewebekultur sind die Bakterien vermutlich nicht vollständig zu eliminieren. Sobald eine Subkultur länger als vier Wochen dauert, ist die Gefahr eines massiven Durchwachsens der Agrobakterien sehr hoch. Derart lange Kulturphasen sind auch erst nach der dritten Subkultur und unter dem Einsatz eines  $\beta$ -Lactamase-Inhibitors möglich.

Matzk et al. (1996) konnten an transgenen Tabak  $T_0$  Pflanzen zeigen, daß die Agrobakterien in der Pflanze persistieren. In der Blüte und dem reifen Samen der Tabakpflanzen konnten aber keine Agrobakterien nachgewiesen werden.

Die konventionelle PCR ist nicht geeignet, zwischen dem im Bakterium auf dem binären Vektor befindlichen Gen und dem im Pflanzengenom integrierten Gen zu differenzieren. Daß die Pflanze 14 im GUS- und PAT-Assay positiv und in der PCR negativ war, ist nur so zu erklären, daß es sich hier um eine sektorielle Chimäre handelte. Die Tatsache, daß ein großer Teil der Pflanze 14 *gus* exprimiert, erklärt zumindest leichter, als dies bei Pflanze 11 der Fall ist, wie der Sproß die vor der Pfropfung durchgeführten Selektionsschritte bis hin zu 10 mg/l PPT überstehen konnte. Pflanze 11 ist auf ganzer Linie negativ. Offenbar ist der kompakte Sproßklon in der Lage, das PPT in einer Konzentration von 10 mg/l an der Basis vollständig zu detoxifizieren oder nicht zu transportieren. Da der Leaf Paint durchaus auch falsch negative Ergebnisse liefern kann, wurde dieses Ergebnis noch einmal durch einen PAT-Assay bestätigt.

### **4.10 $T_1$ Pflanzen**

Der endgültige Nachweis einer Transgenität ergibt sich aus der stabilen Weitergabe und Expression des Transgens in der Nachkommenschaft. Die Agrobakterien werden in Tabak mit sehr hoher Sicherheit nicht über den Samen in die nächste Generation übertragen (Matzk, 1998), dies wurde von der selben Arbeitsgruppe auch für Raps und Zuckerrüben bestätigt.

Erst die  $T_1$  Pflanzen konnten somit einen eindeutigen Nachweis der Transgenität und damit der Aussagekraft der an den  $T_0$  Pflanzen

---

durchgeführten Tests liefern. Da die T<sub>0</sub> Pflanzen nicht alle zur gleichen Zeit zur Samenreife kamen, konnte nur ein Teil der Nachkommenschaft analysiert werden, Pflanze 8, 13 und 14 lieferten ausreichend Samenmaterial um entsprechend aussagekräftige Ergebnisse zu bekommen. Die gesamte T<sub>1</sub> der Pflanze 14 ist im *gus*-Assay und im Leaf Paint mit 300mg/l (Mc Cabe et al., 1999) und 600 mg/l negativ, diese Aufwandmenge liegt weit über der, die sonst in der Literatur zum Testen von transgenen Pflanzen eingesetzt wird. Zwei der T<sub>1</sub> Pflanzen, 14.5 und 14.7 wurden im PAT-Assay und in der PCR überprüft. Diese beiden Pflanzen waren eindeutig negativ und die Ergebnisse korrelieren mit denen der *gus*-Assays und den Leaf Paints. Da auch die PCR an den Sammelproben der T<sub>2</sub> Pflanzen negativ war, ist sichergestellt, daß es sich bei Pflanze 14 (T<sub>0</sub>) eine Transformationschimäre handelte.

Die T<sub>1</sub> der Pflanzen 2, 3, 8 und 13, also 2.1, 3.1, 8.1, 13.1 und 13.7 stellten sich sowohl im *gus*-Assay als auch im Leaf Paint als positiv dar. Dies konnte im PAT-Assay und mittels *gus*-PCR bestätigt werden.

Damit konnte hinreichend bewiesen werden, daß die als Schnelltests anzusehenden PAT-Assays und die Leaf Paints gut geeignet sind, mit sehr hoher Sicherheit richtige Ergebnisse zu liefern. Ein ähnlicher Schnelltest mit erneut in Kultur genommen Blattexplantaten unter einem Selektionsdruck von 5 mg/l PPT wird von Wang & Waterhouse (1997) vorgestellt.

Aus den GUS-Assays und den Leaf Paints ergaben sich Spaltungsverhältnisse, die einem für die Integration eines Gens zu erwartenden Verhältnis von 3:1 entsprechen.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Korrelation von Leaf Paint und GUS-Assay. Wenn der Leaf Paint positiv ist, können zwar unterschiedliche Expressionsstärken des Reportergens beobachtet werden, es ist aber auszuschließen, daß bei einem aktiven *gus*-Gen der Leaf Paint negativ ist. Im Umkehrschluß zeigt der positive Leaf Paint mit hoher Sicherheit den transgenen Charakter der jeweiligen Pflanze an.

#### **4.11 Pfropfung**

Die aus der Gewebekultur stammenden Sprosse lassen sich auf zweierlei Weise für die Überführung in den Boden vorbereiten: Entweder der Sproß wird gepfropft oder er wird bewurzelt. Der Vorteil der Pfropfung liegt in einem schnelleren Wachstum. Der Vorteil der Bewurzelung in Selektionsmedium hingegen stellt weitestgehend den transgenen Charakter der Sprosse sicher. Pflanze 11 und 14 sind gepfropft worden. Pflanze 1.1 und 2.2 wurden bewurzelt. Wie in Abb. 23 zu sehen, exprimieren die in Selektionsmedium entwickelten Wurzeln *gus*. Auffallend ist dabei, daß hier das

## Diskussion

---

Wurzelspitzenmeristem das *gus*-Gen stark exprimiert. Dies ist ein Zeichen dafür, daß hier ein homogen transgenes Organ regeneriert wurde, da alle Zellen der Wurzel von diesem Meristem stammen.

Die Wurzel entspringt dem basalen Teil der regenerierten Sprosse, nachdem diese vom selektierten Sproßklon abgetrennt und in Wurzelinduktionsmedium überführt wurden. Es handelt sich hierbei um Adventivwurzeln. Da unter selektiven Bedingungen nur resistente Zellen proliferieren können, ist zu schließen, daß die Epidermis und mehrere subepidermale Schichten transgen sind, da die Wurzelentwicklung nur in einem intakten Gewebeverbund ablaufen kann. Dies ist theoretisch auch an einem chimären Sproß möglich. Solche chimären Sprosse erliegen aber dem folgenden, stärkeren Selektionsdruck (Grant et al., 1998). Phosphinothricin wird von den Zellen nicht symplastisch transportiert, ein auf die Applikationsstelle begrenzter Leaf Paint wäre sonst nicht möglich. Da durch die Bildung einer Wurzel ein stärkerer Wassertransportstrom zustande kommt, wird aber das Phosphinothricin über das Vaskularsystem zu allen Gewebeteilen transportiert. Dadurch werden das Phosphinothricin, so wie auch die Pflanzennährstoffe, systemisch in der Pflanze verteilt. Der Vorteil der Bewurzelung unter selektiven Bedingungen liegt darin, daß die Bildung einer Wurzel und das Überleben in Selektionsmedium nur einer solchen Pflanze möglich ist, die das Phosphinothricin detoxifizieren kann.

### **5 Ausblick**

Zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Arbeit befanden sich mit *pHK vst* transformierte Primärregenerate bereits auf 5 mg/l PPT supplementiertem Medium. Für molekulare Nachweise waren die Sprosse aber noch nicht groß genug, außerdem würde auch hier erst die T<sub>1</sub>-Generation von Bedeutung sein.

Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Transformationssystem sollen zunächst Pflanzen mit dem Stilbensynthasegen ausgestattet werden.

Anschließend sollen Expressionsstudien und Auswirkungen auf die Resistenzeigenschaften an diesen transgenen Pflanzen und ihrer Nachkommenschaft untersucht werden. Die in der Einleitung beschriebenen Wechselwirkungen zwischen Pathogen und Wirt gelten in ähnlicher Weise auch für symbiotische Bakterien wie Rhizobien. So zeigten Swelim et al. (1997) unterschiedliche Nodulationskompetenz von drei verschiedenen Rhizobienstämmen an verschiedenen Leguminosen, von denen einige gar nicht nodulierten. Singh & Rupela (1998) zeigen einen Genort in *C. arietinum* „kabuli“ welcher für die nicht-Nodulation verantwortlich ist. Stevenson et al. (1997) zeigt einen höheren Gehalt an Medicarpin und Maackiain in den Wurzeln *Fusarium* infizierter Kichererbsen. Inwieweit eine nicht-Nodulation mit dem Phytoalexingehalt der Wurzeln korreliert wäre zu prüfen, insbesondere welche Auswirkungen das durch die Stilbensynthase exprimierte Phytoalexin Resveratrol auf die Nodulation hat.

Die Ultraschallbehandlung hat einen starken positiven Effekt auf die Transformationseffizienz kompakter Gewebe, dieser läßt sich aber nicht in gleichem Maße für die direkte Organogenese nutzbar machen. Trick & Finer (1998) konnten aber transgene Sojabohnen (*Glycine max*) über eine SAAT Behandlung embryogener Suspensionskulturen regenerieren. Es wird daher für die Zukunft angestrebt, embryogene Kulturen auch an Kichererbsen zu entwickeln. Protokolle zur Regeneration sind in der Literatur vorhanden (Kumar et al., 1994; Suhasini et al., 1994; Sagare et al., 1995; Dineshkumar et al., 1995)—, um diese dann ebenfalls über die SAAT-Methode zu transformieren.

Die Möglichkeit eines Co-Transfer zweier T-DNAs aus einem Bakterium sollte weiter untersucht werden. Eine T-DNA sollte dabei nur mit einem selektierbaren Marker, die andere nur mit dem „gene of interest“ ausgestattet sein. Die Integration beider T-DNAs würde mit großer Wahrscheinlichkeit nicht in enger Nachbarschaft auf einem Chromosom erfolgen. Eine spätere Trennung der Transgene könnte also über konventionelle Züchtung und Selektion mittels molekularer Marker erfolgen. Es würden sich so möglicherweise markerfreie transgene Pflanzen herstellen lassen.

### **6 Literatur**

- Bangerth F. (1994)  
Response of cytokinin concentration in the xylem exudate of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) to decapitation and auxin treatment and relationship to apical dominance. *Planta* 194: 439-442
- Barna K.S., Wakhulu A.K. (1994)  
Whole plant regeneration of *Cicer arietinum* from callus cultures via organogenesis *Plant Cell. Rep.* 13: 510-513
- Bayer E. (1972)  
Stoffwechselprodukt von Mikroorganismen - PPT und Phosphinothricyl-Alanyl-Alanin. *Helv. Chim. Acta* 55: 224-239
- Becker D., Kemper E., Schell J., Masterson R. (1992)  
New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA. *Plant Mol. Biol.* 20: 1195-1197
- Birnboim H.C., Doly J. (1979)  
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid Research* 7: 1513-1523
- Böhmer P, Meyer B., Jacobsen H.J. (1995)  
Thidiazuron-induced high frequency of shoot induction and plant regeneration in protoplast derived pea callus. *Plant Cell Reports* 15: 26-29
- Böhmer P.; (1995)  
Entwicklung eines transformationskompetenten Regenerationssystems für Protoplasten der Erbse (*Pisum sativum*). Dissertation, Universität-Hannover,
- Brandt E.B., Hess D. (1994)  
In vitro regeneration and propagation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) from meristem tips and cotyledonary nodes.  
*In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 30P(1): 75-80
- Brogie K., Chet I., Holliday M., Cressmann R., Biddle Planta., Knowlton S., Mauvais C.J., Broglie R. (1991)  
Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254: 1194-1197
- Chandra R., Chatrath A., Polisetty R., Khetarpal S. (1993)  
Differentiation of *in vitro* grown explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.)  
*Indian J. Plant Physiol.* XXXVI, No 2: 121-124
- Chareonpornwattana S., Thara K.V., Wang L., Datta S.K., Panbangred W., Mutukrishnan S. (1999)  
Inheritance, expression, and silencing of a chitinase transgene in rice  
*Theor. Appl. Genet.* 98: 371-378
- Colin G.N., Turnbull M.A.A., Raymond I.C., Suzanne E.M.  
Rapid increase in cytokinin concentration in lateral buds of chickpea (*Cicer arietinum* L.) during release of apical dominance. *Planta* (1997) 202: 271-276

- 
- Covert S.F., Enkerli J., Miao V.P.W., Etten Van H.D. (1996)  
A gene for maackiain detoxification from dispensable chromosome of *Nectaria haematococca*. *Mol. Gen. Genet.*, 251: 397-406
- Cruickshank I.A.M., Perrin D.R. (1960)  
Isolation of a phytoalexin from *Pisum sativum* L. *Nature* 187:
- de Block M., De Sonville A., Debrouwer D.  
The selection mechanism of Phosphinothricin is influenced by the metabolic status of the tissue. *Planta* (1995) 197: 619-626
- de Block M., Bottermann J., Vandewiele M., Dockx J., Thoen C., Gossele V., Movva N.R., Thompson C., Van Montagu M., Leemans J.  
Engineering herbicide resistance in plants by expression of detoxifying enzyme *EMBO J.* (1987) 6: 2513-2518
- de Kathen A., Jacobsen H.J.  
Cell competence for *Agrobacterium* mediated DNA transfer in *Pisum sativum* L. *Transgenic Research* (1995) 4: 184-191
- de Kathen A., Wegelin T., Kiesecker H., Meyer B., Jacobsen H.J. (1998)  
Transgenic grain legumes from protoplasts !?  
3rd European Conference on Grain Legumes, 14-19 November 1998, Valladolid-Spain; P. 370-371
- Delzer B.W., Sommers D.A., Orf J.H. (1990)  
*Agrobacterium tumefaciens* susceptibility and plant regeneration of 10 soybean genotypes in maturity groups 00 to II  
*Crop. Sci.* 30: 320-322
- Depicker A., Herman L., Jacobs A., Schell J., Van Montagu M.  
Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNA's and their relevance to the *Agrobacterium* / plant cell interaction  
*Mol. Gen. Genet.* (1985) 201: 477-484
- Dey S.K; Singh G.  
Resistance to Ascochyta blight in chickpea-genetic basis  
*Euphytica* (1993) 68(1-2): 147-153
- Dineshkumar V., Kirti P.B., Sachan J.K.S., Chopra V.L.(1995)  
Picloram induced somatic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.)  
*Plant Science* 109: 207-213
- Doyle & Doyle, (1990)  
Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15
- Escudero J., Hohn B. (1997)  
Transfer and Integration of T-DNA without Cell Injury in the Host Plant  
*The Plant Cell.* 9: 2135-2142
- Fischer R., Budde I., Hain R., (1997)  
Stilbene synthase gene expression causes changes in flower colour and male sterility in tobacco. *The Plant Journal : for Cell & Molecular Biology.* 11 (3): 489-498.
- Fontana S.G., Santini L., Caretto S., Frugis G., Mariotti D. (1993)  
Genetic transformation in the grain legume *Cicer arietinum* L. (chickpea)  
*Plant Cell Rep.* 12: 194-198

## Literatur

---

- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. (1968)  
Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells  
Exp. Cell. Res. 50: 151-158
- Geier T. (1989)  
Mutationsauslösung in Gewebekulturen. Zur Entstehung der Kohlerien-Sorte „Orange Glow“. Gärtnerbörse Gartenwelt 50: 2437-2441
- Geier T., Rajbir S., Sangwan (1996)  
Histology and chimera segregation reveal cell-specific differences in the competence for shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Kohleria* internode explants. Plant Cell. Rep. 15: 386-390
- Geistlinger J., Weisinger K., Kaiser W.J., Kahl G.  
Allelic variation at a hypervariable compound microsatellite locus in the ascomycete *Ascochyta rabiei*. Mol. Gen. Genet. (1997) 256 (3): 298-305
- Gill R., Saxena P.K (1992)  
Direct somatic embryogenesis and regeneration of plants from seedling explants of peanut (*Arachis hypogaea*): promotive role of Thidiazuron.  
Can. J. Bot. 70: 1186-1192
- Hamill J.D., Prescott A., Martin C. (1987)  
Assessment of the efficiency of cotransformation of T-DNA of disarmed binary vectors derived from *Agrobacterium tumefaciens* and the T-DNA of *A. rhizogenes*. Plant Molecular Biology ): 573-584
- Hood E.E., Helmer G.L., Fraley R.T., Chilton M.D.  
The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA J. Bacteriology (1986) 168: 1291-1301
- Ichinose Y., Tiemann K., Schwenger-Erger C., Toyoda K., Hein F., Hanselle T., Barz W.  
Genes expressed in *Ascochyta rabiei*-inoculated-chickpea plants and elicited cell cultures as detected by differential cDNA-hybridization.  
Accession Nummer AB024989, <http://srs.ebi.ac.uk>
- Ingham J.L. (1976)  
3,5,4'-Trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnut (*Arachis hypogaea*)  
Phytochemistry 15: 1791-1793
- Islam R., Riazuddin S., Farooqui H. (1995)  
Clonal propagation from seedling nodes and shoot apices of chickpea (*Cicer arietinum* L.) Plant Tissue Cult. 5(1): 53-57
- Janssen B.-J., Gardener R.C.  
Localized transient expression of *gus* in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. Plant Molecular Biology (1989) 14: 61-72
- Joersboe M., Brunstedt J.  
Protein Synthesis stimulated in sonicated sugar beet cells and protoplasts; Ph.D. thesis of Morton Joersboe; Danisco A/S Biotechnology Research Division, Copenhagen, Danmark.
- Kahl G.; Kaemmer D., Weising W.; Kost S.; Weigand F.; Saxena M. C.O. (1994)  
The potential of gene technology and genome analysis for cool season food legume crops: Theory and practice. Euphytica 73(1-2): 177-189

- 
- Kar S., Basu D., Das S., Ramkrishnan N.A., Mukherjee P., Nayak P., Sen S.K. (1997)  
Expression of *cryIA (c)* gene of *Bacillus thuringiensis* in transgenic chickpea plants  
inhibits development of pod-borer (*Heliothis armigra*) larvae  
Transgenic Research 6: 177-185
- Kar S., Johnson T.M., Nayak P., Sen S.K. (1996)  
Efficient transgenic plant regeneration through *Agrobacterium*-mediated  
transformation of Chickpea (*Cicer arietinum* L.)  
Plant Cell Rep. 16: 32-37
- Kartha K.K., Pahl K., Leung N.L., Mroginski L.A. (1981)  
Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut,  
chickpea, and bean. Can. J. Bot. 59: 1671-1679
- Koncz C., Schell J. (1986)  
The promotor 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. 204: 383-396
- Kumar S., Singh O., Rhee van H.A. and Rao K.V.S. (1998)  
Repeatability of different stability parameters for grain yield in chickpea  
Plant Breeding 117: 143-146
- Kumar V.D., Kirti P.B., Sachan J.K.S., Chopra V.L. (1994)  
Plant regeneration via somatic embryogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant  
Cell Rep. 13: 468-472
- Langcake P., Pryce R.J. (1976)  
The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a  
response to infection or injury. Physiol. Plant Pathol. 9: 77-86
- Leckband G., 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: 1004-1012
- Malik K.A., Saxena P.K. (1992)  
Thidiazuran induces high frequency shoot regeneration in intact seedlings of pea  
(*Pisum sativum* L.), chickpea (*Cicer arietinum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). Aust.  
J. Plant Physiol 19: 731-740
- Matzk A. (1998)  
Persistenz von *Agrobacterium tumefaciens* in transgenen Pflanzen.  
Dissertation der Technischen Universität Carlo-Wilhelmina zu Braunschweig.  
Verlag Papierflieger, Clausthal-Zellerfeld: ISBN 3-89720-193-3
- Matzk A., Mantell S., Schiemann J. (1996)  
Localization of persisting *Agrobacteria* in transgenic tobacco plants.  
The American Phytopathological Society: Pub. no. M-1996-0424-01R
- Matzke M.A. and Matzke A.J.M. (1998)  
Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence  
responses. Cell. Mol. Life Sci. 54: 94-103
- Matzke M.A., Primig M., Trnovsky J. and Matzke A.J.M. (1989)  
Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed  
tobacco plants. Embo 8: 643-649

- Mc Cabe M.S., Schepers F., van der Arend A., Mohopatra U., de Laat A., M., Power J.B., Davey M.R. (1999)  
Increased stable inheritance of herbicide resistance in transgenic lettuce carrying a *petE* promoter-*bar* gene compared with CaMV 35S-*bar* gene  
Theor Appl Genet 99: 587-592
- Mc Hughen A., Jordan M.C. (1989)  
Recovery of transgenic plants from „escape“ shoots. Plant Cell Reports 13: 611-614
- Melchior F., Kindl H. (1990)  
Grapevine stilbene synthase c DNA only slightly differing from chalcone synthase cDNA is expressed in *Escherichia coli* into a catalytically active enzyme.  
FEBS Lett. 268(1): 17-20
- Meurer C.A., Dinkins R.D., Collins G.B. (1998)  
Factors affecting soybean cotyledonary node transformation  
Plant Cell Rep. 18: 180-186
- Mitchell TD, Bhagsari AS, Ozias-Akins, Dhir SK (1997)  
Transient gene expression in intact cells of sweet potato following electroporation. In Vitro Cell Dev Biol 33:317-318
- Morjane-H; Geistlinger-J; Harrabi-M; Weising-K; Kahl-G; (1994)  
Oligonucleotide fingerprinting detects genetic diversity among *Ascochyta rabiei* isolates from a single chickpea field in Tunisia. Current Genetics 26(3): 191-197
- Murashige T., Skoog F. (1962)  
A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue  
Physiol. Plant. 15: 473-497
- Murray M.G., Thompson W.F. (1980)  
Rapid isolation of high molecular weight plant DNA.  
Nucleic Acids Res. 8: 4321-4325
- Murthy B.N.S, Victor J., Singh R.P., Fletcher R.A., Saxena P.K. (1996)  
*In vitro* regeneration of chickpea (*Cicer arietinum* L.): Stimulation of direct organogenesis and somatic embryogenesis by thidiazuron  
Plant Growth Regulation 19: 233-240
- Nehera K.S., L.K. Chugh, S. Dhillon, R. Singh; (1994)  
Induction, Purification and Characterization of chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.) leaves and pods infected with *Ascochyta rabiei*  
J. Plant Physiol.. 144:7-11
- Nicolaisen M., Poulsen G. B. (1993)  
Optimization of polyethylene glycol mediated transient gene expression in pea protoplasts. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35: 93-97
- Pala M., Mazid A. (1992)  
On farm assessment of improved crop production practices in northwest Syria: Chickpea. Experimental Agriculture 28: 175-184
- Park Y.-D., Moscone E.A., Iglesias V.A., Vaucheret H., Matzke A.J.M. et al, (1996)  
Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. Plant J. 9: 183-194

- 
- Polisetty R., Paul V., Deveshwar J.J, Khetarpal Suresh K. Chandra R. (1997).  
Multiple shoot induction by benzyladenine and complete plant regeneration from seed explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.) Plant Cell Rep. 16 (8): 565-571
- Puonti-Kaerlas J., Ottoson A., Eriksson T. (1992)  
Survival and growth of pea protoplasts after transformation by electroporation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 30:141-148
- Reddy, M.V. and Siham, K. ; (1984b)  
Pathogen variability and race establishment in *Ascochyta rabiei* in Syria and Lebanon. Plant Disease Notes, Plant Disease 69:177
- Rheenen-H-A Van; Haware-M-P; (1994)  
Mode of inheritance of resistance to *Ascochyta* blight (*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.) in chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its consequences for resistance breeding. International Journal of Pest Management 40(2): 166-169
- Sachs L.; Angewandte Statistik, 7. Auflage, 1992
- Sagare A.P., Krishnamurthy K. V. ( 1991)  
Protoplast regeneration in chickpea, *Cicer arietinum* L. Indian journal of Experimental Biology 29: 930-932
- Sagare A.P., Suhasini K., Krishnamurthy K.V. (1995)  
Histology of somatic embryo intiation and development in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Science 109: 87-93
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989)  
Molecular Cloning: A Laboratory Manual., Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York
- Santarém E.R., Trick H.N., Essig J.S., Finer J.J. (1998)  
Sonication - assisted *Agrobacterium* - mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. Plant Cell Rep. 17: 752-759
- Schmülling T., Schell J. (1993)  
Transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks can be periclinal chimeras. Plant Mol. Biol. 21: 705-708
- Schroeder H.E., Schotz A.H., Wardley-Richardson T., Spencer D. and Higgins T.J.V.  
Transformation and regeneration of two cultivars of Pea (*Pisum sativum* L.). Plant Physiol (1993). 101: 751-757
- Singh K., Malhorta R., Saxena M. (1990)  
Sources of tolerance to cold in *Cicer* species. Crop Science, 30: 1136-1138
- Singh K., Malhorta R., Saxena M. (1995)  
Additional sources of tolerance to cold in cultivated and wild *Cicer* species Crop Science, 35: 1491-1497
- Singh K.B., B. Ocampo  
Exploitation of wild *Cicer* species for yield improvement in chickpea Theor. Appl. Genet. (1997) 95: 418-423
- Singh K.B., Reddy M.V.  
Improving chickpea yield by incorporating resistance to *Ascochyta* blight Theor. Appl. Genet (1996) 92:509-515

- Singh O., Rupela O.P. (1998)  
A new Gene that Controls Root Nodulation in Chickpea. *Crop Sci.* 38: 360-362
- Singh R., Pal M. (1993)  
Pathogenic variability in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. causing chickpea blight. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* 23(1): 51-57
- Sitte P., Ziegler H., Ehrendorfer F., Bresinsky (1991)  
Strasburger Lehrbuch der Botanik; Gustav Fischer Verlag, 33. Auflage
- Stachel S., Messens E., Van Montagu M., Zambryski P. (1985)  
Identification of signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318: 624-629
- Stark-Lorenzen P., Nelke B., Hänler G., Mühlbach H.P., Thomzik J.E. (1997)  
Transfer of a stilbene synthase gene to rice (*Oryza sativa*)  
*Plant Cell Rep* 16: 668-673
- Stevenson P.C., Turner H.C., Haware M.P. (1997)  
Phytoalexin accumulation in the roots of chickpea (*Cicer Arietinum* L.) seedlings associated with resistance to fusarium wilt.  
*Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50(3): 167-178
- Suhasini K., Sagare A.P., Krishnamurthy K.V. (1994)  
Direct somatic embryogenesis from mature embryo axes in chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Plant science* 102: 189-194
- Swelim D.M., Hashem F.M., Kuykendall L.D., Hegazi N.I., Abdel-Wahab S.M. (1997)  
Host specificity and phenotypic diversity of *Rhizobium* strains nodulating *Leucaena*, *Acacia* and *Sesbania* in Egypt. *Biol Fertil Soils* 25: 224-232
- Tegeder M., Gebhardt D., Schieder O., Pickardt T. (1995)  
Thidiazuron-induced plant regeneration from protoplasts of *Vicia faba* cv. Mythos.  
*Plant Cell Rep.* 15: 164-169
- Tegeder M., Kohn H., Nibbe M., Schieder O., Pickardt T. (1996)  
Plant regeneration from protoplasts of *Vicia narbonensis* via somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Cell Rep.* 16: 22-25
- Tenhaken R., Salmen H.C., Barz W. (1991)  
Purification and characterization of pterocarpan hydroxylases, a flavoprotein monooxygenase from the fungus *Ascochyta rabiei* involved in pterocarpan phytoalexin metabolism. *Arch Microbiol.* 155: 353-359
- Trick H. N., Finan J.J. (1997)  
SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium* - mediated transformation  
*Transgenic Research* 6: 329-336
- Trick H. N., Finan J.J. (1998)  
Sonication-assisted *Agrobacterium* - mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Rep.* 17: 482-488
- Udupa S.M., Robertson L.D., Weigand F., Baum M., Kahl G. (1999)  
Allelic variation at (TAA)<sub>n</sub> microsatellite loci in a world collection of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm. *Mol. Gen. Genet.* 261:354-363

- 
- Vancanneyt G., Schmidt R., O'Connor-Sanchez A., Willmitzer L., Rocha-Sosa M.  
Construction of an intron containing marker-gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium* - mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* (1990) 220: 245-250
- Villemont E., Dubois F., Sangwan R., Vasseur G., Bourgeois Y., Sangwan-Norreel S.  
Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium* - mediated genetic transformation of *Petunia*: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer.  
*Planta* (1997)201: 160-172
- Vogelsang R., W. Barz; (1992)  
Purification, characterization and differential hormonal regulation of a  $\beta$  1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.)  
*PLANTA* 189:60-69
- Wang M.-B., Waterhouse P.M (1997)  
A Rapid and simple method of assaying plants transformed with hygromycin or PPT resistance genes. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 209-215
- Wehrmann A., Van Vliet A., Opsomer C., Bottermann J., Schulz A. (1996)  
The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nat Biotechnol* 14(10): 1274-1278
- Weigand F., J. Köster, H.C. Weltzien, W. Barz; (1985)  
Accumulation of phytoalexins and isoflavone glucosides in a resistant and a susceptible cultivar of *Cicer arietinum* during infection with *Ascochyta rabiei*.  
*J. Phytopathology*, 115: 214-221
- Wirth R., Friesenegger A., Fiedler S. (1989)  
Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol. Gen. Genet.* 216: 175
- Yang H., Singsit C., Wang A., Gonsalves D., Ozias-Akins (1998)  
Transgenic peanut plants containing a nucleocapsid protein gene of tomato spotted wilt virus show divergent levels of gene expression. *Plant Cell Rep.* 17: 693-699
- Zupan J.R., Zambryski *Planta*. (1995)  
Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell  
*Plant Physiol.* 107: 1041-1047

## **Danksagung**

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Jacobsen vielmals für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die Unterstützung während dessen Bearbeitung. Seine freundliche Anleitung und kritische Diskussion waren für mich eine große Hilfe.

Herrn Dr. de Kathen danke ich besonders für die Anregungen in allen Bereichen der Transformationsarbeit. Der intensive Austausch von Informationen sowie die freundschaftliche Zusammenarbeit haben wesentlichen Anteil an dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Lehmann bedanke ich mich für die wertvolle Beratung in botanischen Fragen zur Pflanzenanatomie und Entwicklung.

Auch Herrn Prof. Dr. Klenert danke ich dafür, daß er die physikalischen Fragen bezüglich des Ultraschalls ausgiebig beantwortete.

Frau Beate Meyer bin ich zu großem Dank für die besonders gewissenhafte Durchführung der Routinearbeiten in der Gewebekultur und Analyse verpflichtet.

Frau Susan Friedmann danke ich vor allem für ihre Mithilfe bei den nicht immer ganz so spannenden Arbeiten im Gewächshaus.

Mein Dank geht auch an Herrn Dipl. Biol. Spötter, der im Rahmen seiner Diplomarbeit wichtige Daten für weitergehende Experimente erarbeitet hat.

Herrn Dr. Jung von der Firma Elma danke ich für die Beratung und die Leihgabe eines Wasserbad-Ultraschallgerätes der Firma Elma.

Herrn Michael Weichert herzlichen Dank für die Beratung in biostatistischen Fragen.

Last but not least danke ich allen Mitarbeitern des LG-Molekulargenetik für das angenehme Institutsklima, die Hilfsbereitschaft und den ständigen Austausch in allen praktischen Fragen.